

멜라노마 세포에서 가미소요산(加味逍遙散)의 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase mRNA 발현 억제 효과

주다혜[#], 이수연, 유단희, 이진영^{*}

호서대학교 한방화장품과학과

Inhibition Effect of Gamisoyo-san on MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase mRNA Expression in Melanoma Cells (B16F10).

Da-Hye Joo[#], Soo-Yeon Lee, Dan-Hee Yoo, Jin-Young Lee^{*}

Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Korea

ABSTRACT

Objectives : Gamisoyo-san complex prescription were made with Angelicae Gigantis Radix, Paeoniae Radix, Atractylodes rhizome white, Hoelen, Bupleuri Radix, Moutan Cortex Radicis, Gardeniae Fructus, Zingiberis Rhizoma Crudus, Menthae Herba. The purpose of this study was to research the whitening effect of the extract from Gamisoyo-san, which is one of the used herbal complex prescription.

Methods : This study investigated inhibitory effect of Gamisoyo-san in tyrosinase activity. Cell viability were performed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Then, Gamisoyo-san measured reversed-transcription-PCR for mRNA expression using B16F10 mouse melanoma cells.

Results : For whitening effects, the tyrosinase inhibition effect of extract was shown to 52.4% at 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. The cell viability on B16F10 melanoma cells of Gamisoyo-san extract showed higher than 75% at 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. In this study, an experiment was performed by setting the non-toxic concentration range of 50, 150, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a positive control. The microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), tyrosinase mRNA expression inhibitory by reverse transcription-PCR of Gamisoyo-san extract were decreased by 95.3%, 98.8%, 96.3% and 49.5% at 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ which the highest concentration.

Conclusions : All these findings could verify that whitening effects of Gamisoyo-san extract by tyrosinase inhibitory activity and mRNA expression. The Gamisoyo-san could be used as material for functional cosmetics, such as skin whitening products.

Key words : Gamisoyo-san, MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase

서론

최근 오존층이 급속한 산업화에 따라 파괴되고 있으며, 그 에 따라 자외선 조사량이 증가하게 되어 피부노화에 큰 영향을 미치게 되었다. 이러한 영향은 기능성 화장품의 발전을 가능하게 했으며, 그 중에서도 노화방지 및 미백효능 부분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{1,2)}. 자외선 조사에 의한 멜

라닌의 합성은 피부에 색소침착 및 피부 발암에 중요한 역할을 하며 멜라닌의 색소 침착으로 인해 기미, 주근깨, 노인성 검버섯과 같은 피부생리적인 문제를 일으키게 된다³⁾. MITF는 microphthalmia transcripyion factor로서 tyrosinase의 발현을 조절하며, MITF의 억제는 tyrosinase의 발현 억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다⁴⁾. Tyrosinase

*Corresponding author : Jin-Young Lee, Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University
· Tel : +82-41-540-9552 · FAX : +82-41-540-9538 · E-mail : jylee@hoseo.edu

#First author : Da-Hye Joo, Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University
· Tel : +82-41-540-9559 · FAX : +82-41-540-9538 · E-mail : dhj9283@naver.com

· Received : 13 October 2014 · Revised : 12 November 2014 · Accepted : 12 November 2014

는 tyrosine을 L-3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)로, DOPA를 DOPA quinone으로 산화시키는 효소이다. TRP-1은 dihydroxy indole carboxylic acid oxidase로서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 indol-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화시키는 효소 이면서 tyrosinase를 안정화시키고 tyrosinase의 활성을 조절하는 역할을 한다. TRP-2는 DOPA Chrome tautomerase로써 DOPA chrome을 DHICA로 변화시켜 멜라닌세포를 이루게하는 eumelanon과 pheomelanon을 형성하고 이들의 비율에 따라 피부, 머리카락, 눈동자의 색깔 등이 결정된다^{5,6}. 지금까지 미백 효과를 나타내는 화장품의 성분에는 코직산(kojic acid), 아스코르빅산(ascorbic acid), 토코페롤(tocopherol) 그리고 레티놀산(retinoic acid) 등이 있으나, 다양한 부작용 및 안정성 문제들이 나타남에 따라 사용제한이 되거나 금지되는 성분들이 증가되고 있다. 최근에는 피부에 합성물질보다 안정성이 높은 천연성분을 이용한 기능성 화장품 개발이 요구되고 있다⁷.

소요산은 송대 진사문의 태평혜민화제국방(太平惠民和劑局方)⁸에 최초로 수록된 처방약으로 가미소요산은 소요산(逍遙散)에 목단피와 치자를 가미한 처방으로, 간울혈허(肝鬱血虛)를 화열생혈(化熱生血)하는 소요산의 주치(主治)에 화울(火鬱)이 겸한 경우에 사용된다⁹. 가미소요산의 처방은 당귀(Angelicae Gigantis Radix, 當歸), 백작약(Paeoniae Radix, 白芍藥), 백출(Atractylodes rhizome white, 白朮), 백복령(Hoelen, 白茯苓), 시호(Bupleuri Radix, 柴胡), 목단피(Moutan Cortex Radicis, 牡丹皮), 치자(Gardeniae Fructus, 梔子), 감초(Glycyrrhizae Radix, 甘草), 생강(Zingiberis Rhizoma Crudus, 生薑), 박하(Menthae Herba, 薄荷)의 한약재로 구성되어 있다. 구성된 약재들의 효능을 보면 당귀는 혈액을 보충시켜주는 보혈효과가 있으며, 혈류 개선 효과가 있어 혈액 순환을 도와 노화방지, 주름개선 및 조직재생에 효과가 있는 것으로 나타났다¹⁰. 백작약은 선행 연구로부터 항균효과¹¹ 등이 알려져 있으며 대표적 성분으로는 paeoniflorin, paeonol, paeonin 등이 있으며 그 중 paeoniflorin은 인간의 피부 조직에서 자외선에 의한 DNA 파괴 및 얼굴 부위의 주름 방지에 효과가 있다는 보고가 있다¹². 백출은 중국의 전통의약으로서 항염증작용이 있으며¹³, 다양한 암세포에 대한 항암효과가 보고되고 있다¹⁴. 백복령은 항산화 능력이 뛰어나며¹⁵, 목단피의 주로 항염효과¹⁶에 대한 연구가 진행되고 있으며, 목단피의 MeOH추출물에서 tyrosinase 활성의 증진 억제하는 물질이 공존하고 있다는 선행연구가 있다¹⁷. 치자추출물은 피부미백효과¹⁸가 있다는 것이 보고되어 있고 생강의 매운맛 성분 중 6-gingerol은 소염, 살균효과 및 항산화 활성을 나타낸다는 연구도 있다¹⁹. 감초는 tyrosinase 억제제로 작용해 멜라닌 합성 억제하는 효과가 코직산과 아스코르빈산보다 우수한 것으로 보고되었다²⁰. 이와 같이 각각의 한약재들의 효능을 살펴보면 당귀, 백작약, 치자 추출물, 감초 등과 같이 피부 노화 및 미백의 효능을 가지는 한약재와 항염, 항산화 효능을 가지는 한약재들을 한방복합처방으로 만들었을 때 미백의 효과를 더욱 증진 할 수 있을 것으로 예상된다. 하지만 한의학 분야에서는 가미소요산(加味逍遙散, SYS)의 항산화²¹에 관한 연구가 이루어지고 있지만 가미소요산에 대한 미백 화장품 소재개발로는 아직 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 각각의 특성을 가진 한방복합처방인 가미소요산의 tyrosinase 저해활성 및 melanoma cells (B16F10)을 이용한 미백인자 MTF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현억제 효과를 확인하여 미백용 화장품 소재로서의 활용 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시료 추출

가미소요산(加味逍遙散)은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였으며, 구성약재는 Table 1과 같다. 당귀 6g, 백작약 6g, 백출 6g, 백복령 6g, 시호 6g, 목단피 4g, 치자 4g, 감초 3g, 생강 2g, 박하 2g 을 혼합하여 준비하고 가미소요산 100g에 증류수 2,000ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고 동결 건조한 후 냉동 보관(-84°C)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

Table 1. Prescription Contents of Gamisoyo-san

| Herbal Name (韓藥名) | Pharmaceutical Name (生藥名) | Weight (g) |
|-------------------|----------------------------|------------|
| 當歸 | Angelicae Gigantis Radix | 6 |
| 白芍藥 | Paeoniae Radix | 6 |
| 白朮 | Atractylodes rhizome white | 6 |
| 白茯苓 | Hoelen | 6 |
| 柴胡 | Bupleuri Radix | 6 |
| 牡丹皮 | Moutan Cortex Radicis | 4 |
| 梔子 | Gardeniae Fructus | 4 |
| 甘草 | Glycyrrhizae Radix | 3 |
| 生薑 | Zingiberis Rhizoma Crudus | 2 |
| 薄荷 | Menthae Herba | 2 |

2. 실험 시약 및 기기

1) 미백효과 측정에 사용된 시약

Tyrosinase mushroom, dimethyl sulfoxide (DMSO), L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다. Tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), tyrosinase-related protein-2 (TRP-2), GAPDH, primary antibody와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibody는 Santacruz (CA, U.S.A)에서 구입하였으며, microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 Abcam (U.S.A)에서 구입하였다.

2) 세포 독성 측정에 사용된 세포주 및 시약

세포 생존을 측정을 위해 마우스 흑색종인 B16F10 melanoma cells를 ATCC에서 구입하였고, 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetalbovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin는 Thermo Scientific Hyclone (U.S.A) 및 GibcoBRL Co. (GrandIsland, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

세포독성을 알아보기 위한 시약

3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다.

3) 실험에 사용된 기기

실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), centrifuge (Hanil Science IndustrialCo, Korea), freeze drier (ILShin BioBase Co, Korea), microscope (Olympus, Japan), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), vortex (Scientific Industries, INC, U.S.A), autoclave (JS Research Inc, Korea), ELISA reader (Tecan, Austria), PCR (C-100, Bio-Rad, U.S.A), ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)을 사용하였다.

3. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법²²⁾에 따라 측정하였다. 반응군은 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 µl에 10 mM L-DOPA (Sigma, U.S.A)를 녹인 기질액 40 µl 및 시료용액 40 µl의 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase (Sigma, U.S.A) 40 µl을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

4. 세포 배양

세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

5. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법²³⁾에 따라 측정하였다. 멜라노마 세포(B16F10)를 96 well plate에 1 × 10⁵ cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 24 시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

6. Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 세포를 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 sample을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상등액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각 well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 µl를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 13,200 rpm 에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 µl이 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거 한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC를 50 µl씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 µl와 멸균수 195 µl 를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 µl/ml) 1 µl, 추출한 RNA (2 µg)와 nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl₂, PCR necleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

7. Reverse transcription-polymerase chain reaction

미백인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), tyrosinase의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 2와 같다. PCR tube에 Go Flexi DNA polymerase, primer, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 94°C에서 30초, 55°C에서 45초, 72°C에서 45초(35 cycles), tyrosinase는 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C 45초(40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 45초(40 cycles)을 하였으며, PCR로 합성 시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

Table 2. Sequence of the Primers Used for RT-PCR

| Gene | Primer | Sequence (5'→3') |
|------------|------------|------------------------------------|
| MITF | Forward | AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG |
| | Reverse | TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT |
| TRP-1 | Forward | ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC |
| | Reverse | AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT |
| TRP-2 | Forward | GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC |
| | Reverse | AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC |
| Tyrosinase | Forward | GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG |
| | Reverse | GCC ATG ACC AGG ATG AC |
| GAPDH | sense | TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC |
| | anti-sense | CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC |

8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석 (analysis of variance ANOVA)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

결 과

1. Tyrosinase 저해활성 측정 결과

자외선이나 환경오염 등의 외부요인으로부터 기저층의 세포가 손상되는 것을 막기 위해 표피의 기저층에서 존재하는 melanocyto의 melanosome에서 멜라닌이 형성된다. 멜라닌은 피부, 눈동자, 머리카락의 색을 결정하는데 있어서 중요한 역할을 한다²⁴⁾. 가미소요산 복합처방의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과, 가미소요산 복합처방의 tyrosinase 저해활성은 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 52.4%의 저해활성을 나타내었으며, 이는 Hwang²⁵⁾ 등 홍화자, 형개, 향부자 에탄올 추출물 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 27%, 23%, 6%의 저해활성을 나타낸다는 결과와 Son²⁶⁾ 등 도화의 물, 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 40%, 32%의 저해율을 나타내었고, Kim²⁷⁾ 등 일반 더덕, 중속 더덕, 초고압 복합 처리 중속 더덕 추출물은 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 7.18%, 15.7%, 25.08%인 것으로 비교해 보았을 때 가미소요산의 tyrosinase 저해효과가 유의한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

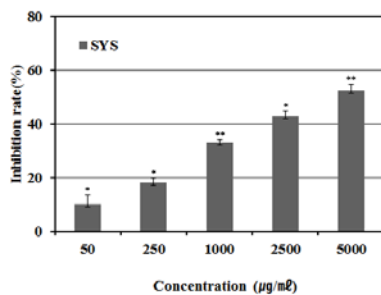


Fig. 1. Inhibition rate of Gamisoyo-san extract on tyrosinase. ■ SYS : Gamisoyo-san extracted with water Results are, means \pm S.D. of triplicate data. (Significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

2. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

흑색종의 일종인 B16F10 melanoma cells을 이용하여 세포 생존율을 MTT assay로 분석한 결과, 세포의 증식과 성장을 살아있는 세포 수에 비례하여 흡광도로 나타내게 되는데 가미소요산에 의한 멜라노마 세포의 생존율을 MTT assay에 의해 확인 한 결과 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 75% 이상의 세포 생존율을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 미백관련 신호전달인자의 측정은 80% 이상의 세포 생존율을 보이는 농도인 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하로 설정하여 실험을 실시하였다.

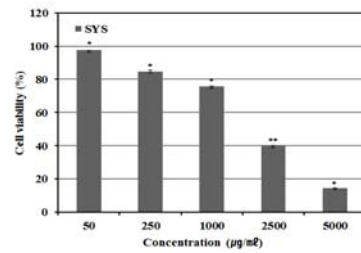


Fig. 2. Cell viability of extract from Gamisoyo-san on melanoma cells (B16F10).

■ SYS : Gamisoyo-san extracted with water. After B16F10 cells (1×10^5 cells) were started in medium for 24h the cells were treated with 50, 250, 1000, 2500, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extracted of Gamisoyo-san for 24h. Each value represents mean \pm SD of three individual experiments. (Significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

3. MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현억제효과 확인

본 연구에서는 가미소요산이 melanin 합성에 관계된 유전자들에게 미치는 영향을 확인하기 위해서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase가 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하였다. B16F10 melanoma cells에 50, 150, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 샘플을 농도별로 처리한 후 24시간 뒤에 PCR으로 mRNA 발현량을 측정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. 가미소요산은 50, 150, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 농도별로 처리한 B16F10군에서는 각 인자의 mRNA발현이 가미소요산을 처리하지 않은 군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, mRNA 발현이 비교군인 kojic acid보다 각각의 인자들 모두 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). Oh⁴⁾ 등 백강잠의 연구를 보면 TRP-1, MITF에서 대조군에 비해 유의성있게 억제하였으나 부분 농도에서만 활성을 나타낸 결과와 비교했을 때, 가미소요산은 피부 미백 소재로서 가능성이 있을 것으로 판단된다.

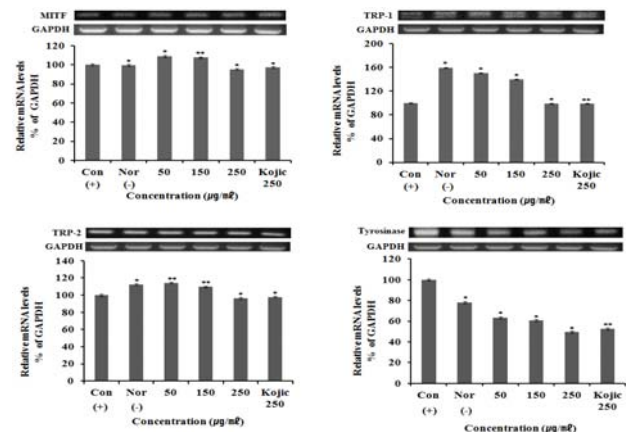


Fig. 3. MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA expression rate of extract from Gamisoyo-san on melanoma cells (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1h the cells were treated with 50, 150, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of extract of Gamisoyo-san for 24h. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments. (Significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

고찰

최근 외모가 하나의 경쟁력이 되면서 여성뿐만 아니라 남성들까지도 관심이 증가하고 있고 그 수요가 커짐에 따라 다양한 고기능성 화장품이 개발되고 있다. 또한 과잉 생성된 활성 산소종에 의한 피부 노화를 막기 위한 화장품 사업은 점점 자연 친화적이면서 천연물을 이용한 소재를 이용한 제품으로 변하고 있으며, 기능성 미백화장품, 주름개선 화장품에 대한 수요가 증가하고 있는 추세이다²⁸⁾. 자외선, 환경오염 등의 외적인 요인에 의해 발생하는 과색소 침착은 melanocyte에서 효소 및 비효소적 산화반응에 의해 tyrosinase로부터 형성되며 표피를 구성하고 있는 각질 형성 세포에 melanin이 전달되면서 피부 표피층에 축적이 이루어지면서 진행된다. melanocyte는 표피세포, 각질세포, 등과 밀접한 세포간 정보망을 구성하고 있다. 이에 따라 과잉 생성된 melanin은 인체에 피부노화, 피부암 유발에도 관여하게 되며 기미, 주근깨를 형성하는 것으로 알려져 있다^{29,30)}. 가미소요산의 tyrosinase 활성도를 측정한 결과 최고 농도에서 52.4%의 활성도를 나타내었고 구성약재 중 목단피, 감초, 치자의 tyrosinase 저해활성이 높은 것으로 보아 그 약재들의 영향이 큰 것으로 보인다.

MTT 분석은 탈수소 효소작용에 의해 담황색 기질인 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan을 생성시키며 미토콘드리아의 호흡연쇄에 의해 환원시키는 효소능력을 이용하여 죽은 세포에는 반응하지 않고 MTT formazan의 생성량을 측정하는 검사법으로 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 된다³¹⁾. B16F10 melanoma cells로 세포 생존율을 MTT assay로 측정한 결과 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 75% 이상의 높은 세포 생존율을 나타내어 미백관련 신호전달인자의 측정 실험을 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하에서 실시하였다.

Melanogenesis는 피부의 모낭 내부의 melanocyte에서 melanin이 생성되는 과정이며 대표적 관여효소는 tyrosinase이다. tyrosinase의 역할은 L-DOPA가 DOPA quinone으로 산화하는데 관여한다. DOPA quinone은 pheomelanin과 eumelanin을 생합성하게 되는 중요한 전구물질로 작용하며 eumelanin에서 갈색 혹은 흑색을 나타내는 eumelanogenesis는 DOPA quinone이 DOPA chrome으로 변환되고, DOPA chrome이 TRP-2 (DOPA chrome tautomerase)에 의해 5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid (DHICA)를 생성하게 된다. DHICA는 TRP-1 (DHICA oxidase)에 의해 생성되며 TRP-1은 DHICA를 oxidation 시켜 indole-2-carboxylic acid (IQCA)를 생성하게 되는데 이때 IQCA는 흑갈색을 나타낸다^{32,33)}. 적색 혹은 황색의 색소를 만드는 pheomelanogenesis는 cysteine, glutathione과 같은 황 함유 아미노산이 관여하는 경로이며 일반적으로 melanin이라고 하면 eumelanogenesis에 의해 생성된 eumelanin을 지칭하는 것이다. MITF는 microrphthalmia transcription factor로 tyrosinase 발현을 조절하는 역할을 한다³⁴⁾. 본 연구는 melanin 생성에 관여하는 유전자들의 영향을 평가하기 위해서 PCR을 이용하여 평가하였다. 멜라닌생성의 관련 유전자 중 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase를 사용하여 50, 150, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 진행하였을 때 최고농도에서는 각각 95.3%, 98.8%, 96.3%, 49.5%의 발현량을 나타내었고 각 인자들은 대조군인 kojic acid에 비하여 mRNA 단백질 발현이 더 감소한 것을 확인

할 수 있었다. 따라서 가미소요산은 미백개선 화장품 소재로 응용이 가능할 것으로 보이며, 차후 화장품 소재로 이용 시 제형에 따른 안정성 연구가 진행된다면 우수한 기능성 천연소재로서의 개발이 가능 할 것으로 보인다.

결론

최근 천연 한방소재를 이용한 한방화장품 개발이 증가하고 있는 실정이며, 본 연구에서는 가미소요산 대해 연구하여 미백화장품 기능성 소재로서의 가능성을 검토하였다.

1. Tyrosinase 저해활성 측정 결과 가미소요산이 최고농도에서 52.4%의 저해활성을 나타내었으며, 이는 가미소요산의 구성약재들 중 서론에서 거론된 감초, 치자, 목단피 추출물의 효능을 토대로 그에 따른 영향이 있었을 것으로 사료된다.
2. MTT assay 를 통한 세포 독성을 확인해 보았을 때 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 75%의 높은 세포생존율을 확인 하여 본 연구에서는 독성이 없는 농도 구간인 50, 150, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 설정하여 실험을 진행하였다.
3. B16F10 세포를 이용해 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 각각의 효소들이 대조군인 kojic acid에 비해 mRNA 발현을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 in vitro 생리활성 검증 결과 가미소요산 복합처방이 그 구성약재 중 몇몇 약재에 대한 영향력이 있었을 것으로 판단되며, tyrosinase 저해활성 및 melanoma cells (B16F10)를 이용한 미백 활성 측정에서도 유의한 결과를 보여 가능성이 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

References

1. Yoo YG, Joung MS, Choi JW, Kim JH. The study on the whitening effect of *Ephedra sinica* extract. J Soc Cosmet Sci Korea. 2005 ; 31(2) : 153-9.
2. Yaar M, Gilchrist BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. Br J Dermatol. 2007 ; 157(5) : 874-87.
3. Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. Pigment Cell Res. 2006 ; 19(6) : 550-71.
4. Oh HC, Lim KS, Hwang CH, Youn IH, Kim NK. A study on the melanin synthesis inhibition and whitening

- effect of *Bombysis corpus*. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2007 ; 20(3) : 1-13.
5. Imokawa G, Mishima Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. Cancer Res. 1982 ; 42(5) : 1994-2002.
 6. Manga PI, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R, Boissy RE. A role for tyrosinase-related protein 1 in 4-tert-butylphenol-induced toxicity in melanocytes: Implications for vitiligo. Am J Pathol. 2006 ; 169(5) : 1652-62.
 7. Smit N, Vicanova J, Pavel S. The hunt for natural skin whitening agents. Int J Mol Sci. 2009 ; 10(12) : 5326-49.
 8. Jin SM. Taepyunghyeminhwajekukbang. China: Inminweeseng Publications. 1985 : 308.
 9. Kim JH, Yoo DY. A philological study on Danchisoyo-san. J Daejon University Orient Med. 1999 ; 7 : 531-51.
 10. Kim CH, Kwon MC, Han JG, NA CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY, Lee HY. Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. Korean J Medicinal Crop Sci. 2008 ; 16(4) : 255-60.
 11. Choi HY. Antimicrobial activity of paeonia japonica extract and its quality characteristic effects in Sulgidduk. Korean J Food cookery SCI. 2009 ; 25(4) : 435-44.
 12. Lee S, Lim JM, Jin MH, Park HK, Lee EJ, Kang S, Kim YS, Cho WG. Partially purified paeoniflorin exerts protective effects on UV-induced DNA damage and reduces facial wrinkles in human skin. J Cosmet Sci. 2006 ; 57(1) : 57-64.
 13. Li CQ, He LC, Dong HY, Jin JQ. Screening for the anti-inflammatory activity of fractions and compounds from *Atractylodes macrocephala* koidz. J Ethnopharmacol. 2007 ; 114(2) : 212-7.
 14. Lee SO, Seo JH, Lee JW, Yoo MY, Kwon JW, Choi SU, Kang JS, Kwon DY, Kim YK, Kim YS, Ryu SY. Inhibitory effects of the rhizome extract of *Atractylodes japonica* on the proliferation of human tumor cell lines. Kor J Pharmacogn. 2005 ; 36(3) : 201-4.
 15. Ke RD, Lin SF, Chen Y, Ji CR, Shu QG. Analysis of chemical composition of polysaccharides from *Poria cocos* Wolf and its anti-tumor activity by NMR spectroscopy. Carbohydrate Polymers. 2010 ; 80(1) : 31-4.
 16. Rho YD, Sim YS, Song HJ, Shin MK. Studies on the mechanism of the anti-inflammatory effect of the Mudanpli(*Cortex Moutan Radicis*). Kor J Herbology. 2004 ; 19(3) : 13-24.
 17. Lee SH, Park JS, Kim SY, Kim JJ, Chung SR. Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*. Yakhak Hoeji. 1998 ; 42(4) : 353-8.
 18. Kwak JH, Kim YH, Chang HR, Park CW, Han YH. Inhibitory effect of gardenia fruit extracts on tyrosinase activity and melanogenesis. Korean J Biotechnol Bioeng. 2004 ; 19(6) : 437-40.
 19. Lee IK, Ahn SY. The antioxidant activity of gingerol. Korean J Food Sci Technol. 1985 ; 17(2) : 55-9.
 20. Kang SY. Inhibitory effect of *Erigeron annuus* (L.) Pers extracts on tyrosinase activity. The Graduate School of Small Business, Soongsil University. 2008.
 21. Sim TK, Jung IC, Lee SR. The effect of *Gamisoyo-san*(*Jiaweixiaoyaosan*) on serotonin metabolism. J Orient Neuropsychiatry. 2011 ; 22(1) : 37-51.
 22. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica. 1986 ; 39(8) : 517-9.
 23. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. Cancer Res. 1987 ; 47(4) : 943-6.
 24. Yu JS, Kim AK. Effect of combination of taurine and azelaic acid on antimelanogenesis in murine melanoma cells. J Biomed Sci. 2010 ; 17 Suppl 1 : S45.
 25. Hwang EY, Kim DH, Hwang JY, Kim HJ, Park TS, Lee IS, Son JH. A study on the depigmenting effect of *Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus* and *Schizonepeta tenuifolia* extracts. Korean J Food Sci Technol. 2012 ; 44(1) : 76-81.
 26. Son HU, Lee SH, Kim MA, Park HJ, Lee SH. Comparison of melanogenesis-inhibiting activity by extracts of *Prunus persica* flower and calyx. Korean J Food Preser. 2012 ; 19(6) : 946-50.
 27. Kim JS, Kim JW, Kwon HS, Lim HW, Lee HY. Screening of skin whitening activity of *Codonopsis lanceolata* extract by complex steaming process. Korean J Medicinal Crop Sci. 2013 ; 21(1) : 54-60.
 28. You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW, Choe M. Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Paeonia suffruticosa* water extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009 ; 38(3) : 292-6.
 29. Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Biochim Biophys Acta. 1995 ; 1247(1) : 1-11.
 30. Jin Y, Ahn SY, Hong ES, Li GH, Kim EK, Row KH. Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. J Korean Ind Eng Chem. 2005 ; 16(3) : 348-53.

31. Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'--1--(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal Biochem.* 1997 ; 251(2) : 206-9.
32. Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J.* 1992 ; 11(2) : 519-26.
33. Jimbow K, Chen H, Park JS, Thomas PD. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *Br J Dermatol.* 2001 ; 144(1) : 55-65.
34. Sakuma K, Ogawa M, Sugibayashi K, Yamada K, Yamamoto K. Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives. *Arch Pharm Res.* 1999 ; 22(4) : 335-9.