

원저

紫何車 藥針液이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향

서형식*

상지대학교 한의과대학 안이비인후과학교실

The effects of Hominis Placenta extract on Melanin synthesis of B16 melanoma cells

Hyung-Sik Seo

Dept. of Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean Medicine, Sangji University

Abstract

Objective : This research was carried out for the development of medicine for vitiligo treatment and focused on the effect of Hominis Placenta extract on Melanin synthesis of B16 melanoma cells.

Methods : Acitivity of tyrosinase playing a vital role in synthesis of Melanin and the quantity of Melanin, which is the final product in cultured B16 melanoma cells, effects of Hominis Placenta extract were measured.

Results : The results indicated that Hominis Placenta extract increased both the amount of Melanin and the activity of tyrosinase according to the concentration, and they also supported by western blot analysis.

Conclusion : The results suggests that Hominis Placenta extract has an advantageous effect on the promotion of Melanin synthesis and will contribute to the development of vitiligo treatment through further related studies.

Key words : Hominis Placenta, melanogenesis, tyrosinase, vitiligo.

1. 서론

백반증은 피부에 있는 멜라닌 세포의 결핍으로 인해 여러 가지 크기 및 형태의 백색 반점들이 피부에 나타나는 후천성 탈색소 질환¹⁾으로 전 세계적으로 인구의 약 1%에서 나타나며 면역설, 신경체액설, 멜라닌 세포자가 파괴설, 유전적 소인²⁾이 관여하는 것으로 알려져 있다.

멜라닌 색소는 아미노산인 tyrosine에서 합성된

tyrosine melanin으로 tyrosinase에 의하여 도파와 도파퀴논에 산화되며, 이 도파퀴논에서 인돌-5, 6-디히드로퀴논을 거쳐서 인돌-5, 6-퀴논이 생성되어 이것이 중합된 물질이며³⁾, tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에 효소로서 중요한 역할을 한다.

백반증은 한의학의 白癜風, 白駁風에 해당하고, 肝氣鬱結, 瘀血, 肝腎不足 등의 원인으로 氣血이 失和하여 肌膚를 고르게 濡潤하지 못하여 발병하는 것으로 보고 있으며⁴⁾, 유효한 치료에 대한 보고가 부족한 상황이다.

백반증 또는 멜라닌에 대한 최근의 연구경향으로는 지 등⁵⁾, 강 등⁶⁾, 이⁷⁾의 백반증에 대한 문헌적 고찰과, 박 등⁸⁾, 임 등⁹⁾, 박 등¹⁰⁾의 멜라닌 형성의 억제, 즉 미백효과에 관한 실험적 고찰, 양 등¹¹⁾의 멜라닌 생성에 관한 연

* 교신저자 : 서형식,
상지대학교 한의과대학 안이비인후과학교실
(Tel : 019-470-2985 E-mail : aran99@sangji.ac.kr)

* 이 논문은 2004년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.

구로 멜라닌의 합성에 관한 연구는 미진한 실정이다.

紫何車는 補氣, 養血, 益精의 효능으로 體質虛弱, 腎虛精虧, 氣血不足을 치료하는 약¹³⁾으로 유 등¹⁴⁾의 자하거약침이 당뇨유발 흰쥐의 신장보호기능에 미치는 영향, 육 등¹⁵⁾의 자하거약침이 체표온도변화에 미치는 영향, 서 등¹⁵⁾의 자하거 약침액이 과산화수소로 유발된 송과선 세포의 Apoptosis에 대한 보호 효과, 육 등¹⁶⁾의 홍화자·녹용·자하거 약침이 골다공증에 미치는 영향 등에 대한 보고가 있으며, 멜라닌 합성에 관한 보고는 없었다.

이에 저자는 紫何車 藥針液이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 형성과정에 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였으며 western blot을 통해 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 시료조제

본 실험에 사용한 紫何車 藥針液은 대한약침학회에서 공급받아 실험에 사용하였다.

2) B16 melanoma 세포주 배양

B16 melanoma 세포주를 한국 세포주 은행에서 구입하여 RPMI-1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD)에 5 % FBS(fetal bovine serum; Hyclones Co.)와 Fungizone를 첨가하여 37°C, 5 % CO₂에서 배양하였다.

2. 방법

1) 세포독성 측정

紫何車 藥針液의 세포독성은 crystal violet을 이용하여 측정하였다. 세포생존율을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2×10⁵ cells를 넣어 배양한 후 紫何車 藥針液을 농도별로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 세척한 후 0.5 % crystal violet(in 20 % methanol)을

300 μl/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 lysis buffer(10 mM Tris · HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1 % SDS) 100 μl를 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570 nm(reference 450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

2) Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도 측정은 Martinez-Esparza 등¹⁷⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 두 번 세척한 후 원심분리하여 세포를 수확한 다음 100 μl의 Buffer(1 % Triton X-100, 10 mM Sodium phosphate, 0.1 mM PMSF)를 넣어 얼음에 방치하였다. 원심분리 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 반응은 100 mM Sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 μl에 효소용액 50 μl를 가하여 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 100 mM catechol 50 μl를 넣은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

3) 멜라닌의 정량 측정

세포내 멜라닌 양 측정은 Hosoi 등¹⁸⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 세척한 후 원심분리하여 세포를 수확한 다음 10 % DMSO(dimethyl sulfoxide)가 첨가된 1N NaOH를 200 μl를 첨가하고 80 °C에서 1시간 용해하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양 변화는 대조군을 100으로 하고 처리군의 상대적인 양을 백분율로 계산하였다.

4) Western bott 분석

(1) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10⁷의 세포당 1 % SDS 100 μl로 현탁시켜 얼음 위에서 한 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 그런 다음 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

(2) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 BCA(bicinchoninic acid, Sigma, U.S.A.) 용액을 이용하여 BSA(bovine serum albumin, Sigma, U.S.A.)를 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well

plate에 BSA(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에 BCA 용액 100 μl 를 첨가하여 20분간 37°C에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 μl 와 BCA 용액 100 μl 을 섞은 뒤 20분간 37°C에서 방치한 후 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

(3) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100 μg 를 12 % SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 상온에서 5 % milk를 함유한 PBS-Tween(0.01 %)에서 1시간동안 hybridization하였다. 이 membrane을 tyrosinase(Santa Cruz, U.S.A.) 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하고, membrane을 horseradish peroxidase으로 conjugated된 antimouse IgG 또는 antirabbit IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네번 세척한 후 chemiluminescence 시약(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Fuji X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

5) 통계분석을 통한 유의성 검정

본 연구의 통계학적 분석은 spss(ver 10.0)를 이용하여 one way ANOVA test로 검증하였고, 유의성은 $p < 0.05$ 수준일 때를 기준으로 하였다.

III. 실험결과

1. 세포생존률에 미치는 영향

紫何車 藥針液이 B16 melanoma 세포의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 crystal violet을 이용하여 측정하였다. 紫何車 藥針液을 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 처리한 결과, 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100 %, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 80 %, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 74 %, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 67 %, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 54 %로 세포 생존률이 농도별로 유의성 있게 감소하였으며 ($p < 0.001$)(Fig.1), 현미경 소견에서도 세포수가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수가 있었다(Fig.2).

2. Tyrosinase 활성도에 미치는 영향

紫何車 藥針液이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16 melanoma 세포에 紫何車 藥針液을 농도별로 처리한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Tyrosinase 활성은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 114 %, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 128 %, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 131 %, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 120 %로 나타나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 증가하다 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소하였으나 전농도에서 유의성을 보였다($p < 0.001$)(Fig. 3).

3. 멜라닌 합성에 미치는 영향

紫何車 藥針液이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. 紫何車 藥針液을 각각 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의

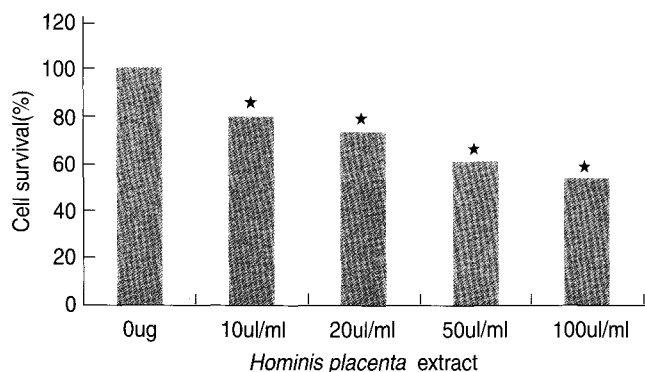
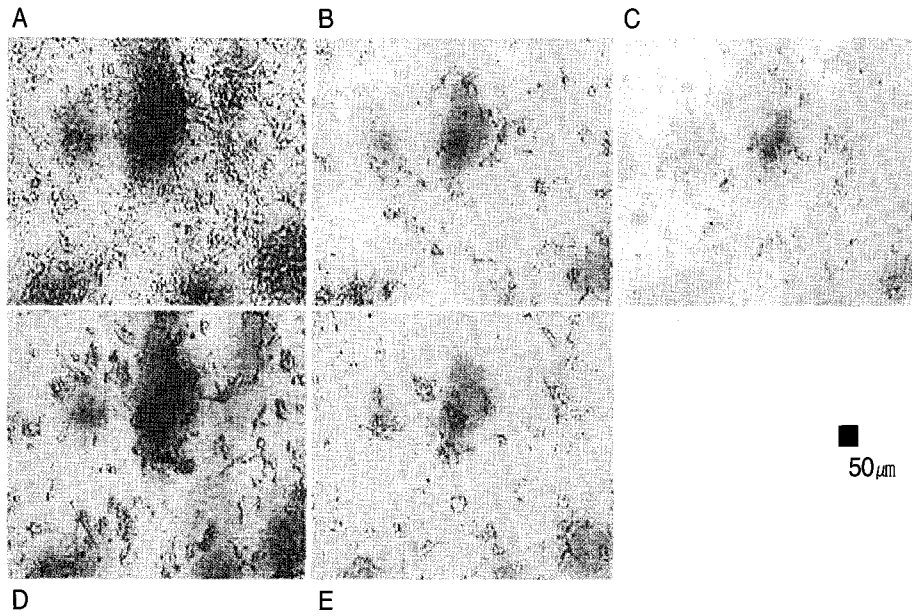


Fig. 1 The survival of B16 melanoma Cells treated with Hominis Placenta extract. All groups treated with Hominis Placenta extract showed significant decreased(* $p < 0.001$).



A: 0 mg/ml, B: 10 mg/ml, C: 20 mg/ml, D: 50 mg/ml, E: 100 mg/ml

Fig. 2 The microscopic images of B16 melanoma cells.

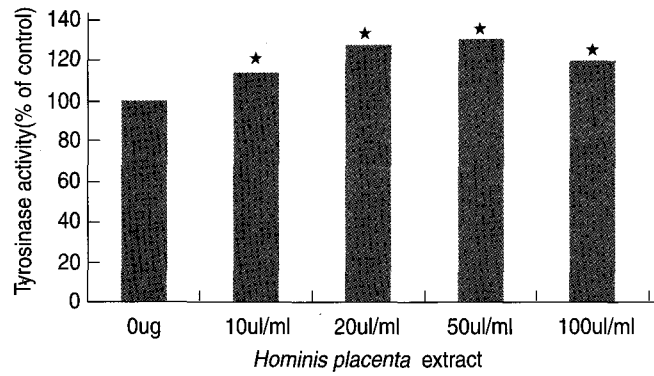


Fig. 3 The tyrosinase activity of B16 melanoma cells treated with Hominis Placenta extract. All groups treated with Hominis Placenta extract showed significant increased(* $p < 0.001$).

다양한 농도로 처리한 결과 멜라닌 생성은 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 102%, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 102%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 103%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 101%로 나타나 50 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 증가하다 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

4. Western blot

단백질에 대한 항체를 사용하여 항원-항체 반응을 일

으킴으로써 특정 단백질의 존재여부를 밝혀내는 western blot을 실시한 결과 紫何車 藥針液을 0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였을 때, actin의 양은 변화가 없었으나 tyrosinase의 양은 증가하였다(Fig. 5). 이는 紫何車 藥針液이 B16 melanoma 세포의 tyrosinase의 활성화도 결과와 일치한다.

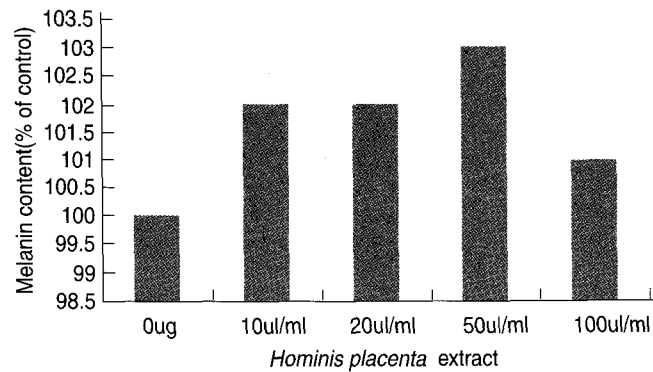


Fig. 4 The melanin content of B16 melanoma cells treated with Hominis Placenta extract. All groups are not showed significant changes.

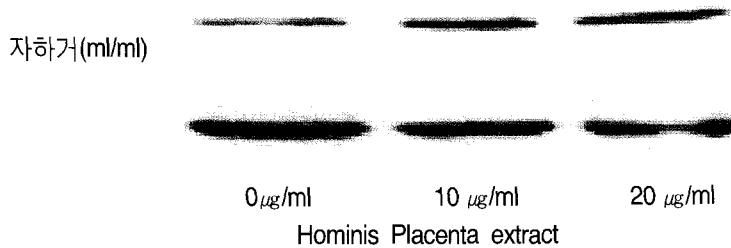


Fig. 5 Western blot analysis.

IV. 고 찰

백반증은 멜라닌세포가 파괴되어 정상적인 피부색의 소실을 가져오는 탈색소성 질환으로 생명단축과 신체 기능에 악영향을 주지는 않으나 사회생활의 어려움과 정신적 스트레스를 유발하여 때로는 정서적 갈등을 동반할 수 있는 질환이다. 그동안 백반증의 발병기전에 관한 많은 연구가 있었으며 치료에 대해서도 많은 연구가 있었지만 아직 정확한 발생기전이나 치료방법은 미흡한 실정이다.

멜라닌의 생성은 전구물질인 tyrosine에서 dopa로 산화되고 다시 dopaquinone으로 변화된 후, 전자 재배열을 통하여 indole이 되며 indole은 적어도 2개 이상의 효소에 의해서 산화되고 중합되어 멜라닌을 형성하며¹⁹⁾, 이 과정에서 tyrosinase는 각 단계에서 촉매작용을 한다고 알려져 있다. 이러한 과정이 정상적이지 못할 경우 멜라닌 세포가 파괴되어 백반증이 유발된다고 하며, 유발병인으로는 멜라닌 세포에 대한 자가 항체로 인해

발생한다는 면역설, 신경 손상이나 스트레스 후에 발생하고 에피네프린과 노에피네프린이 타이로신-타이로신 효소의 반응을 억제하여 멜라닌 세포를 파괴한다는 신경 체액설, 멜라닌 형성 과정 중에 생기는 페놀복합체와 같은 중간 물질이나 대사 물질들에 대한 자체 방어력이 떨어져서 발생한다는 멜라닌 세포 자가 파괴설, 가족력에 의해 발생한다는 유전적 소인²⁰⁾ 등이 관여하는 것으로 소개되고 있다.

백반증의 치료는 국소 또는 전신의 자외선 치료, 표피이식 치료를 할 수 있으나, 자외선 치료법은 간혹 심각한 화상의 부작용이 있으며, 표피이식은 이식 치료 후 재발, 켈로이드 생성, 새로운 백반증 생성 등의 부작용을 형성하기도 한다. 또한 치료 기간이 1년 6개월 내지 2년 정도로 길기 때문에 환자 본인이 질병을 고치고자 하는 꾸준한 의지와 노력이 절대적으로 필요하다²¹⁾고 알려져 있다.

백반증은 한의학에서 白癜風, 白駮風, 斑駁, 白癩, 白蠟 등으로 불리우며^{5,7,20)}, 隨代 巢元方의 《諸病源候論》²¹⁾

에 “白癩者 面及頸項身體皮肉色變白與肉色不同 亦不痒痛 謂之曰癩 此亦是風邪搏於皮膚 血氣不和所生也”라 백반증의 증상과 원인에 대하여 최초로 언급되어 있다.

백반증 발생의 한의학적 원인으로 外因은 風, 濕, 寒 등의 邪氣가 하나 혹은 두 가지 이상이 熱體의 피부나 肌腠에 침입하여 毛竅에 凝滯하여 氣血不行이나 氣血失和를 일으키고, 內因은 七情內傷, 過度勞倦, 驚恐, 肝腎陰虛, 心脾兩虛, 脾腎陽虛, 血虛, 肝熱 등이 氣血不和 氣機壅滯, 氣滯血瘀, 氣血生化無源 등의 병리과정을 일으켜 經脈과 피부를 濡養하지 못하여 經脈이 不暢되어 肌膚가 失養되고, 壓力 摩擦 手術 등의 기계적 자극이 不內外因으로 작용하여 血瘀 經絡阻滯 등을 유발시킨다고 하였다.

한의학적 치료에 있어서는 內服藥으로 蒼耳膏, 浮萍丸, 通竅活血湯의 빈도가 높았고 外用藥으로는 補骨脂酊, 密陀僧散, 玉粉膏가 다용 되었으며, 外用, 塗布로는 硫黃, 蛇蛻皮, 鱧鱺魚, 補骨脂 등이 자주 쓰인 약제라 하였다.

백반증은 만성적이고 난치성의 질환으로 원인과 치료방법이 명확하게 규명되지 않았으며, 한의학적으로 치료에 대한 연구 성과가 미흡한 실정에 있어 환자 뿐만 아니라 의료인들도 치료 및 예방에 많은 어려움을 겪고 있다. 지금까지의 한의학적인 연구경향을 살펴보면 백반증의 동서의학적 고찰⁵⁾, 백반의 치료에 대한 문헌적 고찰⁶⁾ 백반증 치료에 사용된 약물의 고찰⁷⁾과 같은 문헌적 연구와 西施玉容散⁸⁾, 甘草 추출액⁹⁾, 白朮 추출액¹⁰⁾, 蘇木의 에틸아세테이트 추출물²¹⁾, 白芨²³⁾, 더덕 분획별 추출물²⁴⁾ 등이 멜라닌 형성 억제에 미치는 연구와 같은 미백효과에 관한 연구가 대부분이었다. 최근 서 등^{25, 26)}의 보골지 추출물이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향에 대한 실험 연구와 백반증의 치료 1례에 대한 임상 논문이 보고되고 있을 뿐 멜라닌 생성에 관한 연구는 미진한 실정이다.

紫何車는 補氣, 養血, 益精의 효능으로 體質虛弱, 腎虛精虧, 氣血不足을 치료하는 약²⁷⁾으로 당뇨유발 흰쥐의 신장보호기능에 미치는 영향²⁸⁾, 체표온도변화에 미치는 영향²⁹⁾, 송과선 세포의 Apoptosis에 대한 보호 효과³⁰⁾, 골다공증에 미치는 영향³¹⁾ 등과 같은 장기에 대한 보호효과 연구가 대부분이었다. 이에 저자는 紫何車가 인체 정상기능의 쇠퇴 또는 부전으로 일어나는 질환에 효과가 있으리라 판단하고, 백반증 환자의 환부 또는 기타 穴 부위에 자하거 약침을 자침하고 보골지 추출액을 도

포하여 색소변화가 나타나는 것을 관찰하여, 紫何車 약침액이 멜라닌 세포를 활성화하는가를 알아보고자 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 형성과정에 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였으며 western blot을 시행하였다.

紫何車 약침액이 B16 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0 µg/ml에서 100 µg/ml까지 처리한 결과, 처리 양이 증가함에 따라 세포 생존율이 농도별로 유의성 있게 감소하였으며(Fig.1), 현미경 소견에서도 세포수가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수가 있었다(Fig.2).

紫何車 藥針液이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16 melanoma 세포에 紫何車 藥針液을 농도별로 처리한 후 tyrosinase 활성도를 측정된 결과, 처리 양이 증가함에 따라 실험군 모두 증가를 보였으나, 50 µg/ml까지는 증가하다 100 µg/ml에서 다소 감소하는 경향을 보였으며 전농도에서 통계적 유의성을 보였다(Fig. 3).

멜라닌의 정량을 조사해 본 결과 처리 양이 증가함에 따라 실험군에서 모두 증가를 보였으나, 50 µg/ml까지 증가하다 100 µg/ml에서 다소 감소하는 경향을 보였으며 유의성은 없었다(Fig. 3).

또한 여러 단백질의 혼합물로부터 특정 단백질의 존재 여부를 밝혀내는 western blot을 실시한 결과 단백질의 양이 일정하지 확인하는 actin의 양은 변화가 없었으나 tyrosinase의 양은 증가하여 tyrosinase의 활성도가 입증되었다.

이상의 연구 결과 紫何車 藥針液은 B16 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성을 증가시키고 멜라닌 합성을 증가시키므로서 멜라닌화를 촉진시키는 작용이 있을 것을 알 수 있었으며, 이는 실제 임상에서 백반을 포함한 저색소 질환의 치료에 활용될 수 있을 것으로 사려된다.

V. 結 論

紫何車 藥針液이 피부의 멜라닌 색소 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16 melanoma 세포를 이용하여 tyrosinase 활성과 최종산물인 멜라닌의 정량측정을 시행한 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 紫何車 藥針液은 B16 melanoma 세포에 대한 생존율에 있어 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 보였다.
2. 紫何車 藥針液은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 제외하고 농도 의존적으로 유의성 있는 tyrosinase 활성의 증가를 보였다.
3. 紫何車 藥針液은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 제외하고 농도 의존적으로 멜라닌 생성의 증가를 보였으나 유의성은 없었다.
4. Western blot으로 紫何車 藥針液의 tyrosinase protein level을 확인한 결과, 농도 의존적으로 tyrosinase 활성의 증가를 보였다.

이상의 결과로부터 紫何車 藥針液은 tyrosinase 활성을 증가시키고, 멜라닌 합성을 증가시킴을 알 수 있었다. 이를 통하여 향후 자하거 약침액의 임상적인 활용에 관한 연구가 필요하리라 사려된다.

參考文獻

1. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학. 서울 : 여문각. 1994 ; 330.
2. 강원형. 피부질환 아틀라스. 서울 : 한미의학. 2003 ; 227-31.
3. 신태양사 편집국 백과사전부. 원색최신의료대백과사전(7). 서울 : 신태양사. 1994 ; 20.
4. 楊思澍, 張樹生 傳景華. 중의임상대전. 서울 : 의성당. 1993 ; 896-7.
5. 지선영, 권영규, 신상기. 백반증의 동서의학적 고찰. 제한동의학술원 논문집. 1999 ; 4(1) : 262-85.
6. 강경준, 안철. 백전풍, 백박풍의 치료에 대한 문헌적 고찰. 대한외관과학회지. 1990 ; 3(1) : 109-26.
7. 이선동. 백반증 사용약물에 대한 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 1995 ; 16(2) : 44-61.
8. 박지선, 남우열, 문연자, 조광호, 전병훈, 우원홍. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 서시옥용산의 효과. 대한동의병리학회지. 2000 ; 14(1) : 160-70.

9. 임덕우, 이진우, 이무형. 감초추출액이 멜라닌세포의 증식과 멜라닌화에 미치는 영향. 경희의학. 2000 ; 16(2) : 143-50.
10. 박지선, 김용수, 이진우, 박협우, 전병훈, 우원홍, 정우열. 백출추출액이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 1999 ; 13(2) : 91-8.
11. 양현옥, 최원형, 전병훈, 백승화, 천현자. 산수유 물추출물이 B16/F10 melanoma세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002 ; 16(4) : 818-22.
12. 전국한의과대학 본초학교실 共編著. 본초학. 서울: 영림사 1994 ; 567-8.
13. 유진호, 최도영, 강성길. 자하거약침이 당뇨유발 흰쥐의 신장보호기능에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(4) : 152-66.
14. 육태한, 신민섭. 자하거약침이 체표온도변화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2002 ; 19(3) : 88-94.
15. 서정철, 이재동, 박동석, 강성길, 안병철, 김이화, 김순애, 이희제, 김창주, 정주호. 자하거 약침액이 과산화수소로 유발된 송과선 세포의 Apoptosis에 대한 효과. 대한침구학회지. 2001 ; 18(3) : 69-78.
16. 육태한, 이창현, 이학인. 홍화자 · 녹용 · 자하거 약침이 골다공증에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 61-75.
17. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem. 1998 ; 255 : 139-46.
18. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 1985 ; 45 : 1474-8.
19. Pawelek J, Korner A, Bergstrom A, et al. New regulation of melanin biosynthesis and autodestruction of melanoma cells. Nature. 1980 ; 286 : 617-9.
20. 김중호, 채병윤. 백전풍에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지. 1987 ; 8(2) : 90-5.
21. 巢元方. 諸病源候論. 台北: 集文書局. 1965 ; 302.
22. 천현자, 김용수, 남항우, 윤성찬, 우원홍. 소목의 에틸아세테이트 추출물이 B16/F10 흑색종세포의 멜라닌 합성에 미치는 효과. 동의생리병리학회지. 2001

- ; 15(6) : 961-6.
23. 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신, 우원홍. 백급이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. 대한안ibi인후피부과학회지. 2003 ; 16(1) : 100-11.
24. 오한철, 홍철희, 이수형, 황충연, 김남권. 더덕 분획별 추출액이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 대한안ibi인후피부과학회지. 2004 ; 17(2) : 59-71.
25. 서형식, 정재호. 보골지 추출물이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2005 ; 26(3) : 55-65.
26. 서형식, 정재호. 백반증의 치험 1례. 한방안ibi인후피부과학회지. 2005 ; 18(3) : 121-6.