

멜라닌세포 배양시 세포내 Cyclic AMP와 단백질 변화에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 피부과학교실, 국홍일 피부과*
박미연 · 강형철 · 명기범 · 국홍일*

=Abstract=

The Study of Intracellular Cyclic AMP and Protein in Cultured Human Melanocytes

Mi-Youn Park, Hyung Chul Kang, Ki Bum Myung, Hong Il Kook*

*Department of Dermatology, Ewha Womans University and The Kook's Dermatologic Clinic**

The study was performed to get the basic knowledge about the changes of the cyclic AMP concentration and protein contents in cultured human melanocyte during 7 weeks of cultivation.

The results are as follows :

1) The concentrations of cyclic AMP were linearly increased from the 1st week to the 3rd week up to 8.10×10^{-5} pmoles/cell and 0.85 pmoles/mg of protein, which were found to be 2.88-fold and 1.73-fold larger than the those of the 1st week's cultivation. The concentrations of cyclic AMP then gradually decreased from the 3rd week to the 7th week of the cultured-lifespan.

2) The biosynthetic amount of protein was found to be 5.74×10^{-5} mg/cell on the 1st week and 9.57×10^{-5} mg/cell on the 3rd week of cultivation. Values were gradually declined from the 3rd week to the 7th week of cultivation.

In the present investigation, it is clear that the amount of protein content and the concentration of cyclic AMP in the cultured human melanocytes derived from the epidermis of human skin were vividly increased up to the 3rd week of cultivation.

Thus, it might be suspected that the suitable time for the successful transplantation of cultured human melanocytes is around the 3rd week of cultivation.

서 론

멜라닌은 정상 피부색의 형성과 자외선에 의한 손상으로부터 신체를 보호해 주는 역할을 담당하는 중요한 표피 구성 성분으로 신경능에서 기원한 멜라닌세포에 의해 합성된다¹⁾²⁾.

표피 멜라닌세포는 표피 기저막 위에 위치하는 수지상 세포로서, 표피의 세포 성분중 일부(3~7%)를 차지한다¹⁾³⁻⁵⁾. 표피세포의 대부분을 차지하는 각질세포와 달리 멜라닌세포는 각화되어 탈락되지 않으며 세포 분열도 거의 일으키지 않는다¹⁾³⁻⁵⁾. 멜라닌세포에 대한 연구와 멜라닌세포의 이상으로

인한 여러 질환의 치료방법을 개발하기 위해서는 멜라닌세포의 배양 기술의 개발이 필수적이다. 그러나, 멜라닌세포의 배양에는 어려움이 따르는데, 이는 첫째, 멜라닌세포가 주성분을 이루는 조직을 구하기 어렵고 둘째, 멜라닌세포의 분열율이 극히 낮으며, 셋째, 각질세포나 섬유아세포 등이 멜라닌세포보다 훨씬 빨리 증식하여 멜라닌세포의 증식을 방해하기 때문이다¹⁾⁶⁻⁷⁾. 각질세포 없이 멜라닌세포만 배양하면 멜라닌세포의 생존 기간은 6~8 주이고, 배양 배지에 cholera toxin과 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)를 첨가할 경우 32주까지 연장 할 수 있다³⁾.

어떤 물질이나 상태에 대한 멜라닌세포의 반응은 멜라닌세포의 증식과 멜라닌화 및 세포의 형태에 의해 알 수 있다. 멜라닌세포의 증식은 주로 멜라닌세포수를 혈구 계산판 상에서 직접세거나 ³H-thymidine을 이용한 DNA 합성정도를 측정할 수 있고⁶⁾, 멜라닌세포의 멜라닌화는 tyrosinase 활성도를 측정하거나 멜라닌 양을 측정하여 알 수 있는데 이들은 서로 비례하는 것으로 알려져 있으며²⁾⁷⁾⁸⁾ 멜라닌세포의 형태는 수지상 돌기의 수나 길이 변화등으로 관찰하기도 한다¹⁾³⁾. Cyclic AMP는 세포증식과 분화의 강력한 조절물질로 멜라닌세포의 호르몬은 cyclic AMP를 통한 기전을 통하여 작용한다⁹⁾.

본 연구에서는 멜라닌세포를 배양하여 cyclic AMP농도와 단백질량의 변화를 관찰하여 백반증과 같은 멜라닌세포 결핍으로 인한 질환에 멜라닌세포 이식의 이상적인 시기를 제시하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

1) 피부조직

피부 이식시 얻어진 인체 서혜부의 잔여 피부판 (skin piece)

2) 멜라닌세포 배지(Melanocyte Growth Medium : M-GM)의 제조

멜라닌세포의 배양에 사용한 배양액은 변형된 TIC 배양액을 이용하였다¹⁰⁾. 즉 Hams F-10 배지

(Hazelton Biologics, Inc., USA)를 기본 배양액으로 하여 최종배양액에는 다음을 포함하고 있다.

(1) 8% Nu-serum(Collaborative Research, Inc., Mass., USA)

(2) 8% fetal bovine serum(Gibco Laboratories, N.Y., USA)

(3) Penicillin(100IU/ml)-streptomycin(100µg/ml)-amphotericin B(0.25µg/ml)(Gibco Laboratories, N.Y., USA)

(4) 50 nM phorbol-12myristate-13-acetate(PMA)(Sigma Chemical Co., Missouri, USA)

(5) 0.2mM isobutylmethyl xanthine(IBMx)(Sigma Chemical Co., Missouri, USA)

(6) 10nM cholera toxin(CT)(Sigma Chemical Co., Missouri, USA)

(7) 2% bovine pituitary extract(Collaborative Research, Inc., Mass., USA)

(8) 2% 만삭태반추출물

3) 태반추출물의 제조

태반추출물은 이 등¹¹⁾이 사용한 방법에 따라 제조하였다. 즉 정상적인 임신경과를 보인 산모의 만기 분만시 얻은 태반을 멸균된 생리식염수로 2회 세척하여 적혈구를 제거한 후 500g의 태반을 잘게 썰어 분쇄기(CR-450, 삼성전자)에 생리식염수와 혼합하여 넣고 1분간씩 3회 분쇄하였으며, 분쇄된 태반은 최종 부피가 1L가 되도록 생리식염수를 추가시켰으며, 이것을 고속 원심분리기(Beckman, J2-21, California, USA)에서 15,000rpm으로 2시간 원심침전 시켰다. 원심침전 후 상청액을 수확하여 여과공 크기가 0.22µm인 여과지(Gelman, Ann Arbor, Michigan, USA)로 여과하여 사용시까지 영하 60℃ 이하의 냉동고에 보관하였다.

4) Rianen® cAMP[¹²⁵I] RIA kit(Du Pont Co., Del., USA)

본 kit는 다음을 포함하고 있다.

(1) Cyclic AMP Sodium Acetate 완충용액(buffer) : 농축된 sodium acetate(pH 6.2) 완충액 1 vial을 증류수로 500ml까지 희석시켰다. 최종용액은 pH 6.2의 sodium acetate 완충액과 안정액을 포함한다.

(2) Cyclic AMP 표준액(standard) : 동결건조 되어있는 표준시약 1 vial을 2.0ml의 증류수에 넣어서

사용하였다. 이 표준액은 5000pM/ml의 cyclic AMP, sodium acetate 완충액, 0.1% sodium azide와 불활성 첨가물을 포함한다. 표준용액의 농도는 광원파장 259nm, pH 6.9에서 $\text{mole 흡수 계수} = 14.6 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 분광광도계로 측정하였다.

(3) Cyclic AMP 항혈청 복합체(antiserum complex) : 동결건조 처리된 cyclic AMP 항혈청 복합체 용액 1 vial에 증류수 21ml를 첨가하였다. 결과용액은 전처리된 항체 복합체, 0.005% thimerosal과 불활성물질, 그리고 pH 6.0의 sodium phosphate 완충액을 포함하였다.

(4) Cyclic AMP [^{125}I] 추적물질(tracer) : 농축된 두 vial은 추적물질을 사용하였다. 각 vial은 1ml의 1:1 n-propanol : water 용액에서 74KBq(2 μCi)이하를 함유하였다. 각 vial에 증류수 5.0ml를 넣어 냉장보관하였고 방사선 동위원소 사용시의 일반적인 주의사항에 따랐다.

(5) Cyclic AMP 담체혈청(carrier serum) : 친액성 담체혈청을 사용하였다. 각 cyclic AMP 담체혈청 1 vial에 6.0ml의 증류수를 넣었다. 각 용액이 함유하는 것은 담체혈청, 0.1% sodium azide, 안정액 그리고 pH 6.2의 sodium acetate 완충액에 들어간 불활성 물질이다. 냉장보관하여 사용하였다.

(6) Cyclic AMP 침전제(precipitator) : 50ml vial 2개를 사용하였다. 각 vial은 침전 보강제 및 sodium acetate 완충액 속의 sodium azide를 함유 하였다. 냉장보관한후 사용전 잘 흔들어 사용 하였다.

2. 연구 방법

1) 피부조직의 채취 및 단일 표피세포 부유액의 분리

피부이식시 얻어진 인체의 서혜부 피부를 채취한 직후 무균적으로 실험실로 옮겨 0.005~0.001% trypsin EDTA 용액으로 처리하여 단일 표피세포 부유액을 얻었다. 즉 피부 조직을 1cm²의 크기로 절단한 뒤 trypsin-EDTA 용액에 담가 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 배양기에서 2~3시간 방치한 다음 여기에 1/10 부피의 태생기 송아지 혈청을 넣고 진탕기에서 30초간 진탕하여 단일 표피세포 부유액을 얻었다.

2) 멜라닌세포의 배양

피부이식시 얻어진 인체의 서혜부 피부조직으로

부터 분리된 단일 표피세포를 M-GM에 부유시켜 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다. 초대배양시에는 섬유아세포의 증식을 억제하기 위하여 M-GM에 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 geneticin(Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)을 첨가하여 3~6일간 배양하여 멜라닌세포를 순수 배양하였다.

3) 단백질량 측정

각 균질액에 함유되어 있는 단백질량은 Lowry¹²⁾에 의한 방법으로 측정하였다. 표준단백질로써 우혈청 알부민(bovine serum albumin)(Sigma Chemical Co., Missouri, USA)을 사용하였다.

4) Cyclic AMP량 측정

측정 방법은 Rianen[®] cAMP [^{125}I] RIA kit의 사용법에 따라 희석된 cyclic AMP [^{125}I] - 추적물질과 환원된 cyclic AMP 담체혈청을 1:1로 섞어서 활성 추적용액을 만들었고, 남은 것은 적법하게 처리하였다. 그리고 표준곡선을 얻기 위해 20개의 시험관에 번호를 적어 사용하였으며 측정은 실내온도에서 시행하였다. 제 1, 제2 시험관은 활성 추적용액만의 총량을 측정하였다. 시험관 3과 4에 분석 완충제 200 μl 를 첨가하여 blank 시험관으로 하였다. 시험관 5와 6에 분석 완충제 100 μl 를 첨가하여 영점표준 시험관으로 하였다. 7번 이후의 시험관에는 각각 표준용액이나 시료 100 μl 를 넣고 제 3시험관부터 모든 시험관에 활성 추적용액 100 μl 를 넣었다. 항혈청 복합체를 시험관 1, 2와 blank 시험관을 제외하고 모든 시험관에 100 μl 씩 넣었고 시험관 1과 2를 제외하고 보텍스 혼합기(vortex mixer)를 이용하여 잘 섞은다음 뚜껑을 덮고 냉장고에서 밤동안(16~18시간) 보관하였다. 1, 2번 시험관을 제외한 모든 시험관에 차가운 cyclic AMP 침전제 0.5ml를 넣었다. 그리고, 보텍스 혼합기로 잘 섞고 15분간 1200 $\times\text{g}$ 로 냉동 원심기를 사용하여 원침 시켰다. 모든 시험관을 물기를 완전히 없애고 감마계수기(gamma counter)에서 방사능을 측정하였고 측정 효율은 50~70%, 시간 간격은 1분으로 하였다.

연구 결과

1. 배양기간중 멜라닌세포내 cyclic AMP 농도의 변화

정상성인의 서혜부 안쪽에서 얻어진 표피층으로부터 배양된 멜라닌세포내 cyclic AMP 농도의 배양기간에 따른 변화를 관찰한 결과, 배양초기에는 2.81×10^{-5} pmoles/cell 이었던 농도가 배양 3주에는 최고치로써 8.10×10^{-5} pmoles/cell에 도달 하였다 (Table 1). 그러나 배양 3주 이후 부터는 배양기간이 증가 할 수록 반비례적으로 cyclic AMP량은 감소 하기 시작하여 배양 7주에는 배양 1주와 비슷한 농도인 약 2.63×10^{-5} pmoles/cell로 되었다. 즉 배양 3주의 cyclic AMP 농도는 배양 1주와 7주 것의 약 2.88배였다.

2. 배양기간중 멜라닌세포내 단백질량의 변화

단백질은 주로 세포질내의 용액압력을 유지하면서 세포의 구조를 유지하고 세포내 활성물질과 결합하여 표적세포에 전달하는 운반체 역할의 기능도 있다.

배양된 멜라닌세포내에서 생합성된 단백질량은 배양 1주에 약 5.74×10^{-5} mg/cell 이었으나 배양 3주에는 급상승 하여 약 9.57×10^{-5} mg/cell로 나타

났다(Table 2). 그리고 배양 3주이후부터 단백질 생합성이 서서히 감소하여 배양 7주에는 7.70×10^{-5} mg/cell이 되었다. 즉 단백질량은 배양 3주에 배양 1주보다 약 1.67배로 상승하여 최고치에 도달한후 배양기간이 길어질 수록 단백질 생합성량이 서서히 감소하여 7주에는 배양 1주의 약 1.34배가 되었다.

이상의 실험 성적으로 배양기간 동안 멜라닌세포가 생합성한 단백질 1mg당 형성하는 cyclic AMP 농도의 비(pmoles/mg)는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양 1주에 0.49, 2주에 0.75, 3주에 0.85로 배양 3주까지 점차 증가하여 3주에는 1주보다 73%가 증가하였으나 3주이후 부터는 서서히 감소하여 배양 7주에는 0.34로 배양 1주보다 더 저하한 소견을 보였다.

고 찰

멜라닌세포는 세포막에 결합되어있는 수용체에 prostaglandin E, arachidonic acid, α -MSH, interleukin 1, 3, 6, interferon- γ 등¹³⁾의 생물학적 활성물질

Table 1. The levels of intracellular cyclic AMP per cell in human melanocytes on the days of serial culture($\times 10^{-5}$ pmoles/cell)

Sample	Weeks							
	1	2	3	4	5	6	7	
1	2.71	6.71	8.13	6.59	5.31	4.01	2.72	
2	2.23	6.35	7.91	6.66	5.37	3.95	2.58	
3	3.21	6.52	7.81	6.45	5.43	3.79	2.75	
4	2.82	6.81	8.43	6.52	5.37	3.79	2.49	
5	3.09	6.84	8.21	6.73	5.53	4.10	2.61	
Mean	2.81	6.65	8.10	6.66	5.40	3.94	2.63	
SD*	0.38	0.21	0.24	0.11	0.83	0.13	0.11	

SD* : Standard deviation

Table 2. The amount of protein per cell in human melanocytes on the days of serial culture($\times 10^{-5}$ mg/cell)

Sample	Weeks							
	1	2	3	4	5	6	7	
1	5.86	8.80	9.46	8.28	7.91	7.78	7.58	
2	5.28	8.75	9.59	7.89	7.89	7.80	7.75	
3	5.72	8.63	9.83	8.03	8.10	8.02	7.64	
4	6.08	9.21	9.21	8.15	8.20	7.91	7.73	
5	5.78	9.03	9.74	7.95	7.87	8.03	7.81	
Mean	5.74	8.88	9.57	8.06	7.99	7.91	7.70	
SD*	0.29	0.23	0.24	0.16	0.15	0.12	0.09	

SD* : Standard deviation

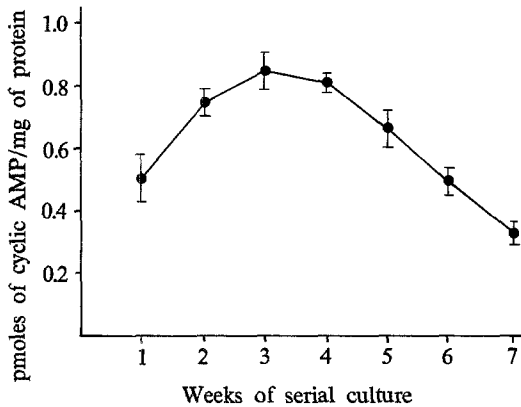


Fig. 1. The concentration of cyclic AMP per mg of protein per cell of cultured melanocytes in human skin.

이나 호르몬의 영향을 받아서 멜라닌소체(melanosome)내에서 멜라닌색소를 생합성하여 멜라닌소체를 각질형성세포로 전이시켜서 표피의 색깔을 좌우한다. 멜라닌색소의 가장 중요한 기능은 피부에 유독한 방사선과 자외선을 흡수하고 분산시킴으로써 피부손상을 막아 보호하는데 있다¹⁴⁻¹⁶. 멜라닌생합성은 분화된 멜라닌세포의 주된 생화학적 기능으로 이미 존재하는 멜라닌세포의 활성화에 수반되는 증식과 연관이 있다¹⁷⁾¹⁸.

멜라닌세포의 배양에는 혈청과 유사분열물질(mitogen)이 필요하며, 이중 유사분열물질은 세균으로 나누어지는데 종양 촉진제인 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)와 같은 phorbol ester등이 있고, cAMP를 자극하는 IBMX, CT, dibutyl cAMP, 멜라닌세포 자극 호르몬(MSH)이 있으며 펩티드 성장인자(peptide growth factor)인 기초적 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor), 전환 성장인자(transforming growth factor)가 있다³⁾¹⁹⁻²⁴. 또한 멜라닌세포는 여러 화학 매개 물질 등에 의해서도 영향을 받게 되는데, 염증 후 과색소 침착이나 일광화상, 색소성 담담진 등에서 멜라닌세포에 arachidonic acid와 그 대사산물, 히스타민, 비타민 D₃와 같은 물질이 자극을 주어 멜라닌을 증가시킨다는 보고도 있다²⁵⁾²⁶. 또한 다른 보고에 의하면 leukotriene C₄, leukotriene D₄가 멜라닌세포 성장을 자극하지만 prostaglandin(PG) D₂나 PGE₂는 자극하지 않는다고 하였다²⁷.

그러나 Nordlund등⁶은 쥐를 이용한 생체내 실험

에서 PGE₂가 멜라닌세포의 증식에 자극을 준다고 하였고, Tomita등⁸도 시험관내에서 PGE₂는 멜라닌세포 증식에 자극을 주지만 PGE₁은 자극을 주지 않는다고 하였다. 또한 vitamin D₃가 멜라닌세포에 자극을 주지만 ergocalciferol은 자극을 주지 않는다고 하였으나²⁸, 이런 연구결과의 차이는 실험방법, 실험상태, 실험재료의에 종족간에 여러 자극인자, 화학매개물질, cytokines에 대한 서로 다른 감수성, 즉 멜라닌세포의 여러 자극인자들의 세포막 수용체 기능에 차이가 있을 것으로 보고하고 있다²⁸.

배양 멜라닌세포의 생존기간은 cholera toxin과 PMA가 포함된 배지에서는 32주까지 지속될 수 있으나, 이들이 포함되지 않은 경우 6~8 주간이다³. 멜라닌세포 배양중 최대증식을 보이는 시기는 11일에 6배의 증식을 보였던 보고³)와 배양 7일째 14.4배의 증식을 보였던 보고¹¹)가 있다.

어떤 물질이나 상태에 대한 멜라닌세포의 반응은 멜라닌세포의 증식, 멜라닌화 및 세포의 형태에 의해 알 수 있다. 멜라닌세포의 증식은 주로 멜라닌세포수를 혈구계산판 상에서 직접 세거나 ³H-thymidine을 이용한 DNA 합성 정도를 측정하여 조사할 수 있고⁶, 멜라닌세포의 멜라닌화는 tyrosinase 활성도를 측정하거나 멜라닌 양을 측정하여 알 수 있는데 이들은 서로 비례하는 것으로 알려져 있으며³⁾⁷⁾⁸, 멜라닌세포의 형태는 수지상 돌기의 수나 길이 변화 등으로 관찰하기도한다¹⁾³). 그러나 세포 활성도의 측정은 세포의 주된 생화학적 기능인 생합성으로 측정하는 것이 보다 효과적으로 사료된다.

멜라닌세포의 활성도는 멜라닌의 생합성을 위한 멜라닌세포내 cyclic AMP가 멜라닌 합성을 증대시킴으로써 증가하여²⁹) 본 연구에서는 체외 배양된 멜라닌세포내의 cyclic AMP 농도를 측정하여 백반증과 같은 피부질환에 멜라닌세포를 이식하는 적절한 시기를 선택하는 기초적 지식을 얻고자 하였다.

배양기간을 연장 할수록 멜라닌세포의 수가 증가하였으나, 배양기간 중 3주에 cyclic AMP 농도가 최고치에 도달하였다가 서서히 감소하여 7주에는 1주보다 더 저하한 소견을 보였다. 이러한 현상은 세포의 증식이 커지면, 높은 밀도로 인한 세포사

이의 상호 억제작용(cell to cell inhibition)에 의한 것으로 설명된다¹¹⁾.

배양 3주에 멜라닌세포내 형성된 cyclic AMP 농도가 8.10×10^{-5} pmoles/cell과 0.85 pmoles/mg of protein으로써 배양 1주보다는 약 2.88배와 1.73배로 상승한 성적은 멜라닌세포의 배양이 배양기간에 따라서 성장과 분화가 각각 다르며 3주에 활발한 시기라고 생각할 수 있다. 더욱이 배양기간 중 단백질량을 비교하여 보아도 배양 3주에 약 9.57×10^{-5} pmoles/cell로써 배양 1주보다는 약 1.67배 정도 다량 생합성 되었다는 성적이 뒷받침해 준다고 사료된다.

이와같은 성적은 다른 보고³⁾¹¹⁾와 다소간의 차이를 보이는데, 이러한 차이는 표본을 채취한 인체의 피부 부위차이에 따른 것으로 생각된다. 즉, 포피의 멜라닌세포인 경우 배지에서 19 μ m의 크기의 방추체 모양으로 양극에서 한개씩의 수상돌기를 내며, 안면부의 멜라닌세포인 경우 27 μ m로 다수의 수상돌기를 내고 포피의 경우 7일과 11일에 최고의 증식을 보이고³⁾¹¹⁾, 안면부에서는 14일에 멜라닌 수가 가장 많이 관찰되며, 포피와 안면의 멜라닌 세포 모두 32주까지 생존이 가능하다³⁾. 저자들의 실험에서는 비노출부인 서혜부의 피부를 이용하여 위의 실험과는 차이를 보일 것으로 사료되며, 연령에 따른 멜라닌 세포의 차이가 보고된 바 있어¹³⁾ 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

정상 성인 피부의 표피로부터 멜라닌세포를 분리하여 1주부터 7주까지 배양하는 기간중 1주간격으로 멜라닌세포의 cyclic AMP 농도와 단백질량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) Cyclic AMP 농도는 멜라닌세포의 배양 1주부터 3주까지는 점차 상승하여 3주에 최고치인 8.10×10^{-5} pmoles/cell과 0.85 pmoles/mg of protein에 달하여 배양일 1주보다 2.88배와 1.73배 상승하였다. 그러나, 배양 3주부터 7주까지는 점차 감소하였다.

2) 단백질 생합성량은 배양 1주에는 5.74×10^{-5} mg/cell 이었던 것이 배양 3주에는 9.57×10^{-5} mg/cell로써 약 1.67배 증가 하였으나 배양 3주부터 7

주까지는 점차 감소하였다.

이상의 결과로, 정상성인 피부로부터 분리한 멜라닌세포는 배양 3주까지 배양일수가 연장될 수록 cyclic AMP 농도, 단백질 생합성량 그리고 단백질에 대한 cyclic AMP 비율이 증가하여 멜라닌 활성도가 가장 높게 나타났다. 그러므로 백반증 치료를 위한 멜라닌세포 이식의 최적기는 멜라닌세포 배양 3주임을 알 수 있다.

References

- 1) Gordon PR, Mansur CP, Gilchrist BA : Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by kerationocyte derived factor. *J Invest Dermatol* 1989 : 92 : 562-572
- 2) Halaban R, Pomerantz SH, Marshall S, Lambert DT, Lerner AB : Regulation of tyrosinase in human melanocytes grown in culture. *J Cell Biol* 1983 : 97 : 480-488
- 3) Esinger M, Marko O : Selective proliferation of normal human melanocyte in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci(USA)* 1982 : 79 : 2018-2022
- 4) Hirobe R, Flyun E, Szabo G, Vrabel M, Garcia RI : Growth characteristics of human epidermal melanocytes in pure culture with special reference to genetic differences. *J Cell Physiol* 1988 : 135 : 262-268
- 5) Quevedo WC Jr, Fitzpatrick TB, Szabo G : Biology of melanocytes. In *Dermatology in general medicine*. Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K et al(eds), 3rd ed, New York, McGraw Hill Book Co, 1987 : pp281-288
- 6) Nordlund JJ, Collins CE, Rheins LA : Prostaglandin E_2 and D_2 but not MSH stimulate the proliferation of pigment cell in the pinnal epidermis of the DBA/2 mouse. *J Invest Dermatol* 1986 : 84 : 433-437
- 7) Friedman PS, Gilchrist BA : Modulation of normal human melanocyte behavior in vitro. *Cin Res* 1986 : 34 : 416A
- 8) Tomita Y, Iwamoto M, Mazuda T : Stimulatory effect of prostaglandin E_2 on the configuration of normal human melanocytes. *In Vitro* 1987 : 89 : 299-301
- 9) Amstrong FB : Cyclic AMP involvement in enzy-

- men induction. In Biochemistry, Armstrong FB(ed), 3rd ed, New York, Oxford University Press, 1989 : pp473-474*
- 10) Kreider JW, Rosenthal M, Lengle N : *Cyclic AMP in the control of melanoma cell replication and differentiation. J Natl Cancer Inst 1973 : 50 : 555-558*
 - 11) 이기호 · 이무형 · 박재경 · 허충림 : 인체 멜라닌 세포의 배양의 관한 연구. 대한피부과학회지 1990 : 28(2) : 136-146
 - 12) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ : *Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951 : 193 : 265-275*
 - 13) Nordlund JJ : *Intoduction to the biology of the pigment system. In : Moschella S, Hurley H. 3rd ed. Philadelphia, Saunders, 1992 : pp1421-1441*
 - 14) Garcia A : *Ultrastructure of melanocyte-keratinocyte interaction. In pigment cell. Vol 4. Klans SN(ed), Busel/New York, Karger S 1979 : pp299-312*
 - 15) Goldsmith LA : *Biochemistry and physiology of the skin. Goldsmith LA(ed), vol 2. New York/Oxford, Oxford university express 1983 : pp1-267*
 - 16) Nanney LB, McKanna JA, Stoscheck CM, Carpenter G, King LE : *Visualization of epidermal growth factor receptros in human epidermis. J Invest Dermatol 1984 : 82 : 165-176*
 - 17) Jimbow KS, Uesugi T : *New Melanogenesis and photobilogical processes in activation and proliferation of precursor melanocytes after UV exposure : ultrastructural differentiation of precursor melanocytes form Langerhans cells. J Invest Dermatol 1982 : 78 ; 108-115*
 - 18) Halaban R, Langdon R, Birchall N : *Keratinocytes produce basic fibroblast growth factor, a natural mitogen for normal human melanocytes. J Clin Res 1988 : 36 : 652a*
 - 19) Kitano Y : *Effects of dibutyryl adenosine 3, 5-cyclic monophosphate on human melanocytes in vitro. Acta Derma Venereol 1976 : 56 : 223-228*
 - 20) Kim MK, Warren TC, Kimball ES : *Purification and characterization of a low molecular weight transforming growth factor from the urine of melanoma patients. J Biol Chem 1985 : 260 : 9237-9243*
 - 21) Gordon PR, Treloar Vd, Vrabel MA, Gilchrest BA : *Relative responsiveness of cultrued human epidermal melanocytes and melanoma cells to selected mitogens. J Invest Dermatol 1986 : 87 : 723-727*
 - 22) Coffey Jr RJ, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin S, Moses HL, Pittelkow MR : *Production and antoinduction of transforming growth factor- α in human Keratinocytes. Nature 1987 : 328 : 817-820*
 - 23) Halaban R, Baird GS : *bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. In vitro 1987 : 23 : 47-52*
 - 24) Herlyn M, Mancinti ML, Jambrosic J, Bolen JB, Koprowski HI : *Regulatory factors that determine growth and phenotype of normal human melanocytes. Exp Cell Res 1988 : 179 : 322-331*
 - 25) Sauk JJ, White JG, Witkop GJ : *Influence of prostaglandin E₁, E₂ and arachidonate on melanosomes in melanocytes and keratinocytes of anagen hair bulbs in vitro. J Invest Dermatol 1976 : 64 : 332-337*
 - 26) Tomita Y, Maeda K, Tagami H : *Mechanisms for hyperpigmentation in postinflammatory pigmentation, urticaria pigmentosa and sunburn. Dermatologica 1989 : 179(suppl. 1) : 49-53*
 - 27) Morelli JG, Yohn JJ, Lyons MB et al : *Leukotriens C₄ and D₄ as potent mitogens for cultured human neonatal melanocytes. J Invest Dermatol 1989 : 96 : 719-722*
 - 28) Tomita Y, Torinuki W, Tagami H : *Stimulation of human melanocytes by vitamin D₃ possibly mediates skin pigmentation after sun exposure. J Invest Dermatol 1988 : 90 : 882-884*
 - 29) Wong G, Pawelek J : *MSH promotes the activation of preexisting tyrosinase molecules in cloudman S91 melanoma cells. Nature 1975 : 255 : 644-657*