

# 한련초의 멜라닌합성 촉진 효과

차수빈<sup>1,3</sup> · 박인혜<sup>2</sup> · 홍석훈<sup>2</sup> · 문연자<sup>1,3</sup> · 우원홍<sup>3,4\*</sup>

1 : 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 2 : 원광대학교 한의과대학 안이비인후과학교실,  
3 : 원광대학교 한의과대학 해부학교실, 4 : 원광대학교 한국전통의학연구소

## Melanogenic Effect of *Eclipta Prostrata* (L.) L.

Su Bin Cha<sup>1,3</sup>, In Hae Park<sup>2</sup>, Seok Hun Hong<sup>2</sup>, Yeun Ja Mun<sup>1,3</sup>, Won Hong Woo<sup>3,4\*</sup>

1 : Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University,  
2 : Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University,  
3 : Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang University,  
4 : Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

This study was performed to investigate the mechanism of ethanol extract of *Eclipta Prostrata* (L.) L.(EEP) induced melanogenesis. EEP enhanced tyrosinase activity and melanin contents of B16F10 cells. Moreover, EEP increased the protein expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 (TRP-1). But EEP did not increase the protein expression of tyrosinase-related protein 2 (TRP-2). These results suggest that melanogenesis-promoting effect of EEP was involved in regulation of tyrosinase and TRP-1 protein, and EEP may be a potent pigmentation darkening agent in hypopigmentation condition.

keywords : *Eclipta prostrata* (L.) L., Melanogenesis, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2

## 서 론

피부의 색깔은 멜라닌, 혈관 분포와 혈액소, 각질층의 두께, 카로틴 등에 의해 좌우되며 이 중 멜라닌이 주된 역할을 한다. 멜라닌은 멜라닌 세포에 의해 방출되는 페놀류의 고분자 물질<sup>1)</sup>로, 유전적 요인, 자외선과 같은 물리적 요인, melanocyte stimulating hormone(MSH), 그 외 여러 가지 cytokine 등이 멜라닌의 합성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>.

기미와 같은 멜라닌의 과다 생성 혹은 침착이 미용상의 불만을 유발하기도 하지만, 색소침착저하증 역시 심각한 정신적 스트레스 및 사회활동의 지장을 초래하는 원인이 될 수 있다<sup>3)</sup>. 주위 피부에 비해 상대적으로 피부 멜라닌이 부족할 때 색소침착저하증이 생기며, 피부 멜라닌이 완전히 없을 때는 탈색소증이 발생한다. 이런 질환들은 다양한 병태생리학적 기전에 의해 발생하게 되는데, 멜라닌세포가 선천적으로 없거나 후천적인 파괴 과정을 통하여 유발되기도 하고 멜라닌세포가 정상적으로 존재하더라도 멜라닌을 합성할 수 없거나 적절하게 각질형성세포로 멜라닌을 전달할 수 없는 경우도 있다<sup>4)</sup>. 대표적인 색소침착저하증으로는 백색증, 백반증, 탈색모반, Ito 멜라닌저하증, 특발물방울모양멜라닌저하증 등이 있으며, 치료법으로는 멜라닌의 합성 및 침착을 촉진하기 위한 국소적인 흑

은 전신적인 스테로이드 치료, 광화학요법, 광선요법 그리고 수술적 방법이 제시되고 있으나 아직까지 완벽한 치료법은 없는 상태로<sup>5,6)</sup>, 보다 안전하고 효과적으로 치료법을 보완하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

멜라닌 합성과정에 대한 연구는 그동안 미백 효과를 중심으로 한 멜라닌 형성 억제 연구에 집중되어 있지만, 반대로 회화나무(*Sophora japonica*)<sup>7)</sup>, 음양곽(*Epimedium Koreanum*)<sup>2,8-10)</sup>, 대두(*Soybean*)<sup>11)</sup>, 쥐눈이콩(*Rhynchosia nulubilis*)과 여우콩(*Rhynchosia volubilis*)<sup>12)</sup> 등이 in vitro에서 tyrosinase 활성을 통해 멜라닌 합성을 촉진한다는 연구 결과가 보고된 바 있다.

한련초(*Ecliptae Herba*)는 쌍떡잎식물인 초롱꽃목 국화과의 한해살이풀인 한련초(*Eclipta prostrata* L.)의 전초를 건조한 것으로,涼甘酸한 氣味를 가지고 肝腎經에 入한다<sup>13)</sup>. 이<sup>14)</sup>는 한련초가 허증 백반증에 활용될 수 있다 하였으나, 한련초의 멜라닌 합성 과정에 관련된 실험적 연구는 아직까지 체계적으로 이루어진 바 없다.

이에 저자는 색소침착저하증 등 멜라닌 합성 저하로 오는 다양한 질환에 응용할 수 있는 한련초의 활용 가능성을 확인하기 위하여, B16F10 세포를 활용하여 일차적으로 한련초에탄올추출물(EEP)의 멜라닌 합성에 관련된 tyrosinase 효소 활성과 관련단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질들의 발현을 조사하였다.

\* Corresponding author

Won Hong Woo, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-dong, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : whwoo@wku.ac.kr Tel : +82-63-850-6845

Received : 2016/09/30 Revised : 2016/10/26 Accepted : 2016/11/27

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.12.30.6.432

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

## 재료 및 방법

### 1. 시료 추출

실험에서 사용된 한련초는 (주)옴니허브에서 구입한 것으로 국내에서 재배된 것을 사용하였다. 한련초 200 g에 94 % 에탄올 2L를 가하여 3일 동안 실온에서 추출하였고, 침전물을 여과한 후 감압 농축하여 6.6 g(수득율 3.3 %)의 시료를 얻었다. 시료는 냉동실에 보관하였으며 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

### 2. 시약

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사 (NY, USA) 제품을, dimethyl sulfoxide (DMSO), alpha-melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), bovine serum albumin (BSA), triton X-100, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), goat polyclonal IgG tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 Santa Cruz사 (CA, USA) 제품을 anti-Goat, anti-Rabbit, anti-Mouse IgG HRP conjugate antibody, hybond-ECL nitrocellulose membrane, western blotting detection reagent는 Amersham Biosciences사 (Buckinghamshire, England) 제품을, non-fat skim milk는 Becton사 (Le Pont de Claix, France) 제품을, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), L-3,4-dihydroxyphenyl alanine (L-DOPA)은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을, 단백질 정량 시약은 Bio-Rad (CA, USA)사 제품을 사용하였다.

### 3. 사용기기

원심분리기 (centrifuge HA-12, micro 17TR centrifuge), clean bench, CO<sub>2</sub> incubator는 한일기기사 (Inchun, Korea) 제품을, ELISA reader는 Bio-T사 (Winooski, USA) 제품을, Electrophoresis power supply는 Amersham사 (Buckinghamshire, England) 제품을, ChemiDoc image analysis는 Bio-Rad사 (CA, USA) 제품을, 감압농축기는 EYELA사 (Rotary evaporator N-100, Digital water bath SB-1000, Temp controller coolace CCA-1100, Japan) 제품을 사용하였다.

### 4. 세포주 배양

한국 세포주 은행(KCLB, Korea)에서 구입한 B16F10 세포는 5 % fetal bovine serum(FBS)과 100  $\mu$ g/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 0.25  $\mu$ g/ml amphotericin B를 첨가하여 dulbecco's modified eagle medium(DMEM)을 사용하여 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

### 5. 세포 생존율 측정

세포생존율은 24-well 배양 용기에 2x10<sup>4</sup> 개씩 분주하고 72시간 배양 후 한련초에탄올추출물(EEP)을 여러 농도로 처리한 다음 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 하에서 3일간 배양하였다. 배양 후 100  $\mu$ l의 MTT 용액을 넣어 4시간 배양한 다음 상층액을 제거한 후 DMSO 1 ml 녹

여서 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. DOPA 염색을 통한 육안적 관찰

B16F10 세포를 chamber slide에 2x10<sup>3</sup> 개씩 분주하고 24시간 배양한 후, 한련초에탄올추출물(EEP) 100  $\mu$ g/ml, kojic acid 200 nM 그리고 forskolin 200 nM을 처리하였다. 3일 후 5 % formalin 용액으로 30분간 고정한 후, 0.1 % L-DOPA로 실온에서 4시간동안 반응시켰다. 10 % formalin 용액으로 30분간 고정하고 에탄올로 탈수시킨 다음 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 7. Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법으로 측정하였다. 6 cm 배양용기에 B16F10 세포를 3x10<sup>4</sup> 개씩 분주하여 부착시킨 후, 한련초에탄올추출물(EEP)을 50, 100  $\mu$ g/ml씩 처리하였다. 72시간 배양후 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer (SPB, pH 6.8) 에 1 % (V/V) triton X-100 과 0.1 % (V/V) 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 분주하고 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 용해시킨 후, 4 °C 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 사용하였다. 단백질 정량은 bradford 시약으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산하여 0.1 M SPB (pH 6.8)의 총량이 150  $\mu$ l 이 되도록 분주하고 0.1 % (W/V) L-DOPA를 50  $\mu$ l씩 분주하여 37 °C에서 30분 반응시켜서 475 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

### 8. 멜라닌 합성량 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법<sup>15)</sup>을 변형하여 사용하였다. 10 cm 배양용기에 1x10<sup>5</sup> 개씩 분주하여 2일간 배양한 후, 한련초에탄올추출물(EEP) 50, 100  $\mu$ g/ml 씩 처리한 다음 3일간 배양하였으며, 각 군당 2x10<sup>6</sup> 개씩 수거하여 lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M SPB(pH 6.8), 1 % triton X-100)로 세포를 용해하였다. 원심분리하여 얻은 세포 침전물을 알코올로 세척한 후 10 % DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액으로 90 °C에서 1시간 용해하여 475 nm로 흡광도를 측정하였다.

### 9. Western blot 분석

B16F10 세포를 10 cm 배양용기에 1x10<sup>5</sup>개씩 세포를 부착시키고 50, 100  $\mu$ g/ml 씩 한련초에탄올추출물(EEP)을 처리하고 3일 동안 배양하였다. 배양된 세포를 냉장된 PBS로 세척한 후 수거하여 lysis buffer(1x RIPA buffer 1 ml, 1 % protease inhibitor)로 얼음 위에서 30분간 용해시킨 후, 4 °C 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 단백질은 bradford 시약을 이용하여 정량하였고, 계산된 단백질과 2x sample buffer(1 ml glycerol, 0.5 ml B-mercaptoethanol, 3 ml 10 % SDS, 1.25 ml 1 M Tris-HCl, 2  $\mu$ g bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 총 단백질 40  $\mu$ g을 10 % SDS polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. nitrocellulose membrane로 전이시키고 5 % non-fat skim milk로 blocking 시킨 후, tyrosinase, TRP-1, TRP-2

antibody를 반응시켰다. TBST로 5회 세척한 후, 2차 antibody를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 세척한 후 ECL 용액으로 발색한 후 ChemiDoc를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

#### 10. 통계처리

실험 결과는 ANOVA를 이용하여 p-value를 구하였으며,  $p < 0.05$  인 경우\*,  $p < 0.01$ 인 경우 \*\*로 유의성이 있다고 표시하였다.

## 결 과

### 1. 한련초의 세포독성 검사

B16F10 세포의 한련초에탄올추출물(EEP)에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  로 72시간 처리하였다. 세포생존율은 MTT assay로 측정하였다. 실험결과 한련초에탄올추출물(EEP)은 대조군에 비해 95 %, 88 %, 84 %, 80 %, 64 %의 생존율을 보였다(Fig. 1A). 한련초에탄올추출물(EEP)을 농도별로 처리하여 멜라닌 세포의 형태학적 변화를 광학현미경을 통해 관찰하였다. 대조군에 비해서 한련초에탄올추출물(EEP)을 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때 멜라닌 세포의 수지상돌기가 더 발달함을 관찰하였다. 이는 양성대조군인 forskolin(FSK)과 비교 했을때도 한련초에탄올추출물(EEP) 처리시 수지상돌기의 형성이 촉진되었다(Fig. 1B).

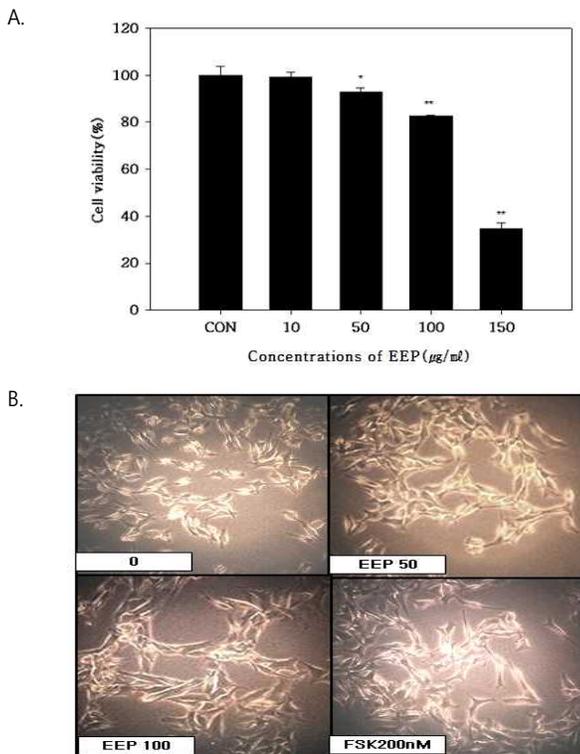


Fig. 1. Cell viability of EEP and Light micrographical observation of B16F10 cells. The cells treated with EEP at different concentrations for 72h was assayed using MTT. Data are mean  $\pm$  S.D. of triplicate experiments.  $\pm$  S.D. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : compared to the untreated control(A). Cells were treated with EEP 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  or 200 nM of forskolin(FSK) for 72h. Cells were photographed with phase contrast inverted microscope (x100)(B).

### 2. 한련초의 세포내 멜라닌합성 유도 효과

한련초에탄올추출물(EEP)의 세포내 멜라닌합성 변화를 측정하기 위하여 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리후, 72h 배양하고  $2 \times 10^6$ 개의 세포를 수집하여 세포를 용해하여 멜라닌 합성량을 측정하였다. 한련초는 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 106 %, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 113 %, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 130 %로 멜라닌 합성량을 증가시켰으며 (Fig. 2A), 육안으로 관찰한 멜라닌색소 침착에서도 대조군 대비 확실한 색의 변화를 보였다(Fig. 2B).

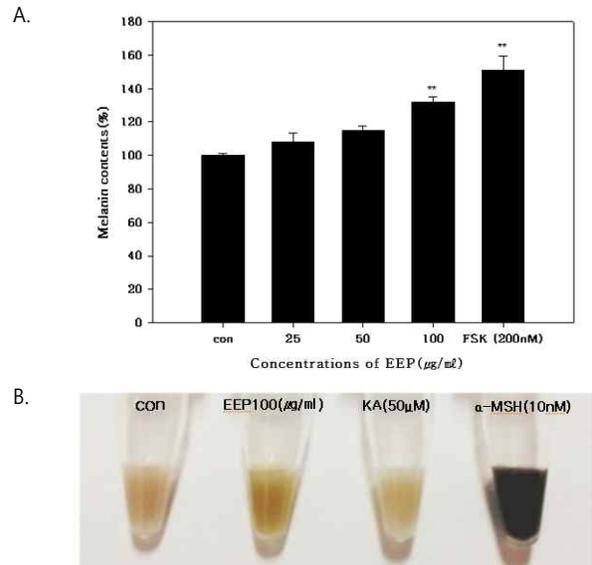


Fig. 2. EEP stimulated the melanin synthesis in B16F10 cells. The cells were treated with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EEP and forskolin 200 nM for 72h. The melanin synthesis was measured as the increase in contents(%) with respect to control cells(100%). Values are means  $\pm$  S.D, N=3(A). The cells were treated with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EEP, kojic acid(KA) 50  $\mu\text{M}$  and  $\alpha$ -MSH 10 nM for 72h. Images show the recovered medium and cell pellet(B).

### 3. 한련초의 tyrosinase 활성 촉진효과

세포내 tyrosinase의 DOPA oxidase 활성에 있어서 한련초에탄올추출물(EEP)의 영향을 살펴보기 위하여 본 실험을 실시하였다. B16F10 세포에서 한련초가 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양된 B16F10 세포에 한련초를 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리하고 72h를 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. 그 결과 한련초에탄올추출물(EEP) 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 102 %, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 113 %, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 127 %로 나타났다. 이를 통해 한련초에탄올추출물(EEP)에 대하여 농도 의존적으로 tyrosinase 활성도가 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3A). Fig. 3B에서는 음성대조군으로 tyrosinase의 활성을 억제하는 효능을 갖는 미백화합물인 kojic acid(KA)<sup>16</sup>을 사용하였고 양성대조군으로 adenylate cyclase를 활성화하여 cAMP의 농도를 상승시키는 것으로 알려진 forskolin(FSK)<sup>17</sup>을 사용하였다. Fig. 3B에서 보는 바와 같이 DOPA 염색을 통해 관찰한 결과, 한련초 처리시 대조군보다 tyrosinase의 DOPA oxidase 활성이 증가하였으며, 수지상돌기가 더 발달하였고 세포의 색깔이 진해지는 것을 관찰하였다. 음성대조군에서는 명확한 변화를 보이지 않았다. 반면 양성대조군인 forskolin(FSK)을 처리한

세포의 색깔이 명확하게 진해진 것을 관찰하였다.

## 고찰

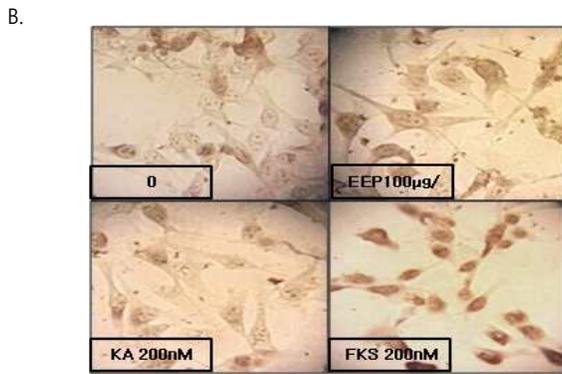
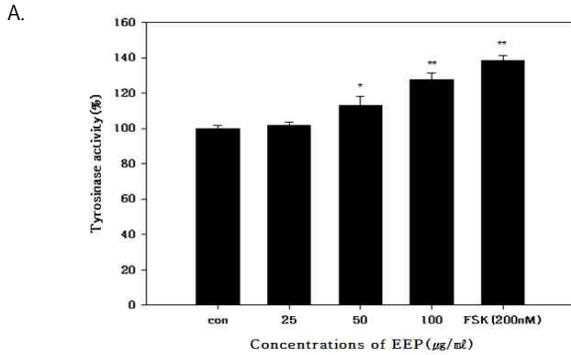


Fig. 3. EEP stimulated the tyrosinase activity in B16F10 cells. The cells were cultured with different concentrations of EEP and forskolin (25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml and 200 nM) for 72h. Tyrosinase activity were measured in B16F10 cells. Values are means ± S.D, N=3(A). The cells were treated with EEP 100 μg/ml, kojic acid(KA) 200 nM and forskolin(FSK) 200 nM. After 72hours, cells were stained with DOPA as described in materials and methods. Cells were photographed with phase contrast inverted microscope (x200)(B).

### 4. 한련초의 멜라닌 합성 관련 단백질 발현 조사

앞서 실험한 한련초에탄올추출물(EEP)는 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성량을 효과적으로 증가시켰는데, 이러한 효소 활성의 증가가 단백질 발현 촉진을 통한 결과인지를 알아보기 위하여 B16F10 세포의 멜라닌 합성 관련 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질들의 발현을 western blot를 통하여 조사하였다. 한련초에탄올추출물(EEP)은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 증가시켰다(Fig. 4).

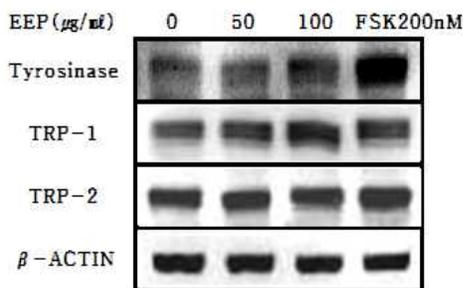


Fig. 4. Effect of EEP on the tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expressions in B16F10 cells. The cells were treated with 50, 100 μg/ml of EEP. After 72h, cells were analysed using western blot as described in materials and methods. Values are means ± S.D, N=3.

백반증은 전체 인구의 0.5~2% 에게 발병하는 비교적 흔한 후천적 탈색소성 질환이다. 경계가 뚜렷한 백색의 반점이나 탈색반이 다양한 크기의 원형이나 불규칙한 모양으로 나타나는데, 피부의 색상 변화 외에는 다른 증상은 거의 없어서 미용상의 결함이 문제가 된다. 이러한 백반증의 병인은 아직 명확하게 밝혀지지 않았는데, 소아 백반증 환자는 가족력이 발견되는 경우가 많아서 유전적 요인이 관계할 것이라고 보고 있다. 또한 자가면역설, 신경체액설, 멜라닌세포 자가파괴설 등의 발병 가설이 있다. 최근에는 이러한 여러 학설이 복합적으로 작용한다는 것이 받아들여지고 있다. 백반증의 치료 방법은 약물치료, 자외선치료, 외과적치료 등 다양하지만 만족스러운 치료법은 없다<sup>18-20</sup>.

한의학에서 백반증은 “白癩”、“白驳风”、“白驳” 혹은 “白处” 이라고 한다. 7세기, 巢元方の 《諸病源候論》에서 처음으로 “백반”이라는 정식 명칭과 병인병기와 증상에 대한 상세한 묘사까지 저술했다<sup>21</sup>. 한의학에서 백반증의 병인병기로는 3가지의 주요 관점이 있다. 巢元方の 《諸病源候論》에서 풍사가 피부에 있고, 혈기가 조화롭지 않다라고 하였다. 王清任의 《醫林改錯》에서는 백반증은 어혈이 피부안에 있다라고 하였으며, 朱仁康의 《中醫外科学》에서는 오랜 병은 몸을 허하게 하고 간신을 쇠약하게 한다고 하였다<sup>22</sup>. 이러한 병인병기를 기준으로 외치법, 내치법을 통한 여러 치료 방법이 응용되고 있지만 한의학과 현대의학 모두에서 백반증의 치료와 예방에 대한 안전하고 탁월한 치료법은 더 연구되어야 한다.

한련초는 습한 땅에서 쉽게 발견되는 일년생 식물이다. 예장(鱧腸), 한련초(旱蓮草), 연자초(蓮子草), 조련자(早蓮子), 금릉초(金陵草), 묵연초(墨烟草), 묵채(墨菜), 저야초(猪牙草)라고 한다. 혈(血)을 맑게 하고 지혈(止血)하며 간신(肝腎)을 보익(補益)해준다<sup>13</sup>.本草綱目中서 李時珍은 한련초는 머리를 검게 하고 신음을 보충한다고 하였다<sup>23</sup>. 또한 동의보감에서 한련초의 효능으로 수염과 머리카락을 자라게 하고, 흰 것을 검어지게 할 수 있다고 소개하였다<sup>24</sup>. 한련초의 성분은 leteolin 7-O-β-D-glucopyranoside, ecliptasaponin C, luteolin, eclalbasaponin IV, apigenin, ecliptasaponin A, echinocystic acid 29-O-β-D-glucopyranoside, echinocystic acid, 3-oxo-16α-hydroxy-clean-12-en-28-cicacid의 9가지로 나타났다<sup>25</sup>. 한련초에 관한 연구로는 Tewtrakul<sup>26</sup> 등의 RAW264.7 macrophage cells을 이용하여 항염 작용을 하는 한련초 성분에 대한 연구와 Manvar<sup>27</sup> 등의 anti-HCV에 대한 한련초의 식물화학물질의 식별과 평가에 대한 보고가 있다. 또한 중의학에서 한련초의 면역조절 작용<sup>28</sup>와 동물실험으로 한련초의 항염작용<sup>29</sup>, 노인성 치매 모델의 동물을 이용한 한련초의 기억력과 해마 신경 전달 물질에 대한 영향<sup>30</sup>에 대한 연구 등이 보고되었다.

피부, 털, 눈에 존재하는 색소인 멜라닌은 유해한 자외선을 흡수하여 자외선으로부터 인체를 보호하는 역할을 하며, 멜라닌의 양에 따라 피부색이 결정된다. 멜라닌은 유멜라닌(eumelanin)과 페오멜라닌(pheomelanin) 두 종류인데, 색깔 뿐만 아니라 그 크기와

모양 등이 다르다<sup>31)</sup>. 하지만 두 멜라닌 모두 tyrosine을 기질로 tyrosinase 의존적인 경로의 생성 과정을 거쳐서 만들어진다. 멜라닌 생성의 생화학적 과정은 표피 기저층의 멜라닌세포의 아미노산인 tyrosine이 tyrosinase의 효소작용과 산화반응을 통해서 3,4-dihydroxy phenylalanine(DOPA), DOPA quinone, DOPA chrome을 거쳐 멜라닌을 형성하게 되는데, 이 과정에서 tyrosinase 뿐만 아니라 TRP-1, TRP-2가 관여한다<sup>32)</sup>. 멜라닌세포는 대부분 멜라닌소체(melanosome)에서 멜라닌을 생성하는데, 멜라닌소체는 멜라닌을 싸서 각질형성세포로 전달시킨다. 1개의 멜라닌세포와 30~40개의 각질형성세포는 표피 멜라닌 단위(epidermal melanin unit)를 형성하며, 멜라닌을 담고 있는 멜라닌소체는 멜라닌 세포의 수지상돌기를 통해 각질형성세포로 전달된다<sup>33)</sup>. 멜라닌 합성과정에 대한 연구로는 자하거 약침액<sup>34)</sup>, 황금(Scutellaria baicalensis)<sup>35)</sup>, 보골지<sup>36)</sup>, 사간(Belamcandae Rhizoma)<sup>37)</sup>, 산수유(Cornis fructus)<sup>38)</sup>, 유백피(Ulmus davidiana var. japonica)<sup>39)</sup> 등이 멜라닌 생성을 촉진시키는 천연물로 연구가 보고된 바 있다. 그러나 한련초의 멜라닌 합성에 관한 실험적 연구는 실시되지 않았다. 따라서 본 연구를 통하여 한련초가 멜라닌합성에 미치는 영향을 알아보고 나아가 한련초를 이용한 백반증 치료에 있어서 그 가능성을 알아보고자 하였다.

본 실험에서는 먼저 한련초에탄올추출물(EEP)의 세포독성여부를 판단하기 위하여 B16F10 세포를 이용하여 MTT법으로 측정하였다. 한련초에탄올추출물(EEP)을 10~150 µg/ml의 농도에서 처리하였고, 그 결과 10~100 µg/ml의 농도에서 80 % 이상의 세포 생존율을 나타냈다. 따라서 B16F10 세포를 이용한 tyrosinase, 멜라닌 합성량, 멜라닌 생성 관련 단백질 발현에서 100 µg/ml 이하의 농도를 사용하였다.

UVB로부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌세포에서 생성되는 멜라닌은 그 생성에 있어서 3가지의 중요한 효소(tyrosinase, TRP-1, TRP-2)가 있다. tyrosinase는 rate-limiting enzyme로써 멜라닌생성에서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>40)</sup>. 따라서 한련초 처리시 tyrosinase의 활성도와 멜라닌 함량의 변화를 통해 한련초의 멜라닌 촉진 효과를 확인해보았다. 한련초가 세포수준에서 tyrosinase 활성을 증가시키는지 알아보기 위한 실험의 결과는 대조군 대비 한련초에탄올추출물(EEP) 50 µg/ml에서 113 %, 100 µg/ml에서 127 % tyrosinase 활성 결과가 나타났다. melanin 합성량은 대조군 대비 한련초에탄올추출물(EEP) 25, 50, 100 µg/ml농도에서 105 %, 113 %, 130 %의 melanin 합성량 증가의 결과가 나타났다. 또한 tyrosinase 활성의 육안적 관찰을 위해 DOPA 염색을 실시하였고, 그 결과 대조군 대비 한련초에탄올추출물(EEP) 처리시 세포의 색깔이 진하게 변한 것을 관찰하였다. western blot을 통해 한련초에탄올추출물(EEP)에 의한 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현 변화를 관찰한 결과, 한련초에탄올추출물(EEP)이 50, 100 µg/ml 일때 tyrosinase, TRP-1 단백질 발현이 농도 의존적인 증가를 보였다. 그러나 TRP-2의 단백질 발현에는 변화가 없었다. 이러한 결과는 한련초가 세포내에서 tyrosinase와 TRP-1 발현을 증가시키고 이를 통하여 멜라닌 합성을 유도하는 것으로 보인다.

이상의 연구 결과를 통해 한련초에탄올추출물(EEP)이 본초강목과 동의보감에서 언급되었던 머리를 검게 하고, 흰 것을 검게 한다는 근거가 제시되었다. 이를 더 명확히 밝히기 위해서는 한련초가 모발에서 멜라닌색소 생성에 미치는 영향을 살펴야 할 것이다. 또한 본 연구 결과가 복잡한 발병기전을 가진 백반증의 치료에 이용되기 위해서는 여러 발병기전에 근거한 좀더 다양하고 깊이 있는 연구와 함께 멜라닌생성에 관한 매커니즘 연구가 이어져야 할 것이다.

## 결 론

한련초의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 B16F10 세포에 한련초에탄올추출물(EEP)을 다양한 농도로 처리한 후 일차적으로 한련초의 세포독성, 멜라닌 합성량의 변화, tyrosinase 활성 및 멜라닌 합성 관련 단백질의 발현 양을 측정하였다. 그 결과 한련초에탄올추출물(EEP)은 세포내의 tyrosinase 활성량과 멜라닌 합성을 증가시켰으며, western blot 결과 tyrosinase 관련 단백질의 발현 역시 증가시켰다. 이러한 결과를 통해 한련초에탄올추출물(EEP)이 고전문헌에서 언급되었던 머리를 검게 하고, 흰 것을 검게 한다는 근거가 제시되었고 이를 근거로 저색소 질환에 관련된 한련초의 다양한 연구를 진행해 볼 가치가 있다.

## References

- Kim, D.S., Park, S.H., Kwon, S.B., Youn, S.W., Park, K.C. Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis. *Chem and Phy of Lipid* 127: 199-206, 2003.
- Chun, H.J., Kim, I.K., Woo, W.H. Inhibitory Effects of Retinoic Acid and Melanization of B16 Melanoma Cell by *Epimedium koreanum* Nakai and  $\alpha$ -MSH. *J of the Korean Chemical Society* 44(6):533-540, 2000.
- Jeon, E.K., Park, Y.O., Seo, Y.J., Park, J.K. Assessment of the quality of life in vitiligo patients. *Korean J Dermatol* 46: 874-880, 2008.
- Korean Dermatological Association. *Dermatology*. 5th ed. Seoul. RMGP. p 491, 2008.
- Lee, Y., Seo, Y.J., Lee, J.H., Park, J.K. Therapeutic effect of the combination of High-dose methylprednisolone pulse therapy and PUVA in vitiligo patients. *Korean J Dermatol* 44: 88-294, 2006.
- Cheong, S.H., Jung, Y., Whang, K.K. Pigment Induction with a Fractional Laser for Vitiligo; A Preliminary Study. *Korean J Dermatol*. 47(5):547-553, 2009.
- Kang, C.H., Hwang, J.Y., Kim, Y.H.. Melanogenesis-Promoting Effects of *Sophora japonica* Methanol Extract in Melan- $\alpha$  Cells.. *J Invest Cosmetol* 11(2):89-96, 2015.
- Ko, J.A., Park, E.Y., Kim, S.N., Kim, Y.C. The Effect of *Epimedium koreanum* Water Extract on the Enzymes and Factor Relevant to Melanin Synthesis in Vitro Test.

- J Investigative Cosmetology 7(1):45-52, 2011.
9. Chun, H.J., Kim, Y.S., Kim, T.Y., Kim, J.J., Ahn, S.H., Jeon, B.H., Woo, W.H.. Effect of Epimedium koreanum Water Extract on the Enzymes and Factor Relevant to Melanin Synthesis in Vitro Test. J. Traditional Korean Medicine 10(2):193-203, 2000.
  10. Lee, E.J., Bae, S.Y., Lee, Y.H. The Stimulatory Effects of Epimedium koreanum Nakai Extract on Melanogenesis. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea 35(4):265-270, 2009.
  11. Lee, J.S., Lee, B.S., Kim, Y.C. Promoting Effects of Soybean Methanol Extract on the Melanogenesis and Tyrosinase Activity. J of Investigative Cosmetaology 9(4):339-345, 2013.
  12. Hong, S.H., Lee, B.S., Kim, Y.H. Rhynchosia nulubilis and Rhynchosia volubilis Ethanol Extracts Upregulate the Expression of Genes Related to Melanogenesis in Melan- $\alpha$  Cells. J Invest Cosmetol 12(2):109-115, 2016.
  13. Shin, M.K. Clinical Traditional Herbalogy. 2nd ed. Seoul, YeongLim's Publisher, p 284, 2006.
  14. Lee, S.D. A Documentary Study on Herb, Dmgs used for Vitiligo. J of Oriental Medicine. 16(2):44-61, 1995.
  15. Hosoi, J.E., Suda, T., Kuroki. T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 $\alpha$ , 25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 45: 1474-1478, 1985.
  16. Lee, S.D. A Documentary Study on Herb, Dmgs used for Vitiligo. Journal of korean medicinel. 16(2):44-61, 1995.
  17. Hwang, J.C., Yun, J.K., Kim, S.K., Lee, S.H., Han, K.H. Mass Pooduction of Chaff-vinegar and Its Effect of Anti-Aging and Whitening. Journal of Microbiology and Biotechnology 40(3):208-214, 2012.
  18. Lerner. A. Vitiligo. J invest dermatol 32: 285-310, 1959.
  19. Bhatia. P.S., Mohan. L., Pandley. N. Genetic naure of vitiligo. J dermatol sci 4: 180-184, 1992.
  20. Kim. S.M., Chung. H.S., Hann. S.K. The genetics of vitiligo in korean patients. Int J dermatol 38: 908-910, 1998.
  21. Tang, H.B., Ye, J.Z., Ouo, Y.X.Y. Preliminary researches of TCM treatment in vitiligo. Chinese Journa e Journal of Aestheti 21(3):530-531, 2012.
  22. Tian, Y.E., Liu, J.J., Yang, K.J. Clinical Observation on the Comprehensive Treatment of Vitiligo. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy 9: 90-91, 2011.
  23. Ding. Y.Q., Liu. P. The Effect of Eclipta prostrata liquid on Delaying Senescence of Skin Tissue. Journal of Traditional Chinese Medicine. 46: 761, 2005.
  24. Park, H.Y., Wu, C., Yonemoto, L., Murphy-Smith, M., Wu, H., Starchur, C.M., Gilcrest, B.A. MITF mediates cAMP-induced protei kinase C- $\beta$  expression in human melanocytes. Biochem J 395: 571-578, 2006.
  25. Huh Joon. Donguibogam Part2. Seoul, humanist books, p 1813, 2008.
  26. Han, L., Kojo, A., Zhao, J., Li, W., Zhang, Y., Wang, T., Gao, X. Qualitative and Quantitative Analysis of Eclipta prostrata L. By LC/MC. The Scientific World Journal. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/980890>.
  27. Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Tansakul, P., Cheenpracha, S., Karalai, C. Antiinflammatory Constituents from Eclipta prostrata using RAW264.7 Macrophage Cells. Phytotherapy research 25: 1313-1316, 2011.
  28. XU, X.H., HAO, P.F., YANG. Y., Zhang, H.J. Effect of the Polysaccharide from Eclipta prostrata L. on Immune Function of Mice. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae. 5: 181-182, 2010.
  29. Hu. H.J., Zhou. D.R., Hang. B.Q., Ma. W. Antiinflammatory Effects Of Herba Eclipta Prostrata. Journal of china pharmaceutical university. 26(4):226-259, 1995.
  30. Wang. A.M., Geng. R.J., Li. Y., Chen. Y.Q., Wei. X.M., Zhang. S., Zhang. T. Effect of Eclipta on Learning and Memory and Hippocampal Neurotransmitters in the Senile Dementia Model Rats. Journal of Basic Chinese Medicine. 3: 332-335, 2016.
  31. Manvar, D., Mishra, M., Kumar, S., Pandey, V., N. Identification and evaluation of anti Hepatitis C Virus phytochemicals from Eclipta alba. J Ethnopharmacol 144(3):545-554, 2012.
  32. Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., Wortsman, J. Melanin Pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Physiol Rev 84: 1155-1228, 2004.
  33. Tsukamoto, K., Jackson, I.J., Urabe, K., Montague, P.M., Hearing, V.J. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. The Journal of the European Molecular Biology Organization 11(2):519-256, 1992.
  34. Seo, H.S. The Effects of Hominis Placenta Extract on Melanon Synthesis of B16 Melanoma Cells. J of Pharmacopuncture. 9(1):75-82, 2004.
  35. Cho, N.C., Bai, S., Chin, J.E. Effects of Scutellaria baicalensis Extracts on Tyrosinase Gene Expression in B16 Melanoma Cells. Korean J. Food and Nutr 23(1):118-123, 2010.
  36. Chung, J.H., Seo, H.S. The Effects of Psoraleae fructus

- Extrant on Increase in Melanin Synthesis of B16 Melanoma Cells. *J Korean Oriental Med* 26(3):55-65, 2005.
37. Sung, B.G., Lee, S.J., Kim, P.J., Seo, H.C., Kim, D.S., Mun, Y.J., Woo, W.H., Lim, K.S. Effect of Ethanol Extract of *Belamcandae Rhizoma* on Dermal Bioactive Properties. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 21(1):104-112, 2008.
38. Choi, W.Y., Chun, H.J., Lee, J.H., Baek, S.H. Effects of Methanol Extract from *Cornis fructus* on Melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn* 34(1):70-74, 2003.
39. Chun, H.J., Jeong, S.I., Kim, I.H. Effects of Ethyl Acetate Extract from *Ulmus davidiana var japonica* on Melanogenesis. *Kor. J. Pharmaceutical Soc.* 45(6):724-729, 2001.
40. Ken. I., George. E., Hoganson., Raffaele. P., Mark. A., Everett., Bryan. B., Fuller. Role of Tyrosinase as the Determinant of Pigmentation in Cultured Human Melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology.* 6: 806-811, 1993.