

Original Article / 원저

## 한련초 에탄올 추출물의 멜라닌 합성 경로에 대한 연구

박인혜<sup>1)</sup> · 홍석훈<sup>1)</sup> · 우원홍<sup>2)</sup> · 문연자<sup>2)3)</sup> · 차수빈<sup>2)3)</sup>

<sup>1)</sup>원광대학교 한의과대학 안이비인후과학교실

<sup>2)</sup>원광대학교 한의과대학 해부학교실

<sup>3)</sup>원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

### A Study of Melanin Synthesis Pathway of the Ethanol extract of *Eclipta prostrata* In Vitro Study

*In-Hae Park*<sup>1)</sup> · *Seok-Hun Hong*<sup>1)</sup> · *Won-Hong Woo*<sup>2)</sup> · *Yeun-Ja Mun*<sup>2)3)</sup> · *Su-Bin Cha*<sup>2)3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University

<sup>2)</sup>Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

<sup>3)</sup>Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang University

### Abstract

**Objectives** : This Study was conducted to investigate the melanin synthesis effect of *Eclipta prostrata* and to determine the relationship between melanin synthesis effect of *Eclipta prostrata* and cAMP/PKA melanin synthesis pathway.

**Methods** : We measured melanin contents, tyrosinase activity, expression of TRPs, p-CREB in B16F10 cells cultured with *Eclipta prostrata* ethanol extracts(EEP). And after treatment with H89 and dibutyryl cAMP, which inhibit or promote the activation of PKA, we observed changes in melanin synthesis and tyrosinase activity stimulated by EEP.

**Results** : EEP increased melanin synthesis by promoting the expression of tyrosinase and TRP-1. It also promoted expression of p-CREB. H89 suppresses melanogenic effect and expression of tyrosinase, TRP-1 in B16F10 stimulated by EEP. Dibutyryl cAMP promotes melanogenic effect of EEP.

**Conclusions** : The results of this study suggest that melanin synthesis effect of EEP is related to induction of tyrosinase and TRP-1 expression through the cAMP/PKA pathway.

**Key words** : *Eclipta prostrata*, melanin

## I. 서론

인체의 피부와 모발의 색을 결정하는 색소인 멜라닌은 표피 기저층의 멜라닌 세포에서 합성되어 방출되며<sup>1)</sup>, 자외선을 흡수 또는 차단하거나 활성 산소의 소거 등을 통해 피부를 보호하는 기능을 가진다<sup>2)</sup>. 멜라닌 색소의 형성은 멜라닌 세포 내의 멜라닌소체에서 이루어지며, 멜라닌 소체는 가지돌기 끝으로 옮겨져 각질형성세포의 탐식에 의해 이동한다. 이러한 과정의 이상으로 멜라닌세포가 파괴되는 경우, 혹은 멜라닌을 합성할 수 없거나 적절하게 각질형성세포로 멜라닌을 전달할 수 없는 경우, 저색소 질환이 발생하게 된다<sup>1)</sup>.

멜라닌 색소의 부족으로 인한 저색소 질환은 피부 손상 및 외관상의 불만족을 유발해 사회활동에 지장을 줄 수 있으며<sup>3)</sup>, 치료법으로 국소 또는 전신 스테로이드 치료, 광선요법, 광화학 요법 및 수술요법 등이 제시되고 있으나 아직 완벽한 치료법은 없는 상황이다<sup>4)</sup>. 저색소 질환에 응용할 수 있는 천연물에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있는데, 회화나무<sup>5)</sup>, 음양곽<sup>6-9)</sup>, 대두<sup>10)</sup>, 쥐눈이콩과 여우콩<sup>11)</sup>, 황금<sup>12)</sup>, 보골지<sup>13,14)</sup>, 산수유<sup>15,16)</sup> 등이 *in vitro*에서 멜라닌 합성을 촉진한다는 결과가 보고된 바 있다.

아울러 이<sup>17)</sup>는 허증 백반증 치료에 한련초를 활용 가능하다고 언급하였다. 한련초는 쌍떡잎식물인 초롱꽃목 국화과의 한해살이풀인 한련초(*Eclipta prostrata*)의 전초를 건조한 것으로<sup>18)</sup> wedelolactone이 함유되어 있어 과거 흰 머리카 수염을 검게 염색하는 염료로 사용하기도 하였으며<sup>19)</sup>, 동의보감에 ‘長鬚髮, 令變白爲黑’의 효능이 있다고 언급하고 있으나<sup>20)</sup>, 한련초가 색소 침착에 미치는 영향에 대한 실험 연구는 미비한 실정이다.

이에 허증 백반증 치료에 활용 가능한 한련초의 멜라닌 합성 촉진 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포를 이용하여 한련초 에탄올 추출물의 멜라닌 생합성 효과와 주요 멜라닌 합성 신호 전달 경로 중 하나인 cAMP/PKA 경로에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시료

실험에서 사용된 한련초는 (주)윌니허브에서 구입한 것으로 국내에서 채매된 것을 사용하였다. 한련초 200g에 94% 에탄올 2 l를 가하여 3일 동안 실온에서 추출하였고, 침전물을 여과한 후 감압 농축하여 한련초에탄올추출물(Ethanol extracts of *Eclipta prostrata*, 이하 EEP) 6.6g(수율 3.3%)의 시료를 얻었다. 시료는 냉동실에 보관하였으며 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

#### 2) 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(NY, USA), dimethyl sulfoxide(DMSO), bovine serum albumin(BSA), triton X-100, ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), goat polyclonal IgG tyrosinase, TRP-1, TRP-2, phosphor-CREB는 Santa Cruz사(CA, USA), CREB는 Cell signalling사(MA, USA), anti-Goat, anti-Rabbit, anti-Mouse IgG HRP conjugate antibody, hybond-ECL nitrocellulose membrane, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED), L-3,4-dihydroxyphenyl alanine(L-DOPA), H-89 dihydrochloride hydrate, Dibutyl cAMP는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA), Western Blotting detection

Corresponding author : Hong Seok-Hoon, Jeonju Wonkwang University Korean Medicine Hospital, Garyeonsanro 99, Jeonju city, Jeonbuk, South Korea,  
(Tel : 063-270-1020, E-mail : castlegate@hanmail.net)

● Recieved 2017/10/2 ● Revised 2017/11/10 ● Accepted 2017/11/17

reagent는 Amersham Biosciences사(Buckinghamshire, England), non-fat milk는 Becton사(Le Pont de Claix, France), 단백질 정량 시약은 Bio-Rad사(CA, USA) 제품을 사용하였다.

### 3) 사용기기

원심분리기(centrifuge HA-12, micro 17TR centrifuge), clean bench, CO<sub>2</sub> incubator는 한일기기사(Inchun, Korea), ELISA reader는 Bio-T사(Winooski, USA), Electrophoresis power supply는 Amersham사(Buckinghamshire, England), Chemi-Doc image analysis는 Bio-Rad사(CA, USA), 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  $\mu\text{g/ml}$  penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  amphotericin B를 첨가하여 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포 생존율 측정

세포생존율은 Mosmann의 방법<sup>21)</sup>에 의하여 실시하였다. 24-well 배양 용기에  $2 \times 10^4$  개씩 분주하고 48 시간 배양 후 EEP를 여러 농도로 처리한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 2일간 배양하였다. 배양 후 100  $\mu\text{l}$ 의 MTT 용액을 넣어 4시간 배양한 다음 상층액을 제거한 후 DMSO 1ml 녹여서 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2) Mushroom tyrosinase 활성 측정

L-DOPA는 2mg/ml를 potassium phosphate buffer(0.1M, pH 6.8) 160  $\mu\text{l}$ 로 완전히 녹이고 96-well microplate에 mushroom tyrosinase는 2,500units/ml, EEP 10  $\mu\text{l}$  또는 음성대조군 KA 50  $\mu\text{M}$ , 양성대조군 FSK 500nM과 함께 넣어 37°C에서 각각 30분, 1시간 반응시킨 후 475nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) 멜라닌 합성량 측정

멜라닌 정량은 Hosoi 등의 방법<sup>22)</sup>을 변형하여 사용하였다. 10cm 배양용기에 B16F10 세포를  $1 \times 10^5$ 개씩 분주하여 2일간 배양한 후, EEP 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ , 양성대조군 FSK 500nM 씩 처리한 다음 3일간 배양하였다. 또한 H89 처리군은 H89 1.5  $\mu\text{M}$ 을 전처리하고 한 시간 후 EEP를 100  $\mu\text{g/ml}$  처리하였고, dbcAMP 처리군은 dbcAMP 15분 전처리 후 EEP를 100  $\mu\text{g/ml}$  처리하여 배양하였다. 이후 각 군당  $2 \times 10^6$ 개씩 수거하여 lysis buffer(5mM EDTA, 0.1M SPB(pH 6.8), 1% Triton X-100)로 세포를 용해하였다. 원심 분리하여 얻은 세포 침전물을 알코올로 세척한 후 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액으로 90°C에서 1시간 용해하여 475nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법<sup>23)</sup>으로 측정하였다. 6cm 배양용기에 B16F10 세포를  $3 \times 10^4$ 개씩 분주하여 부착시킨 후, EEP를 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ , 양성대조군 FSK 500nM 씩 처리하였다. H89 처리군은 H89 1.5  $\mu\text{M}$ 을 전처리하고 한 시간 후 EEP를 100  $\mu\text{g/ml}$  처리하였고, dbcAMP 처리군은 dbcAMP 15분 전처리 후 EEP를 100  $\mu\text{g/ml}$  처리하여 배양 하였다. 이후 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고, 5mM EDTA가 포함된 0.1M sodium phosphate buffer(SPB, pH 6.8)에 1%(V/V) triton X-100과 0.1%(V/V) 0.1M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 분주하고 세포를 수거하여 얼음에서

30분간 용해시킨 후, 4℃ 15,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 시약으로 595nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산하여 0.1M SPB(pH 6.8)의 총량이 150 $\mu$ l이 되도록 분주하고 0.1%(W/V) L-DOPA를 50 $\mu$ l씩 분주하여 37℃에서 30분 반응시켜서 475nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

### 5) Western blot 분석

B16F10 세포를 10cm 배양용기에 1 $\times$ 10<sup>5</sup>개씩 세포를 부착시키고 EEP 50, 100 $\mu$ g/ml, 양성대조군 FSK 500nM 처리한 다음 3일 동안 배양하였다. H89 처리군은 H89 1.5 $\mu$ M을 한 시간 전처리한 후 EEP를 100 $\mu$ g/ml 처리하여 배양하였다. 배양된 세포를 냉장된 PBS로 세척한 후 수거하여 lysis buffer(1x RIPA buffer 1ml, 1% protease inhibitor)로 얼음 위에서 30분간 용해시킨 후, 4℃ 13,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 단백질은 Bradford 시약을 이용하여 정량하였고, 계산된 단백질과 2x sample buffer(1ml glycerol, 0.5ml B-mercaptoethanol, 3ml 10% SDS, 1.25ml 1M 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 milk로 blocking 시킨 후, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, CREB, p-CREB antibody를 반응시켰다. TBST(tris-buffered saline and polysorbate 20)로 5회 세척한 후, 2차 antibody를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 세척한 후 ECL 용액으로 발색한 후 ChemiDoc를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

### 6) 통계처리

실험 결과는 student's t-test를 이용하여 p-value를 구하였으며, p<0.05인 경우 \* 또는 #, p<0.01인 경우 \*\* 또는 ##로 유의성이 있다고 표시하였다.

## III. 결 과

### 1. EEP의 세포 생존율 검사

B16F10 세포의 EEP에 대한 세포 독성을 알아보기 위하여 EEP 10, 50, 100, 150 $\mu$ g/ml로 72시간 처리 후 MTT assay로 세포생존율을 측정하였다. 실험 결과 대조군에 비해 EEP 10 $\mu$ g/ml 농도에서 99%, 50 $\mu$ g/ml 농도에서 92%, 100 $\mu$ g/ml 농도에서 82%, 150 $\mu$ g/ml 농도에서 34%의 세포 생존율을 보였다(Fig. 1).

### 2. EEP가 mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향

Mushroom tyrosinase를 이용한 cell-free 시스템에서 EEP의 tyrosinase activity를 측정된 결과, EEP의 25 $\mu$ g/ml 농도에서 130%, 50 $\mu$ g/ml 농도에서 210%,

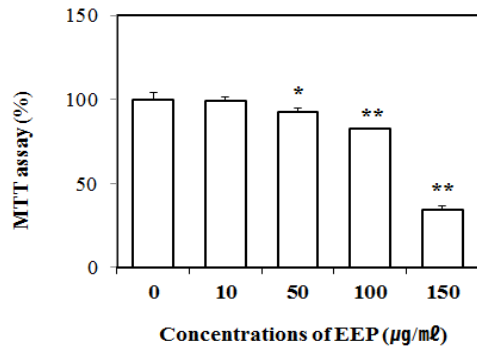


Fig. 1. B16F10 Cells Viability of EEP.

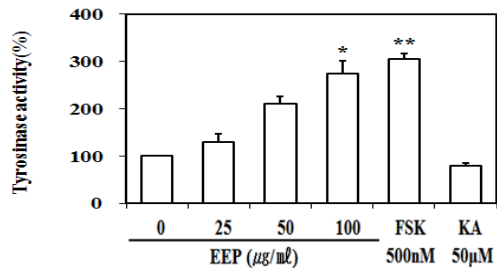


Fig. 2. Effect of EEP on the Tyrosinase Activity in a Cell-free System.

100 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 275%로 mushroom tyrosinase 활성도가 증가하였으며, 양성대조군인 FSK의 경우 305%, 음성대조군인 KA의 경우 80%의 mushroom tyrosinase 활성도를 나타내었다(Fig. 2).

### 3. EEP의 B16F10 세포 내 멜라닌 합성 유도 효과

B16F10 세포에서 EEP의 멜라닌 합성 유도 효과를 확인하기 위하여 배양된 B16F10 세포에 EEP 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ , 양성대조군 FSK 500nM 씩 처리한 다음 72시간 배양한 후 멜라닌 합성량을 측정하였다. 실험 결과 EEP는 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 108%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 115%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 133%로 멜라닌 합성량을 증가시켰으며, 양성대조군인 FSK를 500nM 처리한 결과 151%의 멜라닌 합성량이 증가하였다(Fig. 3-A).

또한 EEP 100 $\mu\text{g/ml}$ , 양성대조군 FSK, 음성대조군 KA 처리군을 처리한 후 72시간 배양하여 배양된 알갱이(pellet)를 육안으로 관찰한 결과에서도 색의 변화를 통해 EEP의 멜라닌 합성 유도 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 3-B).

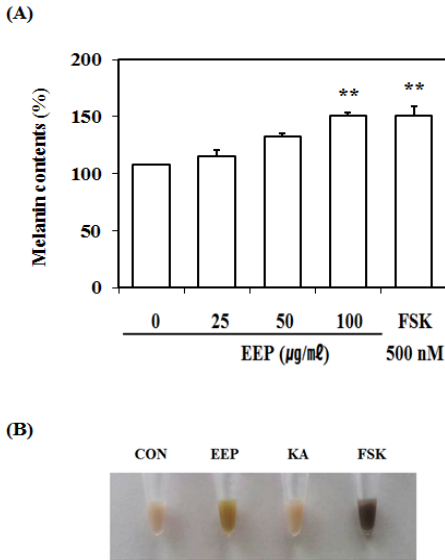


Fig. 3. Effect of EEP on the Melanin Synthesis in B16F10 Cells.

### 4. EEP의 B16F10 세포 내 tyrosinase 활성 촉진 효과

B16F10 세포에서 EEP가 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양된 B16F10 세포에 EEP 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$  처리하고 72시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. 실험 결과 EEP 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 101%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 112%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 127%로 농도 의존적으로 tyrosinase 활성도가 증가하는 것을 알 수 있었으며, 양성대조군인 FSK 500nM에서는 138%의 tyrosinase 활성도를 나타내었다(Fig. 4).

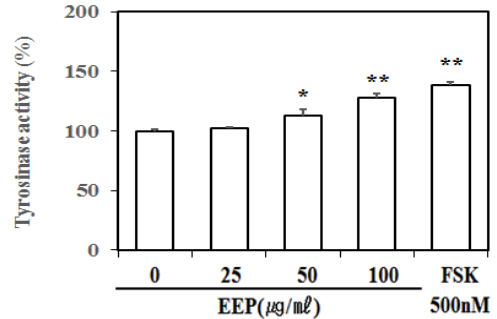


Fig. 4. Effect of EEP on the Tyrosinase Activity in B16F10 Cells.

### 5. EEP에 의한 멜라닌 합성 관련 단백질 발현 조사

B16F10 세포의 멜라닌 합성 관련 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현을 western blot를 통하여 조사하였다. Tyrosinase의 경우 EEP 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 116%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 138%의 발현 증가를 보였으며, TRP-1은 EEP 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 122%, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 198%의 발현 증가를 보였으나, TRP-2의 경우 변화는 관찰되지 않았다. 양성대조군 FSK 500nM에서는 tyrosinase의 경우 171%, TRP-1의 경우 252%의 발현 증가를 나타내었다(Fig. 5).

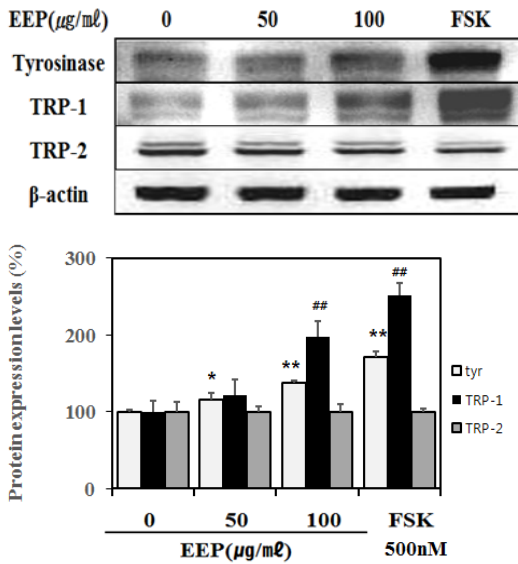


Fig. 5. Effect of EEP on Expression of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B10F10 Cells.

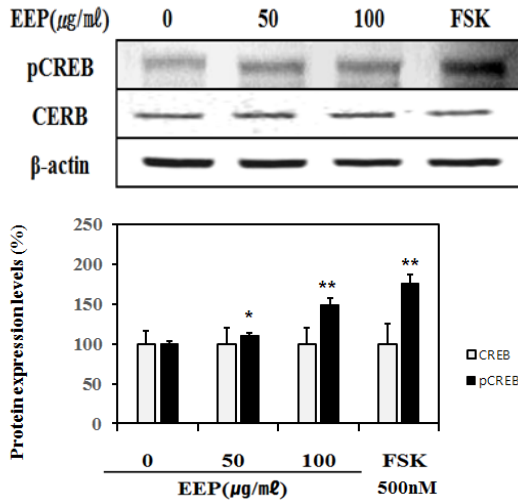


Fig. 6. Effect of EEP on the Expression of Phosphorylation CREB and CREB in B10F10 Cells.

### 6. EEP의 CREB 인산화 촉진 효과

B16F10 세포에 EEP 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$  및 양성 대조군 FSK 500nM 처리한 후 6시간이 경과한 다음 CREB와 인산화된 CREB를 western blot을 통해 측정하였다. 단백질 수준에서 한련초 50 $\mu\text{g/ml}$  처리군에

서 111%, 100 $\mu\text{g/ml}$  처리군에서 149%로 인산화된 CREB의 증가를 관찰되었다(Fig. 6). 이를 통해 한련초의 멜라닌 합성 과정은 CREB의 인산화를 통해 촉진됨을 확인하였다.

### 7. H89 inhibitor에 의한 EEP의 멜라닌 합성 촉진 효과 억제

PKA 억제제인 H89를 처리한 후 멜라닌 합성량의 변화를 관찰하였다. H89만을 처리한 경우 멜라닌 합성량은 81%로 감소하였고, EEP 100 $\mu\text{g/ml}$ 만 처리한 경우 136%, EEP 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 H89를 공동처리한 경우에는 111%의 멜라닌 합성량 변화가 관찰되었다(Fig. 7-A).

알갱이(pellet)을 통해 세포의 색 변화를 관찰한 결과 H89 단독 처리한 경우 멜라닌 합성량이 감소하여 밝게 나타났으며, EEP만을 처리한 경우 멜라닌 합성량이 증가하여 어둡게 나타났다. EEP과 H89를 공동 처리한 경우에는 EEP 단독 처리보다 밝게 관찰되었다(Fig. 7-B).

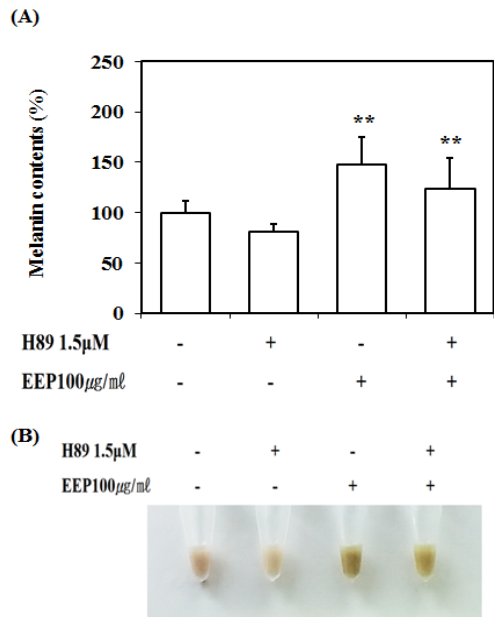


Fig. 7. H89 Suppress Effect of EEP on the Melanin Synthesis in B16F10 Cells.

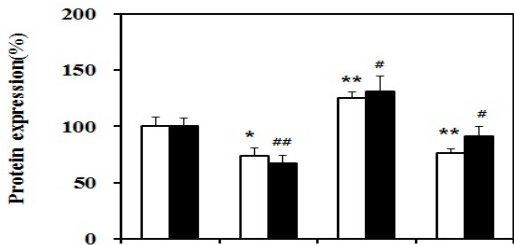
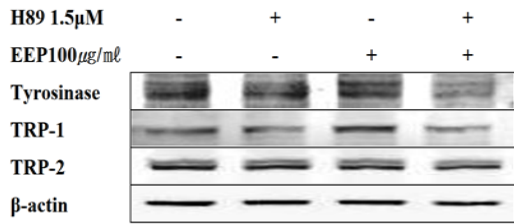


Fig. 8. H89 Suppress Expression of Tyrosinase, TRP-1 in B10F10 Cells.

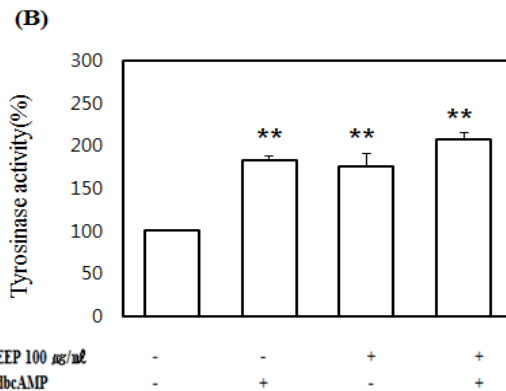
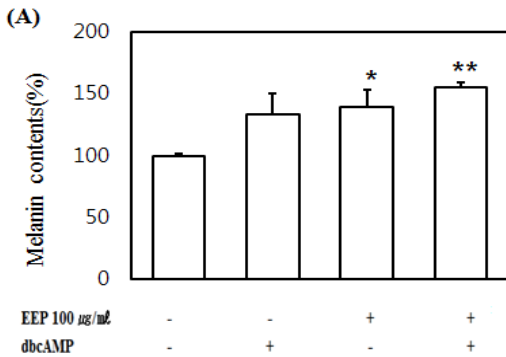


Fig. 9. Dibutyl cAMP Stimulate Effect of EEP on the Melanin Synthesis in B10F10 Cells.

### 8. H89에 의한 EEP의 tyrosinase 활성 촉진 효과 억제 및 단백질 발현 조사

Tyrosinase 활성도의 경우 H89 단독 처리 시 72%, EEP의 100 μg/ml의 단독 처리시에는 202%, EEP 100 μg/ml와 H89를 공동 처리한 경우 141%의 tyrosinase 활성도가 나타났다.

Western blot으로 확인한 tyrosinase 단백질 발현은 H89 단독 처리시에는 대조군에 비해 74%로 감소하였고, EEP 100 μg/ml의 단독 처리시에는 126%로 증가되었다. EEP 100 μg/ml와 H89 공동 처리한 경우에는 76%의 tyrosinase 단백질 발현량이 나타났다.

TRP-1의 경우 H89 단독 처리 시에는 대조군에 비해 67% 감소하였으며, EEP 100 μg/ml의 단독 처리 시에는 131%로 증가되었다. EEP 100 μg/ml와 H89 공동 처리한 경우에는 91%의 TRP-1 발현량이 나타났다. TRP-2의 경우에는 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 8).

### 9. dbcAMP에 의한 EEP의 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성 촉진

PKA의 발현을 유도할 수 있는 dbcAMP를 처리한 후 멜라닌 합성량의 변화를 관찰하였다. dbcAMP만을 처리한 경우 멜라닌 합성량은 134%로 증가하였고, EEP 100 μg/ml만 처리한 경우 140%, EEP 100 μg/ml와 dbcAMP를 공동 처리한 경우에는 155%의 멜라닌 합성량 변화가 관찰되었다(Fig. 9-A).

Tyrosinase 활성도의 경우 dbcAMP 단독 처리 시 184%, EEP의 100 μg/ml의 단독 처리 시에는 175% 증가하였으며, EEP 100 μg/ml와 dbcAMP를 공동 처리한 경우 208%로 tyrosinase 활성도가 증가되었다 (Fig. 9-B).

#### IV. 고찰

멜라닌은 피부나 모발의 갈색 또는 검은색의 근원이 되는 유멜라닌(eumelanin)과 황색 또는 적갈색 색조를 주는 페오멜라닌(pheomelanin) 두 종류가 있다<sup>1)</sup>. 두 멜라닌 모두 tyrosine을 기질로 tyrosinase의 효소작용과 산화반응으로 통해서 3,4-dihydroxy phenylalanine(DOPA), DOPA quinone, DOPA chrome을 거쳐 형성되는데, 이 과정에서 tyrosinase 뿐만 아니라 TRP-1, TRP-2가 관여한다<sup>24)</sup>.

멜라닌 생성은 여러 가지 복잡한 생화학적 경로를 통해 매개되는데, 여러 연구를 통해 cAMP/PKA 의존 경로<sup>25)</sup>, PKC 의존 경로<sup>26)</sup>, NO와 cGMP<sup>27)</sup> 신호전달 과정을 통한 멜라닌 생성 경로 등이 알려져 있다<sup>28)</sup>. cAMP가 멜라닌 합성을 조절하는 기전은 여러 효소, 이온 채널 및 조절 단백질 등을 인산화하는 PKA의 활성화와 관련이 있다. PKA는 멜라닌 합성 과정 중 mRNA가 폴리펩타이드로 번역된 후의 조정 작용에 관여하며<sup>29)</sup>, phenylalanine을 tyrosine으로, tyrosine을 DOPA로 각각 전환시키는 PH(phenylalanine hydroxylase)와 TH(tyrosine hydroxylase) 역시 PKA 의존성 세린 잔기의 인산화 반응에 의해 통제된다<sup>24)</sup>. PKA에 의해 활성화되는 전사 활성화는 CREB(cAMP responsive element binding protein)과 CBP(CREB binding protein)의 인산화와 연관되어 있다<sup>30)</sup>. 인산화된 CREB는 유전자의 CRE 영역과 결합하여 CBP와 상호작용하고 이를 통해 MITF의 발현이 활성화된다. MITF는 tyrosinase, TRP1, TRP2의 프로모터 영역에 존재하는 M-box와 E-box와 결합하여 표적 유전자의 전사를 조절한다. tyrosinase와 TRP1 유전자의 프로모터에는 CRE가 없기 때문에 cAMP에 의한 멜라닌 합성의 전사 조절은 대부분 MITF에 의해서 조정된다. 그러나 TRP2의 전사는 CREB가 CRE와 직접 결합함으로써도 활성화될 수 있다고 알려져 있다<sup>31)</sup>.

cAMP/PKA 경로 외에도 cAMP는 멜라닌 합성 조

절에 관여한 여러 세부 경로들을 활성화한다. cAMP는 후속 조절 요소인 PI(phosphatidylinositol 3-Kinase)와 Akt의 활성을 감소시킴으로서 단계적으로 GSK3 $\beta$ (glycogen synthase kinase 3  $\beta$ )의 인산화를 감소시켜 활성을 촉진한다. 이렇게 활성화된 GSK3 $\beta$ 는 MITF의 Ser298번 잔기를 인산화하여 tyrosinase promoter와의 결합력을 증가시킨다<sup>32)</sup>. 그 외에도 cAMP가 Rho family의 GTPase를 활성화시킴으로서 멜라노솜의 전달 경로인 수지상돌기의 합성을 촉진하여 멜라닌 생성을 증가시킨다는 보고도 있다<sup>25)</sup>.

멜라닌 합성과 관련한 PKC 경로에 대한 연구로는 PKC의 내생적 활성화제인 diacylglycerol이 cell culture와 in vivo에서 모두 멜라닌 합성을 촉진하는 것으로 보고된 바 있으며, PKC의 inhibitor들이나 PKC의 세포 감소는 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 보고된 바 있다<sup>24)</sup>. PKC와 PKA 경로는 cAMP에 의한 유전자 전사의 촉진을 통해 서로의 멜라닌 생성 효과를 증폭시킬 수 있다고 알려져 있다<sup>33)</sup>.

멜라닌 생성을 증가시키는 또다른 경로는 NO(nitric oxide)와 cGMP에 의해 활성화되는데, 특히 자외선 조사에 의한 멜라닌 생성 촉진은 melanocyte에서 NO의 국소적 생산 증가 및 cGMP 합성을 촉진하는 guanylate cyclase의 활성화와 연관이 있을 것으로 추측되고 있다<sup>27)</sup>.

한련초는 性は 寒하고 味는 甘酸하며, 肝腎經에 入하여 涼血, 止血, 補腎, 益陰의 효능이 있어 吐血, 咯血, 鼻出血, 尿血, 血便, 血痢, 刀傷出血 등 각종 출혈성 질환과 鬚髮早白 등을 치료한다<sup>18)</sup>. 각종 실험 연구를 통해 한련초의 지혈 작용<sup>34)</sup>, 항균<sup>35)</sup> 및 항염증<sup>36,37)</sup> 효과, 혈당강하 효과<sup>38,39)</sup>, 면역 증강 및 항암 효과<sup>40)</sup>, 간섬유화 억제 활성<sup>41)</sup> 등이 보고되었으나, 허증 백반증 치료에 한련초를 활용 가능하다고 언급한 이<sup>17)</sup> 외에 한련초의 색소 침착과 관련한 연구는 없었다. 이에 선행연구<sup>42)</sup>로 B16F10 세포에 EEP 처치 후 멜라닌 합성량 및 관련 효소 활성을 측정하여 EEP가 tyrosinase, TRP-1의 발현 및 멜라닌 생합성을 유의



하게 증가시키는 것을 확인하였다.

이어 EEP의 멜라닌 생합성 촉진 효과와 cAMP/PKA 경로와의 연관성을 밝히기 위하여 B16F10 세포에 EEP 처리 후 cAMP/PKA 경로의 하위 신호 전달 과정인 CREB의 인산화에 미치는 영향을 확인하고, PKA의 활성화를 각각 촉진 및 억제할 수 있는 dbcAMP와 H89 inhibitor의 처리에 의한 한련초의 멜라닌 생합성 효과의 변화를 관찰하였다.

먼저 EEP의 세포 독성을 판단하기 위하여 B16F10 세포를 이용하여 MTT법으로 측정하였다. EEP를 10, 50, 100, 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 처리한 결과 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 82% 이상의 세포 생존율을 나타냈다. 따라서 B16F10 세포를 이용한 tyrosinase, 멜라닌 합성량, 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에서 100  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도를 사용하였다.

Cell-free 시스템 및 B16F10 세포에서의 EEP의 tyrosinase 활성 촉진 효과를 확인한 결과 EEP가 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. B16F10 세포에서의 melanin 합성량 역시 EEP 처리 후 농도 의존적으로 증가하여 선행 연구의 결과를 유사하게 재현하였다. 이러한 작용은 western blot을 통해 확인한대로 B16F10 세포에서 EEP가 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 증가시킴으로써 나타난 것으로 생각된다.

B16F10 세포에 EEP 처리 후 6시간이 지나서 p-CREB와 CREB를 western blot을 통해 측정된 결과 EEP 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 p-CREB의 발현이 149% 증가함을 확인하였다. EEP의 tyrosinase 및 TRP-1의 활성 촉진은 p-CREB의 발현 증가를 통하여 이루어지는 것으로 추측되며, 이러한 가설을 뒷받침하기 위해서는 추가 실험을 통해 경로 상 CREB의 하위 신호 전달 인자인 MITF 발현량 증가를 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

또한 PKA 선택적 억제제인 H89 inhibitor를 처리한 결과, EEP 단독 처리된 B16F10 세포에 비해 멜라닌 합성량과 tyrosinase 활성도가 모두 감소되는 것이

관찰되었다. western blot을 통해서도 EEP에 의해 발현이 증가되었던 tyrosinase와 TRP-1 단백질이 H89와 EEP를 함께 처리한 샘플에서는 발현이 감소되는 것을 볼 수 있었다. 반대로 PKA의 활성화를 유도할 수 있는 dbcAMP를 처리한 결과, EEP에 의한 B16F10 세포의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도의 증가가 보다 촉진되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 EEP의 멜라닌 합성 효과가 cAMP/PKA 경로 중 상위 단계인 PKA 활성화와 연관이 있다는 것을 시사한다.

이상의 결과를 통해 EEP는 B16F10 세포에서 cAMP/PKA 경로 중 PKA의 활성화와 CREB의 인산화를 유도하여 멜라닌 합성 단백질인 tyrosinase 및 TRP-1의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 한련초가 멜라닌 생합성 촉진 효과를 통해 백반증 등의 저색소 질환의 치료제로서 응용 가능성이 있는 약재임을 의미하며, 보다 명확하게 한련초의 멜라닌 합성 촉진 기전을 정립하기 위해서는 EEP가 cAMP/PKA 경로의 다른 주요 신호 전달 물질인 cAMP, PKA, MITF 등의 발현량에 미치는 작용을 확인하고, cAMP/PKA 경로 외의 멜라닌 생성 관련 경로들과 한련초와의 연관성을 조사하는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결론

백반증 등 저색소질환 치료제로서 한련초의 응용 가능성을 확인하기 위하여 EEP의 멜라닌 생합성 촉진 효과를 관찰하였다. B16F10 세포를 이용하여 EEP의 멜라닌 합성량과 tyrosinase 활성을 측정하고, tyrosinase, TRP, p-CREB 등의 단백질 발현을 조사하였으며, 아울러 cAMP/PKA 경로에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 PKA의 활성을 억제 또는 촉진하는 H89와 dbcAMP 처리에 따른 EEP의 작용 기전을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EEP은 B16F10 세포에서 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰다.
2. EEP은 B16F10 세포에서 tyrosinase, TRP-1 단백질 발현을 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰다.
3. EEP은 B16F10 세포에서 CREB의 인산화를 유의하게 촉진시켰다.
4. H89를 처리한 결과, EEP 단독 처리된 B16F10 세포에 비해 멜라닌 합성량과 tyrosinase 활성도가 감소되었고, tyrosinase, TRP-1 발현 또한 감소되었다.
5. dbcAMP를 처리한 결과, EEP 단독 처리된 B16F10 세포에 비해 멜라닌 합성량과 tyrosinase 활성도가 보다 증가되었다.

이상의 결과 EEP는 B16F10 세포에서 cAMP/PKA 경로 중 CREB의 인산화와 PKA의 활성화를 통해 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 촉진시켜 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 사료된다.

## References

1. Korean Dermatological Association, Dermatology, 5th, Seoul:RMGP, 2008:17, 491.
2. Hill HZ, Li W, Xin P, Michell DL, Melanin; A two edged sword? Pigment Cell Res, 1997;10:158-61.
3. Jeon EK, Park YO, Seo YJ, Park JK, Assessment of the quality of life in vitiligo patients. Korean J Dermatol, 2008;46:874-80.
4. Cheong SH, Jung Y, Whang KK, Pigment induction with a fractional laser for vitiligo ; A preliminary Study. Korean J Dermatol, 2009;47(5):547-53.
5. Kang CH, Hwang JY, Kim YH, Melanogenesis promoting effects of Shophora Japonica methanol extract in Melan- $\alpha$  cells. J Invest Cosmetol, 2015;11(2):89-96.
6. Chun HJ, Kim IK, Woo WH, Inhibitory effects of reticoic acid and melanization of B16 Melanoma cell by Epimuedium Koreanu Nakai and  $\alpha$ -MSH. J Korean Chemical Society, 2000;44(6):533-40.
7. Ko JA, Park EY, Kim SN, Kim YC, The Effect of Epimuedium Koreanum Water Extract on the Enzymes and Factor Relevant to Melanin Synthesis in Vitro Test. J Invest Cosmetol, 2011;7(1):45-52.
8. Chun HJ, Kim YS, Kim TY, Kim IJ, Ahn SH, Jeon BH, et al, Effect of the Aqueous Extract of Epimedium Koreanum Nakai on Melanin Formation in B16 Mouse Melanoma Cell Line. J Traditional Korean Medicine, 2000;10(2):193-203.
9. Lee EJ, Bae SY, Lee YH, The Stimulatory Effects of Epimedium Koreanum Nakai Extract on Melanogenesis. J Soc Cosmet Scientists Korea, 2009;35(4):265-70.
10. Lee JS, Lee BS, Kim YC, Promoting Effects of Soybean Methanol Extract on the Melanogenesis and Tyrosinase Activity. J Invest Cosmetol, 2013;9(4):339-45.
11. Hong SH, Lee BS, Kim YH, Rhychosia nulubilis and Rhynchosia volubilis Ethanol Extracts Upregulate the Expression of Genes Related to Melanogenesis in Melan- $\alpha$  Cells. J Invest Cosemetol, 2016;12(2):109-15.
12. Cho NC, Bai S, Chin JE, Effects of Scutellaria baicalensis Extracts on Tyrosinase Gene Expression in B16 Melanoma Cells, Korean J

- Food&Nutrition, 2010;23(1):118-23.
13. Chung JH, Seo HS. The Effects of Psoraleae fructus Extract on Melanin Synthesis of B16 Melanoma cells. *J Korean Oriental Medicine*, 2007;26(3):55-65.
  14. Seo HS. The effect of Gorynju and Soju extract Psoraleae fructus on Melanin Synthesis of B16 Melanoma cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2008;21(1): 96-103.
  15. Choi WY, Lee JH, Baek SH, Chun HJ. Effects of Methanol Extract from Cornis fructus on Melanogenesis. *Korean J Pharmacognosy*, 2003;34(1):70-4.
  16. Yang HO, Choi WY, Jeon BH, Baek SH, Chun HJ. Water Extract from Cornis Fructus Regulates Melanogenesis in B16/F10 Melanoma. *J Physiol & Pathol Korean Med*, 2002;16(4):818-22.
  17. Lee SD. A Documentary Study on Herb, Dmgs Used for Vitiligo. *J Oriental Medicine*, 1995;16(2):44-61.
  18. Shin MK. *Clinical Traditional Herbalogy*. 2nd ed, Seoul:YeongLim publishing, 2006:284.
  19. Chang CA. A Study on the Hair Dye Using the Extract of Hanryencho Depending on the Mordanting Methods. Daegu;Graduate school Catholic University of Daegu, 2006:1-34.
  20. Huh J. *Donguibogam*. Seoul:Shinwoo Publishing, 2006:555-63.
  21. Mosmann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival;application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983;65(1):55-63.
  22. Hosoi JE, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 $\alpha$ ,25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res*, 1985;45(4):1474-82.
  23. Martinez-Esparza M, Jimenez-Carvantes C, Solan F, Lozano JA, Garcia-Borrón JC. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem*, 1998;255 (1):139-46.
  24. Andrzej S, Desmond JT, Shigeki S, Jacobo W. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiol Rev*, 2004;84:1155-228.
  25. Roser B, Robert B. Cyclic AMP a Key Messenger in the Regulation of Skin Pigmentation. *Pigment Cell Res*, 2000;13:60-9.
  26. Gordon PR, Glichrest BA. Human Melanogenesis is Stimulated by Diacylglycerol. *J Invest Dermatol*, 1989;93:700-2.
  27. Christine RG, Edith A, Naima B, William M, Jean-Paul O, Robert B. Ultraviolet B Radiation Acts through the Nitric Oxide and cCMP Signaling Transduction Pathway to Stimulate Melanogenesis in Muman Melanocytes. *J Biological Chemistry*, 1996;271(45):28052-6.
  28. Chan CF, Huang CC, Lee MY, Lin YS. Fermented Broth in Tyrosinase and Melanogenesis inhibition. *Molecules*, 2014;19 (9):13122-35.
  29. Korner A, Pawelek J. Activation of melanoma tyrosinase by a cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell-free system. *Nature*, 1977;267:444-7.
  30. Pawelek J, Sansone M, Koch N, Christie G, Halaban R, Hendee J, et al. Melanoma cells resistant to inhibition of growth by

- melanocyte stimulating hormone. Proc Natl Acad Sci USA, 1975;72:951-5.
31. Bertolotto C, Busca R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP, et al. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP:pivotal role of M boxes(GTCATGTGCT) and of mirophthalmia, Mol Cell Biol, 1998;18:694-702.
  32. Takeda K, SER298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance, Hum Mol Genet, 2000;9(1):125-32.
  33. Park HY, Glichrest BA. Signaling pathways mediating melanogenesis. Cell Mol Biol, 1999;45:919-30.
  34. Lee SM, Song BK, Koo BH, J KH. An Experimental Study on the Effect of Serum Prothrombin Time by the Administration of Ecliptae herba Extraction in Mouse. Kyung Hee University Oriental Medical J. 1982;5: 291-6.
  35. Mohammad SR, Mohammaad AR. Antimicrobial activity and cytotoxic of Eclipta prostrata, Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 2008;8(1):47-52.
  36. Chung JR. Improvement Effects of Folliculitis Using Eclipta Prostata L. J Korean Society for Aesthetics and Cosmetology, 2013;11(1): 167-71.
  37. Jo HC, Jung HJ, Kim SC, Jee SY. Anti-inflammatory Effects of the Water Extract of Ecliptae Herba. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2010; 23(2):125-38.
  38. Moon YH, Woo ER, Lee DH. Hypoglycemic Effect of Polysaccharide Isolated from Eclipta alba L. Kor J Pharmacogn, 2003;34(3):246-9.
  39. Choi SW. The Effects of Eclipta Prostrata in Insulin Resistance on Obese Mouse Model Induced by High Fat Diet. Naju;Graduate school Dongshin University, 2014:1-48.
  40. Park JH, Kim YI, Hong KE, Yim YK, Lee H, Lee HR. The Effect of Anti-Cancer and Immune Response Improvement of Eclipta Herba Herbal-Acupuncture into Chung-wan. J Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 2004;21(6):63-84.
  41. Ha NR. Antifibrotic Compounds from the Aerial Parts of Eclipta Prostrata in Liver Fibrosis. Seoul;Graduate school Seoul University, 2007:1-92.
  42. Cha SB, Park IH, Hong SH, Mun YJ, Woo WH. Melanogenic Effect of Eclipta Prostrata L. J Physiol & Pathol Korean Med, 2016;30(6):432-8.