

삼지구엽초의 멜라닌합성 촉진과 작용기전

차수빈^{1,2} · 김단희^{1,2} · 문연자^{1,3} · 우원홍^{2,4*}

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

Melanogenic Effect and the Mechanism of *Epimedium koreanum Nakai*Su Bin Cha^{1,2}, Dan Hee Kim^{1,2}, Yeun Ja Mun^{1,3}, Won Hong Woo^{2,4*}

1 : Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University,

2 : Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang University,

3 : Institute of Environmental Science, Wonkwang University, 4 : Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

In this study, ethanol extract of *Epimedium koreanum Nakai*(EEKN) enhanced melanogenesis by inducing expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 (TRP-1). But EEKN did not increase the protein expression of tyrosinase-related protein 2 (TRP-2). Moreover, EEKN enhanced tyrosinase activity and melanin contents of B16F10 cells. EEKN raised the expression of CREB phosphorylation and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) as a key transcription factor for tyrosinase expression regulating melanogenesis. And PKC inhibitor H89 suppressed that EEKN induced tyrosinase activity, melanin contents, and expression of tyrosinase, TRP-1. These results suggest that melanogenesis-promoting effect of EEKN was correlated with regulation of tyrosinase and TRP-1 protein through cAMP/PKC pathway.

keywords : *Epimedium koreanum Nakai*, Melanogenesis, cAMP/PKC pathway

서론

피부에 존재하는 멜라닌은 피부색을 결정하는 가장 주요한 역할을 하며 외부 자극으로부터 피부를 보호한다. 멜라닌의 생성은 피부 기저층에 존재하는 멜라닌생성 세포에서 외부 환경이나 호르몬, 사이토카인 등에 의해 멜라닌 생성촉진인자인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 효소의 영향을 받아 이루어진다^{1,2)}. 멜라닌생성 세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 멜라닌은 생성되어 성숙하며, 수지상돌기를 통해 각질형성세포로 이동 및 배출하여 피부를 보호하게 한다. 멜라닌은 자외선에 의한 피부 손상을 막아주며, 또한 멜라닌형성 과정의 중간 산물들은 높은 반응성을 가지고 있어서 피부 손상에 의한 외부 항원 혹은 아민이나 금속이온 등과 같은 독성물질과 반응하여 이들을 중화시키거나 제거하여 피부를 보호하는 역할을 하고 있다³⁾.

멜라닌생성 세포의 멜라닌 합성에서 있어서 tyrosinase, tyrosinase-related protein (TRP)-1 및 TRP-2 등의 단백질 발현과 활성화를 통한 효소활성은 매우 중요한 요소이다^{4,5)}. Tyrosinase는 멜라닌 색소 합성과 분비의 기능을 하는 효소이고, 포유동물의 tyrosinase는 멜라닌소체 내에서만 관찰되며, 여섯 개

의 N-glycosilation site를 가진 type I membrane glycoprotein이다. Tyrosinase는 L-tyrosine을 hydroxylation을 거쳐 L-DOPA로 전환시키고 다시 L-DOPA를 oxidation을 거쳐 dopaquinone으로 전환시키는 촉매 역할을 한다⁶⁾. TRP-2는 DOPACHrometautomerase로 알려져 있으며 DOPACHrome을 이용하여 5,6-dihydroxyindolecarboxylic acid (DHICA)를 생성하고⁷⁾, TRP-1은 TRP-2에 의해 생성된 DHICA를 산화시켜 indole-5,6-carboxylic acid로 전환시키는데 관여하는 효소이며 tyrosinase의 활성화에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁸⁾.

멜라닌이 국소적으로 과다하게 배출되어 피부 상피층에 침착되면 기미, 주근깨 등을 유발할 수 있어 피부 미용에 영향을 끼치게 된다. 이와 마찬가지로 상대적으로 주변 피부에 비해 멜라닌이 부족하면 저색소침착증이 나타나게 되며 이 역시 미용상의 문제와 정신적 스트레스의 원인이 될 수 있다. 색소침착저하증은 멜라닌생성 세포의 선천적 결함이나 후천적 파괴 과정으로 유발되거나, 정상적으로 멜라닌생성 세포가 존재하더라도 멜라닌 생합성에 이상이 있는 경우와 각질형성세포로 멜라닌의 정상적 배출이 불가능한 경우도 있다⁹⁾. 색소침착저하증으로 알려진 질환들은 백색증, 백반증, 점상 백색 피부증, 탈색모반, 프레디-윌리 증후군, Ito 멜라닌저하증,

* Corresponding author

Won Hong Woo, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460, Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea

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

Received : 2017/03/10 · Revised : 2016/04/19 · Accepted : 2017/08/24

© 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.2017.08.31.4.226>Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

특발 물방울 모양 멜라닌저하증, 바덴부르크 증후군 등이 있다. 아직까지 색소침착저하증의 완벽한 치료법은 없는 상태로 현재는 멜라닌 합성과 침착의 촉진을 위한 국소적인 혹은 전신적인 스테로이드 치료, 광화학요법, 광선요법, 수술적 방법^{10,11)}이 있으나 보다 안전하고 효과적인 치료를 위한 약물과 치료법에 관한 연구가 이루어지고 있다.

삼지구엽초 *Epimedium koreanum* Nakai는 매자나무과 식물의 전초를 말린 것으로 음양곽(淫羊藿) · 방장초(放杖草) · 선령비(仙靈脾) · 강전(剛前)이라고도 한다. 신경(腎經)과 간경(肝經)에 작용하며 그 성질이 따뜻하고 맛은 맵고 달다. 신양(腎陽)과 정기(精氣)를 보하며 근육과 뼈를 튼튼하게 하고 풍습사(風濕邪)를 없애준다¹²⁾. 삼지구엽초에 대한 연구로는淫羊藿 발효 추출물이 면역활성에 미치는 영향¹³⁾을 살펴보고, 삼지구엽초가 실험적으로 유발된 갑상선 기능저하증 동물모델에 미치는 영향과 안전성¹⁴⁾ 등이 있다. 주요 성분으로는 icariin, icaritin, baohuoside I, epimedin A, B, and C 등이 있는 것으로 알려져있다¹⁵⁾.

본 연구는 천연물을 통한 보다 안전한 색소침착저하증의 치료를 하기 위해, 삼지구엽초가 멜라닌생성 촉진 효과가 있다는 선행 연구를 기반으로 그 작용기전에 대해 자세히 알아보려고 하였다. 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)에 대하여 tyrosinase activity, 멜라닌 합성량의 변화를 살펴보고, western blot을 실시하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질 발현량을 확인하였다. 이러한 실험결과를 통하여 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)의 멜라닌 생성 촉진과 그 작용기전을 평가하여 멜라닌생성이 저해되어 나타나는 질환인 백반증 등에서의 삼지구엽초의 활용 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 시료 추출

실험에서 사용된 삼지구엽초는 약용식물소재은행에서 구입한 것으로 국내에서 채집한 삼지구엽초를 70 % EtOH로 추출하여 동결건조한 시료로 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 (α -MSH), bovine serum albumin (BSA), triton X-100, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), goat polyclonal IgG tyrosinase, TRP-1, TRP-2, p-CREB는 Santa Cruz사 (CA, USA) 제품을, CREB, MITF는 cell signalling(MA, 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), H-89, 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, CO₂ 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 μ g/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml amphotericin B를 첨가하여 dulbecco's modified eagle medium(DMEM)을 사용하여 37 °C, 5 % CO₂에서 배양하였다.

5. 세포 생존율 측정

세포생존율은 24-well 배양 용기에 2x10⁴ 개씩 분주하고 48시간 배양 후 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)을 여러 농도로 처리한 다음 37 °C, 5 % CO₂ 하에서 2일간 배양하였다. 배양 후 100 μ l의 MTT 용액을 넣어 4시간 배양한 다음 상층액을 제거한 후 DMSO 1 ml 녹여서 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등(1998)의 방법으로 측정하였다. 6 cm 배양용기에 B16F10 세포를 3x10⁴개씩 분주하여 부착시킨 후, 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)을 50, 100 μ 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 μ l이 되도록 분주하고 0.1 % (W/V) L-DOPA를 50 μ l씩 분주하여 37 °C에서 30분 반응시켜서 475 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

7. 멜라닌 합성량 측정

멜라닌 정량은 Hosei¹⁶⁾등의 방법을 변형하여 사용하였다. 10 cm 배양용기에 1x10⁵개씩 분주하여 2일간 배양한 후, 삼지구엽초

에탄올추출물(EEKN) 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 처리한 다음 3일간 배양하였으며, 각 군당 2×10^6 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.

8. Western blot 분석

B16F10 세포를 10 cm 배양용기에 1×10^5 개씩 세포를 부착시키고 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)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. 하위세포 분획을 위해서 단백질은 NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagents (Thermo Fisher Scientific, Inc.)을 이용하여 분획하였다. 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 μg bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 총 단백질 40 μg 을 10 % SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. nitrocellulose membrane로 전이시키고 5 % non-fat skim milk로 blocking 시킨 후, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, CREB, p-CREB, MITF antibody를 반응시켰다. TBST로 5회 세척한 후, 2차 antibody를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. β -actin bands는 cytoplasmic 단백질의 컨트롤로 이용하였고, lamin B bands는 nuclear 단백질 컨트롤로 사용하였다. TBST로 세척한 후 ECL 용액으로 발색한 후 ChemiDoc를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

9. 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. 삼지구엽초의 세포독성 검사

세포독성을 알아보기 위하여 B16F10 세포에 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 72시간 처리하였다. 세포생존율은 MTT assay로 측정하였다. 실험결과 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)은 대조군에 비해 87 %, 84 %, 85 %, 84 %, 72 %의 세포생존율을 보였다(Fig. 1). 이에 따라 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)을 사용하여 멜라닌합성 촉진에 관한 다음 실험을 진행하였다.

2. 삼지구엽초의 세포내 tyrosinase 활성 촉진효과, 멜라닌합성 유도효과 및 멜라닌 합성 관련 단백질 발현 조사

B16F10 세포에서 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)의 세포내 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성량 변화에 미치는 영향을 측정하기 위하여 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리 후 tyrosinase 효소 활성과 멜라닌 합성량을 측정하였다. 양성대조군으로는 Adenylate cyclase를 활성화하여 cAMP의 농도를 상승시키는 것으로 알려진 forskolin(FSK)¹⁷⁾을 사용하였다. 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)의 농도 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시에 대조군 대비 285 %, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 410 %의 멜라닌 합성량 증가를 보였다. 이는 양성 대조군인 forskolin 500 nM 처리시 대조군 대비 422 %의 증가량을 보인 것(Fig. 2A)과 비교했을 때 삼지구엽초 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 매우 높은 멜라닌 합성을 보이고 있음을 나타낸다. 또한 Fig. 2B를 보면 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)을 처리시 농도 의존적으로 tyrosinase 활성도가 증가하는 것을 알 수 있다. 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN) 농도 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 120 %, 193 %, 374 %의 세포내 tyrosinase 활성도가 나타났다. 또한 Fig. 2C를 보면 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)이 B16F10 세포에서 멜라닌 합성 관련 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질들의 발현에 미치는 영향을 살펴보고, 삼지구엽초 처리시 농도 의존적으로 tyrosinase, TRP-1의 발현이 증가되었고 TRP-2의 발현에는 영향이 없었다. 이를 통해 선행연구에서 보였던 삼지구엽초의 멜라닌 합성 촉진에 관한 연구 결과를 다시 확인할 수 있었다.

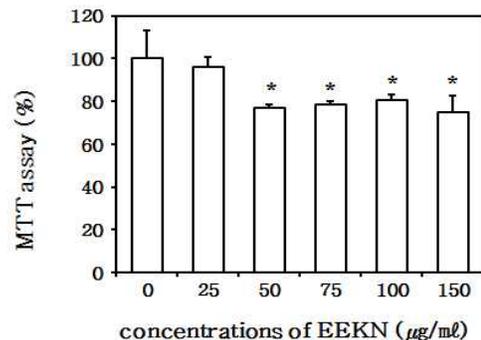


Fig. 1. Cell viability of EEKN of B16F10 cells. The cells treated with EEKN at different concentrations for 72h was assayed using MTT. Data are mean \pm S.D. of triplicate experiments. \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the untreated control.

3. 삼지구엽초의 CREB, MITF 단백질 발현 조사

삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)이 B16F10 세포의 멜라닌 합성 관련 단백질인 CREB, MITF 단백질들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot을 통하여 조사하였다. 이를 위해 시간 별로 핵 내와 세포질에서 인산화 된 CREB의 발현 변화를 관찰하였다. 삼지구엽초 처리 후 8시간에서 핵 내의 인산화 된 CREB의 발현이 컨트롤 대비 213 %로 증가됨을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 삼지구엽초를 처리하여 24시간과 48시간 후 핵 내와 세포질의 MITF의 발현을 관찰한 결과, 48시간 처리 후의 MITF 발현 변화는 관찰할 수 없었다. 또한 24시간 처리 후 세포질에서의 MITF 발현 변화 역시 관찰할 수 없었지만, 핵 내 MITF의 발현이 EEKN 50

μg/ml에서 222 %, 100 μg/ml에서 244 %로 증가됨을 확인하였다 (Fig. 3B). 이러한 결과를 통해 삼지구엽초가 멜라닌 합성과정 중 효소 활성 뿐 아니라 세포내 멜라닌 합성 관련 단백질 발현을 촉진시키는 역할을 하고 있음을 나타내고 있다.

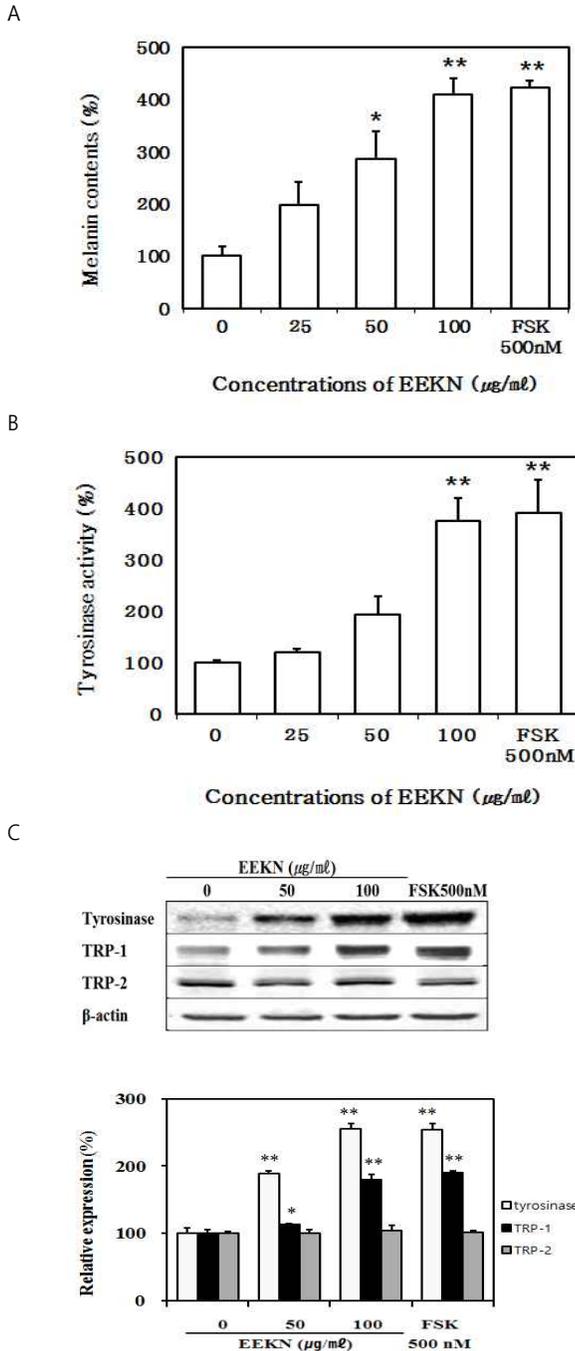


Fig. 2. EEKN stimulated the melanin synthesis, the tyrosinase activity and the effect of EEKN on the tyrosinase, TRP-1, TRP-2 expressions in B16F10 cells. The cells were treated with 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml EEKN and forskolin 500 nM for 72h. The melanin synthesis(A) and the tyrosinase activity(B) were measured as the increase in contents(%) with respect to control cells(100%). The cells were treated with 50, 100 μg/ml of EEKN. After 72h, cells were analysed using western blot(C) as described in materials and methods. Values are means ± S.D, N=3. *p<0.05, **p<0.01 compared to the untreated control.

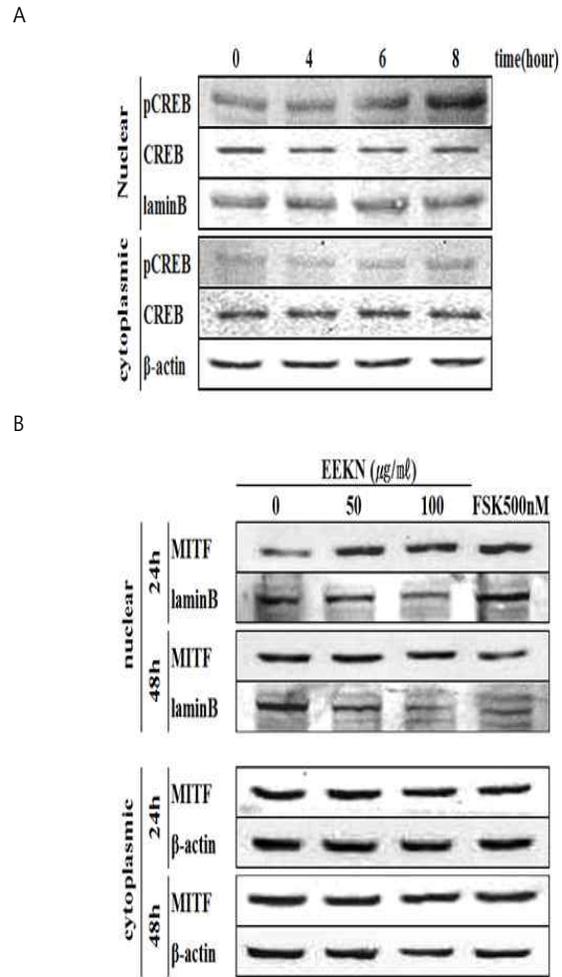


Fig. 3. EEKN increases phosphorylation of CREB and MITF expression. CREB and MITF cytoplasmic and nuclear protein expression in B16F10 cells after EEKN treatment. Cells were treated with EEKN for the indicated time periods, and the subcellular fractions were then isolated and western blotted for phosphorylated CREB(pCREB) and CREB(A). And cells were treated with 50, 100 μg/ml of EEKN and forskolin 500 nM After 24 h and 48h, for measuring the expression of the MITF, cells were analysed using western blot(B). Lamin B and β-actin were used as markers of the nucleus and cytoplasm respectively. Values are means ± S.D, N=3.

4. 삼지구엽초의 cAMP/PKA 활성화에 미치는 영향

멜라닌 합성에 있어서 cAMP/PKA는 주요 신호전달 경로이다. 따라서 본 실험에서 삼지구엽초가 cAMP/PKA의 신호전달에 미치는 영향을 관찰하였다. 이를 확인하기 위해 PKA inhibitor인 H89 1.5 μM을 전처리 한 후, 삼지구엽초 에탄올추출물(EEKN)를 100 μg/ml 처리하여 72h 배양한 후 멜라닌 합성량과 tyrosinase 활성도의 변화를 관찰하였다. 실험 결과 삼지구엽초로 증가되었던 멜라닌 합성량(Fig. 4A)과 tyrosinase 효소 활성(Fig. 4B)은 H89에 의해 감소되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 단백질 수준에서의 변화를 관찰하기 위해 western blot을 실시하였다. 실험 결과 삼지구엽초로 증가되었던 tyrosinase와 TRP-1 단백질 발현이 H89 전처리 시 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4C). 이를 통해 삼지구엽초의 멜라닌 합성 촉진 과정이 cAMP/PKA의 경로를 통해 하고 있음을 확인할 수 있다.

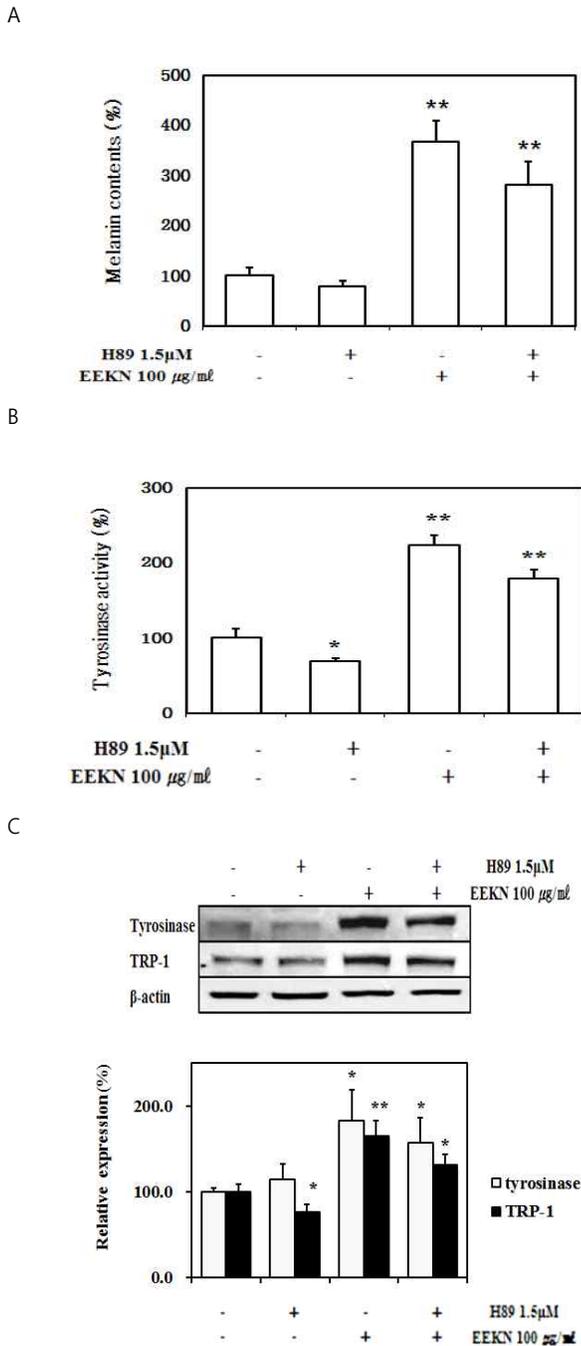


Fig. 4. Effects of H89 on cellular tyrosinase activity, melanin synthesis and expressions of tyrosinase, TRP-1 in EEKN treated B16F10 cells. The cells were inoculated whit pretreated whit 1.5µM of H89 for 1 hour and treated 100 µg/ml of EEKN After 72 hours, cell lysates were using as described in materials and methods. The melanin synthesis(A) and the tyrosinase activity(B) were measured as the increase in contents(%) with respect to control cells(100%). The expressions of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2(C) were analysed using western blot as described in materials and methods. Data are means \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the untreated control.

고찰

한의학에서의 멜라닌 합성에 관한 기존의 연구는 멜라닌 합

성을 저해시키는 한약재에 관한 연구를 통해 기미 치료나 미백 화장품에 이용할 수 있는 한약재와 그 성분을 찾는 것이 주를 이루었다. 멜라닌 생성을 저해시키는 효능이 있는 것으로 알려진 한약재로는 매괴화¹⁸⁾, 세신¹⁹⁾, 산약²⁰⁾, 백봉령²¹⁾, 홍삼²²⁾, 죽여²³⁾ 등이 있다. 점차 한약재의 안정성과 천연물에 대한 관심이 높아짐에 따라 멜라닌 합성을 촉진시킴으로써 여러 색소침착저해증의 치료에 이용할 수 있는 한약재에 관한 연구도 서서히 이루어지고 있다. 이에 대한 연구로 그 효능을 지닌 한약재로 알려진 것으로는 회화나무²⁴⁾, 보골지²⁵⁾, 자하거²⁶⁾, 느릅나무²⁷⁾ 등이 있다. 삼지구엽초는 몇몇의 선행 연구에서 이미 멜라닌 생성 촉진 효과가 있는 것으로 밝혀진 바 있다^{28,29)}. 그러나 삼지구엽초의 이러한 멜라닌 생성 촉진 효과가 세포내에서 어떤 경로를 통하는 것인지 아직 자세히 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구를 통해서 삼지구엽초의 멜라닌생성 촉진의 작용기전을 명확히 밝히고자 하였다.

멜라닌(melanin)은 태양광선으로부터 피부를 보호하는 중요한 역할을 담당한다. 멜라닌은 흑갈색의 유멜라닌(eumelanin)과 적황색의 페오멜라닌(pheomelanin)이 있으며, tyrosinase는 멜라닌 합성 과정 중 두 종류 멜라닌 합성에 모두 필요하고, TRP-1과 TRP-2는 유멜라닌 합성에 더 많은 관여를 하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 멜라닌을 형성하는데 있어서 특히 tyrosinase는 주요 단백질로서 피부 색소 조절 과정연구에서 중요한 지표로 여겨진다. Tyrosinase는 티로신(tyrosine)에서 도파퀴논(DOPA quinone)으로 전환하는 과정에 관여하며, DHI를 indole-5,6-quinone으로 전환시키는 과정에도 관여하는 단백질이다³¹⁾. 따라서 삼지구엽초 에탄올추출물의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 tyrosinase 활성을 측정한 결과, 삼지구엽초 에탄올추출물이 100 µg/ml의 농도에서 약 374 % 이상의 활성 촉진 효과를 확인하였다. 또한 삼지구엽초 에탄올추출물이 멜라닌 합성량에 미치는 영향을 살펴본 실험에서 100 µg/ml의 농도에서 410 %의 멜라닌 합성 촉진 효과를 보이고 있다. 단백질 수준에서 tyrosinase의 발현을 살펴본 결과 역시 삼지구엽초의 농도 의존적으로 그 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 TRP-1은 멜라닌 생성에서 효소의 역할로 DHICA를 indol-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화시키는 것뿐만 아니라 tyrosinase을 안정화시키고 멜라닌소체의 구조를 유지할 수 있도록 도와주는 것으로 알려져 있다³²⁾. 삼지구엽초 에탄올추출물을 처리한 실험군에서 농도 의존적으로 단백질 수준의 TRP-1 발현의 증가가 확인되었다. 이러한 실험 결과를 통해 삼지구엽초 에탄올추출물이 세포내 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 증가시키고 또한 tyrosinase 활성도와 멜라닌 합성량을 증가시키는 효과가 있음을 관찰할 수 있다.

멜라닌의 합성은 자외선, cytokine, 호르몬 등에 의해 조절되며 매우 다양한 인자들이 관여하는 복잡한 과정이다. 멜라닌합성은 몇 가지 세포내 신호전달 기전을 통하게 되는데, 주요 경로로서 cAMP/PKA 경로가 있다. 피부가 자외선에 노출되었을 때 멜라닌 세포의 cAMP 신호가 증폭되고 이는 PKA의 활성화를 유도하게 된다. 활성화된 PKA는 세포내 CREB 단백질을 인산화시킴으로써 MITF의 발현을 증가시킨다³³⁾. MITF는 멜라닌 합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 합성을 증가

시켜 멜라닌 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 삼지구엽초 에탄올추출물의 멜라닌합성 촉진 효과를 확인하기 위해 western blot를 실시하여 멜라닌생성 관련 단백질들을 확인하였고, 또한 이러한 멜라닌합성 촉진 효과가 cAMP/PKA 경로를 따르는지 확인하고자 하였다. 이를 위해 PKA inhibitor인 H89를 전처리 후 삼지구엽초 에탄올추출물을 처리하여 tyrosinase 활성도와 멜라닌 합성량의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 확인한 결과, H89를 처리시 삼지구엽초 에탄올추출물에 의해 증가된 tyrosinase 활성도와 멜라닌 합성량이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 H89를 처리했을 때 tyrosinase, TRP-1의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, 삼지구엽초 에탄올추출물에 의해 증가되었던 tyrosinase, TRP-1 발현이 H89를 처리시 억제되고 있음을 확인하였다. 이는 삼지구엽초 에탄올추출물이 세포신호전달경로 중 cAMP 신호를 증폭시키고 PKA의 활성화를 유도함으로써 MITF에 영향을 미쳐 멜라닌 생합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 촉진시키는 것을 시사한다.

결 론

천연물을 이용한 보다 안전하고 효과적인 색소침착저하증의 치료를 하기 위해, 삼지구엽초의 멜라닌 생합성 촉진 효과에 대한 선행 연구를 기반으로 그 작용 기전에 대하여 자세히 알아보하고자 본 연구를 실시하였다.

멜라닌 합성량을 측정 한 결과 삼지구엽초 에탄올추출물이 100 µg/mL의 농도에서 대조군 대비 410 % 의 증가를 나타내었고, tyrosinase 활성은 삼지구엽초 에탄올추출물이 100 µg/mL에서 374 %의 효소 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

삼지구엽초 에탄올추출물을 50, 100 µg/mL의 농도별로 처리한 B16F10군에서는 TRP-1, tyrosinase 발현이 삼지구엽초 추출물을 처리하지 않은 군보다 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 삼지구엽초 처리 후 24시간이 지난 후 핵내의 MITF의 발현이 삼지구엽초 100 µg/mL에서 244 %으로 증가하여 양성대조군인 500 µM 농도의 forskolin에 비해서 더 높은 증가를 보였으며, 핵내의 인산화된 CREB 발현은 삼지구엽초 추출물 처리후 8시간이 지나자 대조군에 비해 213 %로 발현이 증가한 것을 확인하였다. PKA inhibitor H89의 전처리를 통해 삼지구엽초의 멜라닌생성 촉진 효과의 변화를 관찰하고자 하였다. 실험 결과 삼지구엽초로 증가되었던 tyrosinase 활성도, 멜라닌 합성량, 그리고 세포내 tyrosinase, TRP-1 단백질 발현이 H89의 처리시 감소되는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 삼지구엽초 에탄올추출물은 cAMP/PKA 경로를 통해 CREB가 인산화되고, 이에 따라 MITF가 활성화되어 tyrosinase와 TRP-1의 단백질 발현이 증가되어 멜라닌 생성을 촉진시키는 것을 알 수 있다. 이는 삼지구엽초의 저색소질환 치료제의 기초 자료로 유용할 것이다.

감사의 글

이 논문은 원광대학교 2017년 교내연구비로 수행되었으며, 이

에 감사드립니다.

References

1. Libert A, Ghanem G, Arnould R, Lejeune FJ. Use of an alpha-melanocyte-stimulating hormone analogue to improve alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor binding assay in human melanoma. *Pigment Cell Res.* 1989;2:510-8.
2. Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 2000;13:60-9.
3. Prota G. The chemistry of melanins and melanogenesis. *Fortschr Chem Org Naturst.* 1995;64:93-148.
4. Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S, Akcali C. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;885:117-33.
5. Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, et al. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res.* 2000;254:25-32.
6. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2002;17:207-18.
7. Rad HH, Yamashita T, Jin HY, Hirotsaki K, Wakamatsu K, Ito S, et al. Tyrosinase-related proteins suppress tyrosinase-mediated cell death of melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res.* 2004;298(2):317-28.
8. Wakamatsu K, Ito S, Rees JL. Usefulness of 4-Amino-3-hydroxyphenylalanine as a specific marker of pheomelanin. *Pigment Cell Res.* 2002;15:225-232. Available from: 10.1034/j.1600-0749.2002.02009.
9. Abdel-Malek Z, Suzuki I, Tada A, Im S, Akcali C. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;885:117-33.
10. Lee Y, Seo YJ, Lee JH, Park JK. Therapeutic effect of the combination of High-dose methylprednisolone pulse therapy and PUVA in vitiligo patients. *Korean J Dermatol* 2006;44:88-294.
11. 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.
12. Huh J. Donguibogam Part2. Seoul: shinwu books; 2004. p. 489, p. 511.
13. Jeong HM, Han HS, Lee YJ. Effect of Fermented Epimedium Herba Extract on the Immuno modulating Activity. *Kor. J. Herbology.* 2013;28(6):111-17.

14. Hong MJ, Lee BC, Ahn YM, Ahn SY. The Effects of Epimedii Herba on a Hypothyroidism Rat Model induced by PTU(6-Propyl, 2-thiouracil). *Journal of pharmacopuncture*. 2011;14(4):13-22. Available from: [Doi.org/10.3831/KPI.2011.14.4.013](https://doi.org/10.3831/KPI.2011.14.4.013)
15. Chen XJ, Tang ZH, Li XW, Xie CX, Lu JJ, Wang YT. Chemical Constituents, Quality Control, and Bioactivity of Epimedii Folium (Yinyanghuo). *The American Journal of Chinese Medicine*. 2015;43(5):783-834. Available from: [10.1142/S0192415X15500494](https://doi.org/10.1142/S0192415X15500494)
16. Hosoi JE, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res*. 1985;45:1474-78.
17. Hwang JC, Yun JK, Kim SK, Lee SH, Han KH. Mass Pooduction of Chaff-vinegar and Its Effect of Anti-Aging and Whitening. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012;40(3):208-14.
18. Lee JH, In MH, Kang SH, Mun YJ, Woo WH, Lim KS. Inhibitory Effect of the Ethanol Extract of Rosae rugosae Flos on the Hyperpigmentation and its Action Mechanism Induced by α -MSH. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2015;28(1):41-52.
19. Jang JY, Kim HN, Kim YR, Kim BW, Choi YH, Choi BT. Studies of Inhibitory Mechanism on Melanogenesis by Partially Purified Asiasari radix in α -MSH Stimulated B16F10 Melanoma Cells. *Journal of Life Science*. 2010;20(11):1617-24. Available from: [10.5352/JLS.2010.20.11.1617](https://doi.org/10.5352/JLS.2010.20.11.1617)
20. Lee SY, Yoo DH, Joo DH, Lee JY. Inhibitory Efficacy of Dioscoreae Rhizoma on MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase, PKA and ERK Expression in Melanoma Cells (B16F10). *Kor. J. Herbol*. 2015;30(4):95-100.
21. Park HJ, Kwon EJ, Kim MM, Lee KR, Hong I, Lee DG, et al. Whitening Effect of Poria cocos Ethanol Extract by Inhibition of Melanin Synthesis. *Journal of Life Science*. 2014;24(5):485-90. Available from: <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2014.24.5.485>
22. Hwang EY, Kong YH, Lee YC, Kim YC, Yoo KM, Jo YO, et al. Comparison of Phenolic Compounds Contents between White and Red ginseng and Their Inhibitory Effect on Melanin Biosynthesis. *J. Ginseng Res*. 2006;30(2):82-7.
23. Le, CH, Kim SB, Byun SY. Inhibitory Melanogenesis of Bambusae caulis in Taeniam and Profiling of Related Proteins. *KSBB Journal*. 2010;25:478-82.
24. Kang CH, Hwang JY, Kim YC. Melanogenesis-Promoting Effects of Sophora japonica Methanol Extract in Mean-a Cells. *J Invest Cosmetol*. 2015;1(2):89-96.
25. Chung JH, Seo HyS. The effects of Psoraleae fructus Extract on melanin synthesis of B16 melanoma cells. *J Korean Oriental Med*. 2005;26(3):55-65.
26. Seo HS. The effects of Hominis Placenta extract on melanin synthesis of B16 melanoma cells. *Journal of pharmacopuncture*. 2006;9(1):75-82.
27. Chun HJ, Jeong SI, Kim IK. Effects of Ethyl Acetate Extract from Ulmus davidiana var. japonica on Melanogenesis. *Yakhak Hoeji*. 2001;45(6):724-9.
28. 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.
29. Ko JA, Park EY, Kim SN, Kim YC. The Effect of Epimedium koreanum Water Extract on the Enzymes and Factor Relevant to Melanin Synthesis in Vitro Test. *Journal of Investigative Cosmetology* 2011;7(1):45-52.
30. Park SH, Lee BY, Lee SH, Han CS, Kim JG, Kim KT, et al. Whitening effect of dayflower (*Commelina communis* L.) extract by inhibition of N-linked glycosylation process and melanogenesis. *J Soc Cosmet Scientists Korea*. 2009;35:73-8.
31. Han R, Baden HP, Brissette JL, Weiner L. Redefining the skin's pigmentary system with a novel tyrosinase assay. *Pigment cell Res*. 2002;15:290-7.
32. Manga P, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R., Boissy, R.E. 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.
33. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, et al. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1996;1313:130-8.
34. Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ, et al. Activation of the MITF promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. *Pigment Cell Res*. 2006;19:595-605.