단풍잎돼지풀 발효 추출물의 항산화 효과 및 B16F10 세포에서의 미백 활성 검증

유단희^{1,2}, 오민정¹, 염현지¹, 이진영^{1*}

¹호서대학교 화장품생명공학부

²서원대학교 산학협력단

Received: June 9, 2020 / Revised: September 3, 2020 / Accepted: September 7, 2020

Verification of the Antioxidant Effects and Whitening Activity of fermented *Ambrosia trifida* L. Extracts in B16F10 Cells

Dan-Hee Yoo^{1,2}, Min-Jeong Oh¹, Hyeon-Ji Yeom¹, and Jin-Young Lee^{1*}

¹Division of Cosmetics Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Republic of Korea

²Industry-Academic Collaboration Foundation, Seowon University, Cheongju 28674, Republic of Korea

The purpose of this study was to verify the antioxidant and whitening effects of fermented *Ambrosia trifida* L. extract (ATFE) and to verify its usefulness as a cosmetic material. The antioxidant effects were measured by assessing the electron-donating capacity and 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging ability of these extracts. ATFE was shown to have an electron-donation capacity of 68.4% at a concentration of 1000 µg/ml. While its ABTS⁺ radical scavenging ability was shown to be 58.7% at the same concentration. The ATFE tyrosinase inhibitory effect, which is related to skin-whitening, was shown to be 32.35% at a concentration of 1000 µg/ml and a cell viability assay using melanoma cells showed a 14.8% reduction in cell viability at a concentration of 100 µg/ml. Surviving cells were then used in western blot analyses to evaluate the protein inhibitory effects of ATFE at 25, 50, 100 µg/ml where β-actin was used as a positive control. The whitening effects of these extracts were also evaluated by western blot and show that the expression of microphthalmia-associated transcription factors, Tyrosinase-related proteins (TRP)-1, TRP-2 and Tyrosinase were all inhibited, 51.14%, 55.4%, 38.6%, 83.77% respectively, at 100 µg/ml ATFE. The efficacy of the whitening effects was verified and the suitability of ATFE as a cosmetic material was assured.

Keywords: *Ambrosia trifida* L., fermentation, antioxidant, whitening effect

서론

최근에는 소비자들의 자연친화적, 환경친화적인 소비 경향에 따라 식품뿐만 아니라 화장품에 첨가되는 유효 성분도 화합물 대신 식물 또는 동물 유래의 천연물을 이용한 소재에 대한 연구가 증가하고 있는 추세이다[1].

피부노화는 그 원인에 따라 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 나뉘지며, 외인적 노화는 외부 스트레스와 자외선에 의해 노화 현상이 나타나는 것

로 광노화가 주된 원인이며, 이는 피부의 보습감소, 탄력저하, 주름 및 홍반과 같은 색소침착 등의 증상을 유발하게 된다[2, 3]. 자외선은 표피와 진피를 통과하며, 교원질 및 탄력섬유 등의 기질 단백질을 손상시켜 피부 내 교원질의 양을 부족하게 만들고 탄력 섬유가 파괴되어 주름을 유발하며 주근깨, 기미 및 검버섯이 유발시키게 된다[4–6]. 피부의 멜라닌세포에서 생성되어지는 멜라닌은 동·식물계에 다양하게 분포하는 생체 고분자 물질이며, 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 갖는 페놀계 고분자 물질로도 분류된다. 피부의 표피 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)에서 생성되며, 수상 돌기를 통하여 각질형성세포로 알려져 있는 keratinocyte로 이동하게 되고 각질형성세포의 핵을 보호하는 역할을 한다. 피부 내에 생성된 멜라닌은 각화과정을 통해 피부 바깥층으로 이동하여 떨어져 나가게 되며, 배출되기

*Corresponding author

Tel: +82-41-540-9552, Fax: +82-41-540-9538

E-mail: jylee@hoseo.edu

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

전까지는 없어지지 않는 안정한 물질이다[7-9]. 멜라닌에 의한 색소침착 등과 같은 증상들은 여러 자극에 의해 야기되는데, 자외선으로 인해 생기는 DNA 손상과 회복과정에서 생기는 thymine dinucleotides (pTpT), 활성산소(ROS)의 조직 내 발생, melanocyte growth factor 등이 주요 원인으로 발생되고 있다. 이러한 자극에 대한 방어 기작으로 세포 내 멜라닌의 생성이 증가하면, 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등과 같은 증상들이 일어나 피부노화를 촉진시키며, 흑색종을 비롯하여 피부암을 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다[10-12]. 멜라닌의 생합성은 tyrosinase, tyrosinase-related protein (TRP)-1, TRP-2를 포함하는 tyrosinase 계열의 단백질 참여로 일어나는데, tyrosinase는 다양한 기능을 수행하는 polyphenol oxidase 효소의 일종이며, 구리를 함유하고 있는 단백질이다[13]. 자외선에 의해 피부에 존재하는 keratinocyte가 자극을 받게되면 α -melanocyte stimulating hormone (MSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 등의 세포내 신호전달 물질들을 자극하여 멜라닌 세포로 분비하게 된다[14].

일반적으로 귀화식물이란 비자생종으로 외국으로부터 유입되어 인간의 아무런 도움 없이 야생에서 스스로 자라는 식물을 말한다. 이러한 귀화식물의 생태적 특징은 대부분 비슷하며, 다년생보다는 일년생과 같이 생활사가 짧은 식물이 많이 존재한다. 다른 식물에 비해 빠른 속도로 성장하여 많은 종자를 생산하여 그 번식력이 국내 생태계에서 점차 서식지를 확대해가며 토종식물을 위협하고 산림생태계의 교란을 발생시키고 있는 실정이다[15, 16]. 생태계 유해 외래잡초로 지정되어진 식물 중의 하나인 단풍잎돼지풀은 국화과에 속하며 원산지는 북아메리카인 종자로 번식하는 일년생 식물로서 일본, 유럽, 한국 등의 전 세계적으로 널리 분포한다. 높이는 1 m 이상으로 자라며, 줄기는 일직선으로 곧아있고, 많은 가지를 치고 거친 털이 있다. 잎은 대생하면서 3-5갈래로 갈라지는 특징을 가지며 잎이 단풍잎과 비슷하게 생겨 이름에도 단풍잎이라는 명칭이 붙었다. 꽃은 7-9월에 피며 길이 6-12 mm, 폭 4-5 mm, 5-7능선이 있는 종자를 생산하며, 단풍잎돼지풀의 꽃가루는 알레르기 성분이 있는 것으로 알려져 있다[17, 18].

최근에는 곰팡이, 효모, 유산균 및 버섯류와 같은 유용 미생물을 이용한 발효 공법을 활용한 원료의 생리활성성분을 추출하거나 높이는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 발효를 이용하여 항산화, 미백, 면역 및 항염증 등 다양한 생리활성 물질의 기능을 증진시키고, 다른 공정에 비해 생산비용이 적고 효율이 우수한 장점을 가지고 있어 새로운 소재 개발에서 각광받고 있다[19, 20].

본 논문에서는 생태계교란식물인 단풍잎돼지풀을 새로운 식물자원으로서의 활용가능성을 검증하기 위해 본 연구를

진행하였다. 단풍잎돼지풀을 발효시켜 추출물을 사용하였으며, 미백 메커니즘 검토를 통해 화장품 천연물 소재로서 활용가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용된 단풍잎돼지풀은 경기도산림환경연구소에서 경기도 오산시 인근에서 8월에 채취하였으며, 채취한 시료는 세척하여 열풍건조한 후 분쇄하여 사용하였다. 시료를 100℃에서 2시간동안 열수추출 후 autoclave하여 잡균을 제거하였다. 그 후 열수추출물의 발효를 위해 유산균 (*Lactobacillus plantarum*)을 투입 후 37℃에서 72시간 발효 과정을 거친 후 5분간 끓여 세균활성 억제 및 추가 발효가 일어나지 않도록 하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거 후 동결건조하여 -20℃에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

시약 및 기기

항산화 및 미백 활성 측정에 사용된 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), tyrosinase mushroom, L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA) 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 세포주인 B16F10세포는 ATCC (USA)으로부터 구입하였으며, 세포 배양에 사용한 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Thermo Scientific Hyclone (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corporation (USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하여 사용하였다. Western blot에 microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase relate protein (TRP)-1, TRP-2, Tyrosinase, β -actin의 primary antibody와 anti-mouse, goat anti-rabbit 등의 secondary antibody는 Santa Crus (USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 Rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), microcentrifuge (gyrozen, Korea), microscope (Olympus, Japan), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), hemocytometer (Marienfeld, Germany), microplate reader (Tecan, Austria), PCR (ASTEC Co., Japan), Davinch-ChemiTM imager CAS-400SM System (Davinch-K Co.,

Korea), UV transilluminator (BioTop, Switzerland), digital shaker (Deihan Scientific, Korea), Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA), Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad)을 사용하였다.

전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities)은 Blois의 방법[21]을 변형하여 측정하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 60 µl와 농도별로 조제한 추출물을 120 µl씩 넣고 혼합한 후 15분간 방치한 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

ABTS⁺ cation radical scavenging activity assay 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay의 방법에 의하여 측정하였다[22]. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 ethanol로 희석시켜 사용하였으며, ABTS⁺ 100 µl에 시료 100 µl를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

세포 배양

본 실험에 이용한 세포의 배양을 위하여 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael 등의 방법[23]에 따라 측정하였다. B16F10 세포를 96 well plate에 1 × 10⁵ cells/well이 되도록 0.18 ml 분주하였고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 MTT 용액을 2.5 mg/ml 농도로 제조하여 0.04 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 활성을 알아보기 위하여 cell line B16F10을 100 mm tissue culture dish에 1 × 10⁶ cells/well로 cell seeding한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 α-MSH를 1 µg/ml 농도로 2시간 처리한 후 추출물을 농도 별로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. RIPA buffer 10 ml에 100 µl의 Complete mini ltab을 가하여 용해하고 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit로 정량하였으며, 20 µl의 단백질을 10% acryl amide gel에서 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하였다. 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였으며, TBST로 3회 washing한 후 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

통계 처리

실험결과는 Mean ± SD (Standard deviation)으로 나타내었고 분석된 실험 데이터는 대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 ANOVA를 실시하여 유의성이 있을 경우 post-hoc test로 Tukey range test를 실시하여 95% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

전자공여능 측정 결과

전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 진한 보라색을 띠며 비교적 안정한 free radical로 알려져 있다. DPPH는 글루타치온, 시스테인과 같은 유황아미노산과 butylated hydroxyanisole (BHA), ascorbic acid 등에 의해 전자를 받아 탈색되는 원리를 이용한 것으로 다양한 천연 소재의 항산화능을 검증하는 시험법으로 많이 이용되고 있다[24].

단풍잎돼지풀 발효 추출물의 전자공여능을 측정한 결과를 Fig. 1과 같이 나타내었다. 단풍잎돼지풀 발효 추출물은 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가되는 것을 나타내었고, 1,000 µg/ml 농도에서 68.4%의 효과를 보였다. Cha 등[25]의 두릅 순 수용성 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 1,000 µg/ml 농도에서 28.69%의 활성을 나타내는 결과와 비

Fig. 1. Electron donating ability of fermented extract from *Ambrosia trifida* L.

■ ATF: fermented extract from *Ambrosia trifida* L.
□ Vit. C: L-ascorbic acid.

Result are means $\pm$ SD. of triplicate data.

교하였을 때 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 전자공여능이 높은 활성을 나타내었음을 확인할 수 있었다.

ABTS⁺ cation radical scavenging activity assay 측정 결과

항산화력 측정법 중 ABTS⁺ radical cation 소거능은 ABTS diammonium salt와 potassium persulfate의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 추출물 내에 존재하는 항산화 물질에 의해 제거되면서 ABTS의 특유의 색인 청록색에서 연한 녹색으로 탈색되는 것을 이용한 방법이다[26].

단풍잎돼지풀 발효 추출물의 ABTS 소거능을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 단풍잎돼지풀 발효 추출물은 농

Fig. 2. ABTS⁺ cation radical scavenging activity of fermented extract from *Ambrosia trifida* L.

■ ATF: fermented extract from *Ambrosia trifida* L.
□ Vit. C: L-ascorbic acid.

Result are means $\pm$ SD. of triplicate data.

도의존적으로 효과가 증가하였으며, 1,000 µg/ml 농도에서 58.7%의 소거능을 나타내었다. 이는 Park [27]의 썸바귀의 에탄올 추출물이 1,000 µg/ml 농도에서 8.09%의 효능을 나타내었다는 결과와 비교하였을 때 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 ABTS 소거능이 높았음을 확인할 수 있었다.

Tyrosinase 효소 활성 검증 측정 결과

인간의 피부는 멜라닌이라는 피부색소에 의해 색이 결정된다고 알려져 있으며, 멜라닌은 피부뿐만 아니라 머리카락, 눈동자 등 생물체에 넓은 범위에 분포되어 있는 색소 성분으로 멜라노솜에서 멜라닌 생성을 증가시키며 합성은 tyrosinase의 효소 반응에 의해 조절되어진다. tyrosinase의 활성을 억제시키는 것은 피부 내에서 melanin polymer 합성을 조절할 수 있어 피부 미백제 개발에서는 tyrosinase 활성억제 실험은 유용한 평가법으로 인정되고 있다[28–30].

단풍잎돼지풀 발효 추출물의 tyrosinase의 활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 tyrosinase 저해활성은 1,000 µg/ml에서 32.35%의 저해활성을 나타내었다. 이는 Jeon 등[31]의 비자의 물, 에탄올 추출물의 2,000 µg/ml 농도에서 28.71%, 11.94%의 활성을 나타낸 결과와 비교하였을 때 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 tyrosinase 저해활성이 우수한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포생존율 측정에 사용되어진 MTT는 담황색의 기질로서, 살아있는 세포내의 미토콘드리아에서 호흡연쇄 효소에 의해 환원되어 암적색의 formazan을 생성한다. Formazan

Fig. 3. Inhibition rate of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. on tyrosinase.

■ ATF: fermented extract from *Ambrosia trifida* L.
□ Vit. C: L-ascorbic acid.

Result are means $\pm$ SD. of triplicate data.

Fig. 4. Cell viability of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. on melanoma cells (B16F10). After B16F10 cells (1×10^5 cells/well) were started in medium for 24 h the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 μg/ml of fermented extract AT for 24 h. Result are means $\pm$ SD. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

이 최대로 확인되는 것은 흡광도 550 nm 근처 파장이며, 죽은 세포에서는 호흡연쇄 효소를 생성하지 못하여 반응이 일어나지 않고 formazan 생성하는 생 세포를 측정하는 검사법이다[32].

단풍잎돼지풀 발효 추출물에 의한 멜라노마 세포(B16F10)의 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. 단풍잎돼지풀 발효 추출물은 100 μg/ml의 농도에서 85%의 세포 생존율을 나타내었다. 따라서 이하의 멜라노마 세포에서의 미백관련 신호전달 인자 측정은 생존율이 80%에 이상의 생존율을 보인 100 μg/ml 농도 이하인 25, 50, 100 μg/ml의 농도에서 실험을 진행하였다. An 등[33]의 내소황련탕 복합처방의 100 μg/ml 농도에서 에탄올 추출물이 38% 이하의 생존율을 나타낸 결과와 비교하여 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 melanoma 세포에 대한 세포생존율이 우수함을 확인할 수 있었다.

B16F10 세포에서 단백질 발현 억제 효과 측정 결과

미백 메커니즘은 melanin 합성 단계에서 진행을 억제 또는 차단함으로써 피부에서 melanin이 과도하게 침착하는 것을 억제하고 피부내의 색소함량을 줄일 수 있다. 그 방법에는 tyrosinase 효소에 대한 당전이(glycosylation) 저해, tyrosinase 유전자 발현억제, tyrosinase 효소 분해 촉진, melanin의 melanocyte에서 각질형성세포로의 전달 억제, melanocyte에 대한 직접적인 세포독성, 각질제거와 각질형성주기 가속화에 의한 미백 등이 있다[34]. 주로 세포의 증

식, 분화에 관여하는 것으로 알려진 ERK 신호는 MITF의 인산화를 유도하여 MITF의 ubiquitination이 이뤄져 proteosomal degradation을 일으켜 멜라닌 합성을 감소시키는 것으로 알려져 있다[35, 36].

따라서 미백 소재개발에 있어 멜라닌 생성을 억제하는 기전과 이미 생성된 멜라닌 분해를 촉진시키는 단계에서 작용하는 효소의 작용이 중요하며, 단백질 발현과 연관성이 있는지 보기위해 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 항체를 이용한 western blot으로 관련 단백질 발현량 변화에 대해 확인하였다. B16F10 mouse melanoma cell에 추출물을 25, 50, 100 μg/ml의 농도별로 처리한 후 control은 α-MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현 시키고, normal 부분에는 α-MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현정도의 차이가 거의 없는 housekeeping gene인 β-actin을 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 5-8과 같이 추출물을 25, 50, 100 μg/ml의 농도별로 처리한 결과 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질의 발현은 control 대비 51.14%, 55.4%, 38.6%, 83.77%의 발현 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며, 단백질 발현량이 추출물의 농도가 증가함에 따라 단백질 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 5. MITF protein expression rate of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS were treated with various concentrations of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. for 24 h and then total protein was isolated. MITF protein level was determined by western blot. Con: control, in B16F10 cells treated with α-MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α-MSH. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig. 6. TRP-1 protein expression rate of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS were treated with various concentrations of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. for 24 h and then total protein was isolated. TRP-1 protein level was determined by western blot. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig. 8. Tyrosinase protein expression rate of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS were treated with various concentrations of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. for 24 h and then total protein was isolated. Tyrosinase protein level was determined by western blot. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Fig. 7. TRP-2 protein expression rate of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS were treated with various concentrations of fermented extract from *Ambrosia trifida* L. for 24 h and then total protein was isolated. TRP-2 protein level was determined by western blot. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Results are means $\pm$ S.D. of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

요약

본 연구는 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 항산화 및 미백 효과를 검증하여 화장품 소재로서 활용가능성을 확인하고자 하였다. 항산화 효과를 측정하기 위해 전자공여능 측정과 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 전자공여능 측정 결과 1,000 μ g/ml 농도에서 68.4%의 효과를 보였으며, ABTS 라디칼 소거능 측정 결과 같은 농도에서 58.7%의 효과를 나타내었다. 미백효과를 Tyrosinase의 효소 억제 활성에 의해 측정한 결과, 1,000 μ g/ml 농도에서 32.4%의 저해활성 효과를 보였다. 세포 차원에서 미백효과를 측정하기 위해 단풍잎돼지풀 발효추출물의 세포 생존율을 멜라노마 세포에서 측정하였다. 그 결과, 100 μ g/ml 농도에서 85.2%의 생존율을 보였으며, 독성을 보이지 않는 농도인 100 μ g/ml 농도 이하에서 western blot을 진행하였다. 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 단백질 발현억제 효과를 25, 50, 100 μ g/ml의 농도에서 western blot으로 측정하였으며, 양성대조군으로 β -actin을 사용하였다. 그 결과, 100 μ g/ml 농도에서 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase인자들은 각각 51.14%, 55.4%, 38.6%, 83.77%의 효과를 나타내었다.

결론적으로 단풍잎돼지풀 발효 추출물의 항산화 및 미백

효과가 검증되었으며, 화장품 천연물 소재로서 활용가능성을 확인하였다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Park KM, Yoo JH, Shin YJ. 2009. Effects of egg shell membrane hydrolysates on skin whitening, wound healing, and UV-protection. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **32**: 308-315.
- Tasi TC, Hantash BM. 2008. Cosmeceutical agents: A comprehensive review of the literayure. *Clin. Med. Dermatol.* **27**: 1-20.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* **337**: 1419-1428.
- KDA Textbook Editiong Board. 2008. *Dermatology*. pp. 348-349. 5th Ed. Ryo Moon Gak, Korea.
- Maeda K, Fukuda M. 1991. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cos. Chem.* **42**: 361-368.
- Smit N, Vicanova J, Pavel S. 2009. The hunt for natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci.* **10**: 5326-5349.
- Del Bino S, Duval C, Bernerd F. 2018. Clinical and biological characterization of skin pigmentation diversity and its consequences on UV impact. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 2668-2712.
- Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, et al. 2012. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J. Invest. Dermatol.* **132**: 1222-1229.
- Seiberg M. 2001. Keratinocyte-melanocyte interation during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* **14**: 236-242.
- Gilchrest BA, Eller MS. 1999. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**: 35-40.
- Oh MC, Kim KC, Ko CI, Ahn YS, Hyun JW. 2015. Peptides-derived from scales of branchiostegus japonicus inhibit ultraviolet B-induced oxidative damage and photo-aging in skin cells. *J. Life Sci.* **25**: 269-275.
- Tadokoro T, Kobayashi N, Zmudzka BZ, Ito S, Wakamatsu K, Yamaguchi Y, et al. 2003. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB J.* **17**: 1177-1179.
- Huang YH, Lee TH, Chan KJ, Hsu FL, Wu YC, Lee MH. 2008. Anemonin is a natural bioactive compound that can regulate tyrosinase-related proteins and mRNA in human melanocytes. *J. Dermatol. Sci.* **49**: 115-123.
- Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AT. 1994. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci.* **107**: 205-216.
- Kim JM, Lim YJ, Jeon ES. 2000. *Naturalized Plants of Korea*. Science Books, Korea.
- Luken JO, Thiert JW. 1996. *Assessment and Management of Plant Invasion*. Springer, New York, USA.
- Yang HS, Kim DS, Park SH. 2004. Weed form, physiology, ecology II, pp. 401-403. Previous Agricultural Resources Book, Korea.
- Lee CB. 2003. Original Color of Korean Plants. pp. 382. Hyangmuna, Korea.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, et al. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* **130**: 1695-1699.
- Lee TS. 1990. The full list of recoded mushroom in korea. *Korean J. Mycol.* **18**: 233-259.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**: 1199-1120.
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE. 1999. Antioxidant acitivity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
- Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. 2006. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. inermis Rehder. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 128-134.
- Cha JY, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS, Cho YS. 2009. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. *J. Life Sci.* **19**: 652-658.
- Kim YE, Yang JW, Lee CH, Kwon EK. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* Sing. (Pine Mushroom). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 555-560.
- Park SJ. 2014. Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from *Ixeris dentata* Nakai. *Korean J. Culinary Res.* **20**: 133-142.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 891-896.
- Sim GS, Kim JH, Lee BC, Lee DH, Lee GS, Pyo HB. 2008. Inhibitory effects on melanin production in B16 melanoma cells of *Sedum sarmentosum*. *Yakhak Hoeji* **52**: 165-171.
- Imokawa G, Mishima Y. 1981. Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br. J. Dermatol.* **104**: 513-539.
- Jeon HS, Lee YS, Kim NW. 2009. The antioxidative activities *Torreya nucifera* seed extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**: 1-8.
- Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-(phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **251**: 206-209.
- An BJ, Lee CE, Son JH, Lee JY, Park TS, Park JM, et al. 2005. Antioxidant, anticancer and antibacterial activities of *Naesohwangryntang* and its ingredients. *Korean J. Herbol.* **20**: 17-26.

34. Hearing VJ, Tsukamoto K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**: 2902-2909.
35. Pilawa B, Buszman E, Latocha M, Wilczok T. 2004. Free radical in DOPA-melanin-chloroquine complexes. *Pol. J. Med. Phys. Eng.* **10**: 35-42.
36. Kim DS, Hwang ES, Lee JE, Kim SY, Kwon SB, Park KC. 2003. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and sub-sequent MITF degradation. *J. Cell Sci.* **116**: 1699-1706.