

The Effect of *Aster glehni* Fr. Schm. Extracts on Whitening and Anti-WrinkleHan-Hyuk Kim, Gun-hye Park, Kang-Soo Park, Jin-Young Lee<sup>1</sup>, Tae-Hoon Kim<sup>2</sup> and Bong-Jeun An\**Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk, 712-715, Korea*<sup>1</sup>*Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam, 336-795, Korea*<sup>2</sup>*Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongbuk, 712-715, Korea*

Received March 17, 2010 / Accepted July 21, 2010

Plants and their extracts can be utilized as inexpensive and rich resources of active constituents in the cosmetic field, as well as the food, pharmaceutical and medicinal fields. Until now, *Aster glehni* Fr. Schm. had no known active effect, except on anti-oxidation, that was found during investigations for application in the cosmetic field. In this study, we examined the inhibition of enzymatic reactions to protein levels in inclusive B16F10 melanoma cell lines. Significant inhibition of enzymatic reactions was observed in the EtOAc extract, which advanced to tyrosinase protein and TRP-1 in the B16F10 melanoma cell line. These results indicated that the effect of EtOAc extract inhibited expressions of tyrosinase protein and TRP-1 in the B16F10 melanoma cell line by 30.5% and 41.5% at 100ug/ml respectively. On the other hand, antimicrobial activity was evaluated to the four fractions in normal flora of the skin. Hexane extract was only exhibited in the higher clear zone in all strains. In conclusion, any cosmeceutical effects of *Aster glehni* Fr. Schm. may have a potential meaning, as well as possible value for further studies regarding the effects of chemical constituents of *Aster glehni* Fr. Schm.

**Key words** : Whitening effect, anti-wrinkle effect, *Aster glehni* Fr. Schm.

## 서 론

최근 들어 인간의 수명이 증가하고 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 여러 측면에서 노화 억제와 건강 유지를 위한 기능성 생리활성 물질에 대한 연구가 미생물과 식물분야에서 광범위하게 연구되고 있다[9,25]. 특히, 약용식물류와 채소류에 대한 연구들이 주를 이루어 항산화성, 항암성, 항진균성 등의 생리기능성이 알려지게 되면서 상용하던 약용식물류와 채소류뿐만 아니라 야생산채에 대해서도 기능적인 관심을 가지게 되었다[11,13,19]

울릉지역의 대표적인 산채 특산물인 섬쭉부쟁이는 여러해살이풀로 울릉도 산지에서 자생하는 국화과 개미취속 다년초로서 모양은 취나물과 비슷하게 생겼고, 울릉도에서는 부지깥이라고 부르는데 이른 봄 새순을 잘라 식용하면 향이 진하다[20]. 줄기는 곧추서서 가지를 많이 치고 높이는 1m 안팎으로 짧은 털이 있어 곁곁하며, 잎은 어긋나게 붙고 잎 꼭지가 있다. 잎은 버들잎 모양 또는 넓은 버들잎 모양으로 밑 부분은 좁으며 끝이 날카롭고 변두리에 성긴 톱니가 있으며 잔털이 생기게 있다[12]. 한방에서 *Aster*속 식물들은 주로 뱀에 물린데 상처를 치료하거나 타박상을 치료하는데 사용되어 왔다[16]. 섬쭉부쟁이의 일반성분으로는 수분 5.72%, 단백질 29.0%, 지방

3.5%, 조섬유 5.82%로 국내산 산채류 중 섬쭉부쟁이의 단백질 함량이 가장 높은 것으로 보고되었다[24]. 또한 유기산에는 citric acid, fumaric acid, succinic acid, tartanic acid 등이 함유되어있으며, 유리아미노산은 glutamic acid가 가장 많고, 다음으로 phenylalanin, arginine, tyrosine 등이 함유되어 있으며, 비타민 B군인 riboflavin과 thiamin 중 특히 thiamin의 경우 113.17 mg%가 함유되어 있고, 총 지방산 함량은 3,250 mg%로 필수지방산인 linolenic acid와 linoleic acid가 총 지방산의 70% 이상으로 다량 함유되어있다. 카테킨 함량은 (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, (-)-Epicatechin gallate, (-)-Epigallocatechin gallate이 각각 0.61, 0.12, 0.32, 0.14 mg%이며, 무기질은 Na, Ca, Fe, Zn, P의 함량이 총 2,192.03 mg%로 다량 함유되어 있다[6]. 현재까지 섬쭉부쟁이에 관하여 알려진 물질로는  $\beta$ -amyryn acetate, phytol, alismol,  $\alpha$ -tocopheryl, quinone,  $\alpha$ -spinasterol, 10-O-methyl-alismoxide, alismoxide, 3-O-[6'-O-palmitoyl- $\beta$ -D-glucosyl]-spinasta, 7,22-diene[23]과  $\alpha$ -pinene, limonene,  $\delta$ -elemene,  $\beta$ -pinenene, cis-3-hexenol, myrcene 외 25종[21]과 살초활성 물질인 coumarin[18]이 있으며, 육종[22] 및 저장법[14]에 관한 연구와 추출조건[17] 및 항산화 활성에 관한 연구[5]만 보고되어 있을 뿐, 효소학적 측면의 *in vitro* 검색법과 기타 연구에 관해서는 매우 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 섬쭉부쟁이 분획물의 미백 효능, 주름개선 효능, 항암 효능, 항균활성을 측정하여 약리활성 검증 및 화장품 천연소재로서의 활용 가치를 검토하였다.

## \*Corresponding author

Tel : +82-53-819-1429, Fax : +82-53-819-1429

E-mail : anbj@dhu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 섬쭈부쟁이(*Aster glehni* Fr. Schm.)는 2009년 7, 8월경 경북 울릉군 울릉읍에서 건조된 잎을 구입하여 실험재료로 사용하였다.

### 시료 추출 및 용매분획

시료의 추출은 섬쭈부쟁이 5 kg을 시료 중량의 10배 양인 70% 메탄올을 가하여 상온에서 1주일간 3회 추출한 다음 filter paper (Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축하여 메탄올 추출물(472.7 g)을 얻었다. 이 메탄올 추출물을 극성 차를 이용해 서로 다른 용매를 첨가하여 단계적으로 분획하였다. 섬쭈부쟁이 메탄올 추출물과 hexane을 1:1 비율로 분획 깔대기에 넣고 hexane층과 H<sub>2</sub>O층을 분획하였고, hexane층을 다시 감압농축하여 hexane 분획물 154.22 g를 얻었다. 동일한 과정을 통해 EtOAc층(74.66 g), n-BuOH층(87.84 g), H<sub>2</sub>O (155.98 g)을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻고 감압, 농축 후 동결 건조하여 용매를 제거한 후 실험에 사용하였다.

### 시약 및 기기

미백 및 주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 mushroom tyrosinase, L-3,4-dihydroxy phenyl-alanine (L - DOPA), porcine pancreas elastase (PPE), N-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide, collagenase 및 4-phenyl-azobenzoyloxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 세포주는 melanoma 세포인 B16F10을 Korean Cell Line Bank (KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정 시약은 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL Co. (Grand Island, U.S.A.) 및 Haemacytometer (Marienfeld, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 3-[4,5-dimethyl -thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 항균력 검색 실험에서 사용한 공시 균주는 피부상재균인 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Escherichia coli* KCTC 1039를 사용하였고, 여드름 유발균으로서 *Propionibacterium acnes* KCTC 3065를 계대 배양하여 사용하였다. 전 배양 및 본 배양을 위한 배지로서 *Staphylococcus aureus*는 tryptic soy broth와 agar를 사용하였고, *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus epidermidis*는 nutrient broth와 agar를 사용하였으며, *Propionibacterium acnes*는 Gifu anaerobic medium (GAM)과 본 배지에 agar powder를 첨가하여 실험에 사용하였다.

### Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[29]으로 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 ml에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/ml) 0.2 ml을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

### Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등의 방법[3]에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl- (L-Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 20분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 405 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 ml씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/ml)용액 0.5 ml을 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>- p-nitroanilide (0.5 mg/ml)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

### Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 Wünsch와 Heindrich의 방법[28]에 따라 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxy-carbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/ml)를 녹인 기질액 0.25 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/ml) 0.15 ml를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 ml을 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 ml을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

### 세포배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용

하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. RAW 264.7 세포에 시료용액의 여러 농도(1, 10, 100, 1000 ug/ml) 또는 양성 대조군을 1시간 전처리한 후 LPS (1 ug/ml)를 처리하고 24시간 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 독성 측정

세포 독성 측정은 Carmichael 등의 방법[4]에 따라 측정하였다. Melanoma (B16F10)을 96 well plate에 0.6~0.8×10<sup>3</sup> cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MITT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO:EtOH (1:1) 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 독성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 통한 미백 관련 단백질의 발현 측정

Raw 264.7 세포를 60 mm tissue culture dish에 2×10<sup>4</sup> cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 섬쭉부쟁이 EtOAc층 분획물을 농도별로 처리한 배지로 교환하고 24시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 100 ul를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리하여 (12,000 rpm, 4°C, 20 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 60 ul의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 30~40 V에서 2시간 이상 transfer하였다. Transfer가 끝나면 ponceau에 담근 후 band를 확인하고 TBST로 2회 이상 씻은 후 꺼내서 5% skim milk로 overnight시켜 background는 제거시켰다. 3회 washing 후 1차 antibody (1:1,000)를 1시간 동안 붙인 후 다시 2차 antibody (1:1,000)를 붙이고 ECL kit (Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에

옮겨 측정하였다. Band density는 Gel doc (Bio-rad, America)으로 확인하였다.

생육 저해환(Clear zone) 측정

항균력 측정은 paper disc법[7]을 이용하여 측정하였다. 즉, 평판 배지에 배양된 각 균주를 1백금이 취해서 액체 배지 10 ml에서 18~24시간 배양하여 활성화시킨 후 다시 액체 배지 10 ml에 균액을 0.1 ml 접종하여 3~6시간 분 배양한 후 평판배지 1개당 균수가 약 1×10<sup>7</sup> cells이 되게 접종하여 멸균된 filter paper disc (8 mm, Tokyo, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 0.05 ml/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜 37°C에서 18~24시간 배양하여 disc 주위의 clear zone (mm)의 직경을 측정하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해활성 확인

피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 tyrosinase 저해활성을 측정하기 위하여 mushroom 유래의 tyrosinase 저해활성 측정 결과는 Table 1, Fig. 1과 같이 나타내었다. 섬쭉부쟁이 분획물 중 에틸아세테이트 분획물은 1,000 ug/ml에서 50.0%의 저해능을 나타낸 반면, vitamin C는 100 ug/ml에서 99.0%의 저해능을 나타내었다. 이는 진달래꽃 열수 및 에탄올 추출물 1,000 ug/ml에서 각각 24.0%, 48.0%의 저해를 나타낸 결과[1]와 비교 시 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물의 활성이 더욱 우수함을 확인할 수 있었다.

Elastase 저해활성 확인

피부의 진피조직 속에는 콜라겐과 엘라스틴이 그물망 구조를 형성하면서 피부의 탄력성을 유지시켜 주는데 나이, 자외선과 같은 내외적 스트레스로 인하여 탄력성, 윤택성이 감소하고 과다 발현된 elastase에 의하여 엘라스틴의 그물망 구조가 깨지게 되면 피부가 처지고 주름이 생기므로 피부 노화가 발생하게 된다[27]. 그러므로 피부 노화의 주 원인중의 하나인 엘라스틴 분해효소인 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부

Table 1. Tyrosinase inhibitory activities of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm.

(µg/ml)	Extraction solvents				
	Hexane	EtOAc	n-BuOH	Water	Ascorbic acid
5	-	5.51±0.48	-	-	-
10	-	12.92±3.38	4.85±4.43	-	28.02±2.98
50	8.98±2.35	7.10±2.49	10.10±2.07	-	56.51±3.86
100	11.95±3.35	8.42±0.87	11.29±1.30	3.26±3.86	99.09±1.08
500	21.97±0.59	45.51±2.98	16.72±2.48	7.06±2.64	99.77±1.14
1000	20.98±3.26	50.20±2.24	23.99±1.23	12.90±3.51	99.81±0.07

All measurements were done triplicate, and value are average of three replication.

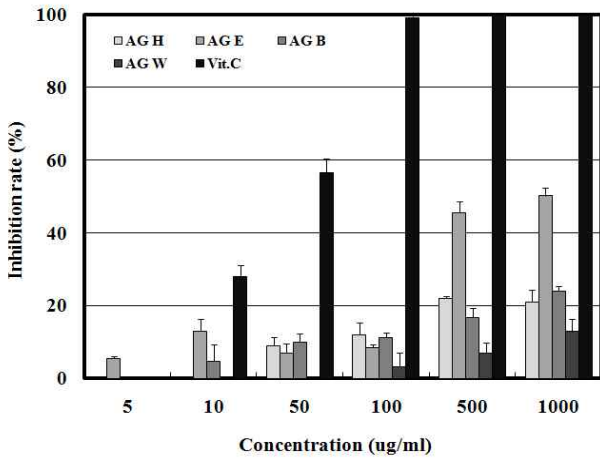


Fig. 1. Tyrosinase inhibition rate of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm. □: AG H, *Aster glehni* Fr. Schm. Hexane extracts; ▤: AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. Ethyl acetate extracts; ▥: AG B, *Aster glehni* Fr. Schm. Butanol extracts; ▦: AG W, *Aster glehni* Fr. Schm. Water extracts; ■: Vit. C, Ascorbic acid. Result are means±S.D. of triplicate data.

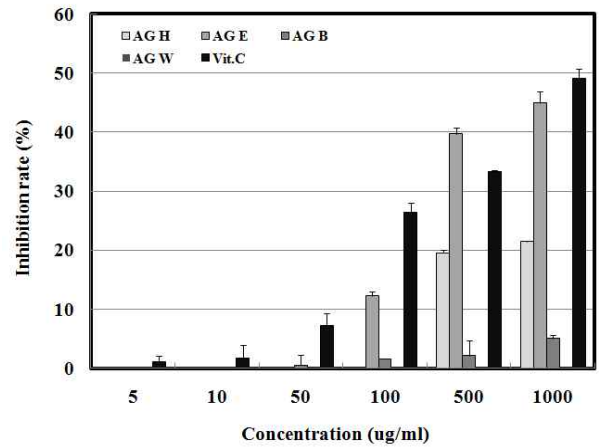


Fig. 2. Elastase inhibition rate of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm. □: AG H, *Aster glehni* Fr. Schm. Hexane extracts; ▤: AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. Ethyl acetate extracts; ▥: AG B, *Aster glehni* Fr. Schm. Butanol extracts; ▦: AG W, *Aster glehni* Fr. Schm. Water extracts; ■: CA, Catechin. Result are means±S.D. of triplicate data.

노화를 억제할 수 있다. 주름 생성과 관련된 elastase 저해 활성을 측정된 결과를 Table 2, Fig. 2와 같이 나타내었다. 섬쑥부쟁이 분획물 중 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물이 각각 1,000 ug/ml에서는 21.4%, 44.9%의 elastase 저해 효과가 나타났고, 대조군인 vitamin C의 경우 1,000 ug/ml에서는 49%의 elastase 저해 효과가 나타났다. 그 외 부탄올 분획물, 물 분획물에서는 거의 효과가 나타나지 않았다. 이는 익지인 열매로부터 열수, 에탄올, 메탄올 추출물 1,000 ug/ml에서 각각 25%, 7%, 26%의 결과[30]와 비교 시 섬쑥부쟁이 에틸아세테이트 분획물의 elastase 저해 활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

Collagenase 저해활성 확인

Collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다[10]. 또한 collagen은 collagenase에 의해 분해된다는 보고[8]가 있어, 섬쑥부쟁이 분획물의 collagenase 저해활성을 Table 3, Fig. 3과 같이 측정하였다. 섬쑥부쟁이 헥산 분획물의 경우 1,000 ug/ml에서 78.0%, 에틸아세테이트 분획물의 경우

1,000 ug/ml에서 83%, 부탄올 분획물의 경우 500 ug/ml에서 53%, 물 분획물의 경우 500 ug/ml에서 65%의 저해 효과가 나타났고, 대조군인 catechin의 경우 500 ug/ml에서 86%의 저해능이 나타났다. 이는 토사자, 음양곽, 건지황 열수 추출물 250 ug/ml에서 각각 40%, 37.5%, 35%의 저해능[15]과 비교 시 섬쑥부쟁이 에틸아세테이트 분획물도 그와 유사한 효능을 확인할 수 있었다.

섬쑥부쟁이 분획물에 의한 melanoma cell (B16F10)의 독성 확인

섬쑥부쟁이 분획물에 의한 melanoma 세포의 독성을 확인한 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. 섬쑥부쟁이 에틸아세테이트 분획물이 1,000 ug/ml에서 10% 이하의 세포독성이 나타나어 멜라노마 세포 독성에 영향을 적게 주는 것으로 나타났다. 이는 돌나물 추출물을 100 ug/ml 이상 처리 시 melanoma cell (B16F10)의 세포생존율이 90% 이하로 나타나는 결과[26]와 비교했을 때 섬쑥부쟁이 에틸아세테이트 분획물의 세포생존율이 우수함을 확인할 수 있었다.

Table 2. Elastase inhibitory activities of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm.

(ug/ml)	Extraction solvents				
	Hexane	EtOAc	n-BuOH	Water	Ascorbic acid
5	-	-	-	-	1.10±1.03
10	-	-	-	-	1.75±2.19
50	-	-	0.56±1.67	-	7.27±1.99
100	-	12.26±0.64	1.58±0.12	-	26.34±1.62
500	19.53±0.52	39.69±1.06	2.16±2.47	-	33.23±0.25
1000	21.48±0.12	44.89±2.03	5.07±0.60	-	49.12±1.63

All measurements were done triplicate, and value are average of three replication.

Table 3. Collagenase inhibitory activities of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm.

(µg/mL)	Extraction solvents				
	Hexane	EtOAc	n-BuOH	Water	(+)-Catechin
5	-	4.85±1.40	-	-	31.01±1.30
10	-	10.66±0.92	4.07±0.62	9.92±2.70	41.11±2.89
50	22.85±1.12	28.69±2.02	13.77±0.50	28.74±3.30	53.29±1.91
100	39.28±1.69	67.77±0.94	22.85±3.94	30.87±2.66	77.16±1.02
500	58.70±3.89	70.07±0.70	53.73±1.00	65.97±1.14	86.02±2.76
1000	78.0±2.81	83.02±0.88	49.96±1.44	70.64±2.50	93.15±0.30

All measurements were done triplicate, and value are average of three replication.

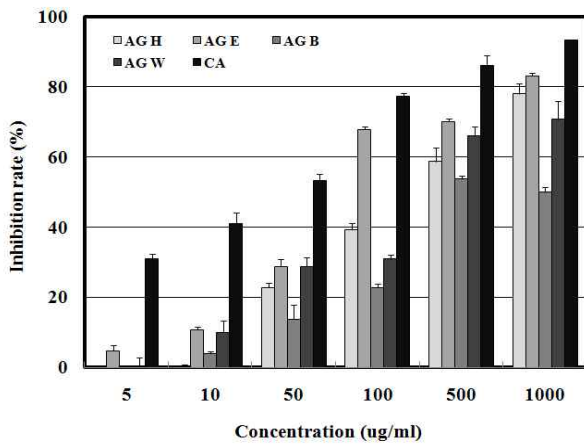


Fig. 3. Collagenase inhibition rate of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm. □: AG H, *Aster glehni* Fr. Schm. Hexane extracts; ▤: AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. Ethyl acetate extracts; ▥: AG B, *Aster glehni* Fr. Schm. Butanol extracts; ▦: AG W, *Aster glehni* Fr. Schm. Water extracts; ■: CA, Catechin. Result are means±S.D. of triplicate data.

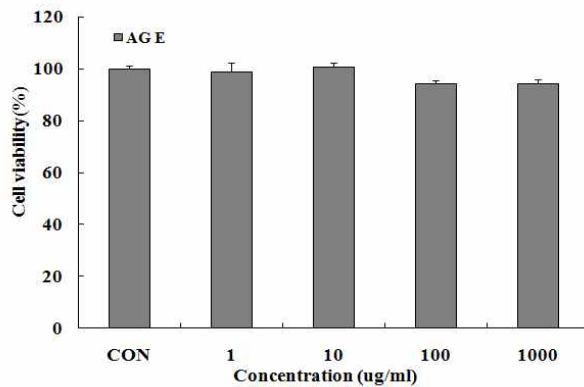


Fig. 4. Cytotoxicity of melanoma cell (B16F10) of EtOAc extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm. ■: AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. Ethyl acetate extracts. Result are means±S.D. of triplicate data.

Western blot을 통한 tyrosinase, TRP-1 단백질의 발현 측정 결과

Mushroom 유래의 tyrosinase 저해 실험의 결과로 섬쭉부

쟁이 에틸아세테이트 분획물은 tyrosinase 활성을 저해하여 melanin 생성을 감소시켰다. 이러한 결과가 멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현과도 연관성이 있는지를 확인하기 위해 tyrosinase, TRP-1의 항체를 이용한 western blot으로 관련 단백질의 발현량 변화에 대하여 조사하였다. B16F10 mouse melanoma 세포에 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물 100 µg/ml 처리 한 후 24시간 뒤에 tyrosinase protein과 TRP-1 발현을 western blotting으로 확인 하였다(Fig. 5). 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물을 처리하지 않은 군에서는 tyrosinase protein과 TRP-1의 발현이 증가 하였지만 에틸아세테이트 분획물을 100 µg/ml을 처리한 군에서는 tyrosinase protein이 30.5% 감소하였고, TRP-1은 41.5% 감소하였다.

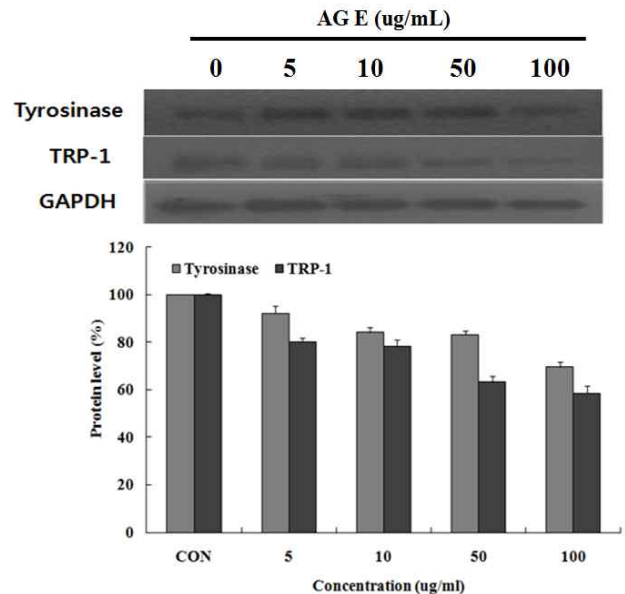


Fig. 5. Tyrosinase, TRP-1 protein expression rate of extracts isolated from *Aster glehni* Fr. Schm. on melanoma cell (B16F10). Lysates were prepared from control or different concentration (5, 10, 50, 100 µg/ml) of *Aster glehni* Fr. Schm. Ethyl acetate extracts. Result are means±S.D. of triplicate data.

Table 4. Anti-microbial activity of solvent fractions of *Aster glehni* Fr. Schm. on several microorganisms

Strains	Clear zone on plate (mm) <sup>a</sup>											
	AG H (mg/disc)			AG E (mg/disc)			AG B (mg/disc)			AG W (mg/disc)		
	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2
Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	- <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9.0	20.0	21.0	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Propionibacterium acnes</i>	8.0	10.0	12.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram(-)	<i>Escherichia coli</i>	11.0	12.0	14.0	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Diameter, <sup>b</sup>No inhibitory zone was formed.

AG H, *Aster glehni* Fr. Schm. Hexane extracts; AG E, *Aster glehni* Fr. Schm. Ethyl acetate extracts; AG B, *Aster glehni* Fr. Schm. Butanol extracts; AG W, *Aster glehni* Fr. Schm. Water extracts.

Tyrosinase와 TRP-1의 발현 저해는  $\alpha$ -MSH에 의한 세포신호 전달 경로 중 지속적인 ERK 활성화를 저해함으로써 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 섬쭉부쟁이 에틸 아세테이트 분획물은  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 extracellular signal-regulated kinase (ERK)의 활성화를 저해함으로써 멜라닌 생합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 사료된다.

#### 생육 저해환(Clear zone) 확인

일반적으로 피부 상재균 중 피부에 염증을 유발할 수 있는 세균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes* 등이 있다. 섬쭉부쟁이 분획물의 항균효과를 측정된 결과 Table 4와 같이 나타내었다. Hexane 분획물을 제외한 나머지 분획물에서 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*에 대한 항균효과는 나타나지 않았으나, Hexane 분획물은 *S. epidermidis*, *P. acnes*, *E. coli*에 대하여 2 mg/disc에서 각각 21.0 mm, 12.0 mm, 14.0 mm의 생육 저해환을 나타내었다. 이는 식물의 2차 대사물질로써 휘발성 성분인 정유성분의 항균효과에 관한 연구[2]와 섬쭉부쟁이 Hexane 분획물 내 정유성분이 다량 함유되어 있다는 보고[21,23]를 근거로 섬쭉부쟁이 Hexane 분획물 내 정유성분이 항균효과에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

본 연구에서는 섬쭉부쟁이 추출물을 용매분획하여 이들의 화장품 소재로서의 가치를 탐색하고자 미백, 주름 개선 및 항균 활성을 조사하였다. 미백과 주름 개선에 관련된 효소 실험에서 4가지 분획물(Hexane, EtOAc, n-BuOH, Water)에서 양성 대조군과 비교 시 이들 중 활성이 가장 우수한 섬쭉부쟁이 EtOAc 분획물을 선정하여, 색소 침착과 관련된 대표적인 메카니즘인 tyrosinase protein과 TRP-1 발현을 mouse 유래의 B16F10 melanoma cell line을 이용하여 측정하였다. 결과적으로 섬쭉부쟁이 EtOAc 분획물에서 농도 유의적으로 관련 단백질 발현을 저해하였으며, 이는 산업적인 응용을 고려할 때, 섬쭉부쟁이 EtOAc 분획물의 미백 활성이 특정 화합물에 의한 활성인지, 추출물 자체로서의 활성인지 섬쭉부쟁이 EtOAc 분획물의 미백 효과의 정확한 평가가 요구된다. 또한 추가적인

연구로 섬쭉부쟁이 EtOAc 분획물 또는 특정 화합물 모두 인체에 대한 효능과 부작용 측면에서 동물 대체 시험법(Alternatives to Animal Testing)을 통한 안전성이 확보된 근거를 위한 연구가 필요하다고 판단된다.

#### References

- An, B. J., C. E. Lee, J. H. Son, J. Y. Lee, G. H. Choi, and T. S. Park. 2005. Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. **48**, 280-284.
- Caccioni, D. R. L., M. Guizzardi, D. M. Biondi, A. Renda, and G. Ruberto. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* International J. of Food Microbiol. **43**, 73-79.
- Cannell, R. J. P., S. J. Kellan, A. M. Owsianski, and J. M. Walker. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Med **54**, 10-14.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. **47**, 936-942.
- Cho, M. J. 2001. A study on the antioxidant nutrients analysis and antioxidative activities of *A. denophora remotif lora* and *Aster glehni*. MS Thesis, Duksung Women's University Seoul, Korea.
- Choi, M. G., H. S. Chung, and K. D. Moon. 2008. Chemical components of *Solidago virgaurea* spp. *gigantea*, *Aster glehni* var. *hondoensis* and *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* grown on Ulleung Island. Korean J. Food Preserv. **15**, 576-581.
- Conner, D. E. and L. R. Beuchat. 1984. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. Appl. Environ. Microbiol. **47**, 229-233.
- Demina, N. S. and S. V. Lysenko. 1996. Collagenolytic enzymes synthesized by microorganisms. Mikrobiologiya **65**, 293-304.
- Goldberg, I. 1994. Functional Foods. pp. 3-550, Chapman & Hall Press. New York, NY, USA.
- Grant, N. H., and H. E. Alburn. 1959. Studies on the collagenases of *Clostridium histolyticum* Arch. Biochem. Biophys. **82**,

- 245-255.
11. Han, K. S., S. S. Ham, E. H. Jeong, and H. K. Lee. 1992. Antimutagenic effects of the edible mountain herb juices against Trp-P-1 and 2AF. *J. Fd Hyg. Safty* **7**, 161-168.
  12. Im, R. J. and B. S. Do. 1988. Plant Book. pp. 672, Social Science Publishers Seoul, Korea.
  13. Kaba, T., K. Morita, and T. Inoue. 1978. Antimutagenic action of vegetable factor on the mutagenic principle of tryptophane pyrrolysate. *Mutation Res.* **53**, 351-353.
  14. Kang, K. S. 2007. The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract. *J. Life Science* **17**, 1147-1151.
  15. Kang, Y. C., K. K. Choi, K. H. Kim, and H. K. Kim. 2002. Microencapsulation of aster scaber and *Aster glehni* by spray drying. *Korean J. Food Preserv.* **9**, 212-220.
  16. Kim, C. M., M. K. Sin, T. K. An, and K. S. Lee. 1997. Dictionary of Chinese Herb, pp. 1431, JucngDam Publisher, Seoul, Korea.
  17. Kim, H. K., Y. J. Kwon, K. H. Kim, and Y. H. Jeong. 2000. Changes of total polyphenol content and electron donating ability of *Aster glehni* extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 1022-1028.
  18. Kim, K. W., J. G. Shin, and D. G. Lee. 2008. Isolation of herbicidal compound from *Aster glehni* Fr. Schm. *Kor. Soc. Weed Sci.* **28**, 434-441.
  19. Kwon, Y. J., K. H. Kim, and H. K. Kim. 2002. Changes of total polyphenol content and antioxidant activity of *Ligularia fisheri* extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Korean J. Food Preserv.* **9**, 332-337.
  20. Lee, C. B. 2006. Coloured flora of Korea. pp. 322, Hyang moon sa, Seoul, Korea.
  21. Lee, M. S. and M. S. Jung. 1998. Analysis of volatile flavor components of *Aster glehni*. *Korean J. Soc. Food Sci.* **14**, 547-552.
  22. Lee, J. S. 2000. Effects of NAA on stem cuttings of varigated *Aster glehni*, *Achillea sibirica* and *Solidago virga-aurea* var. *asiatica* native to Korea. *J. Korean Env Res & Reveg Tech* **3**, 8-11.
  23. Min, Y. D., H. C. Kwon, S. Z. Choi, and K. R. Lee. 2004. Terpenoids from the aerial parts of *Aster glehni*. *Yakhak Hoji* **48**, 65-69.
  24. Nam, Y. and J. Baik. 2005. Status of research and possibility of development about endemic wild vegetables in Korea. *J. Korean Soc. Plants People Environment.* **8**, 1-10.
  25. Sadaki, O. 1996. The development of functional foods and materials. *Bioindustry* **13**, 44-50.
  26. Sim, G. S., J. H. Kim, B. C. Lee, D. H. Lee, G. S. Lee, and H. B. Pyo. 2008. Inhibitory Effects on Melanin Production in B16 Melanoma Cells of *Sedum sarmentosum*. *Yakhak Hoji* **52**, 165-171.
  27. Voegeli, R. 1996. Elastase and tryptase determination on human skin surface. *Cosmetic & Toiletries* **111**, 51-58.
  28. Wünsch, E. and H. G. Heindrich. 1963. Zur quantitativen bestimmung der collagenase. *Hoppe-Seyler's Physiol. Chem* **333**, 149-151.
  29. Yagi, A., T. Kanbara, and N. Morinobu. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica* **3981**, 517-519.
  30. Yoon, J. K., D. H. Lee, N. M. Kim, and J. S. Lee. 2005. Screening and extraction condition of anti-skin aging elastase inhibitor from medicinal plant. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**, 213-216.

초록 : 섬쭉부쟁이(*Aster glehni* Fr. Schm.) 분획물의 미백 및 주름 개선 효과

김한혁 · 박근혜 · 박강수 · 이진영<sup>1</sup> · 김태훈<sup>2</sup> · 안봉전\*

(대구한의대학교 화장품약리학과, <sup>1</sup>호서대학교 한방화장품과학과, <sup>2</sup>대구한의대학교 한약재약리학과)

천연의 식물과 추출물은 비용의 효율성과 풍부한 자원을 이점으로 식품, 약, 의약 분야와 마찬가지로 화장품 분야에서도 이용될 수 있다. 현재까지 섬쭉부쟁이는 항산화 활성을 제외하고는 그 효능에 대해 알려진 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 울릉도의 대표적인 특산 식물인 섬쭉부쟁이 추출물을 이용하여 화장품 분야에서의 활용 방안에 대한 연구를 조사한바, 효소적 *in vitro* 검색법을 측정하여 이들 중 가장 우수한 EtOAc 추출물을 대상으로 이러한 저해능이 멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현과도 연관성이 있는지를 확인하기 위해 B16F10 melanoma cell line 내 단백질 수준을 확인하였다. Tyrosinase, TRP-1의 항체를 이용한 western blot으로 관련 단백질의 발현량을 조사한 결과 섬쭉부쟁이 에틸아세테이트 분획물 100 µg/ml을 처리한 군에서는 tyrosinase protein을 30.5%를 억제하였고, TRP-1은 41.5% 억제하였다. 한편, 섬쭉부쟁이 분획물의 생육 저해환 측정에서는 *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*에 대하여 핵산 분획물 2 mg/disc에서 각각 21.0 mm, 12.0 mm, 14.0 mm의 저해환을 나타내어 섬쭉부쟁이 핵산 분획물만이 유일하게 높은 항균활성을 나타냈다. 이들 실험 결과를 미루어보아, 섬쭉부쟁이의 화장품 분야에서의 활용적 가치가 충분하다고 사료되나, 그 활성 성분에 대한 명확한 규명을 위한 추가적인 연구를 제시하는 바이다.