

Endlicheria anomala (Nees) Mez 추출물의 항산화, 항염증 및 미백 활성

진경숙¹, 이지영¹, 권현주^{1,2}, 김병우^{1,2*}

¹동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터

²동의대학교 생명융합학과

Received: September 25, 2013 / Revised: October 23, 2013 / Accepted: October 25, 2013

Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory, and Anti-Melanogenic Activities of *Endlicheria Anomala* Extract. Jin, Kyong-Suk¹, Ji Young Lee¹, Hyun Ju Kwon^{1,2}, and Byung Woo Kim^{1,2*}. ¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

In this study, the anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-melanogenic activities of *Endlicheria anomala* (Nees) Mez methanol extract (EAME) were evaluated by use of *in vitro* assays and cell culture model systems. The results revealed that EAME scavenges various radicals such as 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl hydrogen peroxide induced reactive oxygen species, and lipopolysaccharide induced nitric oxide. Furthermore, EAME induced the expression of anti-oxidative enzymes such as heme oxygenase 1, thioredoxin reductase 1, NAD(P)H dehydrogenase 1, and their upstream transcription factor, nuclear factor-E2-related factor 2. Moreover, EAME inhibited *in vitro* DOPA oxidation and 3-isobutyl-1-methylxanthine induced melanogenesis in B16F10 cells. Its anti-melanogenic activity will have originated from the inhibition of tyrosinase enzyme activity and melanogenesis related protein expression. Taken together, these results provide the important new insight that *E. anomala* possesses various biological activities such as anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-melanogenic. Therefore, it might be utilized as a promising material in the fields of nutraceuticals and cosmetics.

Keywords: *Endlicheria anomala*, anti-oxidative activity, anti-inflammatory activity, anti-melanogenic activity

서 론

생활 수준의 향상으로 삶의 질에 대한 욕구가 높아지면서 세대와 성별을 불문하고 건강과 미용에 대한 관심이 매우 높다. 특히 자외선, 염증, 산화적 스트레스 등 다양한 자극에 의해 유발되는 기미, 주근깨와 같은 색소침착형 피부질환(hyperpigmentation)은 대인 관계 및 사회 생활에 영향을 미치는 경우가 많아 이의 예방 및 치료에 대한 관심이 집중되고 있다. 이에 따라 최근 많은 연구들이 항산화 및 항염증 활성을 바탕으로 한 미백 활성 보유 신소재 개발 및 그 활성 메커니즘의 규명에 주력하고 있으며 특히 천연유래 소재로부

터 유용성분을 추출하고 생리활성을 규명하여 기능성 소재로서의 가능성을 타진하는 연구가 활발히 이루어지고 있다 [6, 13, 27].

생명체의 에너지대사 과정에서 끊임없이 발생하는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)은 과잉 생산 시 산화적 스트레스(oxidative stress)의 유발을 통해 세포조직에 치명적인 손상을 유발하여 암, 뇌 질환, 심장질환, 동맥경화 등 다양한 퇴행성 질환의 원인이 되며 피부 손상, 염증, 노화 등을 유발할 뿐만 아니라 자외선에 의한 melanin 생성 과정에서도 직·간접적인 원인물질로 작용하는 것으로 알려져 있다 [4, 9, 28]. 또한 최근 많은 연구에서 자외선에 의해 유발된 피부 색소 침착 및 melanin 생성의 원인으로 nitric oxide (NO)를 포함한 reactive nitrogen species (RNS)의 생성 또한 주목 받고 있어 이러한 ROS 및 RNS의 생성을 억제하거나 제거할 수 있는 강력한 항산화제의 개발에 많은 관심과

*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2900, Fax: +82-51-890-2914

E-mail: bwkim@deu.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

연구가 집중되고 있다[24, 32]. 한편 대표적인 cellular defensive phase 2 detoxifying antioxidant enzyme으로 알려진 heme oxygenase (HO)-1, NAD(P)H dehydrogenase 1 (NQO1), thioredoxin reductase 1 (TrxR1)의 유도는 산화적 스트레스를 방어하는 중요한 기전 중 하나로 다양한 carcinogen으로부터 세포를 보호하는 chemoprevention에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[8, 37]. 특히 천연에서 유래한 다양한 dietary phytochemical은 phase 2 detoxifying antioxidant enzyme의 발현 증가를 통해 chemopreventive function을 나타내며 그 상위 전사인자인 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 조절된다. 이러한 chemoprevention은 항산화 활성을 기초로 하여 함암 뿐만 아니라 염증, 뇌 및 심혈관계 질환, 노화 등의 예방 및 치료 기전과도 상호작용하는 것으로 알려져 있어 그 중요성이 더욱 커지고 있다[5, 30, 31, 35].

Melanin은 대부분의 생물체에 널리 분포되어 있는 흑갈색의 색소 성분으로 표피층의 melanocyte 내에 존재하는 melanosome에서 합성되는데, tyrosinase에 의해 tyrosine을 원료로 하여 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA) 또는 DOPA quinone으로 변환되는 산화 및 중합 반응으로 생합성 된다[18, 26]. 이러한 melanin은 자외선을 흡수하여 침투를 차단함으로써 피부자극에 대해 저항력을 높여주지만, melanin 합성이 과도하게 일어날 경우 기미, 주근깨, 검버섯과 같은 색소 침착을 유발하게 된다[23].

Melanogenesis, 즉 melanin의 생성은 자외선과 같은 스트레스에 의해 유도된 free radical이 melanocyte에서 melanin 생성을 촉진하는 tyrosinase 단백질 발현 유도를 통해 일어나는 일련의 과정이다[1]. 자외선에 의해 keratinocyte에서 p53이 활성화되면 pro-opiomelanocortin에서 γ -melanocyte stimulating hormone (γ -MSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), β -lipotropin이 생성되고 이 중 ACTH에 의해 생성된 α -MSH가 keratinocyte로부터 방출되어 melanocyte의 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor에 결합하여 GTP-binding protein (Gs)을 활성화시킨다. Gs는 다시 adenylate cyclase의 활성화를 통해 cAMP의 증가를 통한 protein kinase A (PKA) 활성화를 유발한다. 활성화된 PKA는 cAMP response element binding protein (CREB)의 인산화를 일으키고 인산화된 CREB는 핵 내로 이동하여 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 promoter에 존재하는 CREB binding site에 결합함으로써 MITF의 발현을 유도한다. 생성된 MITF는 melanin 생성에 직접적인 역할을 담당하는 tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP1), TRP2의 promoter 지역에 결합하여 각 유전자의 발현을 유도하고 이렇게 만들어진 tyrosinase, TRP1, TRP2는 melanogenesis를 일으킨다[26]. 이러한

melanogenesis의 기전을 바탕으로 천연물을 이용한 미백 소재 개발의 전략 중 하나는 소재가 보유한 강한 항산화능 및 항염증 활성을 기반으로 하여 세포나 조직들을 여러 가지 외부 자극원으로부터 보호 또는 방어하며 안전성과 기능성을 바탕으로 melanin 생성에 직접적으로 관여하는 tyrosinase 효소의 작용 기작을 저해함으로써 피부의 미백효과를 기대할 수 있다[7, 16].

Endlicheria anomala (Nees) Mez는 쌍떡잎식물 녹나무목 녹나무과의 상록수로 남아메리카와 아마존 지역에서 주로 자생하는 신중 열대 식물이다. 민간에서 독을 제거하거나 괴사로 몸의 한 부분이 썩어서 생리적 기능을 잃는 병인 괴저(壞疽)의 치료에 사용된 것으로 알려지고 있으나 본 소재와 관련하여 보고된 연구 결과는 거의 없다. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 신소재 개발의 일환으로 민간에서 약재로 사용된 것으로 알려진 *E. anomala* 수피의 메탄올 추출물이 보유한 항산화, 항염증 및 미백 활성을 *in vitro* assay system 및 cell culture model system을 이용하여 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

E. anomala 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 *E. anomala* 추출물(이하 EAME)은 한국생명공학연구원, 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FBM117-033)하였으며 메탄올을 이용하여 45°C에서 15분간 초음파 파쇄 후 2시간 동안 정치시키는 과정을 하루 10회 반복하여 3일간 수행 후 filter로 여과하고 농축건조시킨 시료로서 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

DPPH radical 소거 활성 측정을 통한 EAME의 항산화능 분석

항산화 작용의 주요 기전 중 하나인 전자공여능은 인체 내에서 생성되는 free radical의 전자를 공여함으로써 free radical에 의한 노화와 질병을 억제한다. 이러한 전자공여능은 항산화 작용의 주요 지표로서 활용되고 있으며 특히 천연물이 보유한 항산화능의 측정에 많이 사용되고 있다[9]. 이러한 전자공여능 측정은 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical 소거능 분석을 이용하여 측정하였다. DPPH는 비교적 안정한 free radical로써, ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다[17].

DPPH radical scavenging activity 측정을 위해 EAME를

농도별(0.1024-12.8 µg/ml)로 메탄올에 녹여 준비하고 96 well plate에 메탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 40 µl와 각 시료 160 µl를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, multi-plate reader (Paradigm, Beckman, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(Inhibitory Concentration, IC₅₀)를 계산하였다. 대표적인 항산화제로 DPPH radical 소거 활성 측정 시 양성 대조군으로 주로 사용되는 ascorbic acid를 함께 비교 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

RAW 264.7 murine macrophage의 배양 및 세포독성 분석

항산화 및 항염증 활성의 세포 실험 모델계로 murine macrophage cell line인 RAW 264.7을 American Type Tissue Collection (ATCC®, TIB-71™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin/streptomycin (Pen/Strep)이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다[25].

활성 분석 수행 전 소재가 지닌 세포독성의 유무 확인과 함께 이후 실험 농도의 결정을 위해 RAW 264.7 cell을 24-well tissue culture plate에 well 당 1.0×10^5 cell을 seeding하여 부착시킨 후 EAME에 의한 세포 독성 유발 유무를 WST assay를 통해 분석하였다. EAME 처리 24 시간 후 WST 시약이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 반응시키고 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었으며 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 이후 실험을 수행하였다.

EAME의 reactive oxygen species (ROS) scavenging activity 분석

ROS는 과량 생산 시 DNA, protein, lipid를 포함한 생체 내 분자에 산화적인 변형을 유발하여 다양한 질병의 원인이 되므로 ROS 소거능은 항산화능의 중요한 지표로 활용된다[21]. Hydrogen peroxide (H₂O₂)는 대표적인 ROS 중 하나로 소재의 항산화능의 규명하기 위한 많은 연구에서 ROS 유도제로 사용되고 있다[33, 34, 36]. 본 연구에서는 EAME가 보유한 항산화능을 H₂O₂로 유도한 ROS 생성에 시료가 미치는 영향을 통해 분석하였다. RAW 264.7 cell에 cell permeable fluorescent dye인 50 µM의 dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 2 시간 동안 전 처리한 후 제거하고 500 µM의 H₂O₂와 농도 별 시료를 처리한 후 시료에 의한 ROS 생성 억제능을 multiplate reader를 이용한 fluorescence 측정을 통해 분석하였다. 측정값은 3회 반복 실험의

평균값으로 나타내었다.

EAME의 NO 생성 억제능 분석

대표적인 free radical 중 하나인 NO는 생체 내에서 중요한 세포신호전달물질로서 작용하나 과잉 생산 시 산화적 스트레스의 유발을 통해 염증 및 세포 손상의 원인이 된다[15]. 이러한 NO 생성 억제능의 분석은 Park 등[25]의 방법을 변형하여 수행하였다. RAW 264.7 cell을 24-well tissue culture plate에 well 당 1.0×10^5 cell을 seeding하여 부착시킨 후 1 µg/ml의 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 NO 생성을 유도하고 식물 추출물에 의한 NO 생성 저해능을 Griess reaction을 통해 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

항산화 효소 HO-1, TrxR1, NQO1 및 그 전사인자인 Nrf2의 발현 조절능 분석

EAME의 항산화 활성 기전을 알아보기 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1, TrxR1, NQO1과 그 전사인자인 Nrf2의 시료 처리에 의한 단백질 발현 변화를 Western blot hybridization으로 분석하였다. HO-1의 일차항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)로부터 구입하였으며 TrxR1, NQO1, Nrf2, Actin의 일차항체와 anti-goat, anti-rabbit, 그리고 anti-mouse 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후 50 µg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 1:1,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 hybridization하였다. Membrane washing 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시킨 후 chemiluminescence detection system (FluoChem® FC2, AlphaInnotech, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 실험의 결과는 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 대표적인 데이터를 제시하였다.

In vitro tyrosinase 효소 활성 저해능 분석을 통한 EAME의 미백 효능 분석

EAME의 tyrosinase inhibitor로서의 작용 유무를 mushroom tyrosinase 효소 활성 억제능 분석을 통해 확인하였다[22]. 1 mM L-tyrosine, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 그리고 증류수를 10:10:9의 비율로 혼합한 반응 혼합액 170 µl에 10 µl의 EAME와 20 µl의 mushroom tyrosinase 수용액(1000 units/ml)을 첨가하여 25°C에서 30분간 반응시

킨 후, multi-plate reader를 이용하여 490 nm에서 생성된 dopachrome의 양을 흡광도로 측정하였다. 양성대조군으로는 대표적인 tyrosinase 효소 활성 억제 물질 중 하나인 kojic acid를 사용하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다[3].

Melanocyte의 배양 및 melanogenesis 유도

미백 활성 분석에 사용되는 대표적인 cell model system의 하나인 B16F10 mouse melanocyte (CRL-6475™)를 ATCC®로부터 구입하여 10% FBS 및 Pen/Strep이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다[6]. 50 µM의 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)를 처리하여 melanogenesis를 유도하고 EAME에 의한 미백 활성을 분석하였다[14].

EAME의 세포 독성 유무 분석

미백 활성 분석 수행 전 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인함과 동시에 세포 독성을 유발하지 않는 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 WST assay를 수행하였다. 2×10^4 cell을 24-well multi plate에 분주하여 24시간 동안 부착시킨 후 시료를 농도 별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 시료 처리 후 WST 시약이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 반응시킨 후 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었으며 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 이후 실험을 수행하였다.

B16F10 mouse melanoma cell을 이용한 세포 내 melanin 함량 측정

미백 활성 분석을 위해 먼저 세포 내 melanin 함량 측정을 통해 EAME가 melanocyte 내에서의 melanin 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 1×10^6 개의 B16F10 cell을 D100 cell culture dish에 분주하여 24시간 동안 배양하고 3일 간의 시료 처리 후 배양 세포를 1× phosphate buffered saline (PBS)으로 씻어준 다음 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 포함된 1 N sodium hydroxide (NaOH) 용액을 처리하여 80°C에서 한 시간 동안 반응시킨 후 multi-plate reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Synthetic melanin solution을 이용하여 standard curve를 작성한 후 측정값을 대입하여 melanin 생성량을 계산하였다. 양성 대조군으로는 미백활성 보유 물질로 잘 알려진 arbutin을 사용하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다[20].

B16F10 mouse melanoma cell을 이용한 세포 내 tyrosinase 활성 측정

B16F10 cell에서의 tyrosinase 활성의 분석은 melanin 측

정과 같은 방식으로 세포에 시료를 처리한 후 배양 세포를 1× PBS로 씻어준 다음 1% (w/v) Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 0.1 M phosphate buffer가 포함된 lysis buffer를 처리하여 얼음에서 30분간 반응시킨 후 원심분리하여 cell lysate를 준비하였다. Bradford method로 단백질을 정량한 후 96-well plate에 50 µg의 단백질을 분주하고 2 mg/ml의 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)를 첨가한 후 405 nm에서 한 시간 동안 반응시키면서 매 10분 간격으로 dopachrome의 생성량을 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

EAME의 melanogenesis 관련 단백질 발현 조절능 분석

EAME가 melanogenesis의 각 단계에 관여하는 효소인 tyrosinase와 TRP-1, 2 그리고 melanocyte에 특이적인 전사인자로서 melanin 생성 효소의 발현을 조절하는 MITF의 promoter에 존재하는 CREB binding site에 결합하여 MITF의 발현을 유도하는 CREB의 단백질 발현 변화를 Western blot hybridization으로 분석하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, actin의 일차항체와 anti-goat 및 anti-rabbit 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였으며 p-CREB 및 CREB의 일차항체는 Cell Signaling Technology로부터 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 cell lysate를 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정 한 후 50 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 1:1,000으로 희석한 일차 항체와 hybridization하였다. Membrane 수세 후 HRP가 부착된 이차항체로 한 시간 동안 반응시키고 chemiluminescence detection system을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 실험의 결과는 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 대표적인 데이터를 제시하였다.

통계 분석

실험의 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 각 데이터의 통계 분석은 SPSS 20.0 software를 이용한 unpaired Student's *t*-test를 통해 *p* 값이 0.05 미만($p < 0.05$)인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

EAME의 항산화능 분석

천연소재가 보유한 항산화능은 다양한 생리활성의 근간이 되며 특히 산화적 스트레스와 염증에 의해 쉽게 발생하는 색소 침착 및 피부 질환에 대응하기 위해서는 강한 항산화능을 보유한 미백 소재 개발이 매우 중요하다. 이러한 관점에

Table 1. DPPH radical scavenging activity of EAME.

Reagent	Concentration (µg/ml)	Inhibition rate (%)
EAME	0.1024	22.09 ± 2.64
	0.512	34.39 ± 3.63
	2.56	69.56 ± 2.54
	12.8	96.92 ± 0.13
Ascorbic acid (Positive control)	0.512	20.44 ± 0.11
	2.56	68.53 ± 0.59
	12.8	97.15 ± 0.06

서 천연유래 소재를 대상으로 한 많은 연구들이 항산화, 항염증 및 미백 활성 및 그 기전 연구를 중심으로 이루어지고 있다[12, 19, 29]. EAME의 항산화능 보유 유무 및 그 정도를 알아보기 위해 먼저 항산화능의 주요 지표 중 하나인 DPPH radical scavenging activity를 분석하였다. 그 결과 Table 1에 제시된 바와 같이 EAME의 농도 증가에 따라 강한 radical 소거능을 보여 0.1024, 0.512, 2.56, 12.8 µg/ml의 시료 처리에 의해 DPPH radical 소거능이 각각 22.09, 34.39, 69.56, 96.92%로 나타나 50% 소거 농도를 나타내는 IC₅₀ 값이 1.42 µg/ml로 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid, 즉 vitamin C의 IC₅₀ 값인 1.77 µg/ml과 유사한 정도의 높은 활성을 보여 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 이에 EAME가 DPPH 외에도 ROS 및 NO 등의 다양한 radical에 대한 소거활성을 나타내는지를 세포 수준에서 확인할 필요성이 제기되었다.

EAME가 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

EAME가 보유한 항산화능을 세포 수준에서 확인하기 위해 먼저 EAME가 세포 실험 모델체인 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 Fig. 1A에 제시한 바와 같이 100 µg/ml 이하의 처리 농도에서는 세포생존율이 증가하는 것으로 나타났으며, 150 µg/ml 이후에서는 농도의존적으로 세포증식이 억제되었다. 이를 통해 EAME가 100 µg/ml 이하에서는 독성을 유발하지 않는 것을 확인하였으며 이후 실험의 농도를 100 µg/ml까지로 결정하여 수행하였다. 한편 EAME의 처리시 10-50 µg/ml의 범위에서 농도의존적인 세포증식을 보여 저농도에서 세포 증식 활성능을 보유할 가능성을 시사하였다. 이러한 현상은 다수의 천연 유래 소재들이 일정 농도 처리에 의해 세포 증식이 촉진되는 것과 같은 현상으로 판단되나 그 정확한 기전은 아직 밝혀진 바 없다. 다만 소재 자체가 일정 농도에서 세포 증식을 촉진시키는 효과를 보유하고 있거나 혹은 외부 자극에 대한 일종의 방어 기작으로 세포 증식이 활성화되는 것으로 추측된다[11, 38].

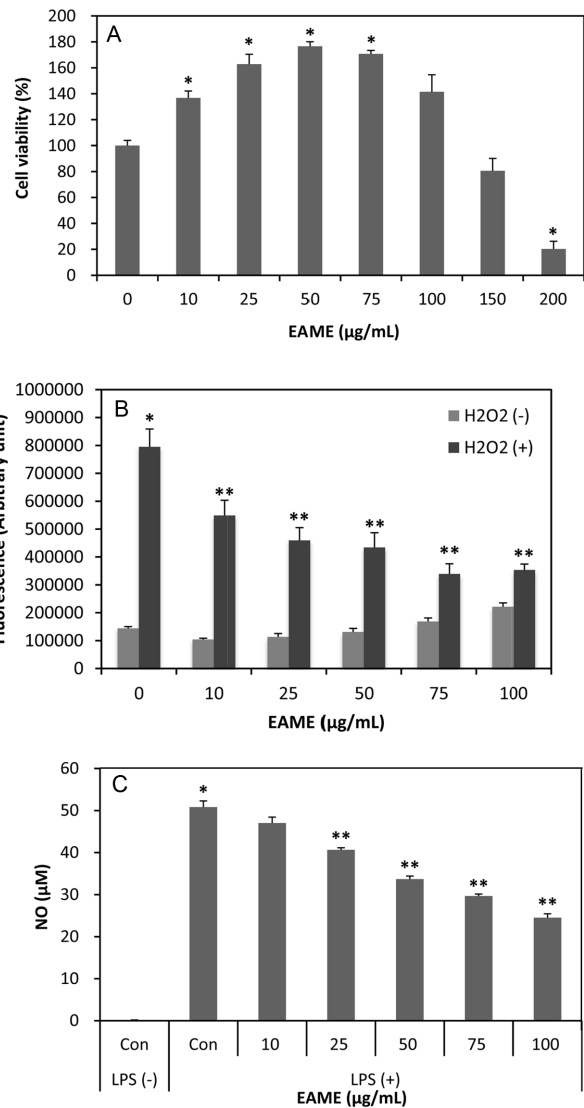


Fig. 1. Effect of EAME on cell viability (A), H₂O₂ induced ROS scavenging activity (B), and LPS induced NO formation (C) in RAW 264.7 cells.

Values are represented as the mean ± SD (n = 3 to 9). *, **Significantly different from the vehicle control [0 or Con (-)] and H₂O₂ or LPS induced control [Con (+)], respectively (p < 0.05).

EAME의 ROS scavenging activity 분석

DPPH radical scavenging activity에 의해 EAME가 보유한 높은 항산화능이 확인됨에 따라 그 작용 기전을 좀 더 자세히 알아보기 위해 먼저 RAW 264.7 cell에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H₂O₂를 처리하여 EAME에 의한 ROS scavenging activity를 분석하였다. 그 결과 Fig. 1B에 제시한 바와 같이 H₂O₂에 의해 유도된 ROS 생성이 EAME의 처리에 의해 효과적으로 저해되는 것으로 나타나 EAME가 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스를 효과적으로 감

소시킴을 확인하였다.

EAME의 NO 생성 저해능 분석

EAME가 DPPH 및 ROS에 대한 강한 소거 활성을 보임을 확인함에 따라 대표적인 RNS의 하나인 NO 생성에 미치는 효과를 알아보기 위해 LPS로 자극을 유도한 쥐 대식세포주 RAW 264.7 cell에서 농도별 EAME의 처리에 따른 NO 생성 양의 변화를 분석하였다. 그 결과 Fig. 1C에 제시된 바와 같이 10-100 µg/ml의 시료 처리에 의해 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보유함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 EAME가 DPPH, ROS, RNS 등의 다양한 산화적 스트레스에 대한 방어능을 보유함을 확인하였다.

EAME가 항산화 효소 HO-1, TrxR1, NQO1 및 상위 전사인자 Nrf2의 발현에 미치는 영향

강한 항산화능을 보유한 천연 유래 소재들이 Nrf2에 의한 항산화 효소계의 발현 유도를 통해 활성을 나타낸다는 것이 여러 연구를 통해 밝혀짐에 따라 EAME가 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보려 하였다[10, 30]. 이를 위해 대표적인 항산화 효소들로 천연물에 의한 항산화 활성에 의해 주로 발현이 유도되는 세 효소인 HO-1, TrxR1, NQO1과 그 상위 전사인자인 Nrf2의 단백질 발현에 EAME가 미치는 영향을 분석한 결과 Fig. 2에 제시된 바와 같이 10-100 µg/ml의 시료 처리에 의해 세 효소의 단백질 발현이 증가되었으며 그 정도는 HO-1이 가장 강하게 나타났다. 세 효소의 상위 전사인자인 Nrf2의 단백질 발현 또한 증가되었으며 Nrf2의 인산화 또한 증가되는 것으로 나타나 EAME에 의한 항산화 효소 발현 증가가 Nrf2의 발현 증가 및 인산화에 의해 나타날 가능성을 보였다[2, 8].

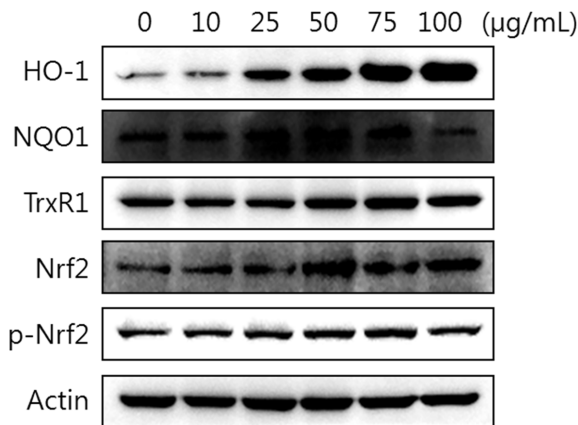


Fig. 2. Modulation of anti-oxidative enzymes, HO-1, NQO1, TrxR1, and its upstream transcription factor, Nrf2 protein expression in RAW 264.7 cells by EAME. Actin was used as an internal control.

Table 2. Tyrosinase enzyme inhibition activity of EAME.

Reagent	Concentration (µg/ml)	Inhibition rate (%)
EAME	4	5.66 ± 0.23
	20	6.77 ± 0.13
	100	52.77 ± 2.28
	500	74.66 ± 0.45
Kojic acid (Positive control)	2	17.63 ± 0.51
	10	82.44 ± 0.27
	50	98.21 ± 0.02

EAME의 tyrosinase inhibition activity 분석

EAME가 보유한 강한 항산화능이 확인됨에 따라 미백 효능의 분석을 위해 먼저 EAME가 *in vitro* tyrosinase activity에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과 Table 2에 제시된 바와 같이 4, 20, 100, 500 µg/ml의 시료 처리에 의해 tyrosinase 활성 저해율이 각각 5.66, 6.77, 52.77, 74.66%로 나타나 농도의존적인 tyrosinase 효소 활성 저해능을 보였으며 50% 소거농도를 나타내는 IC₅₀ 값은 77.33 µg/ml로 나타났다. 이는 양성 대조군으로 사용한 kojic acid 보다는 낮은 활성이지만 단일 물질이 아닌 추출물임을 감안할 때 높은 활성 저해능을 보유한 것으로 판단된다. 이와 같이 소재가 보유한 tyrosinase inhibitor로서의 가능성이 확인됨에 따라 세포 수준에서 직접적으로 melanin 생성 저해능의 유무 및 정도를 확인할 필요성이 제기되었다.

EAME가 B16F10 cell에서 melanin 생성 및 tyrosinase activity에 미치는 영향

EAME의 농도의존적인 tyrosinase 활성 저해능이 관찰됨에 따라 B16F10 melanocyte에서 IBMX에 의해 유도된 melanin 생성에 EAME가 미치는 영향을 분석하였다. 이를 위해 먼저 B16F10의 세포증식에 EAME가 미치는 영향을 분석한 결과 Fig. 3A에 나타난 바와 같이 70 µg/ml까지의 처리에서는 세포생존율에 큰 변화를 나타내지 않았고 80 µg/ml 이상에서 농도가 높아짐에 따라 세포증식이 억제되는 것으로 나타났다. 이를 통해 세포생존율에 영향을 미치지 않은 70 µg/ml까지의 처리 농도에서 IBMX에 의해 유도된 melanogenesis에 EAME가 미치는 영향을 분석한 결과 Fig. 2B에 제시된 바와 같이 50-70 µg/ml 범위에서 농도의존적인 melanin 생성 억제능이 관찰되었으며 활성의 정도는 양성대조군으로 사용한 100 µg/ml의 arbutin 처리시 보다 다소 높게 나타났다. 이러한 EAME의 anti-antimelanogenic effect가 tyrosinase 효소 활성 저해에 의한 것인지 확인하기 위해 cellular tyrosinase activity assay를 통해 분석한 결과 Fig. 3C에 나타난 바와 같이 농도의존적인 tyrosinase 효소

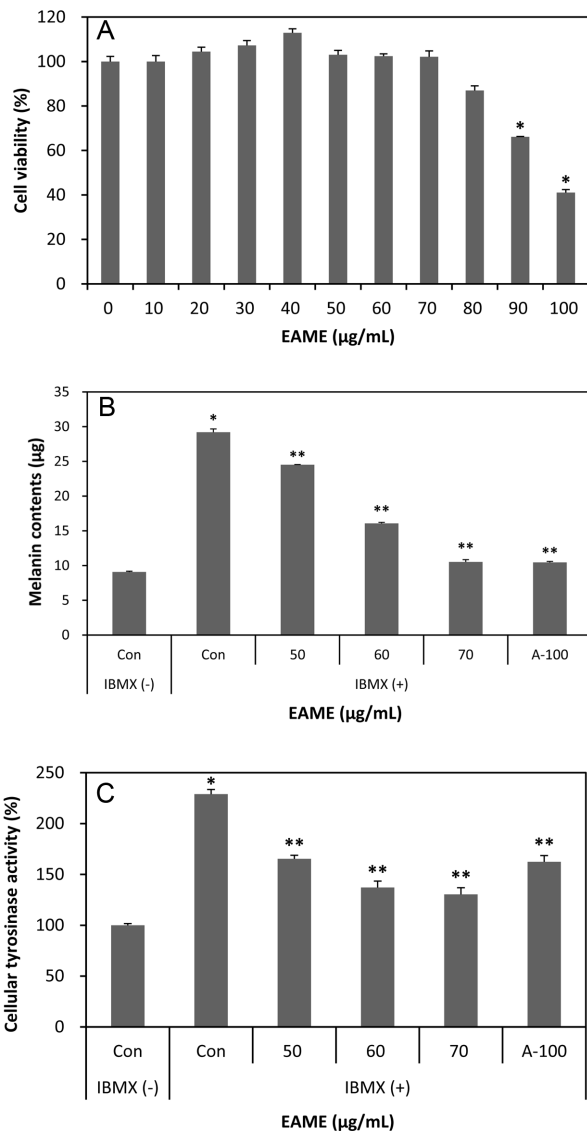


Fig. 3. Modulation of cell viability (A), IBMX induced melanogenesis (B), and cellular tyrosinase enzyme activity (C) by EAME on B16F10 cells.

A; arbutin used as a positive control. *, **Significantly different from the vehicle control [0 or Con, IBMX (-)] and IBMX induced control [Con, IBMX (+)], respectively ($p < 0.05$).

활성 저해능을 보였으며 그 정도는 melanin 생성 결과와 유사하게 나타나 EAME에 의한 anti-melanogenic effect가 melanocyte 내의 tyrosinase 효소 활성 저해에서 기인함을 확인하였다.

EAME가 melanogenesis 관련 단백질 발현에 미치는 영향 분석

EAME의 anti-melanogenic effect가 tyrosinase 효소 활

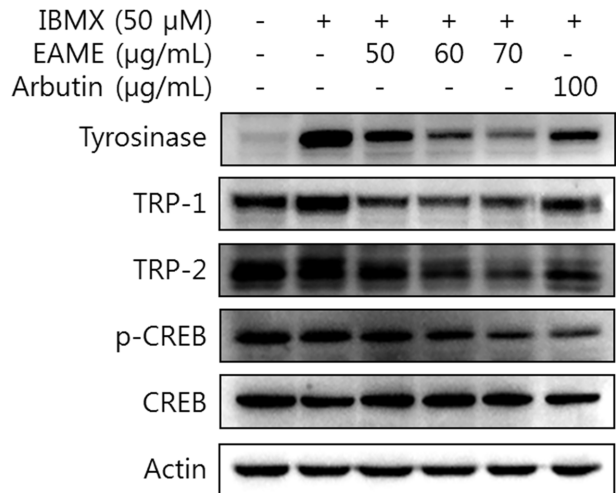


Fig. 4. Modulation of melanogenesis related protein expression by EAME.

Actin was used as an internal control.

성 저해에서 기인함을 확인함에 따라 EAME가 melanogenesis에 중요한 역할을 담당하는 핵심 단백질들의 발현에 미치는 영향을 Western blot hybridization으로 분석하였다. 그 결과 Fig. 4에 제시한 바와 같이 IBMX 처리에 의해 발현이 증가된 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2의 단백질 발현이 농도의존적으로 감소되었으며 그 저해능의 정도는 양성대조군인 arbutin 보다 높게 나타났다. 또한 세 melanin 합성 효소의 상위 전사인자인 CREB의 인산화 또한 농도의존적으로 감소됨을 보여 EAME에 의한 melanin 합성 단백질의 발현 저해가 상위 전사인자인 CREB의 인산화 저해를 통해 일어남을 시사하였다.

이상의 결과를 통해 EAME가 높은 항산화능과 미백 활성을 보유함을 확인하였으며, 이러한 결과는 향후 생리활성 보유 기능성 식품 및 피부 미용 소재로서의 활용을 위한 근거 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 *Endlicheria anomala* (Nees) Mez 메탄올 추출물(EAME)의 항산화, 항염증 및 미백 생리활성을 *in vitro* assay 및 cell culture model system을 이용하여 분석하였다. EAME의 항산화능을 분석한 결과 DPPH, H₂O₂로 유도한 ROS, LPS로 유도한 NO 등 다양한 산화적 스트레스 원인을 효과적으로 소거하였다. 대표적인 항산화 효소들로 천연물에 의한 항산화능 활성화에 의해 주로 발현이 유도되는 세 효소인 HO-1, TrxR1, NQO1 및 그 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과 시료 처리 농도의

증가에 따라 세 효소 및 Nrf2의 발현이 유의적으로 증가됨을 보였다. 또한 EAME는 *in vitro* DOPA oxidation을 강하게 저해하여 tyrosinase inhibitor로서 작용할 가능성을 시사하였고 이에 B16F10 melanocyte를 이용하여 미백 효능을 분석한 결과 유의적인 melanin 생성억제능 및 tyrosinase 효소 활성 억제능을 보였으며 이는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등 melanin 생성의 핵심 작용 효소들의 단백질 발현 저해를 통해 일어나는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 EAME가 높은 항산화능과 항염증 활성, 그리고 미백 활성을 보유함을 처음으로 밝혔으며 향후 기능성 식품 및 피부 미용 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This work was supported by Blue-Bio Industry Regional Innovation Center (RIC08-06-07) at Dong-Eui University as a RIC program under Ministry of Trade, Industry and Energy (MOTIE) and Busan city.

References

- Agar N, Young AR. 2005. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutat Res.* **571**: 121-132.
- Bryan HK, Olayanju A, Goldring CE, Park BK. 2013. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol.* **85**: 705-717.
- Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**: 982-985.
- Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher AM, et al. 2013. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 17643-17663.
- Chapple SJ, Siow RC, Mann GE. 2012. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**: 1315-1320.
- Chung KW, Park YJ, Choi YJ, Park MH, Ha YM, Uehara Y, et al. 2012. Evaluation of in vitro and in vivo anti-melanogenic activity of a newly synthesized strong tyrosinase inhibitor (E)-3-(2,4 dihydroxybenzylidene)pyrrolidine-2,5-dione (3-DBP). *Biochim. Biophys. Acta.* **1820**: 962-969.
- Gillbro JM, Olsson MJ. 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents—existing and new approaches. *Int. J. Cosmet. Sci.* **33**: 210-221.
- Giudice A, Arra C, Turco MC. 2010. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods Mol. Biol.* **647**: 37-74.
- Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**: 5319-5341.
- Hu R, Saw CL, Yu R, Kong AN. 2010. Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with antiinflammatory. *Antioxid. Redox. Signal.* **13**: 1679-1698.
- Huang HC, Hsieh WY, Niu YL, Chang TM. 2012. Inhibition of melanogenesis and antioxidant properties of *Magnolia grandiflora* L. flower extract. *BMC Complement Altern Med.* **12**: 72.
- Huang HC, Lien HM, Ke HJ, Chang LL, Chen CC, Chang TM. 2012. Antioxidative Characteristics of *Anisomeles indica* Extract and Inhibitory Effect of Ovatoiodolide on Melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 6220-6235.
- Ishikawa M, Kawase I, Ishii F. 2007. Glycine inhibits melanogenesis in vitro and causes hypopigmentation in vivo. *Biol Pharm Bull.* **30**: 2031-2036.
- Jin ML, Park SY, Kim YH, Park G, Son HJ, Lee SJ. 2012. Suppression of alpha-MSH and IBMX-induced melanogenesis by cordycepin via inhibition of CREB and MITF, and activation of PI3K/Akt and ERK-dependent mechanisms. *Int. J. Mol. Med.* **29**: 119-124.
- Kalyanaraman B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* **1**: 244-257.
- Kameyama K, Jimenez M, Muller J, Ishida Y, Hearing VJ. 1989. Regulation of mammalian melanogenesis by tyrosinase inhibition. *Differentiation* **42**: 28-36.
- Kedare SB, Singh RP. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**: 412-422.
- Lerner AB, Fitzpatrick TB. 1950. Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* **30**: 91-126.
- Li WJ, Lin YC, Wu PF, Wen ZH, Liu PL, Chen CY, et al. 2013. Biofunctional constituents from *liriodendron tulipifera* with antioxidants and anti-melanogenic properties. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 1698-1712.
- Lim YJ, Lee EH, Kang TH, Ha SK, Oh MS, Kim SM, et al. 2009. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of alpha-melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. *Arch Pharm Res.* **32**: 367-373.
- Liochev SI. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med.* **60**: 1-4.
- Maeda K, Fukuda M. 1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**: 765-769.
- Ortonne JP. 1990. The effects of ultraviolet exposure on skin melanin pigmentation. *J. Int. Med. Res.* **18 Suppl 3**: 8C-17C.
- Panich U, Tangsupa-a-nan V, Onkoksoong T, Kongtaphan K, Kasetsinsombat K, Akarasereenont P, et al. 2011. Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system. *Arch*

- Pharm Res.* **34**: 811-820.
25. Park CM, Park JY, Noh KH, Shin JH, Song YS. 2011. Taraxacum officinale Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF-kappaB modulation in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **133**: 834-842.
 26. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA. 2009. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* **66**: 1493-1506.
 27. Peng LH, Liu S, Xu SY, Chen L, Shan YH, Wei W, et al. 2013. Inhibitory effects of salidroside and paeonol on tyrosinase activity and melanin synthesis in mouse B16F10 melanoma cells and ultraviolet B-induced pigmentation in guinea pig skin. *Phytomedicine* **20**: 1082-1087.
 28. Pillai S, Oresajo C, Hayward J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**: 17-34.
 29. Rizza L, Bonina C, Frasca G, Puglia C. 2012. Skin-whitening effects of Mediterranean herbal extracts by in vitro and in vivo models. *J. Cosmet. Sci.* **63**: 311-320.
 30. Su ZY, Shu L, Khor TO, Lee JH, Fuentes F, Kong AN. 2013. A perspective on dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: oxidative stress, nrf2, and epigenomics. *Top Curr. Chem.* **329**: 133-162.
 31. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. 2008. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* **74**: 1526-1539.
 32. Videira IF, Moura DF, Magina S. 2013. Mechanisms regulating melanogenesis*. *An Bras Dermatol.* **88**: 76-83.
 33. Wang FW, Wang Z, Zhang YM, Du ZX, Zhang XL, Liu Q, et al. 2013. Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis in vitro. *J. Cell Biochem.* **114**: 2346-2355.
 34. Yagi H, Tan J, Tuan RS. 2013. Polyphenols suppress hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* **114**: 1163-1173.
 35. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **100**: 30-47.
 36. Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Maeng YH, Lee KH, Chang WY, et al. 2009. Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Chem Biol Interact.* **177**: 21-27.
 37. Zhao CR, Gao ZH, Qu XJ. 2010. Nrf2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol.* **34**: 523-533.
 38. Zhou J, Shang J, Ping F, Zhao G. 2012. Alcohol extract from Vernonia anthelmintica (L.) willd seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes. *J. Ethnopharmacol.* **143**: 639-647.