



## Whitening effect of extracts from *Matricaria chamomilla* L. with B16F10 melanoma cells

Jae-Bum Jo<sup>1</sup> · Myung-Uk Kim<sup>2</sup> · Eun-Ho Lee<sup>1</sup> · Ye-Jin Kim<sup>1</sup> · Eun-Bi Cho<sup>1</sup> · In-Kyu Kang<sup>3</sup> · Young-Je Cho<sup>1</sup>

### B16F10 melanoma cell을 이용한 캐모마일(*Matricaria chamomilla* L.) 추출물의 미백 효과

조재범<sup>1</sup> · 김명욱<sup>2</sup> · 이은호<sup>1</sup> · 김예진<sup>1</sup> · 조은비<sup>1</sup> · 강인규<sup>3</sup> · 조영제<sup>1</sup>

Received: 5 July 2018 / Accepted: 20 August 2018 / Published Online: 30 September 2018  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

**Abstract** *Matricaria chamomilla* L. has been used as a bath agent in Europe because of its sterilization effect on the skin. Flowers contain terpenes, flavonoids are effective in relieving inflammation. *Matricaria chamomilla* L. has been reported to have various drug efficacies such as sedation, anti-diabetic effect and anti-arthritis effect, but there is little research on the scientific efficacy of whitening effect. The purpose of this study was to examine the whitening effect of *Matricaria chamomilla* L. extract and to investigate the mechanism of inhibition of melanogenesis. The extracts were used to determine tyrosinase inhibitory activity. The tyrosinase inhibitory activity of extracts was ineffective for water extract but in 60% ethanol extract was shown in a concentration-dependent manner. B16F10 melanoma cell was measured using a powder obtained by lyophilization of 60%

ethanol extract. The toxicity was observed at a concentration of 75 µg/mL. And concentration range was selected to be at most 50 µg/mL. The effect of tyrosinase, MITF, TRP-1 and TRP-2 on the expression of melanin protein was investigated in melanoma cells of B16F10 melanoma cells. As a result, it was confirmed that as the concentration of the extract increased, the melanogenesis level decreased and the protein expression level also decreased in a concentration dependent manner. Therefore, it was concluded that *Matricaria chamomilla* L. extract inhibited melanogenesis in cells. Based on the above results, it is expected that it will be used as a useful basic data for industrialization of whitening functional food of *Matricaria chamomilla* L.

**Keywords** B16F10 Melanoma cell · Beauty food · Biological activity · Extracts · *Matricaria chamomilla* L.

Young-Je Cho (✉)  
E-mail: yjcho@knu.ac.kr

<sup>1</sup>School of Food science & Biotechnology/Food & Bio-Industry Research Institute, Kyungpook National University, 80 Daehakro, Bukgu, Daegu 41566, Republic of Korea

<sup>2</sup>Gyeongbuk Institute for Marine Bio industry, Uljin 36315, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Horticultural Science, Kyungpook National University, 80 Daehakro, Bukgu, Daegu 41566, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서론

현대 사회에서는 깨끗하고 하얀 피부는 미(美)의 척도가 되고 있다. 생활수준 또한 향상되고 평균 수명이 연장됨에 따라 피부미용에 대한 관심이 증가되었고, 자외선 노출의 증가와 환경 오염으로 인해 피부 미용 및 미백에 대한 관심이 더욱 커지게 되었다. 미백 효과를 검증하기 위해서는 melanin 형성을 억제 하는 것이 가장 중요한데, 이러한 이유는 keratinocyte에 있는 melanin 분포량에 따라 피부의 색소가 침착되고 피부색까지 결정되기 때문이다[1]. 피부의 색에 관여하는 melanin은 검은 색

소와 단백질의 복합체로 자연계에 널리 분포하는 phenol류의 고분자 물질로서 사람의 피부색을 결정하는 요인인 유전적 요인을 제외하고 일차적으로 피부 색소에 기인한다[2-4]. 현재 알려진 미백 원료로는 kojic acid, ascorbic acid, arbutin 등이 있다. 하지만 발암을 유발하거나 유전 독성을 가지며, 수용성에서 분해되며 세포 투과성의 문제로 화장품 미백 원료로서 문제점이 대두되고 있다. 그러한 이유로 부작용이 적은 천연적인 미백 소재의 탐구가 지속적으로 이어지고 있다.

허브류 중 캐모마일(*Matricaria chamomilla* L.)은 인도와 유럽이 원산지인 국화과 다년생 식물로 황색의 꽃이 피는 다이스 캐모마일과 백색의 꽃이 피는 로만 캐모마일로 나뉜다[5]. 피부 살균효과와 진신 미용 효과가 있어서 유럽에서는 미용을 위한 목욕제로 쓰이며, 자궁냉증에 효과를 가지며, 건위제 및 발한작용에 의한 감기에방, 불면증 해소, 진정작용 등의 효과가 알려져 있기 때문에 염증성 질환, 발열, 설사, 소장과 간의 조양을 치료하기 위해 주로 차로 음용 되어왔다[6].

캐모마일의 꽃에는 terpenes, flavonoids, coumarin, calicacid, 무기질 등의 성분이 함유되어 있으며, 꽃을 증류 추출하여 얻은 에센셜 오일은 푸른빛을 띠고 28종류의 terpenes ( $\alpha$ -bisabolol, chamazulene, bisabolol oxide 등)의 성분과 36가지의 flavonoids (apogenin 등), 52가지의 유기산 등 120여종의 화합물들이 함유되어 있는 것으로 보고되었으며, 특히  $\alpha$ -bisabolol은 통풍을 감소시키며, 위궤양의 진행을 억제시키고, 피부염 치료에 효과가 있으며, chamazulene은 항염증 지질과산화 억제효과를 가지고 있어 염증을 가라앉히는데 효과적이다[7,8]. 또한 캐모마일은 진정 작용, 항당뇨 효과, 항관절염 효과 등의 다양한 약물 효능이 있는 것으로 보고되었다[9-11]. 현재 캐모마일은 독특한 향과 맛으로 차 형태로 많이 이용되고 있으나 주로 향미적인 특성과 항산화 물질 탐색에만 집중되어 있어 캐모마일이 가지는 미백 효과에 대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 캐모마일 추출물을 동결건조하여 B16F10 mouse melanoma cell에 처리한 후 cellular tyrosinase 저해 활성을 측정하고, MITF, TRP-1, TRP-2 등의 melanin 생성에 관여하는 단백질의 발현 억제를 확인하여 미백 효과에 대한 효능을 확인함으로써 피부 미백 개선 화장품으로서 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료

본 실험에서 시료로 사용한 캐모마일은 시중에서 판매하는 것을 구입하여 사용하였고, 45 °C의 dry oven (Jeiotech, FO-600M, Daejeon, Korea)에서 건조한 후 40 mesh로 분쇄한 다음 진공포장하여 4 °C에서 저온저장하며 측정 시료로 사용하였다.

### 캐모마일 추출물 제조

시료의 추출은 열수 추출물의 경우, 건조 분말 1g과 증류수 200 mL를 가열하여 용액이 100 mL가 될 때까지 가열하여 증발시킨 후 냉각하여 shaking incubator에서 24시간 동안 120 rpm으로 4 °C에서 교반 추출하였으며, ethanol 추출물은 시료 1g에 60% ethanol 100 mL를 추출용매로 가하여 24시간 동안 120

rpm으로 4 °C에서 교반 추출하였다. 추출액은 Whatman No. 1 filter paper (Whatman, Maidstone, Buckinghamshire, UK)로 여과한 후 rotary vacuum evaporator (BUCHI, R-200, DE, New Castle, USA)를 이용하여 농축하였으며, 농축물은 phenolic compounds를 측정하여 농도를 설정하여 효소 실험에 적용하였으며, freeze dryer (Ilshinbiobase, FD8518, Dongducheon, Korea)로 -80 °C에서 96시간 동결 건조하여 얻은 분말은 cell line 실험 시 사용하였다.

### 세포 외 tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성 측정은 Hearing[12]의 방법에 준하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 2.3 mL와 기질액 1.5 mM L-tyrosine 용액 0.4 mL의 혼합액에 250 U/mL mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich Co.) 0.1 mL와 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL phenolic compounds 농도의 시료 0.2 mL를 넣고 대조구에는 시료 대신 증류수를 0.2 mL를 첨가하여 37 °C에서 20분간 반응시킨 다음, 흡광도 475 nm에서 측정하여 저해율(%)을 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance)  $\times 100$ 으로 계산하였다.

### 세포배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Thermo, Froma 311, Waltham, MA, USA)에 적응시켜 계대 배양하였다. 세포 확인 시 inverted microscope (Nikon, ECLIPSE Ts2, Tokyo, Japan)를 사용하였다. B16F10 mouse melanoma cell에 시료용액 농도별로 1시간 전처리 후  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) 1  $\mu$ M을 48시간 처리하였다.

### MTT assay에 의한 세포 독성 측정

세포 독성 측정은 Carmichael 등[13]의 방법에 따라 측정하였다. B16F10 mouse melanoma cell을 48 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well이 되게 450  $\mu$ L 분주하고, 24시간 뒤 시료를 농도별로 조절하여 50  $\mu$ L 첨가한 후 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 처리하였다. 대조군은 시료와 동량의 (-)DMEM 배지를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 50  $\mu$ L를 첨가하여 4시간 배양하여 배양액을 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO) 300  $\mu$ L를 가하여 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. 세포 생존율(%)은 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance)  $\times 100$ 으로 계산하였다.

### Melanin 함량 측정

멜라닌 양은 Hosoi 등[14]의 방법을 준하여 사용하였다. B16F10 mouse melanoma cell을 6 well에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주하여 24시간 뒤, (+)DMEM 배지를 제거한 다음 각각의 well에 (-)DMEM 배지를 분주하고  $\alpha$ -MSH 200  $\mu$ L는 normal 군을 뺀 모든 well에 분주하여 자극시켰다. 이후 시료를 농도별로 200  $\mu$ L 분주 후 48시간 동안 처리하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>

incubator에서 배양시켰다. 배양 후 상등액을 모두 제거하고 PBS로 세척한 후 -80 °C deep freezer에서 하루 보관 뒤, 상온에서 M-PER를 20 µL 분주하여 세포들을 모아 13,000 rpm, 4 °C, 15 분간 원심 분리하여 세포 침전물을 만들었다. 상등액을 제거 후 10% DMSO/1N NaOH 200 µL를 분주하여 heating block 70 °C에서 1시간 용해시킨 다음 흡광도 405 nm에서 O.D 값을 측정하였다. Melanin 함량(%)은 (1-시료의 absorbance/대조구의 absorbance)×100으로 계산하였다.

**Western blot을 통한 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 단백질 발현 측정**

B16F10 mouse melanoma cell을 6 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 안정화 하였다. (+)DMEM 배지를 제거한 후 (-)DMEM 배지를 분주하고 α-MSH 200 µL는 normal군을 제외한 모든 well에 분주하여 자극시켰다. 이후 시료를 농도별로 분주하여 48시간 처리 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer를 well 당 20 µL를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리(13,000 rpm, 4 °C, 15 min)하여 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 20 µL의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 1시간 30분간 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 60 V에서 2시간 30분 transfer하였다. Transfer가 끝나면 5% bovine serum albumin (BSA)에 1시간 동안 방치하여 background를 제거시켰다. 1X TBST로 3회 washing 후 1차 antibody (1:500)를 2시간 30분간 불린 후 다시 2차 antibody (1:1000)를 1시간 불리고 ECL kit (Adavansta, Melno Park, CA, USA)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Band density는 Image Quant LAS-4000 (GE life sciences, Taipei, Taiwan)으로 확인하였다.

**통계 처리**

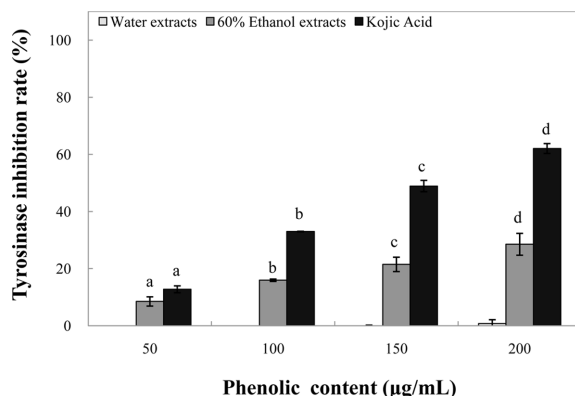
모든 실험은 3회 반복하여 측정한 평균값을 나타내었으며, 평균 ± 표준편차로 나타내었다. SPSS 22 for windows 프로그램 (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리 하였고, 분산분석(analysis of variance) 및 Duncan의 다중범위검정법(Duncan’s multiple range test)으로 95% 수준에서 유의성을 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**캐모마일 추출물의 tyrosinase 저해(미백) 활성 측정**

흑갈색 색소인 melanin은 피부속의 melanocyte 세포의 펩타이드 tyrosinase에 의해서 생성된다. Tyrosinase 효소는 인체의 melanin 생합성 경로 중에서 가장 중요한 초기 속도결정 단계인 L-tyrosine을 L-DOPA를 거쳐 L-dopaquinone으로의 전환에 관여한다. 피부가 자외선으로부터 노출되었을 때 활성화되는데, 피부의 노화를 촉진하며 피부에 암갈색 색소를 침착시키기 때문에 이후 미백 성분 효과를 평가하는데 널리 이용되고 있다 [15].

따라서 피부 내에서 melanin의 생합성을 효과적으로 저해하



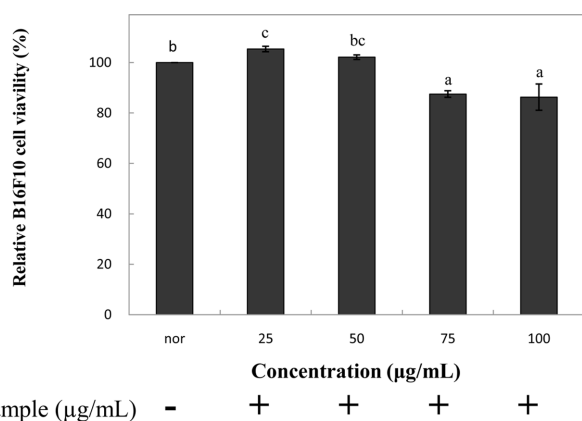
**Fig. 1** Tyrosinase inhibition rate of *Matricaria chamomilla* L. extracts. Mean ± standard deviation (n =3). Mean with different letters (a-d) above the bars are significantly different at p <0.05 by a Duncan’s multiple range test

기 위해서는 tyrosinase 저해 활성을 측정하는 것이 효과적이다. 이에 천연 약용 식물인 캐모마일을 Cho 등[5]의 방법에 따라 water와 60% ethanol 용매로 추출하여 tyrosinase 저해 활성을 우선적으로 측정하였다. 그 결과, Fig. 1에서와 같이 water extracts에서는 눈에 띄는 저해 효과를 확인할 수 없었다. 반면 60% ethanol 추출물에서는 phenolic compounds 200 µg/mL 농도에서 28.51%의 저해 활성을 나타내었으며, 농도 증가할수록 저해 효과 또한 증가하는 경향을 나타내어 농도 의존성을 확인할 수 있었다. 또한 이미 미백제로 알려진 kojic acid를 positive control로 설정하여 사용한 결과와 비교했을 때, 캐모마일 추출물이 보다 낮은 저해 효과를 보였지만, Jeon 등[16]의 골담초 잎과 꽃의 70% ethanol 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 살펴 보았을 때 200 µg/mL 농도의 phenolic에서 8.3%, 꽃은 6.1%의 낮은 저해 효과를 나타내었다. 이에 캐모마일의 tyrosinase 저해 활성은 보다 우수한 것으로 판단할 수 있으며, 위의 결과로 캐모마일 water 추출물과 60% ethanol 추출물 중 ethanol로 추출하였을 때 피부 미백과 관련 있는 효소인 tyrosinase의 저해 효과를 가진다는 것으로 판단하였고, 60% ethanol 추출물을 B16F10 melanoma cell에 적용시켜 세포 생존율을 측정하여 이후 실험의 시료로 사용하기에 적합한 농도를 알아보기로 하였다.

**캐모마일 추출물의 B16F10 melanoma cell에 대한 세포 독성 평가**

MTT는 노란색을 띠는 tetrazole로, 살아있는 세포에서 mitochondrial reductase에 의해 보라색 formazan을 형성한다. DMSO, ethanol solution 등에 의해 formazan이 용해되어 보라색을 띠고 500과 600 nm 사이의 파장을 흡수한다[17].

캐모마일의 미백 효능을 알아보기 위해 B16F10 Melanoma cell에 캐모마일 60% ethanol 추출물을 동결건조하여 얻어진 분말을 첨가하여 세포에 대한 독성과 생존율에 미치는 영향을 분석하였다. 캐모마일 60% ethanol 추출물의 농도를 25, 50, 75, 100 µg/mL로 처리하여 세포에 MTT assay를 시행하였다. 그 결과, Fig. 2에서와 같이 세포의 생존율은 대조군과 비교하였을 때 캐모마일 60% ethanol 추출물은 농도에 따라 각각 105.4,

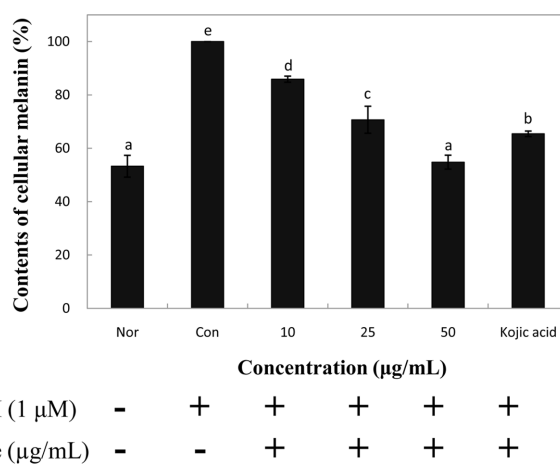


**Fig. 2** Cell viability of the *Matricaria chamomilla* L. extract on melanoma cells (B16F10) by using MTT assay. The cell were added with various concentrations (25, 50, 75 and 100 µg/mL) of the *Matricaria chamomilla* L. extract. Mean  $\pm$  standard deviation (n=3). Mean with different letters (a-c) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  by a Duncan's multiple range test

102.2, 87.5, 86.3%의 세포 생존율을 나타내어 농도 75 µg/mL에서 부터 세포의 생존율이 감소하여 약간의 독성이 있는 것으로 관찰되었다. 따라서 B16F10 세포에서 캐모마일 60% ethanol 추출물은 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하며, 이에 본 연구에서는 세포 생존율이 90% 이상인 10, 25, 50 µg/mL를 sample 농도로 설정하여 이후의 실험들을 진행하였다.

#### 캐모마일 추출물의 melanin 생성 억제 효과

Melanin은 식물, 동물 그리고 미생물에 까지 널리 분포하는 색소이며, 사람의 경우 피부색을 결정하는 동시에 외부의 유해한 자외선이나 유리기(free radical)로부터 사람의 피부를 보호하는 역할을 담당하고 있다. 이러한 melanin 색소는 피부의 기저층에 존재하며 melanin 생성 세포가 자외선을 비롯한 다른 자극들에 노출되었을 때 표피 가장 위층의 각질층에서 활성화되어 만들어진다. Melanin 색소의 생합성은 tyrosinase 효소를 비롯하여 다양한 효소들에 의해 생성, 조절되는 것으로 보고되고 있다[18-20]. 이에 현재 사용되고 있는 많은 합성 미백제 보다 부작용으로부터 안전한 천연 약용 식물인 캐모마일을 이용하여 melanin의 생성을 억제하는 효과를 알아보았다. 그 결과, Fig. 3에서와 같이  $\alpha$ -MSH를 단독으로 처리하였을 때, melanin의 생성량이 높아진 것을 알 수 있었고, 캐모마일 추출물과 함께 처리하였을 때, 추출물의 농도가 높아질수록 농도 의존적으로 melanin 생성량이 감소하는 경향을 보였다. 캐모마일 추출물 10 µg/mL의 농도에서는 약 15%의 melanin 생성 억제를 보였지만, 최고 농도인 50 µg/mL의 농도에서는  $\alpha$ -MSH 단독 처리구에 비하여 약 46%의 melanin 생성 억제 효과를 보여주었다. Positive control로 사용한 kojic acid는 동일 농도에서 약 35%의 억제 효과를 나타내었다. Yu 등[21]은 만형자 분획물을 이용하여 melanin 생성량을 측정된 결과, 25 µg/mL의 농도에서 butanol 분획물은 27%, hexane 분획물은 19%의 억제 효과를 보였다고 보고한 것과 비교하였을 때, 캐모마일 추출물은 25 µg/mL의 농도에서 약 30%의 억제 효과를 나타내었다.



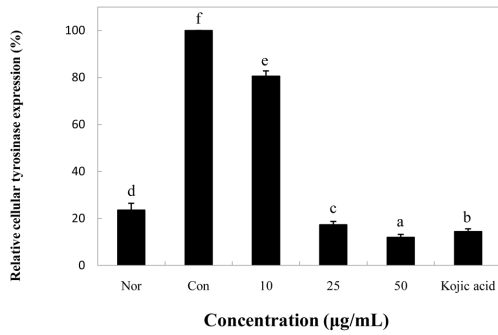
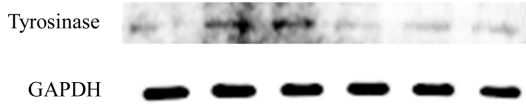
**Fig. 3** Inhibition melanin synthesis of *Matricaria chamomilla* L. and kojic acid on mouse melanoma cell (B16F10). Melanin contents were measured after treatment of the indicated concentration of *Matricaria chamomilla* L. and  $\alpha$ -MSH (1  $\mu$ M) for 48 h. Mean  $\pm$  standard deviation (n=3). Mean with different letters (a-e) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  by a Duncan's multiple range test

#### 캐모마일 추출물의 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 protein 발현 억제 효과

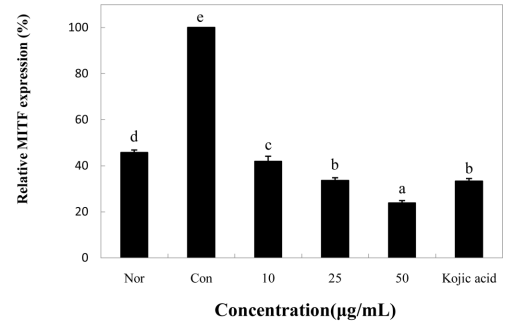
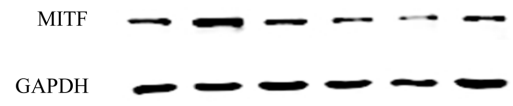
본 실험에서 사용한 자극제인  $\alpha$ -MSH는 tyrosinase의 활성을 자극시키고[22], melanin 합성에 관여하는 효소인 TRP-1, TRP-2에 작용하며 eu-melanin을 합성하도록 유도한다고 알려져 있다[23]. 이에 캐모마일 추출물을 이용하여 melanin 생성에 관련된 단백질의 발현과 억제 효과를 알아보기 위해  $\alpha$ -MSH 자극에 의해 유도된 조건에서 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 항체를 이용한 western blotting으로 단백질의 발현 변화를 확인해보았다. Fig. 4A에서 tyrosinase 단백질 발현량을 측정된 결과,  $\alpha$ -MSH를 단독 처리한 경우, 단백질 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 캐모마일 농도별과 kojic acid를 처리한 결과, tyrosinase 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제시키는 효과를 확인할 수 있었다. 캐모마일 50 µg/mL의 농도에서 단백질 발현량 11.9%로 동일한 농도인 kojic acid의 14.3%와 비교하였을 때 보다 우수한 단백질 발현 억제 효과를 확인할 수 있었다. Jeon 등[24]의 잣나무 잎 70% ethanol 추출물의 tyrosinase 단백질 발현량 측정 결과, 50 µg/mL의 농도에서 33%의 발현 저해를 보고한 것과 비교하였을 때, 캐모마일 추출물은 동일 농도에서 약 88%의 단백질 발현 저해를 보여 melanin 생성 억제에 효과가 보다 우수하다고 판단되었다.

Fig. 4B에서 MITF 단백질 발현량을 측정하였다. 그 결과,  $\alpha$ -MSH를 단독으로 처리하였을 때 단백질 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 캐모마일 농도별과 kojic acid를 처리한 결과, MITF 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제시키는 효과를 확인할 수 있었다. 캐모마일 추출물 50 µg/mL의 농도에서 MITF 단백질 발현 저해는  $\alpha$ -MSH 단독 처리구 대비 77%의 억제 효과를 나타내었고, 동일 농도인 kojic acid는  $\alpha$ -MSH 단독 처리구 대비 67%의 억제효과를 보인 것과 비교하였을 때 합성 미백제인 kojic acid 보다 캐모마일 추출물의 MITF 단백질 발현 억제 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. Yoo 등[25]은 연

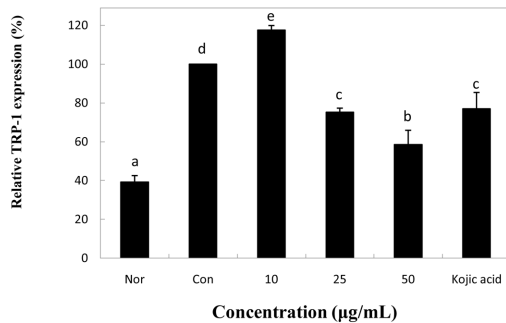
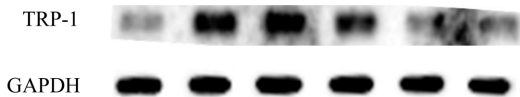
(A)  $\alpha$ -MSH (1  $\mu$ M) - + + + + +  
 Sample ( $\mu$ g/mL) - - 10 25 50 50



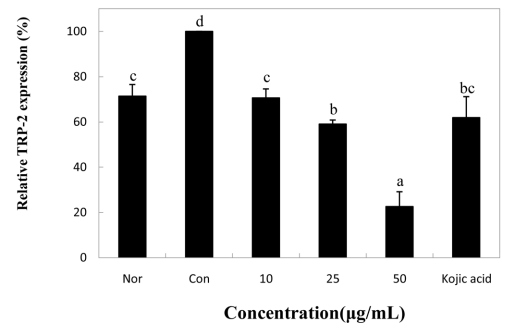
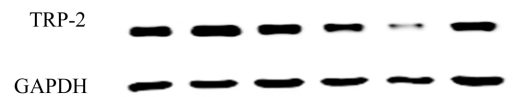
(B)  $\alpha$ -MSH (1  $\mu$ M) - + + + + +  
 Sample ( $\mu$ g/mL) - - 10 25 50 50



(C)  $\alpha$ -MSH (1  $\mu$ M) - + + + + +  
 Sample ( $\mu$ g/mL) - - 10 25 50 50



(D)  $\alpha$ -MSH (1  $\mu$ M) - + + + + +  
 Sample ( $\mu$ g/mL) - - 10 25 50 50



**Fig. 4** Tyrosinase (A), MITF (B), TRP-1 (C), TRP-2 (D) protein expression rate of 60% ethanol extracts from *Matricaria chamomilla* L. and kojic acid on mouse melanoma cell (B16F10). The expression levels of tyrosinase (A), MITF (B), TRP-1 (C), TRP-2 (D) in the protein was measured after treatment of the indicated concentration of *Matricaria chamomilla* L. and  $\alpha$ -MSH (1  $\mu$ M) for 48 h. Mean  $\pm$  standard deviation (n=3). Mean with different letters (a-f) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$  by a Duncan's multiple range test

있 추출물을 이용하여 MITF 발현량을 측정된 결과, 연잎 추출물 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 69.6%의 단백질 발현량을 보인다고 보고하였다. 저농도인 50  $\mu$ g/mL 농도의 캐모마일 추출물은 23%의 단백질 발현량을 나타내었다. MITF는 melanin 생성 기전에서 최초로 작용함으로 이 후 melanin 생성에 관여하는 기전들인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2를 억제하는 효과가 보다 우수하다고 보여진다.

TRP-1은 DHICA를 indole-5,6-carboxylic acid로 전환시키는 효소이다. DHICA oxidase라고도 불리며 tyrosinase의 변성을 막는 작용을 하여 tyrosinase 활성화에 기여하여 간접적으로 melanin 생성을 조절한다. TRP-2는 dopa chrome totomerase로서 dopa chrome을 DHICA로 변환시키는 기능을 수행한다[26,27].

Fig. 4C에서 TRP-1 단백질 발현량을 측정하였다.  $\alpha$ -MSH를 단독으로 처리한 경우 보다 캐모마일과 함께 처리하였을 때 농도가 증가할수록 단백질 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 캐모마일 추출물 50  $\mu$ g/mL의 농도에서  $\alpha$ -MSH 단독 처리구에 비해 46%의 단백질 발현을 억제하였다. Lee[28]의 왕까마중 열매와 전초의 ethanol 추출물은 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 열매는 62.2%, 전초는 65.8%의 TRP-1 단백질 발현량을 보였다고 보고한 것과 비교하였을 때, 캐모마일 추출물은 50  $\mu$ g/mL의 농도에서 54%의 발현량을 보여 저농도 처리로도 우수한 TRP-1 단백질 발현 억제 효과를 나타냄을 알 수 있었다. Fig. 4D에서 캐모마일 추출물의 TRP-2 단백질 발현량을 측정된 결과, 캐모마일 추출물의 농도가 증가할수록 TRP-2 단백질 발현이 감소하

는 것을 확인할 수 있었다. 캐모마일 추출물 50 µg/mL의 농도에서는 22%의 단백질 발현량을 보여 α-MSH 단독 처리구에 비하여 78%의 높은 단백질 저해 효과를 보였고 동일 농도의 kojic acid는 39%의 저해 효과를 보여 캐모마일 추출물의 TRP-2 단백질 저해 효과가 더욱 우수한 것을 알 수 있었다. Yoo 등 [25]의 연잎 추출물의 TRP-2 단백질 발현량과 비교하였을 때, 연잎 추출물의 TRP-2 단백질 발현량은 100 µg/mL의 농도에서 67.3%의 발현량을 보인 것과 비교하였을 때, 캐모마일 추출물은 50 µg/mL의 농도에서 22% 발현량을 나타내어 보다 우수한 단백질 발현 억제 효과를 알 수 있었다.

따라서 캐모마일 추출물의 melanin 생성 억제 효과와 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 protein expression 억제 효과를 확인한 결과, 합성 미백제인 kojic acid보다 동일 농도에서 더욱 우수한 활성을 보여 천연 미백제로서 효능을 확인하였다. 또한 위와 같이 캐모마일 추출물의 우수한 skin whitening 효과는 추출물에 함유된 terpenes, flavonoids, coumarin, 무기질 성분들의 작용으로 예상되었으며, skin whitening에 효과가 있다고 알려진 flavonoids (apigenin, quercetin, patuletin, luteolin 등)에 관한 후속 연구가 진행되어야 한다고 판단되었다.

## 초 록

기능성 천연물 소재로서의 가능성을 검토하고자 캐모마일 추출물의 미백 효과를 조사하고 melanin 생성 반응에 관여하는 물질 억제에 대한 기전을 규명하고자 하였다. 캐모마일을 water와 60% ethanol을 이용하여 추출하였고, 얻어진 추출물을 phenolic 농도별로 설정하여 tyrosinase 저해 활성을 알아보았을 때, water 추출물의 경우 효과가 미비하였고, 60% ethanol 추출물에서는 농도 의존적으로 저해 활성이 나타나어 melanin 생성 저해 효과가 있을 것으로 판단되었다. 캐모마일 60% ethanol 추출물을 동결건조하여 얻어진 분말을 이용하여 B16F10 melanoma cell에 대한 세포 독성을 측정 결과, 75 µg/mL의 농도에서부터 독성이 관찰되어 농도 구간을 10, 25, 50 µg/mL으로 선정하였다. α-MSH로 자극한 B16F10 melanoma cell에서 melanin 생성량을 측정하여 캐모마일의 melanin 생성 억제 효능과 melanin 생성에 영향을 미치는 단백질인 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현 억제 효과를 알아본 결과, 캐모마일의 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 melanin 생성 함량이 감소하였고, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, 등의 단백질 발현량 또한 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 캐모마일 추출물은 B16F10 melanoma cell에서 melanin의 생성을 억제하고, melanin 생성 관련 단백질발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 위의 결과들로 인하여 캐모마일은 미백 기능성 식품 산업화를 위한 유용한 자원으로 활용 될 것으로 예상되며, 추후 산업적 응용을 위한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단되었다.

**Keywords** B16F10 melanoma cell · 미용식품 · 생리활성 · 추출물 · 캐모마일

## References

1. Cho JH, Kim HJ, Kim YB (2003) The study on depigmentation effects of salt, acetum, sesame semen nigrum. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol 16: 79–95
2. Jin Y, Li G, Ahn SY, Kim EK, Row KH (2006) Extraction and effect of whitening agents from chinese plants. Analytical science & Technology 19: 194–202
3. Gates RR, Zimmermann AA (1953) Comparison of skin color with melanin content. Journal of Investigative Dermatology 21: 339–348
4. Parra EJ, Kittles RA, Shriver MD (2004) Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research. Nature Genetics 36: S54–S60
5. Cho YJ, Yoon SJ, Kim JH, Chun SS (2005) Biological activity of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 34: 446–450
6. Lawrence MB, Tobacco RJR (1996) Progress in essential oil. Perfumer and Flavorist 21: 55–68
7. Lee SH, Min KJ, Lee KO, Sin JS, Kim YC (2008) Effect of german chamomile oil application to atopoc dermatitis mice on the change of serum IgE level. J Kor Soc Cosm 14: 337–345
8. Srivastava JK, Shankar E, Gupta S (2011) Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. Mol Med Report 3: 895–901
9. Kim JH, Kim SY, Hong YN, Kim YS, Han YM (2014) Effect of chamomile flower extract on septic arthritis due to *Candida albicans*. Yakhak Hoeji 58: 343–348
10. Abebe W (2002) Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. J Clin Pharm Ther 27: 391–401
11. Weidner C, Wowro SJ, Rousseau M, Freiwald A, Kodelja V, Abdel-Aziz H, Kelber O, Sauer S (2013) Antidiabetic effects of chamomile flowers extract in obese mice through transcriptional stimulation of nutrient sensors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family. PLoS One 8: e80335
12. Hearing VJ Jr (1987) Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. Methods Enzymol 142: 154–165
13. 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
14. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 melanoma cell by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and retinoic acid. Cancer Res 45: 1474–1478
15. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. Photochem Photobiol 74: 283–290
16. Jeon YS, Jo BS, Park HJ, Kang SA, Cho YJ (2012) Screening of biological activity of *Caragana sinica* Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 41: 1211–1219
17. Mosmann Tim (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55–63
18. Aroca P, Urave K, Kobayashi K, Taskamoto K, Hearing VJ (1993) Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. J Biol Chem 268: 25650–25655
19. Paval S (1993) Dynamics of melanogenesis intermediates. J Invest Dermatol 100: 162S–165S
20. Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano J (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. J Biol Chem 269: 17993–18001
21. Yu JM, Kim DH, Son JH (2015) Whitening effects of solvent fractions

- isolated from *Vitex rotundifolia*. J Appl Biol Chem 58: 266–271
22. Abdel-Maldk A, Swope VB, Suzuki I, Harriger MD, Boyce ST, Urabe K (1995) Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropoc peptides. Proc Natl Acad Sci 92: 1789–1793
  23. Fuller BB, Meyskens FL Jr (1981) Endocrine responsiveness in human melanocyte and melanoma cell in culture. J Natl Cancer Inst 66: 799–802
  24. Jeon MO, Moon JS (2017) Study on Applicability of *Pinus koraiensis Siebold et Zucc* Leaf Extract as a Cosmetic Ingredient. Journal of Oil & Applied Science 34: 602–612
  25. Yoo DH, Joo DH, Lee SY, Lee JY (2015) Antioxidant effect of *Nelumbo nucifera* G. leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line. Journal of Life Science 25: 1115–1123
  26. Hearing VJ, Tsukamoto K, Urabe K, Kameyama K, Montague PM, Jackson IJ (1992) Fuctional properties of cloned melanogenic proteins. Pigment Cell Res 5: 264–270
  27. Takechi Y, Hera I, Nafizer C, Xu Y, Houghton An (1996) A melanosomal membrane protein is a cell surface taket for melanoma therapy. Clin Cancer Res 2: 1837–1842
  28. Lee HJ (2016) Effect of *Solanum nigrum* L. extract on antioxidant activity and melanogenesis. Daejeon University, Daejeon, Korea