



## Whitening and anti-wrinkle effect of *Spirodela polyrhiza* extracts

Dong Hee Kim<sup>1</sup> · Tae Soon Park<sup>1</sup> · Se Gie Kim<sup>2</sup>

### 부평초 추출물의 미백 및 항주름 효과

김동희<sup>1</sup> · 박태순<sup>1</sup> · 김세기<sup>2</sup>

Received: 17 October 2019 / Accepted: 29 October 2019 / Published Online: 31 December 2019  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2019

**Abstract** The antioxidant, whitening, and anti-wrinkle activity of *Spirodela polyrhiza* extracts and fractions were evaluated to determine its efficacy as a functional cosmetic material. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radical scavenging activities were 44.2 and 74.3%, respectively, at 100 µg/mL of SE-E (the ethyl acetate fraction of 70% ethanol extract). To measure anti-wrinkle effects, procollagen biosynthesis and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) inhibition activity were determined. At 25 µg/mL of SE (70% ethanol extract), the biosynthesis activity was 48.5%, and SE-E showed the best activity (57.8%) at the same concentration. MMP-1 inhibition activity of SE and SE-E was 13.4 and 28.5%, respectively, at 25 µg/mL. Finally, the inhibition of cellular melanin synthesis and cellular tyrosinase were measured to determine the whitening effect; at 25 µg/mL, the inhibition activities of SE were 9.6 and 13.8%, respectively, and those for SE-E were 15.4 and 22.0%, respectively. Our results confirmed the possibility of SE and SE-E as effective functional materials. Further research investigating the antimicrobial, anti-inflammatory, and anticancer activities of *S.*

*polyrhiza* is necessary to confirm its potential use in the food, cosmetics, and drug industries.

**Keywords** Anti-oxidant · Anti-wrinkle · Functional cosmetics · *Spirodela polyrhiza* · Whitening

### 서론

국내 기능성 식품 및 화장품 산업은 21세기에 들어서 크게 발전하고 있으며 이중 화장품 산업의 개발 추세는 친환경, 저자극 화장품에 있다. 일부 화장품은 값싼 원료를 대량으로 얻기 위해 피부자극을 유발하는 유기합성 성분이 사용되고 있으며, 피부 트러블이 자주 논란이 되고 있다[1,2]. 따라서 국내외 유수의 화장품 업체들은 피부자극이 강한 성분을 저자극, 천연소재로 대체하는 노력을 활발히 경주하고 있다. 또한 미백, 주름 개선, 자외선 차단기능을 갖는 기능성 화장품의 매출이 크게 늘고 있어, 식물계 소재를 이용한 기능성 화장품 소재개발이 매우 활발하다[3,4]. 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)는 진피 또는 표피 조직을 공격하고, 엘라스틴(elastin)의 분해 효소인 elastase를 활성화시킨다[5]. 활성화된 elastase는 엘라스틴 단백질의 3차 구조를 변형시켜 진피의 유연성을 감소시키고 피부주름을 생성한다[6]. 피부노화는 그 요인에 따라 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 외인적 노화는 외부 스트레스에 의해 노화 현상이 나타나는 것으로 자외선에 의한 광노화가 주된 원인이다. 자외선을 받게 되면 교원질(collagen) 및 탄력섬유(elastin fiber) 등의 기질 단백질이 손상되어 피부 내 교원질의 양이 부족해지고 탄력섬유가 변성되어 주름을 유발하며 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하는 현상을 보인다[7,8]. 또한 자외선에 노출되면,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), adrenocorticotropic

Dong Hee Kim and Tae Soon Park are equally contributed to this work.

Se Gie Kim (✉)  
E-mail: sgkim7@cu.ac.kr

<sup>1</sup>National Institute For Korean Medicine Development, Gyeongsan 38540, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Catholic University, Gyeongsan 38430, 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.

hormone 등의 신호전달물질을 멜라닌세포로 분비하게 된다[9]. 멜라닌은 melanosome 내부에서 생성되고 아미노산인 L-tyrosine 이 효소인 tyrosinase에 의해 dopaquinone으로 전환된다. 그러나 과도한 멜라닌 생성은 흑색증, 염증 후 색소 침착, 주근깨 또는 종자와 같은 상태에서 상당한 문제를 일으킬 수 있다[10]. 기능성화장품 개발 관련 연구에서는 피부 미백과 주름 개선 효능이 있는 다양한 소재 연구가 활발하게 진행되고 있으며 특히 웰빙 트렌드 확산으로 안전하고 우수한 효능을 함유한 천연 소재 개발에 초점을 맞추고 있다[11,12].

부평초(Spirodela Herba)는 개구리밥과(Lemnaceae)에 속한 다년생 수생식물인 개구리밥(*Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid)과 청평(*Lemna minor* L.), 좁개구리밥(*Lemna paucicostata* Hegelm)의 전초를 건조한 것으로, 6월9월 사이에 채취하여 씻어 불순물을 제거한 다음 건조하여 치료에 사용되고 있는 한약재이다. 부평초의 성분 관련 연구로 개구리밥(*S. polyrrhiza*)에서 campesterol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol 등의 sterol [13]과 apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucoside, cynaroside, hypolaetin-8-O- $\beta$ -D-glucoside, vitexin, orientin 등의 flavonoid, anthocyanin 및 tannin 등이 보고되어 있다[14,15]. 예로부터 한방과 민간에서는 부평초를 말려 부종, 수종, 갈증, 강장, 발한, 해독, 충독, 수독, 양모, 당뇨병, 창종, 화상 등 피부와 관련된 질환의 약재로 사용하였으며 [16,17] 이를 근거로 아토피관련 효능, 피부재생관련 효능, 항염증관련 효능, 피부 진정관련 효능, 피부미백관련 효능을 객관적으로 검증하여 바이오 소재화할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 부평초의 효능에 관한 연구로서 비만의 원인인 수습정체, 담음, 양허 등에 부평초가 효과가 있는 것으로 생각되어 지방세포 합성에 미치는 영향을 관찰한 결과 유의성 있는 결과가 있는 것으로 보고된바 있으며 [18], 면역과 아토피관련 효능, 항암 활성에 대한 연구 [19,20]와 부평초의 화학성분 및 항산화효과에 관한 연구 등이 일부 보고된 바 있어 건강 바이오 소재나 다이어트 소재로서도 활용 가능성이 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 수생식물로부터 항산화, 항주름 및 미백 활성을 나타내는 천연소재를 탐색하고자 다양한 수생식물을 대상으로 효능을 조사, 평가하였으며, 그 중에서 우수한 생리활성을 나타낸 부평초(*S. polyrrhiza*) 70% EtOH 추출물 및 각 분획물의 강한 라디칼 소거활성, 항주름 및 미백 활성을 검증하고 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 추출물의 제조

부평초(*S. polyrrhiza*)는 경산시 소재 약업사로부터 2016년 9월에 구입하였으며 원산지는 중국이다. 증거 표본은 한국한약진흥원 표본실에 보관중이다. 부평초 물 추출물(SW)은 시료 200 g을 환류 냉각하여 3시간 2회 반복 열수 추출하였다. 이후 열수 추출물을 여과하고 농축, 동결 건조하여 건조 중량 23.5 g을 얻었으며 수율은 11.8%이었다. 부평초 70% 에탄올추출물(SE)은 부평초 4 kg을 70% 에탄올 30 L를 사용하여 상온에서 2일간 침지시켜 2회 반복 추출하였다. 추출액을 여과하여 40 °C 이하에서 감압 하에 완전히 농축하고 동결 건조하여 건조 중량 480.29 g을 얻었으며 수율은 12.0%이었다. 이 중 457.2 g을 증

류수에 현탁 시킨 후 용매 극성에 따라 *n*-hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH을 이용하여 순차적으로 분획하여 *n*-hexane 분획물(SE-H) 94.05 g, EtOAc 분획물(SE-E) 68.80 g, *n*-BuOH 분획물(SE-B) 50.26 g을 얻었다. 나머지는 H<sub>2</sub>O 분획물(SE-W)로 하였으며 212.09 g이 얻어져서 각각의 회수율은 순서대로 20.6, 15.0, 11.0, 46.4%이었다.

### DPPH 라디칼 소거 활성

부평초 추출물 및 분획물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois 방법 [21]에 따라 측정하였다. 각 시료용액에 100  $\mu$ L에 0.02 mM의 희석한 DPPH 용액 50  $\mu$ L을 넣고 교반한 후 10분간 방치한 다음 microplate reader (Sunrise™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조물질로는 Butylated Hydroxy Anisole (BHA)를 사용했으며 DPPH 라디칼 소거 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도비로부터 산출하였다.

### ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성 측정

부평초 추출물 및 분획물의 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical 소거 활성을 Re 등의 방법 [22]을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 7 mM ABTS (in water)와 2.4 mM K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> 동량을 혼합 후 실온, 암소에서 12시간 방치하여 라디칼의 생성을 유도한 후 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액을 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.6-0.7 정도가 되도록 희석하여 사용하였다. 희석한 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 용액 100  $\mu$ L와 생약 추출액 50  $\mu$ L을 혼합하여 실온에서 7분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조물질로는 BHA를 사용하였으며 결과는 시료를 처리하지 않은 군에 대한 흡광도비로부터 산출하였다.

### 세포 배양 및 세포 생존율 측정

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum과 1% penicillin (100 U/mL)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) 배지를 사용하였으며, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. 세포 생존율 측정은 Park 등의 방법 [23]에 따라 측정하였다. 각 세포주[melanoma (B16F10) (ATCC, Rockville, MD, USA), fibroblast (CCD-986sk) (ATCC, Rockville, MD, USA)]를 96 well plate에 0.6-8 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well이 되게 180  $\mu$ L 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 20  $\mu$ L 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 MTT 용액 20  $\mu$ L를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 200  $\mu$ L를 가하여 실온에서 15분간 반응 시킨 뒤 microplate reader (Sunrise™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Procollagen type 생합성 및 MMP-1 저해 활성 측정

CCD-986sk 세포를 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 12 well plate에 접종한 후, UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>)를 조사한 후 시료를 농도별로 처

리 하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 이렇게 실험한 세포의 상등액을 모아서 실험에 사용하였다. 세포 배양액 내 콜라겐 생합성 정도는 procollagen type-C peptide (PIP) EIA kit (Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 propeptide의 양을 측정하였으며, MMP-1 저해 활성 측정은 matrix metalloproteinase-1 ELISA kit (Abcam, Cambridge, MA, USA)을 이용하여 측정하였다.

### Melanin 생합성 및 cellular tyrosinase 저해 활성 측정

피부 melanoma 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등의 방법[24]에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 melanoma 세포를 100 mm culture dish에 2×10<sup>6</sup> cell/dish가 되게 분주하고, 24시간 배양 후 α-MSH를 처리한 후 시료를 농도 별로 조제하여 2 mL 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액 (pH 7.4)으로 세척하였다. 그 다음 0.25 M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확한 세포를 1×10<sup>6</sup> cell 당 1 mL의 5% TCA로 처리하고, 2,500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether:ethanol (1:3) 1 mL를 가하여 2회 원심분리한 후 ether 1 mL로 세척 건조시킨다. 건조된 melanin에 1 N NaOH를 1 mL 가하여 80 °C에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cellular tyrosinase 저해 활성 측정은 B16F10 melanoma 세포를 6 well에 5×10<sup>4</sup> cell이 되도록 접종하여 배양하고, 24시간 뒤 각 well에 시료를 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 PBS로 2회 세척한 후 각 well의 세포에 lysis buffer (1% triton X-100, 0.1 M Sodium phosphate buffer, 50 mM PMSF, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 파괴시키고 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2 mg/mL 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160 μL에 효소용액 40 μL를 가하고 37 °C에서 1시간 가온하고 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하였다. Melanin 생합성 저해와 Cellular tyrosinase 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도비로부터 산출하였다.

### Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

MMP-1, MMP-9, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, microphthalmia transcription factor 저해활성을 보기 위하여 각각의 세포를 60 mm tissue culture dish에 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>)로 조사하고 추출물을 농도 별로 처리한 배지로 24-48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. RIPA buffer 10 mL에 complete mini 1 tab를 가함 100 μL로 용해해서 4 °C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 bradford assay로 정량하여 20 μL의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell 기기(Hofer, Holliston, MA, USA)를 이용하여 PVDF membrane (EMD millipore, billerica, MA, USA)에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. 1차 항체를 희석하여 4 °C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 mouse anti-rabbit IgG HRP (Santa Cruz

Biotechnology Inc, Dallas, TX, USA), bovine anti-goat IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc)의 각각의 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 3회 세척한 뒤 LAS 4,000(GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였으며 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 유의성 검증은 SPSS statistics 20 (IBM, Armonk, NY, USA) software package program을 이용하여 Duncan's multiple range test와 t-test를 실시하였으며 통계적 유의수준  $p < 0.05$ , 0.01에서 검증하였다.

### 결과 및 고찰

#### DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성 측정 결과

부평초 열수추출물(SW), 에탄올추출물(SE)과 에탄올추출물의 용매별 분획물에 대한 DPPH 라디칼 소거활성 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. SE는 100 μg/mL 농도에서 36.1%의 소거활성을 나타내었고, SW는 100 μg/mL 농도에서 24.7%의 소거능을 나타내어 SE가 SW보다 DPPH 라디칼 소거활성이 우수하였다. 부평초 70% 에탄올 추출물의 용매별 분획물의 경우 100 μg/mL 농도의 SE-E와 SE-B에서 각각 44.2, 42.6%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 머루 과피[25]와 선학초[26] 용매별 분획물에서 EtOAC, BuOH 분획물의 높은 DPPH 라디칼 소거활성 결과와 유사한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다.

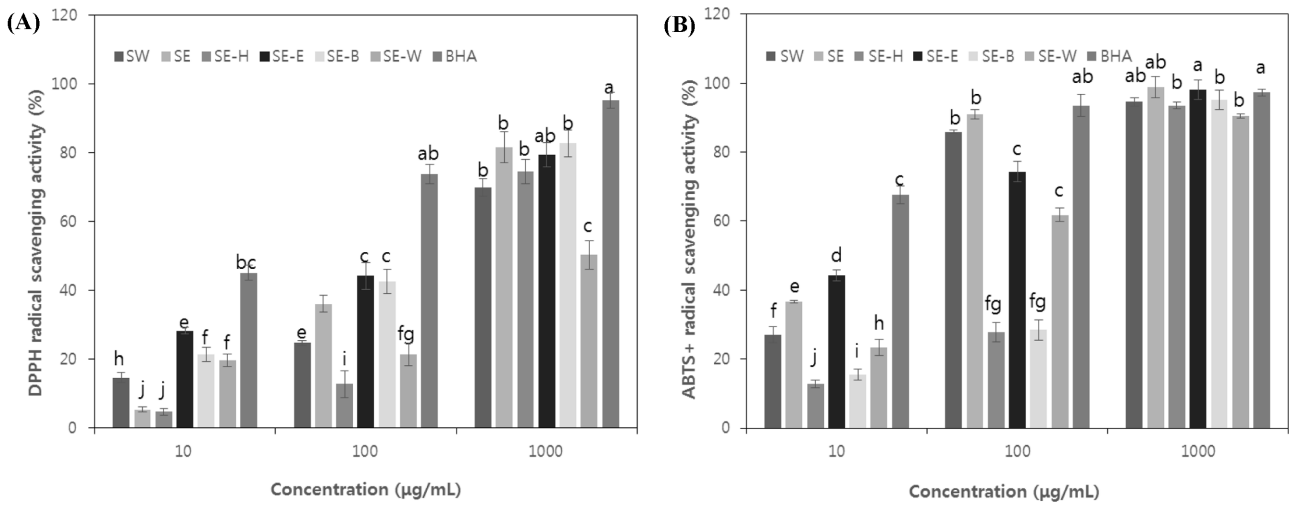
부평초 추출물들의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능 측정 결과는 Fig. 2와 같이 확인되었다. SE의 경우 100 μg/mL의 농도에서 91.0%로 열수 추출물보다 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성이 우수하였다. SE의 용매별 분획물 중에서는 SE-E가 100 μg/mL의 농도에서 74.3% 소거활성을 나타내어 분획물 중 가장 우수한 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 나타내었다. 이는 눈개승마 용매 분획물 중 EtOAC 분획물에서 ABTS<sup>+</sup> radical 소거능이 500 μg/mL 농도에서 99.2%로 높게 나온 것과 비교될 수 있는 결과이다[27].

#### CCD-986sk fibroblast 세포에 관한 MTT 측정 결과

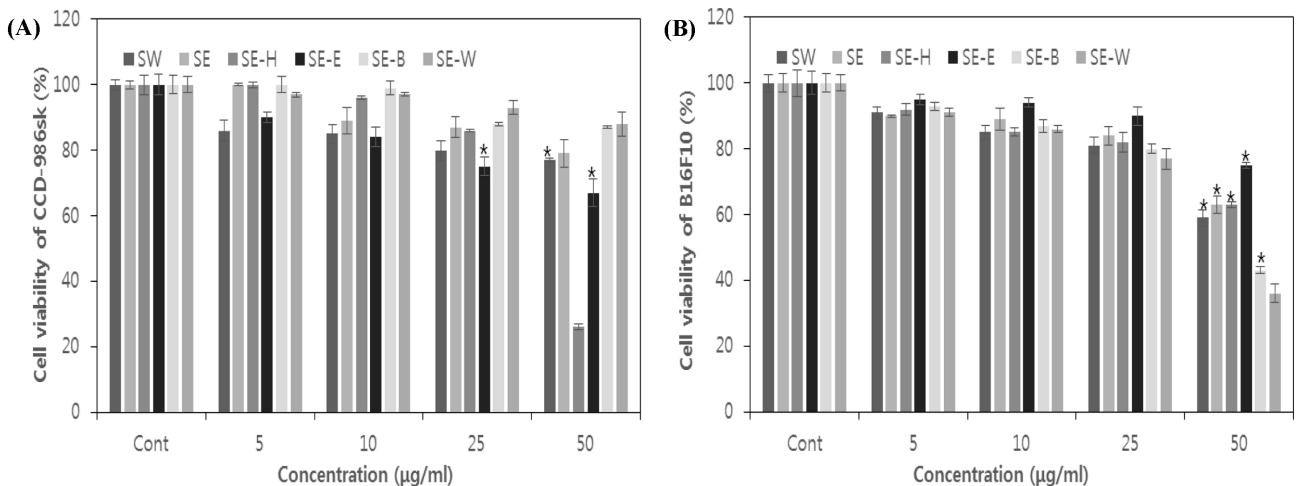
CCD-986sk 세포에 대한 부평초의 세포 생존율을 측정된 결과, 대조군에 비해 부평초 에탄올, 열수 추출물과 용매별 분획물은 25 μg/mL의 농도 이하에서 80% 이상의 세포생존율을 나타내었으며, B16F10세포에서도 대조군에 비해 25 μg/mL의 농도 이하에서 모두 80% 이상의 생존율을 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 SW, SE 및 70% 에탄올 용매 별 분획물은 세포생존율 결과를 바탕으로 25 μg/mL의 농도에서 procollagen 생합성, MMP-1 저해 활성, melanin 생합성 저해활성, tyrosinase 저해 활성 등을 검증 하였다.

#### Procollagen type 생합성 kit 측정 결과 및 MMP-1 저해 활성 kit 측정 결과

Procollagen은 아미노 말단과 카르복시 말단에 propeptide라는 peptide 염기서열을 포함한다. Propeptide는 소포체내에서



**Fig. 1** DPPH and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of extracts and fractions from *S. polyrhiza*. (A), DPPH radical scavenging activity of extracts and fractions from *S. polyrhiza*.; (B), ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of extracts and fractions from *S. polyrhiza*. ■ SW, *S. polyrhiza* extracted with Water; ■ SE, *S. polyrhiza* extracted with 70% EtOH; ■ SE-H, Hexane fraction of SE; ■ SE-E, Ethyl acetate fraction of SE; ■ SE-B, Butanol fraction of SE; ■ SE-W, Water fraction of SE. The results were expressed as the average of triplicate. Means not sharing a common letter (a-i) are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test

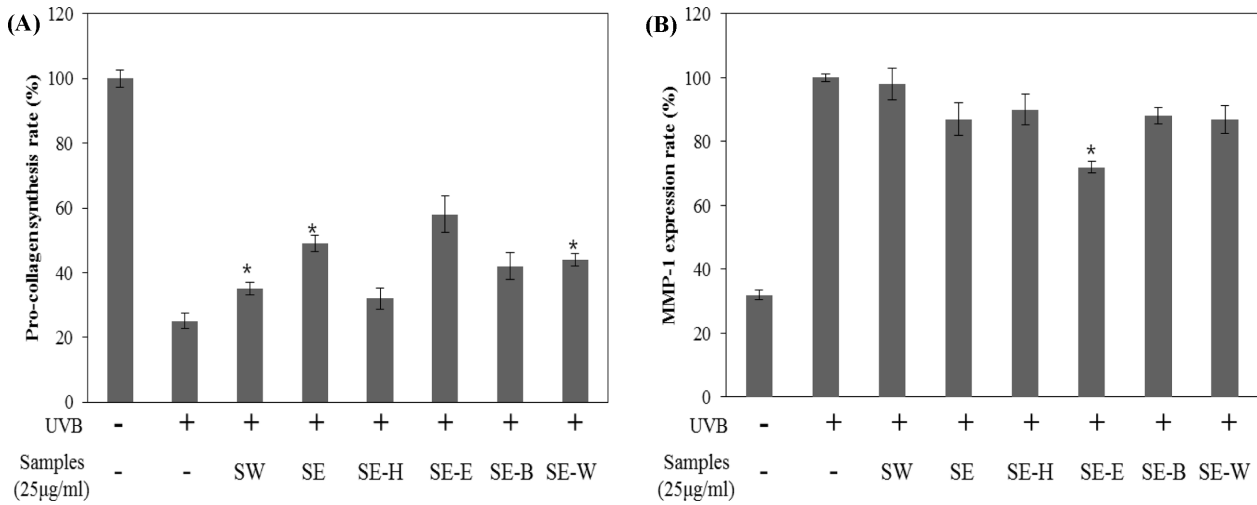


**Fig. 2** Cell viability of CCD-986sk and B16F10 cells after treatment with extracts and fractions from *S. polyrhiza*. (A), Cell viability of CCD-986sk.; (B), Cell viability of B16F10 cells. ■ SW, *S. polyrhiza* extracted with Water; ■ SE, *S. polyrhiza* extracted with 70% EtOH; ■ SE-H, Hexane fraction of SE; ■ SE-E, Ethyl acetate fraction of SE; ■ SE-B, Butanol fraction of SE; ■ SE-W, Water fraction of SE. The results were expressed as the average of triplicate. Significant differences were compared with control at  $*p < 0.05$  compared with no treatment

procollagen 분자의 folding을 도와줌과 동시에 collagen 중합반응이 일어날 때 collagen 분자로부터 절단, 분리된다고 알려져 있다. 따라서 propeptide의 양을 측정함으로써, 세포 내에서의 collagen 생합성 정도를 파악할 수 있다[28]. 섬유아세포에 대한 procollagen type C-peptide enzyme immunoassay에 의한 collagen 생합성량을 측정된 결과 Fig. 6과 같이 나타내었다. SW, SE의 경우 25 µg/mL의 농도에서 각각 35.4, 48.5%의 procollagen 생합성량을 나타내었다. 부평초의 용매별 분획물의 경우 SE-E (57.8%) > SE-W (43.8%) > SE-B (41.5%) > SE-H (32.3%) 순으로 procollagen 생합성 활성을 나타내었다. Koo 등[29]의 보고에 의하면, 사상자 용매별 분획물의 경우에는 BuOH > EtOAC

> water > hexane 분획 순으로 콜라겐 생합성의 증가가 확인되었다. 본 실험 결과에서는 SE-W가 SE-B보다 활성이 조금 높은 것으로 나타났지만 그 차이가 크지 않으므로 전체적으로는 EtOAC와 BuOH 분획물의 procollagen 생합성 활성이 우수한 경향을 유지하였다.

체내에서 생성되는 수종의 MMPs 가운데 MMP-1은 콜라겐에 특이적으로 작용하는 protease로서 MMP-1의 활성을 억제하여 콜라겐의 분해를 감소시키면, 피부조직의 탄력을 유지하고 주름생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다[30]. 부평초의 MMP-1 저해 활성 측정 결과는 Fig. 3에서 나타내었다. 그 결과, SE의 경우 25 µg/mL의 농도에서 13.4%를 나타내어 2.3%



**Fig. 3** Procollagen synthesis and MMP-1 inhibition activity on human dermal fibroblast treated with extracts and fractions from *S. polyrhiza*. UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>)-exposed cells were cultured for 48 h in the presence of *S. polyrhiza*. (A), Procollagen synthesis activity on human dermal fibroblast; (B), MMP-1 inhibition activity on human dermal fibroblast nor, normal control group (non irradiated-vehicle); con, negative control group (UVB irradiated vehicle); SW, *S. polyrhiza* extracted with Water; SE, *S. polyrhiza* extracted with 70% EtOH; SE-H, Hexane fraction of SE; SE-E, Ethyl acetate fraction of SE; SE-B, Butanol fraction of SE; SE-W, Water fraction of SE. The results were expressed as the average of triplicate. Significant differences were compared with control at \**p* < 0.05 compared with no treatment

의 저해 활성을 나타낸 SW보다 효과가 우수하였다. SE-E의 경우 대조군에 비해 28.5%의 저해율을 나타내어 분획물 중에서 MMP-1 저해활성이 가장 우수하였다. 이는 Koo 등[29]이 연구한 사상자 EtOAc분획물의 대조군 대비 3-12% 수준의 MMP-1 저해활성을 나타낸 결과와 비교해 보았을 때 SE-E의 MMP-1 저해활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 Procollagen type 생합성 측정 결과와 MMP-1 저해활성 측정 결과 모두에서 SE와 이의 분획물들은 control 대비 positive 활성을 나타내어 피부 주름 개선을 위한 소재로서 가능성을 보였으며 특히 SE-E는 가장 우수한 활성이 확인되었다.

**MMP-1, MMP-9의 단백질 발현 저해 활성 측정 결과**

노화와 관련된 인자인 MAPK에 가장 많은 영향을 받은 인자는 c-fos이며 이는 p38의 영향을 받는다. 이러한 요인들이 활성화되면 MMPs의 발현을 강력히 조절한다[31]. 본 연구에서는 MMP family 중 MMP-1, MMP-9의 단백질 발현을 측정하였다. SE-E 처리군에서 MMP-1과 MMP-9의 protein 발현이 5, 10, 25 µg/mL의 농도에 의존적으로 모두 저해 되었다(Fig. 4). 특히 MMP-1의 protein 측정 시 25 µg/mL의 농도에서 58.2%의 발현 저해 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과는 산겨울 추출물의 EtOAc 분획물 결과[32]와 비교했을 때 유사한 경향이 확인되며, 산겨울의 EtOAc 분획물이 100 µg/mL의 농도에서 60%의 MMP-1 발현 저해 활성을 나타내었으므로 SE-E는 우수한 저해 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

**Melanin 생합성 저해 활성 측정 결과 및 Cellular tyrosinase 활성 측정 결과**

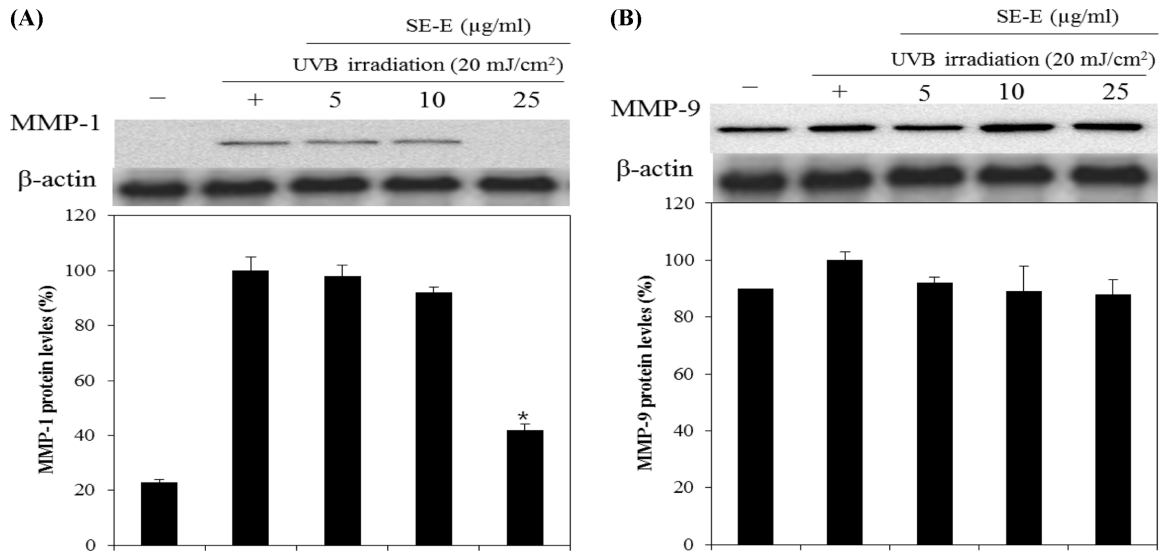
피부 흑화는 피부에 존재하는 melanocyte가 UV 노출 등의 외부 환경에 대응하여 melanin의 생성을 증가시키기 때문이다. 원료 및 물질의 미백효능을 확인하기 위해 melanin 생성효소인

tyrosinase의 효소활성 억제 탐색이 주요하게 이용되어 왔으나 최근 효소활성억제와 더불어 미백원료가 melanocyte에서 tyrosinase와 관련 효소 발현을 증가시키는 환경에서 신호전달 체계를 교란시키는 기전 연구에 대한 보고가 매우 많아졌다 [33,34]. SW, SE 등의 melanin 생합성 저해활성을 측정 한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. SE의 경우 25 µg/mL의 농도에서 9.6%의 저해활성을 나타내었고, SE-E의 경우 25 µg/mL의 농도에서 15.4%로 분획물 중 melanin 생합성 저해활성이 가장 우수하였다. Cho의 연구 보고[35]에 따르면 파래 추출물의 EtOAc 분획물의 실험 농도 100 µg/mL에서 15%의 melanin 생합성 감소율을 나타내어 분획물중 EtOAc 분획물이 가장 우수하였다. 이는 부평초 분획물 중 EtOAc 분획물의 활성이 가장 우수한 것과 유사한 경향의 실험결과이다.

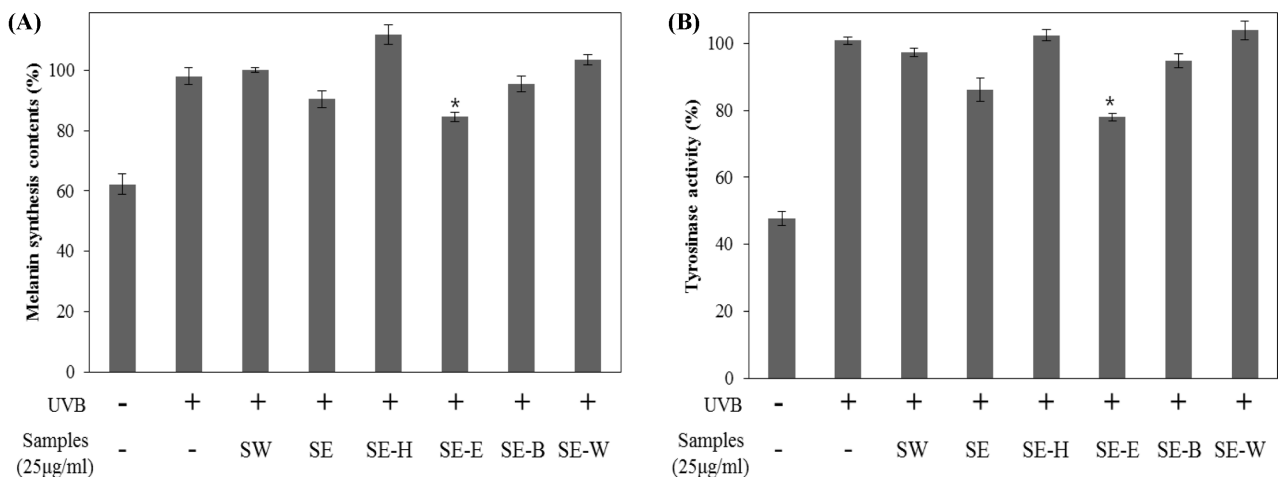
Tyrosinase는 피부가 자외선에 노출되면 tyrosine에서 melanin 생성에 가장 중요하게 작용하는 효소이다. Tyrosinase 활성을 저해함으로써 melanin 생성을 억제 할 수 있으며 이로 인해 기미, 주근깨, 노인성 홍반 등의 유발을 막을 수 있는 것으로 알려져 있다[36]. 세포내 tyrosinase 활성을 측정하기 위하여 B16F10 melanoma 세포에 부평초 에탄올, 열수 추출물을 처리하여 tyrosinase 활성을 측정 한 결과는 Fig. 13에 나타내었다. SW와 SE의 경우 25 µg/mL의 농도에서 각각 2.7와 13.8%의 세포내 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 분획물의 경우 SW-E가 22.0%로 저해활성이 가장 우수하였다.

**MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 단백질 발현 저해 활성 측정 결과**

B16F10 melanoma cell은 melanocyte의 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor (Mc1R)을 통해 멜라닌 합성의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다[37]. 이 과정에서 microphthalmia transcription factor (MITF)는 핵으로 이동하여 DNA의 tyrosinase,



**Fig. 4** Effects of SE-E on MMP-1 and MMP-9 expression in CCD-986sk cell. UVB (20 mJ/cm<sup>2</sup>)-exposed CCD-986sk cells were cultured for 48 h in the presence of *S. polyrhiza*. nor, normal control group (non irradiated-vehicle); con, negative control group (UVB irradiated vehicle); SE-E, Ethyl acetate fraction of SE. The results were expressed as the average of triplicate. Significant differences were compared with control at \**p* < 0.05 compared with no treatment

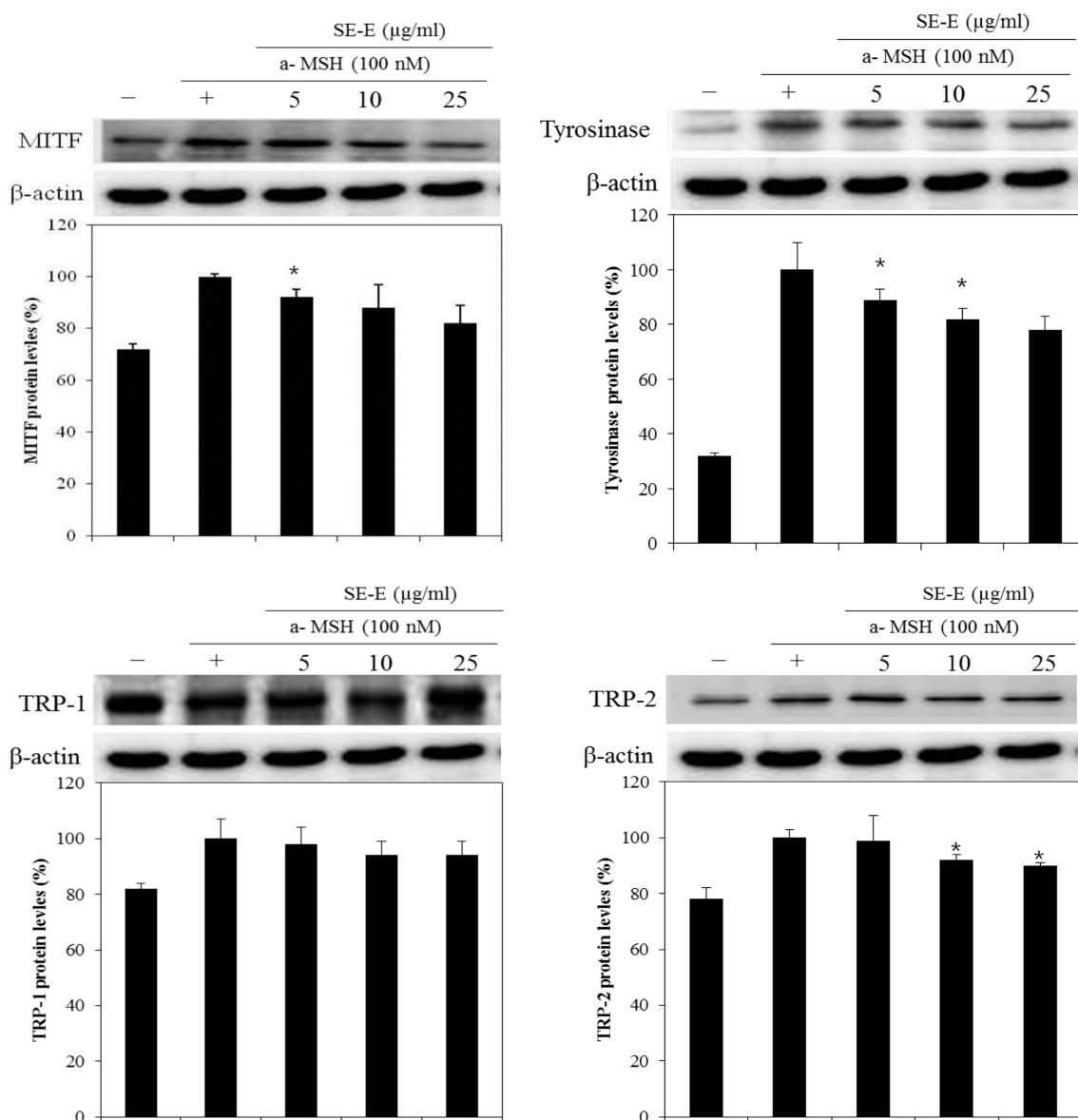


**Fig. 5** Inhibition of melanin synthesis and cellular tyrosinase activity of extracts and fractions from *S. polyrhiza* on melanoma cell(B16F10).  $\alpha$ -MSH (100 nM) stimulated cells were cultured for 48 h in the presence of *S. polyrhiza*. (A), Inhibition of melanin synthesis activity; (B), Inhibition of cellular tyrosinase activity. nor, normal control group (non treated-vehicle); con, negative control group ( $\alpha$ -MSH stimulated vehicle); SW, *S. polyrhiza* extracted with Water; SE, *S. polyrhiza* extracted with 70% EtOH; SE-H, Hexane fraction of SE; SE-E, Ethyl acetate fraction of SE; SE-B, Butanol fraction of SE; SE-W, Water fraction of SE. The results were expressed as the average of triplicate. Significant differences were compared with control at \**p* < 0.05 compared with no treatment

TRP-1, TRP-2의 promotor에 결합하여 각 각의 유전자 발현을 증가시켜 melanogenesis를 유도하는 것으로 알려져 있다[7]. 이 중 TRP-1과 TRP-2는 tyrosinase related protein 으로 알려져 있는 단백질로서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) 를 흑갈색을 나타내는 indole-5,6-quinone-2- carboxylic acid로 산화하는 효소이며 TRP-2는 DCT라고도 하며 DOPA chrome을 DHICA로 이성화 하는 효소이다[38]. MITF의 억제제는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. SE-E가 melanin 합성관련 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 protein 발현에 미치는 영향을 5, 10, 25 µg/mL

농도에서 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 특히, MITF의 경우 SE-E 25 µg/mL의 농도에서 대조군에 비해 18.0% 저해하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 25 µg/mL의 농도에서 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현이 각각 21.6, 6.3, 10.4% 감소되었다. 이러한 결과는 SE-E가 MITF 억제제를 통해 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현을 저해하고 그 결과 melanin 색소 형성이 억제되는 미백소재로의 개발 가능성이 있음을 나타낸다.

열악한 환경에서 서식하는 수생식물인 부평초는 민간에서 한약재 등으로 사용되었음에도 불구하고 그 동안 충분한 연구가 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 부평초 추출물 및 부평초 분



**Fig. 6** Effects of SE-E on MITF, Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in melanoma cell (B16F10).  $\alpha$ -MSH (100 nM) stimulated cells were cultured for 48 h in the presence of *S. polyrhiza*. nor, normal control group (non treated-vehicle); con, negative control group ( $\alpha$ -MSH stimulated vehicle); SE-E, Ethyl acetate fraction of SE. The results were expressed as the average of triplicate. Significant differences were compared with control at \* $p < 0.05$  compared with no treatment

획물의 기능성 화장품 소재로서의 효능을 측정하기 위하여 항산화, 항주름 및 미백 활성을 평가하였으며 그 결과 부평초 70% 에탄올 추출물(SE)과 이의 에틸아세테이트 분획물(SE-E)이 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성, 세포내 procollagen 생합성 활성, MMP-1 저해 활성, melanin 생합성 저해 활성, 세포내 tyrosinase 저해 활성 등에서 우수한 생리활성이 있음을 검증하였다. 특히 SE-E에서 높은 항주름 및 미백 활성이 확인되어 우수한 기능성 소재로서 개발 가능성이 높아졌으며 추가적인 항균, 항염, 항암 등의 연구가 진행된다면 제약, 화장품, 기능성 식품 등의 분야에 효과적인 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 초 록

부평초 추출물 및 부평초 분획물의 기능성 화장품 소재로서의 효능을 측정하기 위하여 항산화, 항주름 및 미백 활성을 평가하였다. DPPH와 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거 활성은 부평초 70% 에탄올추출물의 에틸아세테이트 분획물(SE-E) 100 µg/mL 농도에서 각각 44.2와 74.3%로 나타났다. 항주름 활성을 측정하기 위하여 세포내에서의 procollagen 생합성 활성과 MMP-1 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 부평초 70% 에탄올추출물(SE)은 25 µg/mL 농도에서 48.5%, 같은 농도에서 SE-E는 가장 높은 57.8%의 생합성 활성을 나타내었다. SE와 SE-E의 MMP-1 저

해활성은 25 µg/mL 농도에서 각각 13.4와 28.5%로 나타났다. 마지막으로 미백 효과를 검증하기 위해 melanin 생합성 저해 활성과 세포내 tyrosinase 저해 활성을 측정 한 결과, 25 µg/mL 농도에서 SE는 각각 9.6과 13.8%의 저해활성을 나타내었으며 SE-E는 각각 15.4와 22.0%의 값을 나타내었다. 본 연구의 결과로부터 SE와 SE-E의 높은 항주름 및 미백 활성이 확인되어 우수한 기능성 소재로 개발 가능성이 높아 졌으며 추가적인 항균, 항염, 항암 등의 연구가 진행된다면 제약, 화장품, 기능성 식품 등의 분야에 효과적인 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

**Keywords** 기능성 화장품 · 미백 · 부평초 · 항산화 · 항주름

## References

- Żukiewicz-Sobczak WA, Adamczuk P, Wróblewska P, Zwoliński J, Chmielewska-Badora J, Krasowska E, Galińska EM, Cholewa G, Piątek J, Koźlik J (2013) Allergy to Selected Cosmetic Ingredients. *Postep Derm Alergol* 30: 307–310
- Amasa W, Santiago D, Mekonen S, Ambelu A (2012) Are Cosmetics Used in Developing Countries Safe?. *J Toxicology* 2012: 8–15
- Juliano C, Magrini GA (2018) Cosmetic Functional Ingredients from Botanical Sources for Anti-Pollution Skincare Products. *Cosmetics* 5: 19
- Kanlayavattanakula M, Louritha N, Chaikula P (2016) Jasmine Rice Panicle: A Safe and Efficient Natural Ingredient for Skin Aging Treatments. *J Ethnopharmacology* 193: 607–616
- Svobodova A, Walterova D, Vostalova J (2006) Ultraviolet Light Induced Alteration to the Skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150: 25–38
- Roy A, Sahu RK, Matlam M, Deshmukh VK, Dwivedi J, Jha AK (2013) In vitro Techniques to Assess the Proficiency of Skin Care Cosmetic Formulations. *Pharmacognosy Reviews* 7: 97–106
- Lin JW, Chiang HM, Lin YC, Wen KC (2008) Natural Products with Skin-whitening Effects. *J Food and Drug Analysis* 16: 1–10
- Smit N, Vicanova J, Pavel S (2009) The Hunt for Natural Skin Whitening Agents. *Int J Mol Sci* 10: 5326
- Gilchrist BA (1989) Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol* 2: 610–613
- Kang KS, Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Oh SH, Kim MA, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ (2007) The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract. *J Life Sci* 17: 1147–1151
- Lee BG, Kim JH, Ham SG, Lee CE (2014) Study on biological activities of extracts for cosmeceutical development from *Lagerstroemia indica* L. branch. *Korean J Plant Res* 27: 29–34
- Kim DS, Kim DH, Oh MJ, Lee KG, Kook MC, Park CS (2010) Antiaging and whitening activities of ethanol extract of Yuza (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) by-product. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 36: 137–143
- Suh SS, Shin JS (1969) Studies on phytosterols. *Yakhakhoe Chi* 13: 144–146
- Chi HJ (1981) Iridoid-containing Korean Medicinal plants (I). *Kor J Pharmacogn* 12(1): 19–22
- Harborne JB (1986) The natural distribution in angiosperms of anthocyanins acylated with aliphatic dicarboxylic acids. *Phytochemistry* 25: 1887–1894
- Xue Q, Wen-ni H, Cheng X, Jian H, Li-jun W, De-an G, Min Y (2011) Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in *Spirodela polyrhiza* by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Phytochem Anal* 22: 475–483
- Kim JP, Lee IS, Seo JJ, Jung MY, Kim YH, Y NH, Bae KH (2010) Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Phytother Res* 24: 1543–1548
- Cho SE, Kim BW, Kwon KR, Rhim TJ, Kim DH (2008) The effect of *Spirodela herba* pharmacopuncture on adipocyte metabolism. *Kor Pharmacopuncture Institute* 11(1): 71–82
- Lee HJ, Kim MH, Choi YY, Kim EH, Hong JK, Kim KS, Yang WM (2016) Improvement of atopic dermatitis with topical application of *Spirodela polyrhiza*. *J Ethnopharmacology* 180: 12–17
- Ahn YS, Seong NS, Ham IH, Cho HY (2004) Study on the effect of medicinal herbs used as Bu-pyung (*S. polyrhiza* and *L. paucicostata*) on immune and anti-cancer. *Kor J Herbology* 19: 117–127
- Blois MS (1958) Antioxidant activity determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199–1200
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231–1237
- Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF (1987) Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 22: 5875–5879
- Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* 45: 1474–1478
- Choi SY, Cho HS, Sung NJ (2006) The antioxidative and nitrite scavenging ability of solvent extracts from wild grape (*Vitis Coignetia*) skin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 961–966
- Min KJ, Song JW, Cha CG (2008) The antioxidative and antitumor activity of extracts of *Agrimonia pilosa*. *J Fd Hyg Safety* 23: 149–156
- Kim MS, Kim KH, Jo JE, Choi JJ, Kim YJ, Kim JH, Jang SA, Yook HS (2011) Antioxidative and antimicrobial activities of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* Hara extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 47–55
- Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM (1987) Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res* 2: 427–436
- Koo BS, Hwang EI, So SH, Lee SK, Han GH, Kim NM (2007) Effect of *Torilis fructus* on Procollagen Biosynthesis and Activity of Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) in Human Dermal Fibroblast. *Kor J Pharmacogn* 38(4): 349–353
- Fisher GJ, Voorhees JJ (1999) Molecular mechanism of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol*, 69: 154–158
- Fanger GR, Johnson NL, Johnson GL (1997) MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J* 16: 4961–4972
- Park SH, Lee KH, Han CS, Kim KH, Kim YH (2010) Inhibitory Effects of *Carex humilis* Extract on Elastase Activity and Matrix Metalloproteinase-1 Expression. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 36: 129–136
- Lin CB, Babiarz L, Liebel F, Roydon Price E, Kizoulis M, Gendi menico GJ, Fisher DE, Seiberg M (2002) Modulation of microphthalmia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation. *J Invest Dermatol* 119: 1330–1340
- Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J Invest Dermatol* 100(2 Suppl): 150S–155S
- Cho YH (2008) Inhibitory Effect of *Enteromorpha linza* on the Melanogenesis in B16 Melanoma Cells. *Kor J Pharmacogn* 39: 174–178
- Jeon MJ, Kim MH, Jang HJ, Lee SW, Kim JH, Kim HS, Lee SH (2012) Whitening effect of *Hizikia fusiformis* ethanol extract and its fractions. *J Life Sci* 22: 889–896
- Abdel-Malek ZA, Swope VB, Suzuki I, Harriger D, Boyce ST, Urabe K, Hearing VJ (1995) Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1789–1793
- Jimenez CC (2004) Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient down regulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *J. Cell Sci* 114: 2335–2344