

## 멜라노마 세포(B16F10)에서의 개망초 추출물을 이용한 미백효과에 관한 연구

주다혜, 유단희, 이진영\*  
호서대학교 화장품생명공학부

Received: May 24, 2018 / Revised: September 4, 2018 / Accepted: September 27, 2018

### A Study on the Whitening Effect of *Erigeron annuus* (L.) Pers. Ethanol Extract on Melanoma Cell (B16F10)

Da-Hye Joo, Dan-Hee Yoo, and Jin-Young Lee\*

Department of Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 31499, Republic of Korea

A 70% ethanol extract of *Erigeron annuus* (L.) Pers. was investigated for its whitening activity for application as a functional ingredient in cosmetic products. At the *E. annuus* extract concentration of 1,000 µg/ml, the electron-donating ability was found to be 67.83%, the tyrosinase inhibitory effect (related to skin-whitening) was 69%, the elastase inhibitory effect (related to skin-wrinkling) was 69%, and the astringent effect was 80%. The ABTS<sup>+</sup> radical-scavenging ability was 87% at the 500 µg/ml concentration. In the cell viability test measured on melanoma cells, 96% of the cells treated with 100 µg/ml of the extract were viable. According to the western blot results, the protein expression of the microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase, tyrosinase-related protein (TRP) -1, and TRP-2 was decreased by 60.22%, 47.83%, 54.79%, and 67.88%, respectively, at the extract concentration of 100 µg/ml. The protein expression of phosphorylated extracellular signal regulated kinase (p-ERK) and phosphorylated cAMP response element-binding protein (p-CREB) was decreased with increasing concentrations of the extract. Reverse transcription-polymerase chain reaction of the extract showed that the mRNA expression of MITF, tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 was decreased by 86.51%, 85.22%, 74.26%, and 66.66%, respectively, at 100 µg/ml extract concentration. The findings suggest that the 70% ethanol extract from *E. annuus* (L.) Pers. has potential as a cosmeceutical ingredient with whitening effect.

**Keywords:** *Erigeron annuus* (L.) Pers., whitening effect, melanoma cell, western blot, RT-PCR

## 서론

현대인들의 경제성장에 따른 생활수준 향상은 단순한 아름다움뿐만 아닌 효능 및 효과를 중시하는 기능성 화장품 수요를 매우 증가시키고 특히 천연물에 함유된 유용성분들의 다양한 효능이 알려지면서, 고부가 가치의 기능성 천연신소재로서 가능성을 주목하고 있다. 이러한 식물자원들은 단순히 인간의 수명연장을 넘어서 건강한 삶과 활동을 유지하려는 현대인들에게 노화를 예방하고 질병 예방, 건강 유지에

도움을 줄 수 있는 천연자원으로 인식되고 있다[1-3]. 멜라닌 합성의 첫 번째 단계인 rate-limiting 과정은 tyrosinase에 의해 중재되어 tyrosine은 tyrosinase에 의해 L-3,4-dihydroxyl-L-phenylalanine (L-DOPA)가 되고 그 이후 산화된 DOPA는 DOPA quinone으로 산화된다. 그 후 자동적인 축진과정을 통해 DOPA는 5,6-dihydroxy indole (DHI) melanin을 합성하여 다른 멜라닌 생성 효소는 multi-pathway를 거치게 된다. tyrosinase-related protein (TRP)-2로 인해 DOPA chrome은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 산화되며, TRP-1은 이후 산화과정을 통해 DHICA melanins의 중합 작용을 촉진한다[4, 5]. 자외선에 의해 피부의 케라티노사이트가 자극을 받게 되면 α-MSH, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 등의 신호전달 물질

### \*Corresponding author

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

E-mail: jylee@hoseo.edu

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

들에 의해서 멜라닌 세포로 분비하게 된다[6]. 멜라닌 세포의 MC1R에서 이러한 자극을 받아들이게 되고 세포 내의 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)가 증가하고 protein kinase A (PKA)를 활성화 시킨다[7]. 멜라닌 합성에 중요한 역할인 cAMP의 증가는 cAMP-responsive element binding protein (CREB) 인산화를 촉진시키고 이것이 전사인자인 MITF의 발현을 증가시키고, 이것은 tyrosinase의 활성을 향상시키고, tyrosinase mRNA 발현을 증가시킨다는 보고들이 있다[8].

개망초(*Erigeron annuus* (L.) Per.)는 국화과(Compositae)에서 속하는 북아메리카 원산으로 귀화 식물이며, 우리나라 도 시나 농촌의 길가나 빈터, 밭, 들판, 길가, 산비탈에서 야생으로 자라고 있는 흔히 볼 수 있는 식물이다. 우리나라에서는 청쿨(제주), 지심(전남 고흥) 망풀, 잔꽃풀, 멸망초(전남 순천), 큰망초, 지붕초, 개망초 등의 다양한 이름으로 불리고 있다. 높이는 높이는 30-100 cm 정도로 가지가 많이 갈라지며, 꽃은 6-8월에 백색 또는 연한 자줏빛으로 개화하며, 주위에서 흔히 볼 수 있는 잡초이다[9].

개망초 꽃에는  $\alpha$ -amyrenone,  $\alpha$ -amyrin 및  $\beta$ -amyrin과 같은 3종의 triterpenoid 성분이 있다는 연구[10] 및 개망초 꽃 추출물을 이용한 화장품의 방부효과를 확인한 결과 방부력의 효과를 보였으며, 개망초 추출물을 이용한 천연 염색[11] 등의 선행연구가 진행되어 왔다. 본 연구는 우리나라 전역에서 재배가 가능한 천연 식물인 개망초 추출물을 이용하여 *in vitro* 미백활성을 검증하여 기능성 천연 소재로서의 효능을 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료 준비

본 실험에서 사용된 개망초는 경기도산림환경연구소에서 6월에 채집하여 에탄올 추출을 실시하였다. 개망초를 건조시킨 후 70% ethanol은 시료의 10배를 가하여 상온에서 24시간 침지하였다. 그 후 상등액과 침전물을 분리 및 추출을 하였으며, 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 사용하여 여과하였다. 감압농축은 EYELA evaporator로 실시하였으며, 용매를 완전히 제거한 후 동결건조하여 -20°C에서 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 전자공여능 측정 방법

전자공여능(EDA: electron donating abilities)은 Blois의 방법[12]을 변형하여 측정하였다. DPPH 용액 60  $\mu$ l와 농도별 추출물을 120  $\mu$ l씩 넣어 혼합하고 15분간 반응 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정

하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### ABTS<sup>+</sup> cation radical scavenging activity assay 측정

ABTS<sup>+</sup> cation decolorization assay 방법[13]은 ABTS radical을 이용한 항산화력 측정방법으로 7 mM 2,2-azino-bis (3-ethyl-benthiazoline-6-sulfonic acid) 및 2.45 mM potassium persulfate를 혼합 후 실온에서 24시간 동안 반응하여 ABTS<sup>+</sup>를 형성시켰다. 이 후 ethanol로 희석하여 ABTS<sup>+</sup> 100  $\mu$ l에 시료 100  $\mu$ l를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[14]에 따라 실험하였다. 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80  $\mu$ l에 10 mM L-DOPA (Sigma, USA)를 녹인 기질 액 40  $\mu$ l 및 시료용액 40  $\mu$ l의 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase (Sigma, USA) 40  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### Elastase 저해활성 측정

Cannell 등의 방법[15]에 따라 elastase 저해활성 측정을 실시하였다. 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide (Sigma, USA)를 사용하여 37°C에서 30분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 시험용액을 일정 농도가 되도록 희석하여 40  $\mu$ l씩 96-well plate에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/ml) 40  $\mu$ l를 가하고, 기질은 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide (0.5 mg/ml)을 80  $\mu$ l 첨가하여 30분간 반응시킨 후 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### Astringent 활성 측정

Astringent 활성 측정은 Lee 등의 방법[16]에 따라 측정하였다. 피부 단백질과 유사한 혈액단백질인 헤모글로빈을 사용하였으며, 원심분리관 용기에 각각의 시료용액과 헤모글로빈 용액을 1:1로 넣어 진탕 혼합한 후 1,500 rpm에서 3분간 원심분리 후 576 nm에서 흡광도를 측정하였다. Astringent 활성측정은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 세포 배양

본 실험에 이용한 melanoma cell인 B16F10는 ATCC (USA)에서 구입하여 사용하였다. 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

### MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

MTT assays는 Carmichael의 방법[17]에 따라 실시하였다. 멜라노마 세포(B16F10) 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well을 180 µl씩 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 20 µl 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 2.5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 40 µl를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 100 µl를 가하여 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase, ERK, p-ERK, CREB, p-CREB 미백 관련 인자들의 활성을 알아보기 위해 cell line B16F10을 100 mm tissue culture dish에 cell seeding 후 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24-48시간 배양한 후 PBS로 2회 세척해주었다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab를 가한 100 µl로 용해한 후 4°C 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였으며, 20 µl의 단백질을 10% SDS-PAGE 상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮겨 blocking buffer (5% skim milk in TBST)을 제조한 후 실온에서 1시간 blocking을 실시하였다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night 후 다시 10분간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하고 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 실온에서 2시간 반응하였다. 3회 세척한 후 DavinCh-Chemi<sup>TM</sup> Imager CAS-400SM 기기를 사용하여 밴드 확인을 하였다.

### Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포의 cell seeding은 100 mm culture dish에  $1 \times 10^6$  cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거

**Table 1. Sequence of the primers used for PCR.**

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
TRP-1	Forward	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Reverse	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC

후 trizol lysis buffer를 well에 1 ml씩 분주하였고, 세포를 lysis한 후 chloroform 200 µl를 분주하여 20초간 반응시켰다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 µl과 1:1 튜브에 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거 한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 2분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하여 실온에서 건조시켰다. Diethylpyrocarbonate water (DEPC water) 50 µl로 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 µl와 멸균수 195 µl를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. 추출한 RNA 2 µg, Oligo (dT) 15 primer (500 µg/ml) 1 µl, nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, reverse transcriptase, nuclease free water, PCR necleotide mix, rnasin inhibitor를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

### Reverse transcription-polymerase chain reaction

MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 Go Flexi DNA polymerase, primer, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 94°C에서 30초, 55°C에서 45초, 72°C에서 45초 (35 cycles), tyrosinase는 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C 45초 (40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 45초 (40 cycles)을 하였으며, PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 UV transilluminator를 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

## 통계처리

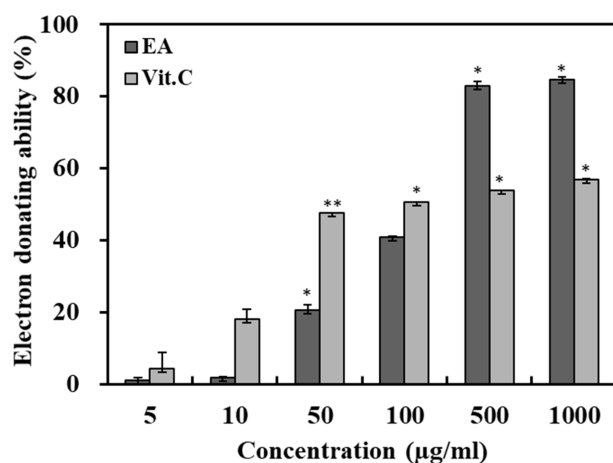
모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance ANOVA)을 한 후  $\alpha = 0.05$  수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

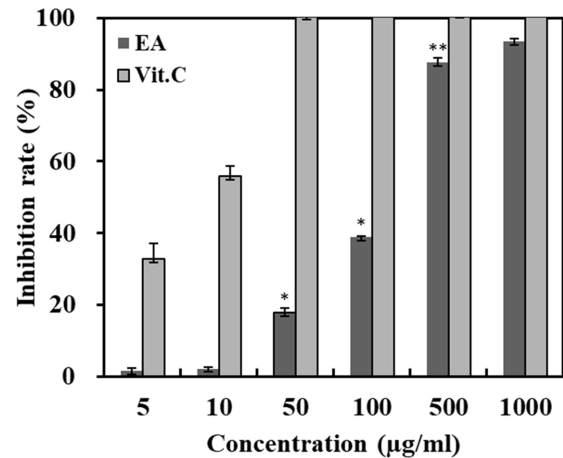
### 전자공여능 측정 결과

DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨에 따라 지질과산화의 초기반응 억제 정도를 예측할 수 있다. 유해산소인 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화지질을 축적함으로써 인해 생체기능이 저하되고 동시에 색소침착, 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다[18]. 전자공여능 측정 실험에서 이용한 DPPH assay는 페놀성 화합물, 방향족 아민류 및 아스코빅산 등에 의해 수소나 전자를 받아 환원되어 보라색이 탈색되는 원리를 이용한 방법이라고 할 수 있다. 주로 항산화 물질을 확인하기 위해 사용되며 비교적 간단하며 짧은 시간 내에 측정할 수 있어 널리 이용되어졌다[19].

개망초 에탄올 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가하였고, 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서 82%의 효과를 나타내었으며, 비교군인 Vit. C와 비교해 보았을 때 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서 53%를 나타낸 Vit. C보다 우수한 전자공여능 활성을 나타낸 것을 확인할 수 있



**Fig. 1. Electron donating ability of *Erigeron annuus* (L.) Pers. extract.** Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). ■ EA : *Erigeron annuus* (L.) Pers. extracted with ethanol. ■ Vit.C : Ascorbic acid.



**Fig. 2. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging ability of *Erigeron annuus* (L.) Pers. extract.** Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). ■ EA : *Erigeron annuus* (L.) Pers. extracted with ethanol. ■ Vit.C : Ascorbic acid.

었다. Ju 등[20]은 오가피와 감국 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 41%, 21%의 결과를 나타내었고, Cho 등[21]의 피막이플 잎과 줄기 추출물의 전자공여능 측정 결과 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 81.03%, 33.06%를 나타낸 것과 비교했을 때 개망초 에탄올 추출물이 더 높은 활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

### ABTS<sup>+</sup> cation radical scavenging activity assay 측정 결과

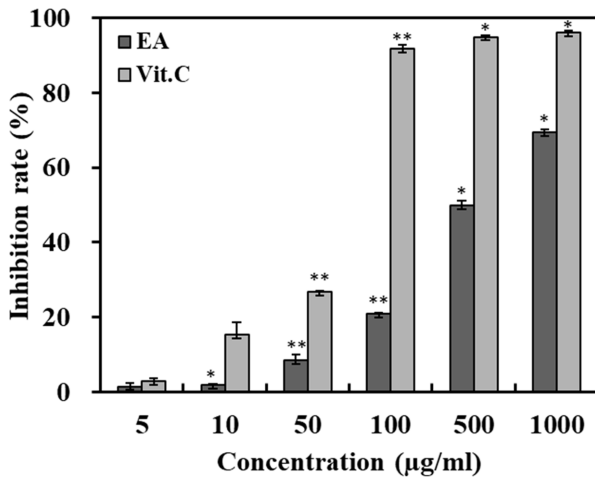
DPPH radical 소거활성 실험과 동일한 원리로, ABTS 시약은 합성된 radical이나 유기용매와 물에 모두 용해되므로 극성 시료뿐만 아니라 비극성 시료의 항산화 활성 측정에 사용 가능하여 항산화 활성 연구에 많이 이용되었다[22].

개망초 에탄올 추출물의 ABTS 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가하였고, 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서 87%, 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 93%의 소거능을 나타내었다. 대조물질인 Vit. C의 결과와 유의한 것을 확인할 수 있었다. Kim 등[23]은 돼지감자잎의 물과 에탄올 추출물이 5,000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 66.41%와 53.37%의 활성을 나타냈다고 보고한 결과와 비교하여 개망초 에탄올 추출물의 우수한 라디칼 소거활성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다.

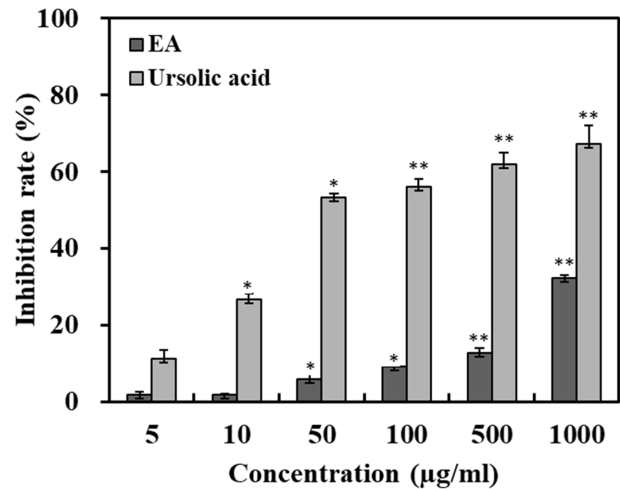
### Tyrosinase 저해활성 측정 결과

Tyrosinase는 tyrosine의 사화를 촉진하여 melanin을 생합성하기 위한 효소로서 피부 표피층에 melanocyte의 melanosome에서 합성되어진다. Melanin의 합성은 tyrosine이 산화와 중합반응을 하면 3,4-dihydroxyphenylalanine





**Fig. 3. Inhibition rate of extract from *Erigeron annuus* (L.) Pers. on tyrosinase.** Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). ■ EA : *Erigeron annuus* (L.) Pers. extracted with ethanol. □ Vit.C : Ascorbic acid.



**Fig. 4. Inhibition rate of extract from *Erigeron annuus* (L.) Pers. on elastase.** Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). ■ EA : *Erigeron annuus* (L.) Pers. extracted with ethanol. □ Ursolic acid.

(DOPA) 또는 DOPA quinone이 되어 합성된다. 멜라닌 세포는 자외선 등의 외부자극 및 산화적 스트레스에 대한 피부 보호하는 역할을 하지만 멜라노솜에서 멜라닌 생성을 증가시키고 증가된 멜라닌은 각질형성세포로 이송되어 과다 생성한 멜라닌은 색소침착을 초래하였다[19, 24, 25]. Tyrosinase 저해제는 미백 기능성과 연관성이 크며, 식품과 화장품 산업에서 많은 주목을 받는다.

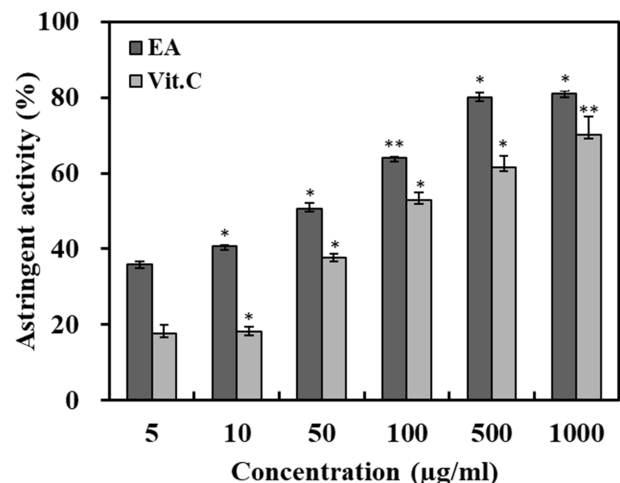
개망초 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 500 µg/ml에서는 49%, 1,000 µg/ml에서 69%의 효과를 나타내었다. 비교군인 C와 비교한 결과 유의한 것을 확인할 수 있었다. Jeon 등[26]의 비자 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 1,000 µg/ml의 농도에서 물, 에탄올, 열수 추출물의 각각 21.32%, 3.38%, 4.09% 저해율을 나타낸 결과와 비교했을 때 개망초 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

**Elastase 저해활성 측정 결과**

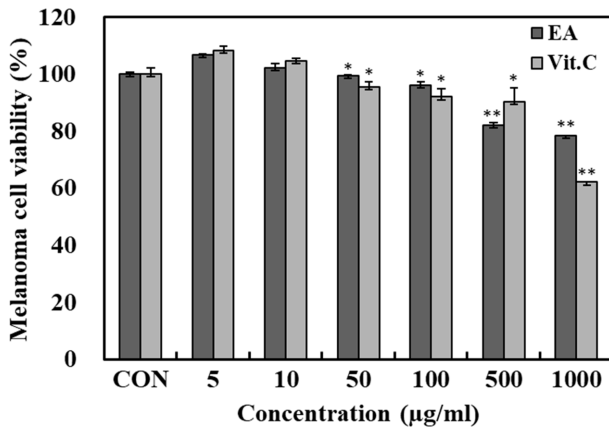
자외선 또는 피부 기질 단백질 분해효소로 인하여 elastin이 분해되면 이러한 그물망 구조가 붕괴되어 피부의 탄력성이 저하되고 주름이 생기게 된다. Elastase는 elastin을 분해하는 효소이며, 또한 collagen을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 따라서 elastase의 활성을 저해함으로써 피부 주름 생성을 억제할 수 있었다[27, 28].

개망초의 에탄올 추출물의 Elastase 저해활성 측정 결과

Fig. 4와 같이 나타내었다. 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 1,000 µg/ml에서 32.2%의 효과를 나타내었다. Lim 등[29]의 포공영의 에탄올 추출물과 열수 추출물이 1,000 µg/ml에서 각각 21.6%, 12.2%의 활성을 나타내었다는 연구 결과와 비교하였을 때 개망초 에탄올 추출물 elastase 저해활성능이 유의한 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 5. Inhibition rate of extract from *Erigeron annuus* (L.) Pers. on astringent.** Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). ■ EA : *Erigeron annuus* (L.) Pers. extracted with ethanol. □ Vit.C : Ascorbic acid.



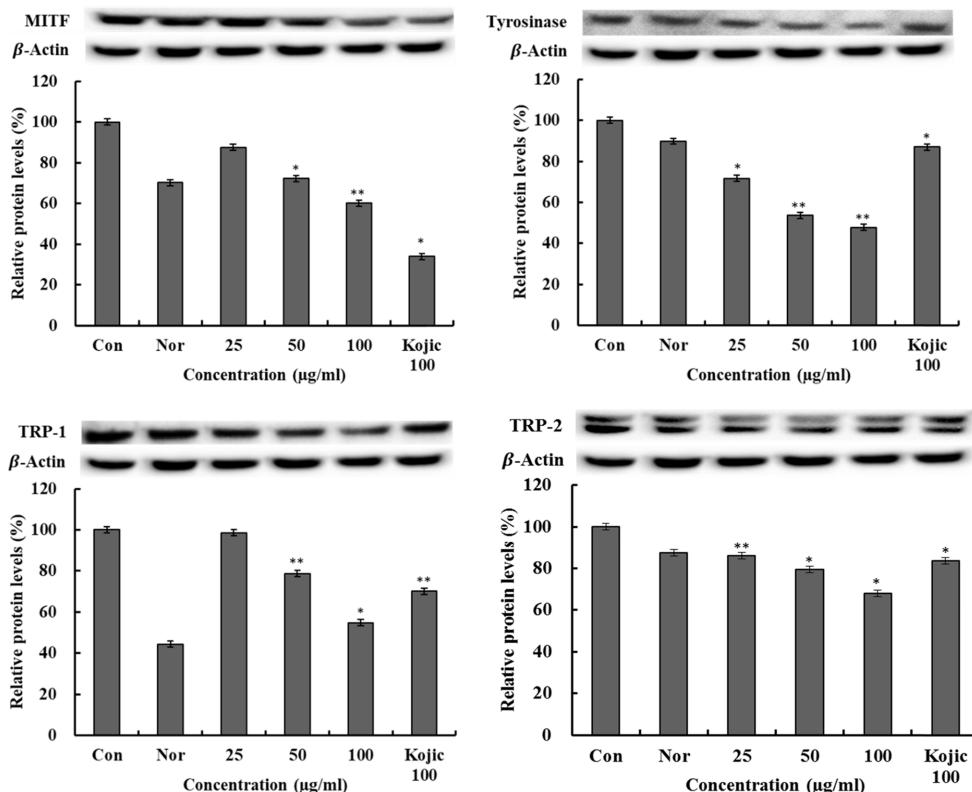
**Fig. 6. Cell viability of extract from *Erigeron annuus* (L.) Pers. on melanoma cell (B16F10).** B16F10 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *Erigeron annuus* (L.) Pers. for 24 h and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). ■ EA : *Erigeron annuus* (L.) Pers. extracted with ethanol. □ Vit.C : Ascorbic acid.

### Astringent 활성 측정 결과

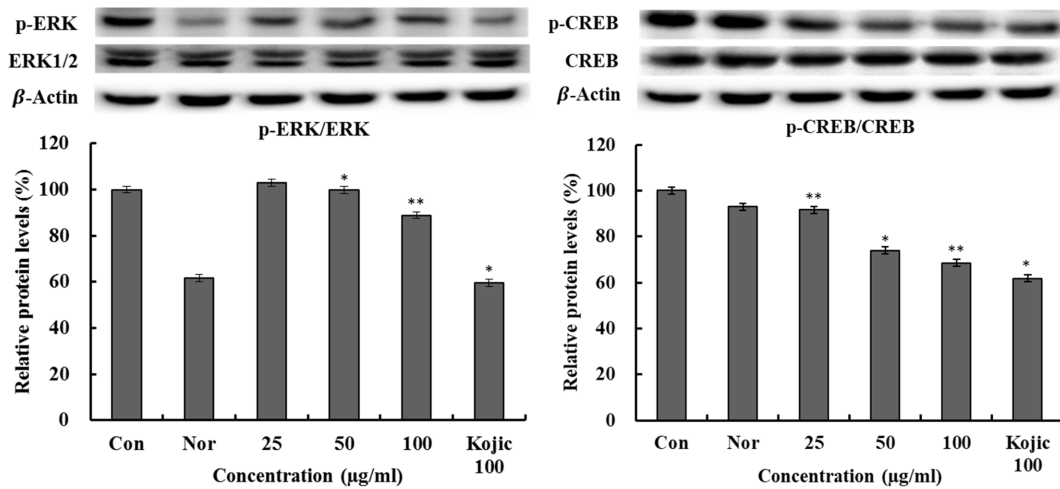
본 실험에서는 hemoglobin의 단백질이 개망초의 에탄올 추출물과 결합하는 정도에 따라 수렴 효과 정도를 판단하였고, 그 결과를 Fig. 5와 같이 나타내었다. 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 5 µg/ml에서 35%의 효과를 확인할 수 있었으며, 1,000 µg/ml에서 80% 이상의 수렴효과를 확인할 수 있었다. 이는 비교군인 Vit.C 보다 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다. Youn 등[30]의 눈개승마 에탄올과 물 추출물이 2,500 µg/ml 농도에서 약 60%의 효과와 10%이하의 수렴효과가 나타났다는 보고와 비교할 때 500 µg/ml 농도에서 60% 이상의 활성을 나타낸 개망초 에탄올 추출물의 수렴효과가 더 우수한 것을 확인할 수 있었다.

### MTT 분석법을 이용한 세포 생존율 측정 결과

MTT 분석은 탈수소 효소작용으로 담황색 기질인 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan을 생성시키고, 미토콘드리아의 호흡연쇄에 의해 환원시키는 효



**Fig. 7. Protein expression rate of extract from *Erigeron annuus* (L.) Pers. on melanoma cell (B16F10).** B16F10 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS were treated with various concentrations of *Erigeron annuus* (L.) Pers. for 24 h and then total protein was isolated. MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 protein level was determined by western blot. Con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with  $\alpha$ -MSH. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Fig. 8. Inhibitory effects ethanol from *Erigeron annuus* (L.) Pers. extract on signaling pathways of melanogenesis on melanoma cell (B16F10).** After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 25, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  of *Erigeron annuus* (L.) Pers. extract for 24 h. Con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with  $\alpha$ -MSH. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

소능력을 이용하여 죽은 세포에는 반응하지 않는 MTT formazan의 생성량을 측정하는 검사법이며, 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 된다[31].

개망초 에탄올 추출물에 의한 멜라노마 세포의 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과 Fig. 6과 같이 나타내었다. 개망초 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 96%의 세포 생존율을 나타내었다. 이는 비교군인 Vit.C와 유의한 결과이며, 따라서 이하의 멜라노마 세포에서의 미백관련 신호전달 인자 측정은 생존율이 100%에 가까운 농도인 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 실험을 진행하였다.

#### Western bolt을 통한 단백질 발현 측정 결과

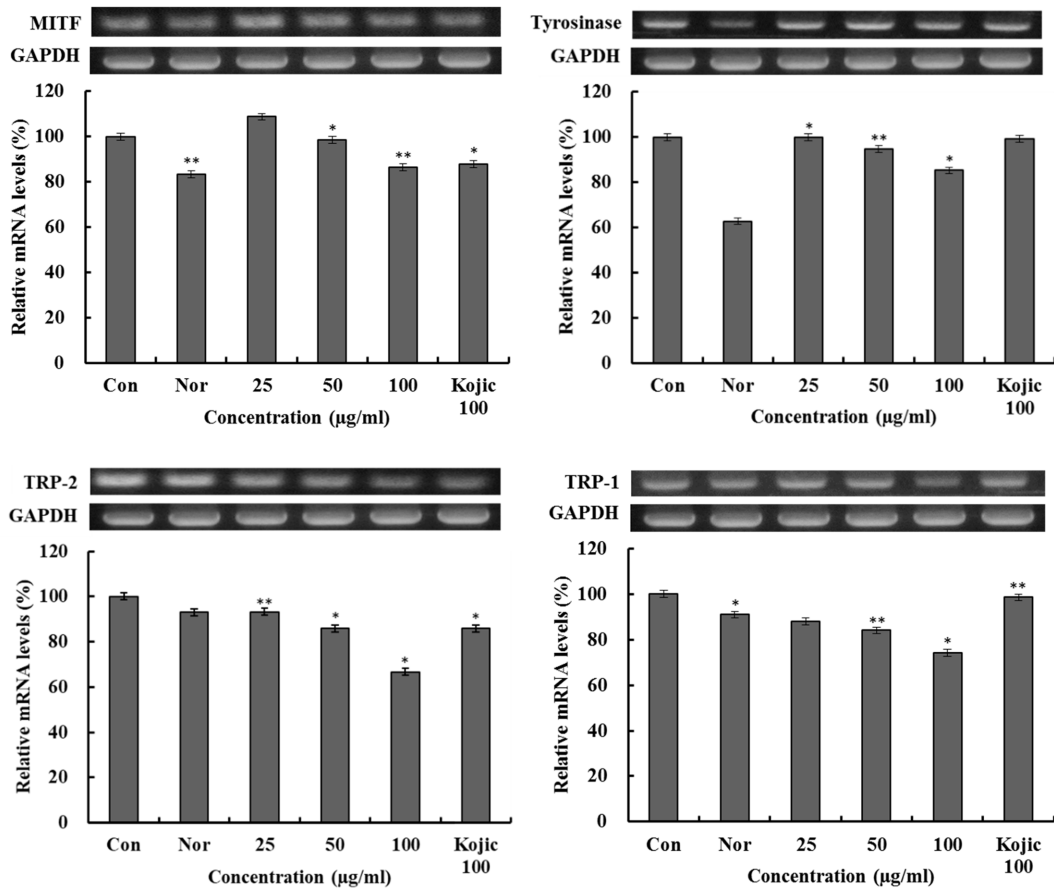
멜라닌 생합성은 아미노산의 하나인 tyrosin이 tyrosinase, TRP-1, TRP-2에 의해 DOPA를 거쳐 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 멜라닌이 생성되었다. 이와 같은 단백질은 멜라닌 생성의 중요한 전사인자인 MITF의 발현에 의해 조절된다고 알려져 왔다. MITF의 발현이 억제됨에 따라 tyrosinase, TRP-1의 단백질 발현이 감소되어 멜라닌 생성 억제로 이어지는 것이라고 판단할 수 있다[32].

미백 소재개발에 있어 멜라닌 생성을 억제하는 기전과 이미 생성된 멜라닌 분해를 촉진시키는 단계에서 작용하는 효소의 작용이 중요하며, 단백질 발현과 연관성이 있는지 보기 위해 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 및 상위 단계 유전자들인 ERK, p-ERK, CREB, p-CREB 항체를 이용한 western blot으로 관련 단백질 발현양 변화에 대해 확인하

였다. B16F10 mouse melanoma cell에 개망초 에탄올 추출물을 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리한 후 control은  $\alpha$ -MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현 시키고, normal 부분에는  $\alpha$ -MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인  $\beta$ -actin을 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 7, 8과 같이 개망초 에탄올 추출물을 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리한 결과 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질의 발현은 control 대비 60.22%, 54.79%, 67.88%, 47.83%의 발현 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며, 대조군인 kojic acid와 비교했을 때 유의한 결과를 확인할 수 있었다. ERK, 인산화된 ERK, CREB, 인산화된 CREB의 단백질 발현양을 측정한 결과 ERK와 CREB의 단백질량의 변화는 미비하지만, 인산화된 ERK는 농도가 증가함에 따라 억제율을 보였으며 멜라닌 생합성에 직접적인 관여하는 상위 유전자인 인산화된 CREB의 단백질 발현양이 개망초 추출물의 농도가 증가함에 따라 단백질 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

#### RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정 결과

$\alpha$ -MSH는 tyrosinase의 활성을 자극시키고 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 TRP-1, TRP-2에 작용되어 eumelanin을 합성하도록 유도시켜준다. TRP-1은 DHICA를 indole-5,6-carboxylic acid로 전환시키는 효소로서 DHICA oxidase라고도 하며 tyrosinase의 변성을 막는데 작용하여 간접적으로 tyrosinase 활성에 기여하여 멜라닌의 생성을 조절할 수 있



**Fig. 9.** MITF mRNA expression rate of extract from *Erigeron annuus* (L.) Pers. on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were started in serum free medium free medium for 1 h the cells were treated with 25, 50 and 100 µg/ml of ethanol extracted of *Erigeron annuus* (L.) Pers. for 24 h. Con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with  $\alpha$ -MSH. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments (Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

다[33]. 미백 소재의 개발에 있어 멜라닌을 생성을 억제시키는 작용과 멜라닌의 분해를 촉진시키는 단계에서의 효소의 조절이 매우 중요하며 멜라닌 생성과 연관성이 있는지 보기 위해 mRNA 발현양을 확인하였다.

개망초 에탄올 추출물이 melanin 합성에 관계된 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase에 미치는 mRNA 발현의 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma cell에 25, 50, 100 µg/ml의 농도별로 처리한 후 control은  $\alpha$ -MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현 시키고, normal 부분에는  $\alpha$ -MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 24시간 뒤 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인하였다. Positive control로 GAPDH를 사용하였다. 그 결과 Fig. 9와 같이 개망초 에탄올 추출물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도별로 처리하였으며 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현 측정 결과 농도가 증가함에 따라서 mRNA 발현을 억제하였고 100 µg/ml에서 86.54%, 85.22%, 74.26%, 66.66%의 억제율을 나타

냈다. 대조군인 kojic acid와 비교했을 때 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

## 요약

개망초의 항산화능 측정으로 전자공여능을 측정한 결과 농도 의존적으로 활성이 증가하여 500 µg/ml에서 82%의 높은 전자공여능을 나타내었다. ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 측정 결과 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며, 500 µg/ml에서 87% 이상의 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해 활성 측정 결과 개망초 에탄올 추출물이 1,000 µg/ml에서 69%의 효과를 나타내었다. 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 1,000 µg/ml에서 32.2%의 효과를 나타내었다. 개망초 추출물에 대한 수렴효과를 측정한 결과 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, 1,000 µg/ml에서 80% 이상의 우수한 수렴효과를 확인할 수 있었다. 세포 생존율을



MTT 분석법을 통해 확인한 결과 농도 구간이 100 µg/ml 일 때 96%의 생존율을 보였으며, 따라서 관련 실험을 세포생존율이 100%에 가까운 25, 50, 100 µg/ml에서 진행하였다. B16F10 세포에 개망초 에탄올 추출물을 처리한 결과 MITF, TRP-2의 단백질 발현양이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, TRP-1과 tyrosinase 발현양이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 상위 단계 유전자인 ERK와 CREB의 발현양은 미비했으나, 인산화된 ERK와 인산화된 CREB에서 농도가 증가함에 따라 단백질 발현양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 개망초 에탄올 추출물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도 별로 처리하였으며 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현 측정 결과 농도가 증가함에 따라서 mRNA 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 항산화 및 멜라닌 생합성에 관여하는 그 하위 유전자 및 상위 유전자의 발현을 저해하여 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 추측되고 그에 따라 우리나라 전역에서 재배가 가능하고 국화과에 속하는 신귀화식물 개망초를 기능성 천연 미백소재로써 이용 가능성을 확인하였다.

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Kim EJ, Choi JY, Yu MY, Kim MY, Kim SH, Lee BH. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 337-342.
- Kim JW, Kim JS, Song IS, Kwon ES, Youn KS. 2013. Comparison of antioxidant and physiological properties of jerusalem artichoke leaves with different extraction processes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 68-75.
- Youm TH, Lim HB. 2010. Antimicrobial activities of organic extracts from fruit of *Thuja orientalis* L. *Korean J. Med. Crop Sci.* **18**: 315-322.
- Parvez S, Kang MK, Chung HS, Cho CW, Hong MC, Shin MK, et al. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agent. *Phytother Res.* **20**: 921-934.
- Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, et al. 2000. Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 162-167.
- Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AT. 1994. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci.* **107**: 205-216.
- Busca R, Ballotti R. 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigm. Cell Res.* **13**: 60-69.
- Fordin M, Peraldi P, Van Obberghen E. 1994. Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 6207-6214.
- Lee JH, Lee SY. 1983. Effects of toxic substances of *Erigeron annuus* on the germination and seeding growth of several upland crops. *Wonkwang Univ.* **17**: 107-139.
- Kim DH, Jung SJ, Bang MH, Chung IS, Kim SH, Kwon BM, et al. 2004. Development of biologically active compounds from edible plant sources -XIII. Isolation of triterpenoids from the flower of *Erigeron annuus* L. *J. Korean Soc. Appl. Bol. Chem.* **47**: 422-425.
- Shin YS, Cho AR. 2004. Natural dyeing using the colorants extracted from American Fleabane (Part II) - Dyeing properties on cotton. *J. Korean Soc. Cloth. Text.* **28**: 1625-1631.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**: 1199-1200.
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 1231-1237.
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med.* **3981**: 517-519.
- Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianski AM, Walker JM. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**: 10-14.
- Lee JT, Jeong YS, An BJ. 2002. Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials. *Korean J. Herbol.* **17**: 51-60.
- 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.
- Hatano T. 1995. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species tannins and related polyphenols. *Nat. Med.* **49**: 357-363.
- Riley PA. 1997. Molecules in focus melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 1235-1239.
- Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. 2006. Antioxidative activity of hot water extracts from medicinal plants. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 7-14.
- Cho KS. 2016. Inhibitory effect of DPPH radical scavenging activity and hydroxyl radicals (OH) activity of *Hydrocotyle sibthorpioides* Lamarck. *J. Life Sci.* **26**: 1022-1026.
- Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Agric. Food Chem.* **51**: 6657-6719.
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeon BT. 2011. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves on t-BHP induced oxidative stress in Chang cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**: 1525-1531.
- Cha JY, Yang HJ, Jeong JJ, Seo WS, Park JS, Ok M, et al. 2010. Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J. Life Sci.* **20**: 940-947.
- Im S, Moro O, Peng F, Medrano EE, Cornelius J. 1998. Activation

- of the cAMP pathway by  $\alpha$ -melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res.* **58**: 47-54.
26. Iwata M, Corn T, Iwata S, Everett MA, Fuller BB. 1990. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.* **95**: 9-15.
27. Lee SY, An JH, Chun H, Cho HY. 2003. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* Bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *Korean J. Soc. Appl. Biol. Chem.* **46**: 60-65.
28. 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.
29. Lim AK, Kim JO, Jung MJ, Jung HK, Hong JH, Kim DI. 2008. Functional biological activity of hot water and ethanol extracts from taraxaci herba. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* **37**: 1231-1237.
30. Youn JS, Shin SY, Wu YX, Hwang JY, Cho JH, Ha YG, et al. 2012. Antioxidant and anti-wrinkling effects of *Aruncus dioicus* var. *kamtschaticus* extract. *Korean J. Food Preserv.* **19**: 393-399.
31. Ukeda H, Maeda S, Ishii T, Sawamura M. 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'--1--(phenylamino)- carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **251**: 206-215.
32. Kim BY, Park SH, Park BJ, Kim JJ. 2015. Whitening effect of *Androsace umbellata* extract. *J. Soc. Cosmet. Sci.* **41**: 21-26.
33. Hearing VJ, Tsukamoto K, Urabe K, Kameyama K, Montague PM, Jackson IJ. 1992. Functional properties of cloned melanogenic proteins. *Pigment Cell Res.* **5**: 264-334.