

The Effects on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells and the Anti-inflammatory Activities of an Ethyl Acetate Fraction from *Glechoma hederacea* var. *longituba*

Hyeon-Ji Yeom¹, Min-Jeong Oh¹, Jung-Woo Chae² and Jin-Young Lee^{1*}

¹Division of Cosmetics and Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Korea

²Gyeonggi-do Forest Environment Research Institute, Osan 12408, Korea

Received November 30, 2021 / Revised January 20, 2022 / Accepted February 24, 2022

This study aimed to confirm the possibility of being used as a cosmetic material through the verification of the whitening and anti-inflammatory activities of an ethyl acetate fraction from *Glechoma hederacea* var. *longituba* (GHEA). The observed electron donating and ABTS⁺ radical scavenging abilities of GHEA were 89.6% and 88.7%, respectively, at 1,000 µg/ml concentration, with a tyrosinase inhibitory effect of 22.3% at the same concentration. For cell viability, a rate of 80% or more was observed in all concentrations that treated GHEA on melanoma and macrophage cells. Protein and mRNA expression inhibition was measured by Western blot and RT-PCR for 25, 50, and 100 µg/ml concentrations, and it was confirmed that expression decreases in a concentration-dependent manner as GHEA concentration increases. The inhibition of the whitening-related factors MITF and TRP-2 were superior following GHEA treatment than those of the control group treated with kojic acid of 100 µg/ml concentration. For tyrosinase, the lowest mRNA expression rate was 29.1% at 100 µg/ml which confirmed excellent inhibition. In analyzing the effects of pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, and TNF-α on protein and mRNA expression, IL-6 and TNF-α showed high protein and mRNA inhibition compared to a vitamin C control group. Based on these experimental results, GHEA could be applied as a natural cosmetic material.

Key words : Anti-inflammatory, cytokine, *Glechoma hederacea* var. *longituba*, IL-6, whitening

서론

현대 사회는 소비자들의 의학적, 생활적 수준이 향상됨에 따라 건강한 삶과 아름다움을 위하여 화장품의 유해성분에 대한 관심과 친환경적인 제품을 선호하는 경향이 강해지고 있다[12, 32]. 이러한 시대적 변화로 인하여 관련 화장품 시장의 규모가 확대되고 있으며, 유효성을 가진 기능성 합성원료를 대체하여 화장품에 이용 가능한 천연물 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[9].

피부의 색에 관여하는 적갈색 또는 흑갈색의 고분자 화합물인 melanin [19]은 자연계에 널리 분포하며 외부의 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할[21]을 하지만 과도하게 생성되면 melanin 전구물질의 독성으로 인하여 피부노화 촉진 및 세포 사멸, 피부암을 유발하며 주근깨, 검버섯, 기미 등과 같은 과색소 침착의 원인이 되기도 한다[4]. 자외선으로 인해 피부

의 keratinocyte가 자극을 받으면 α-melanocyte stimulating hormones (α-MSH)를 생성하며, 생성된 α-MSH는 신호전달 물질로써 멜라닌 세포로 신호를 보내어 세포 내 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)의 생산을 자극하게 된다. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 cAMP의 반응 요소인 cAMP response element-binding protein (CREB)에 의해 발현이 조절되는 전사인자로 tyrosinase-related protein (TRP)-1, TRP-2, tyrosinase의 생합성을 촉진하여 멜라닌 생성이 증가하게 된다[11, 28].

염증(inflammation)은 세균 및 미생물 감염, 화학물질 및 물리적 작용 등의 다양한 외부 자극에 의해 인체조직이 손상 되면 면역세포(immunocyte)에서 이에 대응하기 위해 염증 매개물질을 분비하는 시스템의 국소적인 방어기전이다[13, 16]. 염증반응을 조절하는 대식세포(macrophage cell)는 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 자극의 반응으로 interleukin (IL)-1β, IL-6 및 tumor necrosis factor-α (TNF-α)와 같은 전 염증성 cytokine과 염증 매개물질인 nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂) 등을 분비한다 [18, 29]. Cytokine 중 하나인 TNF-α는 면역세포를 조절하고 다른 pro-inflammatory cytokine들의 생성을 활성화하여 염증 반응에 영향을 미치며, IL-1β는 대식세포를 활성화시키고 대표적인 cytokine인 IL-6는 다양한 요인으로 합성되어 염증

*Corresponding author

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

E-mail : jylee@hoseo.edu

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.

환의 진행과정에 중요한 역할을 한다[3]. 따라서 이들의 활성을 억제하고 조절함으로써 염증 질환을 예방할 수 있는 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

긴병꽃풀(*Glechoma hederacea* var. *longituba*)은 금전초(金錢草)의 두 가지 종 중 하나로 꿀풀과(Lamiaceae)의 여러해살이 초본식물이다[10]. 우리나라에서는 경기도와 전라남도, 경상남도, 황해 이북 등에 분포하고 있으며 주로 산지의 습한 환경의 양지에서 자란다. 민간에서는 관상용으로도 쓰이며 예로부터 기관지염, 담석증, 요로결석 제거, 해독 등의 염증관련 질환을 다스리는 효능을 가지고 있다고 하여 약용으로도 사용되어 왔다[15, 22].

현재 긴병꽃풀의 정유에 대한 연구 결과[17, 26]와 금전초 관련으로는 항산화 및 세포보호 효과[10], 염증성 세포 활성들의 생성 조절에 관한 연구[20] 등의 다양한 연구결과가 있으나, 긴병꽃풀의 특정 분획물에 대한 기능성 활성 관련 연구는 미흡한 실정으로 본 연구에서는 긴병꽃풀의 ethyl acetate 분획물을 이용하여 피부 미백 및 항염증 활성을 확인함으로써 기능성 화장품의 천연 소재로서의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

본 실험에 사용된 긴병꽃풀은 경기도 오산시에 위치한 물향기수목원 내에 자생하고 있는 것을 5~9월경에 채취하였으며 세척 후 건조한 뒤 파쇄하여 시료 중량의 10배수에 해당하는 70% ethanol을 넣고 24시간 실온에서 침지하여 추출하였다. 이후 침전물과 상등액을 분리하여 3회 반복 추출하였으며 여과지(Whatman No.2)로 추출물을 여과하고 EYELA evaporator를 사용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 수분을 제거한 가루 형태의 시료를 얻었다. Ethyl acetate 분획물을 얻기 위해 가루 형태의 긴병꽃풀 70% ethanol 추출물에 동량의 ethyl acetate로 3회 반복 분액 하였으며, ethyl acetate층과 H₂O층 중 ethyl acetate층을 분리하여 이전과 동일한 방법으로 감압 농축 후 동결 건조하여 ethyl acetate 분획물을 얻었다. 이는 -20℃에서 보관하며 본 실험의 시료로 사용하였다.

시약 및 기기

항산화 활성 측정을 위한 전자공여능 및 ABTS⁺ radical 소거능 측정 실험에 사용된 시약인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)와 potassium persulfate는 Sigma-Aldrich Corporation (USA)에서 구입하여 사용하였으며 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 미백활성 측정 실험에 사용된 시약인 tyrosinase from mushroom과 L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA) 등은

Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

본 연구에서 세포 배양 및 세포 독성 측정에 사용된 melanoma cell인 B16F10와 macrophage cell인 Raw 264.7은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위해 사용한 penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS)와 trypsin은 Thermo Fisher Scientific (HyCloneTM, USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하였고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corporation (USA)에서 구입하여 사용하였다.

또한 단백질 발현 실험에 사용된 β -actin 및 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 primary antibody와 anti-mouse의 secondary antibody는 Santa Cruz (CA, USA)에서 구입하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 이용한 GAPDH 및 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase, IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 Bionics (Seoul, Korea)에서 구입하였으며 cDNA polymerase kit, Go ScriptTM Reverse Transcription kits는 Promega (USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), vortex (Scientific Industries, INC, USA), microplate reader (Tecan, Austria), autoclave (JS Research Inc., Korea), freeze drier (ILShin BioBase Co., Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), microscope (Olympus, Japan), haemocytometer (Marienfeld, Germany), centrifuge (Hanil Science Industrial Co., Korea), micro centrifuge (gyrozen, Korea), digital shaker (Daihan Scientific, Korea), Mini-PROTEAN[®] tetra cell (Bio-Rad, USA), Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad, USA), Davinch-ChemiTM Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co., Korea), PCR (C-100, Bio-Rad, USA)의 기기를 사용하였다.

실험 방법

Electron donating ability 측정

전자공여능(electron donating ability, EDA)은 Blois의 방법 [1]을 변형하여 측정하였다. 각각의 농도별로 조제한 추출물 120 μ l와 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)를 100% ethanol에 용해한 용액을 60 μ l씩 96-well plate에 넣고 혼합한 후 실온의 암실에서 15분간 반응시켜 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

전자공여능(%) = (1 - 시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도) \times 100

ABTS⁺ radical 소거능 측정

ABTS⁺ radical이 탈색되는 원리를 이용한 항산화 활성 측정 방법인 ABTS⁺ decolorization assay [27]에 의하여 측정하였다. 7 mM의 2,2-azino-bis(3-ethyl-benthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 용액에 2.45 mM의 potassium persulfate를 넣어 혼합한 후 24시간 동안 실온의 암실 조건에서 반응시켰다.

ABTS⁺ radical이 형성된 용액은 100% ethanol로 희석하여 실험에 사용하였으며, 농도 별 시료용액과 ABTS⁺ radical 용액을 100 μ l씩 1:1의 비율로 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ radical 소거능}(\%) = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[30]에 따라 실험을 실시하였다. 반응구는 농도별 시료용액 40 μ l와 67 mM의 sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 μ l, 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 40 μ l를 넣은 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase를 40 μ l씩 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 DOPA chrome을 흡광도 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용된 melanoma cell인 B16F10과 macrophage cell인 Raw 264.7은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 분양받아 사용하였다. 10%의 FBS와 1%의 penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C의 온도와 5% CO₂ 조건 하의 incubator에서 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 독성 측정

세포에 대한 시료의 독성을 확인하기 위하여 Carmichael의 방법[2]에 따라 실험을 실시하였다. Melanoma cell (B16F10)과 macrophage cell (Raw 264.7)을 96-well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 180 μ l씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 농도별로 조제한 시료용액을 20 μ l씩 처리하여 동일 조건의 incubator에서 24시간 배양하였다. 이후 MTT 용액을 2.5 mg/ml의 농도로 제조하여 40 μ l씩 첨가하였으며 3시간 반응시킨 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 100 μ l씩 가하여 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료를 처리하지 않은 군의 흡광도를 100%로 하여 시료첨가군의 상

대적인 세포 생존율을 나타내었다.

$$\text{세포 생존율}(\%) = (\text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

미백관련 인자들인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2, tyrosinase와 cytokine 생성에 관련된 interleukin (IL)-1 β , IL-6 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 인자들의 활성을 알아보기 위하여 western blot을 통해 단백질 발현 정도를 측정하였다. Melanoma cell인 B16F10과 macrophage cell인 Raw 264.7을 100 mm tissue culture dish에 1×10^6 cells/dish가 되도록 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였으며, B16F10 세포에는 100 nM의 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)를 처리하였으며 Raw 264.7 세포에는 2 μ g/ml의 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 2시간 동안 반응시켰다. 배지를 제거하여 1x PBS로 세척 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 1x PBS로 2회 세척하여 다음의 과정을 진행하였다. Complete mini 1 tab을 radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 가한 용액을 B16F10 세포에는 80 μ l, Raw 264.7 세포에는 100 μ l씩 각 dish에 분주하여 세포를 lysis한 후 centrifuge를 이용해 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 그 후 BCA protein assay kit를 사용하여 상층액을 정량하였으며, 10% SDS-PAGE상에서 20 μ l의 단백질을 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 과정을 통해 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 후 실온에서 1시간 동안 blocking buffer (5% skim milk in tris-buffered saline and tween 20 (TBST))로 blocking을 진행하였다. Primary antibody를 3% skim milk in TBST에 1:200 및 1:500의 비율로 희석하여 4°C에서 3시간 30분 동안 반응시킨 후, 10분 간격으로 TBST를 사용하여 3회 세척하였으며 1:2,000으로 희석한 secondary antibody는 4°C에서 90분간 반응시킨 후 다시 TBST로 10분씩 3회 세척하여 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM system을 이용하여 밴드를 확인하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

B16F10 세포와 Raw 264.7 세포를 100 mm culture dish에 1×10^6 cells/dish가 되도록 seeding하여 24시간 동안 배양한 후 B16F10 세포에는 100 nM의 α -MSH를 처리하였으며 Raw 264.7 세포에는 2 μ g/ml의 LPS를 처리하여 2시간 동안 반응시켰다. 그 다음 농도별 시료용액을 처리하여 24시간 배양한 후 배지 상층액을 제거한 뒤 1x PBS로 2회 세척하였다. Trizol lysis buffer를 dish에 1 ml씩 분주하여 각각의 세포를 lysis한 후 수거한 lysate에 chloroform 200 μ l를 분주하여 위아래로 30초간 흔들어서 반응시켰다. 이후 centrifuge를 이용해 4°C,

13,200 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액 500 µl와 동량의 isopropanol를 첨가하여 섞어주었으며 다시 이전과 동일한 조건에서 원심분리하였고, 상층액을 제거하여 RNA pellet을 얻었다. 각각의 e-tube에 75% EtOH-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 1 ml씩 분주하여 동일 조건의 centrifuge를 사용하여 원심분리한 뒤 상층액을 완전히 제거하였다. 여기에 DEPC water를 50 µl씩 분주하여 RNA pellet을 녹인 후 A260/A280의 비율을 사용하여 1.8~2.0 순도의 total RNA를 추출하였고 total RNA 값을 microvolume spectrometer를 이용하여 측정하였다. 추출한 RNA (3 µl)와 oligo (dT) 15 primer (500 µg/ml) 1 µl를 첨가한 후 nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨다. 이후 5X reaction buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

미백관련 인자들인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase와 염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6 및 TNF-α에 대한 mRNA 발현을 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시하였으며 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 합성한 cDNA와 5X green GoTaq flexi buffer, MgCl₂, 10 mM의 PCR nucleotide mix, primer, GoTaq DNA polymerase, nuclease free water를 첨가하여 혼합한 후 PCR을 진행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), tyrosinase 및 TNF-α는 96°C에서 10초, 64°C에서 30초, 72°C에서 1분(40 cycles), MITF, TRP-1 및 TRP-2는 각각 96°C에서 10초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분(40 cycles), IL-1β와 IL-6는 96°C에서 10초,

59°C에서 30초, 72°C에서 1분(40 cycles)을 실행하여 PCR로 합성시켰다. 이후 0.002% ethidium bromide (EtBr)을 첨가하여 제조한 1.5% agarose gel으로 100 V에서 30분 동안 전기영동 후 UV transilluminator를 이용하여 밴드를 확인하여 분석정량하였다.

결과 및 고찰

전자공여능 측정 결과

가장 간편한 항산화 활성 측정방법 중의 하나로 free radical인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다. 이러한 방법으로 긴병꽃풀 70% ethanol 추출물을 이용하여 ethyl acetate 분획을 통해 얻은 분획물의 항산화 활성을 확인하기 위해 전자공여능을 측정한 결과, Fig. 1과 같이 나타났으며 ethyl acetate 분획물의 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 100 µg/ml에서 50% 이상의 활성을 나타내었고 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 89.6%의 효과를 보였다. Oh의 연구[24]에서 썸바귀 잎 70% ethanol 추출물이 1,000 µg/ml의 농도에서 47.23%의 활성을 나타내었고, Park 등[25]의 연구에서 동일한 농도의 아가위 열매 ethanol 추출물이 85.8%의 활성을 나타낸다는 결과와 비교하였을 때 다른 추출물에 비해 높은 전자공여능 활성을 확인할 수 있었다.

ABTS⁺ radical 소거능 측정 결과

ABTS⁺ radical scavenging activity assay는 인체 내에서 생성되는 radical을 대체하여 간접적으로 항산화능을 측정할 수 있는 시험법으로 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물의 ABTS⁺ rad-

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence (5' →3')
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	Anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
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
IL-1β	Sense	AGG ACA CGA CTG CTT TCT TC
	Anti-sense	GCA CCG CAG TAG GGA AGT GT
IL-6	Sense	GGC TTT TAA GTG GGG CTG TC
	Anti-sense	CCC AAG ATC CAC TGC AAA TG
TNF-α	Sense	GAG AGG AAC ACG TTC TGG CTC C
	Anti-sense	TGC TGG AGG CTG AGG CAT CC

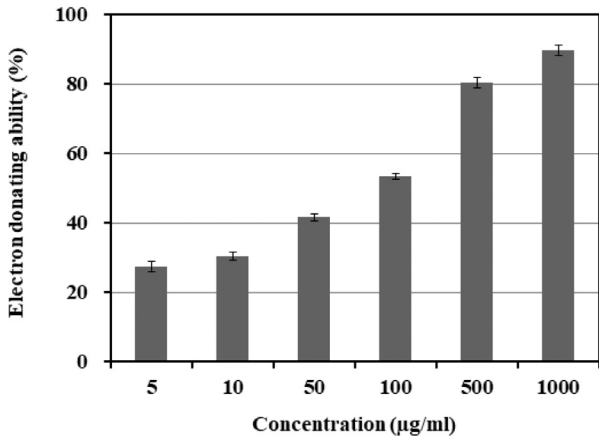


Fig. 1. Electron donating ability of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction. Electron donating ability for *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction from various concentration was determined with 0.2 mM DPPH ethanolic solution. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

ical 소거능을 측정할 결과, Fig. 2와 같이 나타났다. 분획물의 농도가 증가함에 따라 ABTS⁺ radical 소거활성이 증가하였으며 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 88.7%의 소거능을 나타냈다. Hyun 등[6]의 제주 재래종 감귤 홍굴 과피 ethyl acetate 분획물의 1,000 µg/ml에서 약 90%, Hwang 등[5]의 연구에서 동일한 농도의 홍마늘 ethyl acetate 분획물이 76.6%의 ABTS⁺ radical 소거능을 나타낸다고 보고됨에 따라 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물의 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

Tyrosinase 저해활성 측정 결과

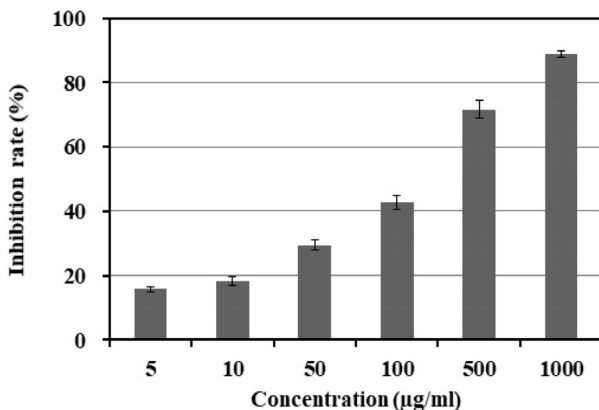


Fig. 2. ABTS⁺ radical scavenging activity of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction. ABTS⁺ radical scavenging activity for *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction from various concentration was determined with ABTS⁺ radical solution. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

인체의 melanin 생합성은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로 변환되고 효소적 산화반응을 통해 DOPA quinone으로 전환되며, DOPA quinone의 반응에 따라 pheomelanin과 eumelanin이 생성된다[8, 31]. Tyrosinase는 피부 내의 melanin polymer의 생합성 과정에서 rate limiting enzyme로 작용하며 이 enzyme의 활성을 억제하는 실험은 미백 원료 개발의 1차적인 단계에서 큰 의미를 갖는다[23].

긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과, Fig. 3과 같이 나타났으며 시료의 농도 의존적으로 저해능이 증가하였으며 100 µg/ml의 농도에서 15%에 가까운 억제활성을 보였고 최고 농도인 1,000 µg/ml에서는 22.3%의 저해활성을 확인할 수 있었다. 기존에 보고된 연구에서는 Kim 등[14]의 섬초롱 80% ethanol 추출물의 ethyl acetate 분획물은 1,000 µg/ml에서 약 25%의 저해활성을 보였으며, 열풍건조 삼차 뿌리 ethyl acetate 분획물이 2,000 µg/ml에서 40.6%의 저해활성을 나타낸다는 Jeong 등[7]의 결과와 비교하였을 때 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

MTT assay에 의한 세포독성 측정 결과

긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물에 의한 melanoma cell과 macrophage cell의 생존율을 확인한 결과, Fig. 4, Fig. 5와 같이 나타났다. 시료용액의 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 감소하였으나, 모든 농도구간에서 80% 이상의 세포 생존율을 확인할 수 있었으며, 특히 macrophage cell에서 95% 이상의 높은 생존율을 확인할 수 있었다. 따라서 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물은 melanoma cell과 macrophage cell에 대해 독성이 미비하다고 판단하였으며, 이하의 Western blot과 RT-

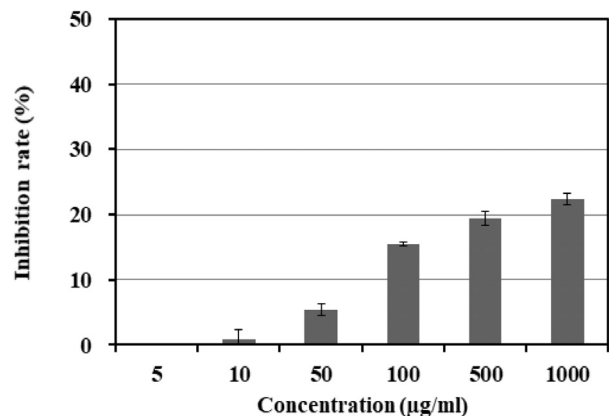


Fig. 3. Inhibition rate of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction on tyrosinase. Inhibition rate of tyrosinase for *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction from various concentration was determined with 200 U/ml mushroom tyrosinase solution. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

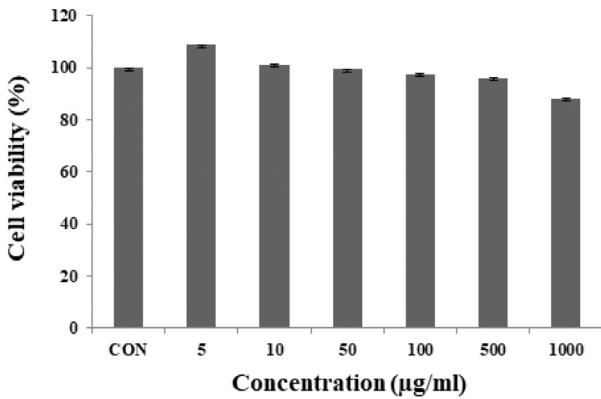


Fig. 4. Cell viability of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 hr in DMEM containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction for 24 hr and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

PCR의 실험에서는 melanoma cell과 macrophage cell에서 모두 90% 이상의 생존율을 나타낸 25, 50, 100 µg/ml의 농도구간으로 설정하여 실험을 진행하였다.

Western blot을 통한 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현에 미치는 영향

긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물이 melanin 합성에 관계된 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma cell에 25, 50, 100

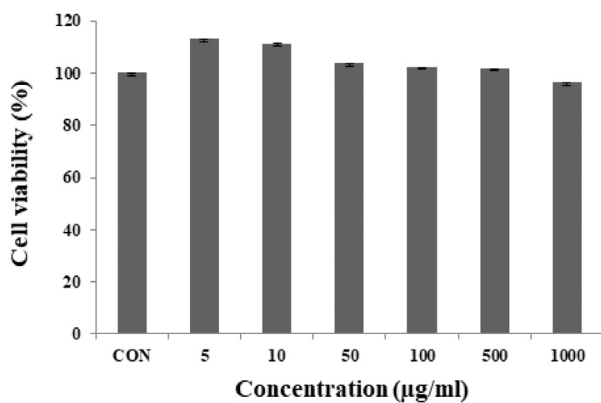


Fig. 5. Cell viability of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction on macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated for 24 hr in DMEM containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction for 24 hr and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

µg/ml의 분획물을 농도별로 처리한 후 control은 자극제인 α -MSH를 처리하여 melanin을 과발현시키고, normal 부분에는 α -MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 이후 24시간 뒤에 protein 발현을 Western blotting으로 확인하였으며 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β -actin을 positive control로 사용하였다. 그 결과, Fig. 6과 같이 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도별로 처리한 B16F10 군에서 α -MSH에 의해 증가된 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현양이 분획물의 농도가 증가함에 따라 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 대조군인 kojic acid에 비해 MITF와 TRP-2에서 더 높은 단백질 발현 억제율을 확인할 수 있었다.

Western blot을 통한 Pro-inflammatory cytokine의 단백질 발현에 미치는 영향

대식세포인 Raw 264.7 세포에서 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물이 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 단백질 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Western blot을 진행하였다. Raw 264.7 cell에 25, 50, 100 µg/ml의 분획물을 농도별로 처리한 후 control 구간은 염증활성을 과발현시키기 위해 LPS를 처리하였고, normal 구간에는 LPS를 처리하지 않았다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β -actin을 positive control로 사용하였으며 그 결과, Fig. 7과 같이 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물이 농도 의존적으로 단백질이 억제됨을 보였으며, LPS에 의해 증가된 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 단백질 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 특히 IL-6와 TNF- α 의 인자가 같은 농도의 대조군인 Vit. C에 비해 높은 단백질 억제율을 확인할 수 있었다.

RT-PCR을 통한 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현에 미치는 영향

미백관련 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 인자에 대해 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물이 mRNA 발현양에 미치는 영향을 측정하기 위해 reverse transcription-PCR을 진행하였으며 이때 GAPDH을 positive control로 사용하였다. Melanoma cell인 B16F10에 분획물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리하여 진행하였으며, 그 결과 Fig. 8과 같은 결과를 확인할 수 있었다. MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA 발현양이 분획물의 농도가 증가함에 따라 억제됨을 확인하였으며 대조군인 kojic acid에 비해 MITF와 TRP-1 인자에서 우수한 mRNA 억제를 보였고 tyrosinase에 대해서는 100 µg/ml에서 가장 낮은 29.1%의 발현량을 보여 매우 뛰어난 mRNA 발현 억제를 나타내어 미백 기능성화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

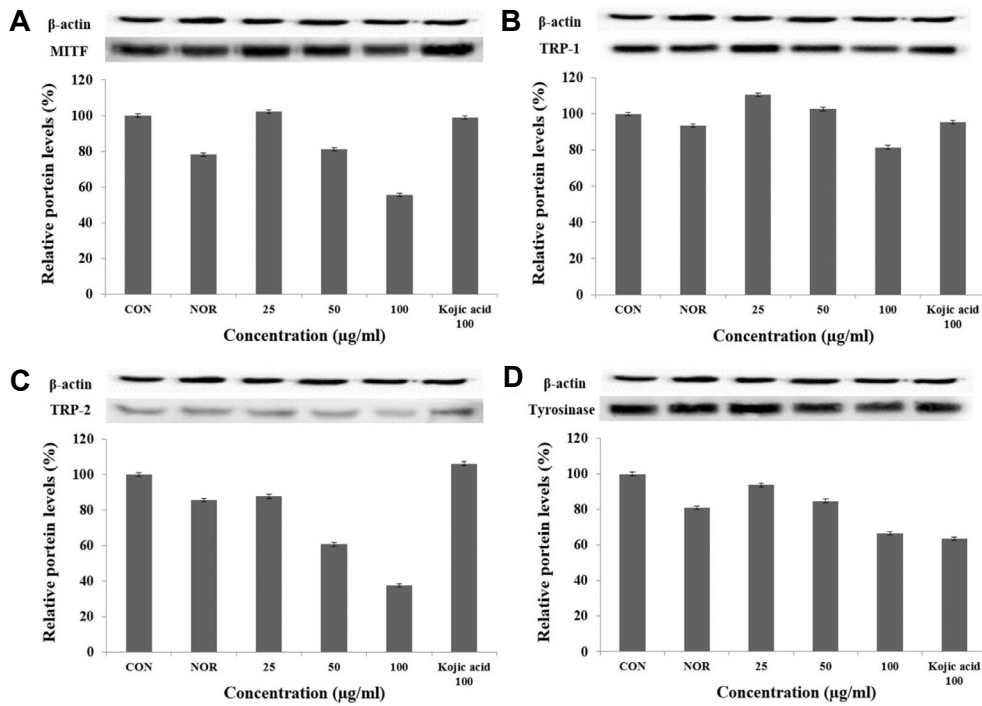


Fig. 6. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression rate of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 hr in DMEM, were treated with 25, 50 and 100 μ g/ml concentration of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction for 24 hr and then total protein was isolated. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein level was determined by Western blot. CON: control, treated with α -MSH; NOR: normal, not treated with α -MSH. The results were expressed as the average of triplicate samples.

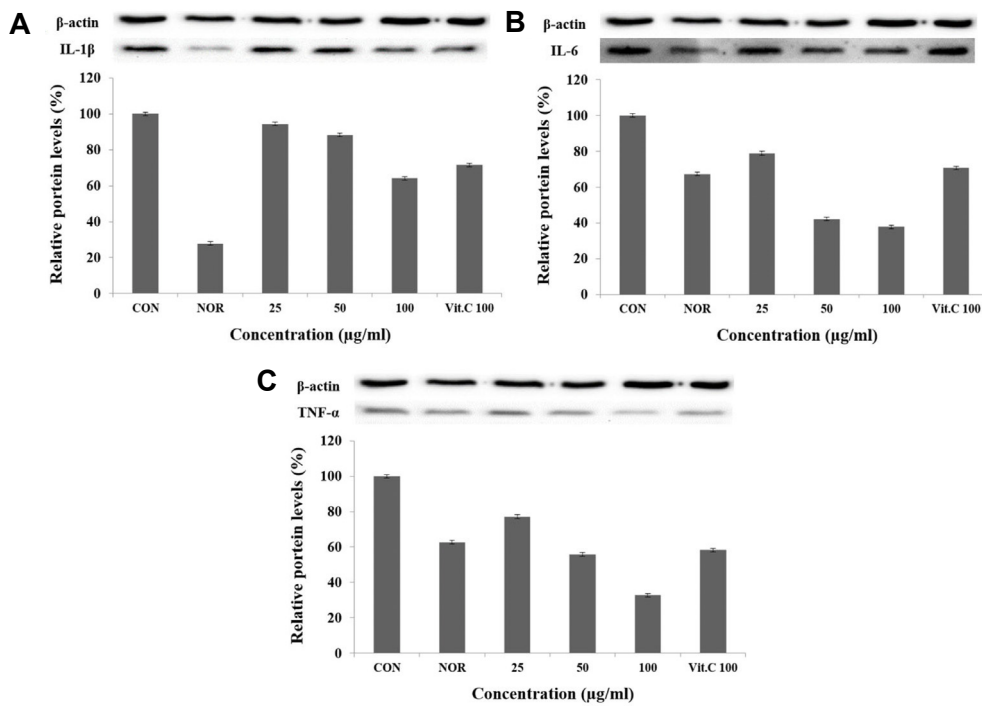


Fig. 7. IL-1 β , IL-6, TNF- α protein expression rate of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction on macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated for 24 hr in DMEM, were treated with 25, 50 and 100 μ g/ml concentration of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction for 24 hr and then total protein was isolated. IL-1 β , IL-6, TNF- α protein level was determined by Western blot. CON: control, treated with LPS; NOR: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

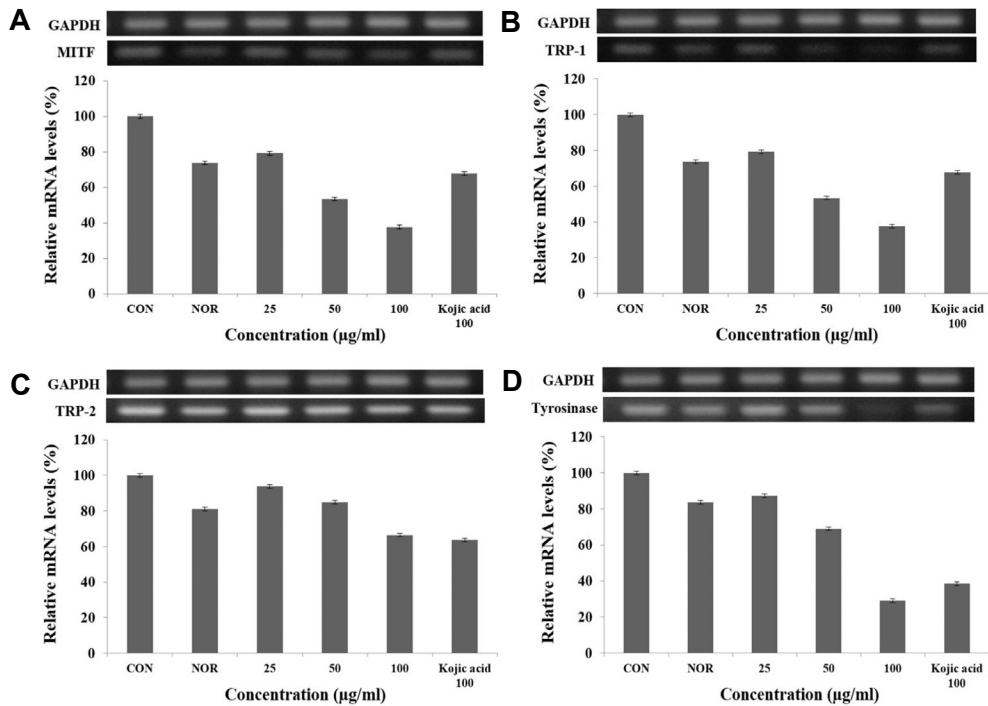


Fig. 8. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase mRNA expression rate of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 hr in DMEM, were treated with 25, 50 and 100 µg/ml concentration of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction for 24 hr and then total RNA was isolated. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase mRNA level was determined by RT-PCR. CON: control, treated with α-MSH; NOR: normal, not treated with α-MSH. The results were expressed as the average of triplicate samples.

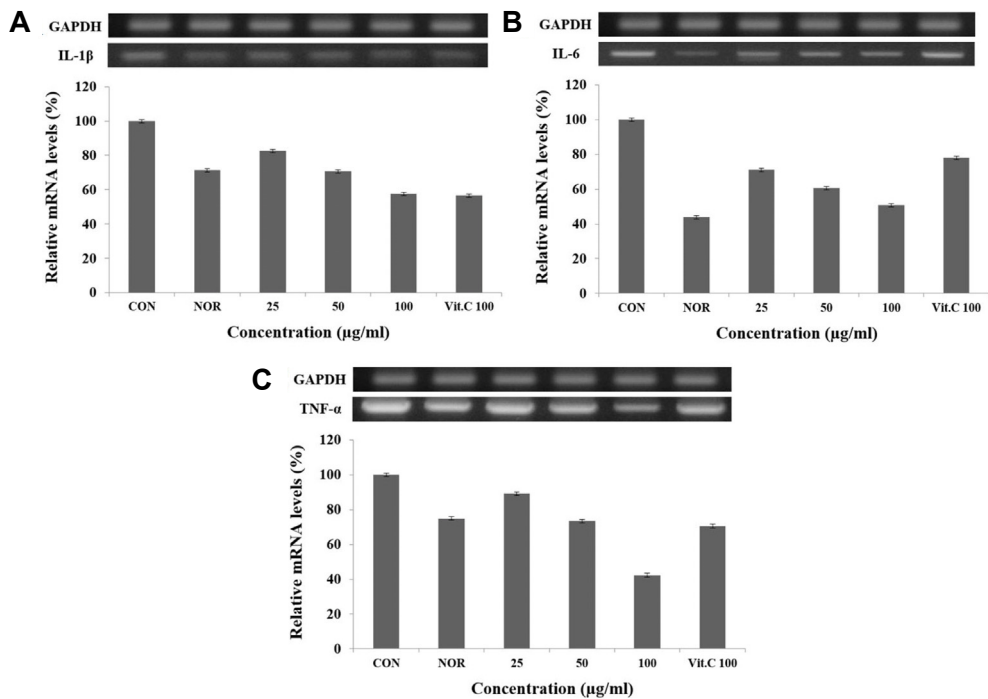


Fig. 9. IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA expression rate of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction on macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated for 24 hr in DMEM, were treated with 25, 50 and 100 µg/ml concentration of *Glechoma hederacea* var. *longituba* ethyl acetate fraction for 24 hr and then total RNA was isolated. IL-1β, IL-6, TNF-α mRNA level was determined by RT-PCR. CON: control, treated with LPS; NOR: normal, not treated with LPS. The results were expressed as the average of triplicate samples.

RT-PCR을 통한 Pro-inflammatory cytokine의 mRNA 발현에 미치는 영향

염증유발 인자인 LPS로 염증이 유도된 Raw 264.7 cell에서 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물이 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 인자의 mRNA 발현량에 미치는 영향을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 이때 GAPDH를 positive control로 사용하였으며, 분획물을 25, 50, 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 진행하였다. 그 결과, Fig. 9와 같이 나타났으며 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물의 mRNA 발현양이 농도 의존적으로 억제되었으며, IL-6와 TNF- α 에서 발현양은 50.7%, 42.4%로 같은 농도의 대조군인 Vit. C에 비해 높은 억제율을 나타내었다. 본 연구 결과에 의해 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물이 염증 억제에 대한 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1120.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Cho, Y. H., Kim, H. J., Kim, D. I., Jang, J. Y., Kwak, J. H., Shin, Y. H., Cho, Y. G. and An, B. J. 2015. Effect of garlic (*Allium sativum* L.) stems on inflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expressions in Raw 264.7 cells induced by lipopolysaccharide. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 613-621.
- Chun, H. J., Hwang, S. G., Lee, J. S., Baek, S. H., Jeon, B. H. and Woo, W. H. 2002. Inhibitory effects of butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanogenesis in melan-a cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **33**, 130-136.
- Hwang, C. R., Shin, J. H., Kang, M. J., Lee, S. J. and Sung, N. J. 2012. Antioxidant and antiobesity activity of solvent fractions from red garlic. *J. Life Sci.* **22**, 950-957
- Hyun, J. M., Park, K. J., Kim, S. S., Park, S. M., Lee, Y. J. and An, H. J. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory effects of solvent fractions from the peel of the native Jeju citrus 'Hongkyool' and 'Pyunkyoool'. *J. Life Sci.* **25**, 1132-1138.
- Jeong, S. J., Kim, K. H. and Yook, H. S. 2015. Whitening and antioxidant activities of solvent extracts from hot-air dried *Allium hookeri*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 832-839.
- Jo, J. B., Kim, M. U., Lee, E. H., Kim, Y. J., Cho, E. B., Kang, I. K. and Cho, Y. J. 2018. Whitening effect of extracts from *Matricaria chamomilla* L. with B16F10 melanoma cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **61**, 267-273.
- Jun, Y. J., Lee, S., Heo, S. and Jin, B. S. 2019. Functional characterization of the extracts from Nipa palm, Molokhia, and Finger root for cosmetic ingredients. *J. Kor. Appl. Sci. Technol.* **36**, 821-829.
- Kim, A. R., Jung, M. C., Jeong, H. I., Song, D. G., Seo, Y. B., Jeon, Y. H., Park, S. H., Shin, H. S., Lee, S. L. and Park, S. N. 2018. Antioxidative and cellular protective effects of *Lysimachia christinae* Hance extract and fractions. *Appl. Chem. Eng.* **29**, 176-184.
- Kim, D. H., Moon, Y. S., Park, T. S., Hwang, J. Y. and Son, J. H. 2013. Potent whitening activity of *Aruncus dioicus* extract in B16F10 melanoma cell by suppression of melanin biosynthesis. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **31**, 813-820.
- Kim, H. S. and Ko, K. S. 2020. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Ginseng berry ethanol extracts as a cosmetic ingredient. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **18**, 389-387.
- Kim, M. K. and Kim, D. Y. 2015. Anti-inflammatory effect of barley leaf ethanol extract in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage. *Kor. J. Food Preserv.* **22**, 735-743.
- Kim, M. S., Kim, K. H. and Yook, H. S. 2012. Antioxidative effects of *Campanula takesimana* Nakai extract. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1331-1337.
- Kim, O. K. 2004. Antidiabetic effect of *Glechoma hederacea* LINNAEUS in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**, 300-308.
- Kim, P. K., Jung, K. I., Choi, Y. J. and Gal, S. W. 2017. Anti-inflammatory effects of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extracts in LPS-induced RAW 264.7 cells. *J. Life Sci.* **27**, 986-993.
- Kim, S., Kim, H. Y., Hwang, K. H. and Chun, I. J. 2008. Herbicidal activity of essential oil from *Glechoma hederacea*. *Kor. J. Weed Sci.* **28**, 152-160.
- Lee, E. J., Seo, Y. M., Kim, Y. H., Chung, C., Sung, H. J., Sohn, H. Y., Park, J. Y. and Kim, J. S. 2019. Anti-inflammatory activities of ethanol extracts of dried Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Life Sci.* **29**, 325-331.
- Lee, G. W., Lee, J. Y. and Cho, Y. H. 2010. Whitening effect of the extracts from *Juglans mandshurica*. *KSBB J.* **25**, 18-24.
- Lee, H. J. 2004. Inhibitory effect of nitric oxide production of *Lysimachiae christinae*. Master's Thesis Dissertation, Wonkwang University, Jeonrabukdo, Korea.
- Lee, H. J. and Lim, M. H. 2020. Whitening activities of extracts of seomaeyakssuk (*Artemisia argyi* H.). *J. Kor. Appl. Sci. Technol.* **37**, 241-249.
- Lim, S. B., Park, K. T., Lee, E. H., Kim, B. O., Lee, S. H., Kang, I. K. and Cho, Y. J. 2017. Quality characteristics and biological activity of *Yanggaeng* with *Glechoma hederacea* var. *longituba* Nakai powder. *Kor. J. Food Preserv.* **24**, 206-214.
- Lee, S. H., Kim, S. Y., Kim, J. J., Jang, T. S. and Chung, S. R. 1999. The isolation of the inhibitory constituents on melanin polymer formation from the leaves of *Cercis chinensis*. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**, 397-403.
- Oh, H. K. 2020. Antioxidant and anti-inflammatory activities of different parts of *Ixeris dentata* according to extract methods. *J. Kor. Appl. Sci. Technol.* **37**, 1567-1574.
- Park, S. J., Kwon, S. P. and Rha, Y. A. 2017. Antioxidative activities and whitening effects of ethanol extract from *Crataegus pinnatifida* bunge fruit. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*

- 46, 1158-1163.
26. Park, Y. H., Lim, S. H., Kim, H. Y., Kim, K. H. and Kim, S. 2009. Comparison of compounds on the essential oil in *G. hederacea* var. *longituba* Nakai by fertilizer treatment. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **27**, 171.
27. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
28. Sim, J. H., Lee, K. M., Park, T., Kang, M. S., Hong, H. and Kim, S. Y. 2021. Biorenovation-assisted modification of *Ligustrum japonicum* extract for skin-whitening effect. *KSBB J.* **36**, 30-35.
29. Woo, H. S., Lee, S. M., Heo, J. D., Lee, M. S., Kim, Y. S. and Kim, D. W. 2018. Anti-inflammatory activity of extracts of *Hovenia dulcis* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Plant Res.* **31**, 466-477.
30. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by Aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.
31. You, S. H. 2017. Antioxidant activity and whitening activity of *Psidium guajava* leaf extract. *J. Oil Appl. Sci.* **34**, 296-304.
32. Yu, H. A. and Kim, C. D. 2017. Applicability of *Lindera obtusiloba* flower extracts as cosmetic ingredients. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **15**, 132-144.

초록 : 긴병꽃풀(*Glechoma hederacea* var. *longituba*) ethyl acetate 분획물의 항염증 활성 및 B16F10 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향

염현지¹ · 오민정¹ · 채정우² · 이진영^{1*}

(¹호서대학교 화장품생명공학부, ²경기도산림환경연구소)

본 연구는 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물의 미백 및 항염증 활성 검증을 통해 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 전자공여능과 ABTS⁺ radical 소거능 측정 결과 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 각각 89.6%, 88.7%의 활성을 확인할 수 있었다. Tyrosinase 저해활성 측정 결과 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 ethyl acetate 분획물은 22.3%의 억제활성을 나타내었다. 세포 생존율 측정 결과, 멜라노마 세포와 대식세포에 대해 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물을 처리한 모든 구간에서 80% 이상의 생존율을 보였다. 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물의 단백질 및 mRNA 발현량을 측정하기 위한 western blot과 RT-PCR의 농도구간은 25, 50, 100 µg/ml로 설정하였다. 그 결과 분획물의 농도가 증가함에 따라 발현량이 감소됨을 확인하였으며 미백관련 인자 MITF와 TRP-2의 단백질 발현 억제율이 대조군인 kojic acid에 비해 우수하였고, tyrosinase에 대해서는 100 µg/ml에서 29.1%의 가장 낮은 발현량을 보여 매우 뛰어난 mRNA 발현 억제를 확인할 수 있었다. Pro-inflammatory cytokine인 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 단백질 및 mRNA 발현량에 미치는 영향을 확인한 결과, IL-6와 TNF-α의 인자가 같은 농도의 대조군인 Vit. C에 비해 높은 단백질 및 mRNA 억제율을 나타내었다. 이러한 실험결과를 기반으로 긴병꽃풀 ethyl acetate 분획물이 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인함으로써 화장품에 천연 소재로서 응용할 수 있을 것이라 판단되었다.