

Bioactive Characteristics of Extracts of *Opuntia humifusa* Fruit as Functional Cosmetic Ingredients

Min-Jung Ha, Seon-Hee You*

Department of Biological Engineering, Konkuk University, Seoul, Korea

*Corresponding author: Seon-Hee You,
Department of Biological Engineering, Konkuk
University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu,
Seoul 05029, Korea
Tel.: +82 2 450 3523
Fax: +82 2 3436 5594
Email: yoush4843@naver.com

Received September 21, 2016

Revised November 24, 2016

Accepted December 2, 2016

Published December 30, 2016



Abstract

Purpose: This study aimed to analyze the applicability of extracts of *Opuntia humifusa* fruit (OHF) as functional cosmetic ingredients. **Methods:** Total polyphenol and flavonoid contents were measured, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical elimination, melanogenesis inhibition, microphthalmia-associated transcription factor (MITF), and tyrosinase expression were evaluated. Furthermore, inhibitory effects of matrix metalloproteinase 1 (MMP1), phosphorylated extracellular signal-related kinase (p-ERK), and phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) were evaluated. **Results:** DPPH radical elimination and high polyphenol content were confirmed in extracts of OHF. As a result of a cytotoxicity experiment with the extracts of OHF on B16F10 and human dermal fibroblast cells, no cytotoxicity effects was observed at any of concentrations tested in both cells. The effects of melanogenesis inhibition even at a low concentration was established. In addition, a slight inhibitory effects on tyrosinase and MITF expression, reduction in MMP1 expression, and inhibition of phosphorylation of JNK were also confirmed. **Conclusion:** The extracts of OHF have excellent anti-oxidant effects, thus the extracts are valuable as ingredients in various functional cosmetics with whitening and wrinkle-improving effects.

Keywords: *Opuntia humifusa*, Anti-oxidant effects, Polyphenol, Melanin, Anti-aging effects

Introduction

색소침착에 중요한 멜라닌 생성은 주로 생체 내 tyrosine의 산화적 반응에 의해서 일어나는데 ultraviolet B (UVB), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) 등에 의해 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)가 자극 되면 멜라닌 관련 효소인 tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP1), tyrosinase related protein 2 (TRP2)의 발현이 증가되어 멜라닌의 생성이 증가되는 것으로 알려져 있다(Lalli & Sassone-Corsi, 1994). 노화의 작용은 콜라겐 생성에 관여하는 transforming growth factor β (TGF β)와 matrix metalloproteinase 1 (MMP1)의 콜라겐 분해 작용, 그와 관련된 효소들이 관여하게 되는데, 콜라겐은 항노화 활성의 핵심 단백질로 자외선에 의해 MMP1의 발현과 활성이 증가하게 되면 콜라겐 분해를 촉진시켜 주름 생성과 탄력 감소가 일어나게 된다(Kang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011).

천년초(*Opuntia humifusa*)는 생물학적으로 선인장과 부채선인

장속으로 분류되어 있으며, 한국에서는 천년초와 백년초 두 종류의 부채선인장이 자생하고 있다. 천년초는 제주도에서 자라는 백년초와는 달리 내륙지방 영하 20℃ 추운 지역에서도 얼어 죽지 않는 강한 생명력을 지닌 다년생 식물로(Lee & Lee, 2010), 예로부터 소담제나 해열제로 쓰여왔다. 특히 열매는 항암과 노화 방지에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 변비, 이뇨효과, 장 운동의 활성화 및 식욕 증진 효능이 있고, 피부 질환, 류마티스 및 화상치료에도 사용되어 왔다(Kim, 1996).

현재까지 천년초의 생리활성 연구로는 천년초의 성분특성과 항산화 활성(Shin & Han, 2016), 항산화, 항균 효과 및 유효성분의 분리(Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), 항당뇨 및 항산화 활성 효과(Park *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014), 티로시나아제 활성 억제 효과(Lee *et al.*, 2000), 유방암 세포(MCF-7)에 대한 성장 억제 효과(Yoon *et al.*, 2012), 항산화 활성 및 염증매개 물질 조절 효과(Kim *et al.*, 2014), 천년초 선인장 추출물을 적용한 microneedle therapy system 관리가 여성 피부 개선에 미치는 영향(Min & Bae, 2013) 등

이 있다. 그러나 천연초 추출물의 항멜라닌, 항노화에 관한 생리활성 효능 연구에 대해서는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 천연초 열매 추출물(*Opuntia humifusa* fruit, OHF)을 천연초 줄기 추출물(*Opuntia humifusa* stem, OHS)과 비교하여 항산화 활성을 살펴보고, 천연초 열매 추출물의 B16F10 melanoma 세포에서의 세포 독성, 멜라닌 생성 억제 효과 및 MITF, tyrosinase 활성 억제와 human dermal fibroblast (HDF) 세포에서의 세포 독성, MMP1 발현 억제 효과 및 phosphorylated extracellular signal-related kinase (p-ERK), phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK)와 같은 인산화 효소 억제제를 통한 항노화 효과를 평가함으로써, 천연초 열매 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 생리활성 효능을 알아보고 기초 자료들을 제공하고자 하였다.

Methods

1. 실험 재료

1) 시료 준비

천년초 열매는 물로 4-5회 세척한 후 종자를 분리하고 실온에서 건조시킨 후 분쇄하여 50 g에 70% ethanol을 20배로 가한 후 37°C, 100 rpm 인큐베이터 안에서 72 h 동안 추출하였다. 추출 후 추출용매인 ethanol을 제거하기 위하여 감압 농축한 뒤 동결 건조하여 사용하였다. 천연초 줄기는 물로 4-5회 씻어 불순물과 가시를 제거하여 실온에서 건조시킨 후 분쇄하여 열매와 동일한 방법으로 추출하여 사용하였다.

2) 시약

실험에 사용된 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, caffeic acid, aluminum nitrate, potassium acetate, quercetin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid, neutral red (NR) solution, phosphate buffered saline (PBS), formaldehyde solution, NR desorb solution, α -MSH, anti-MMP1 mouse antibody, anti-mouse Ig G antibody, 4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (p-nitrophenyl phosphate), diethanolamine, magnesium chloride, nonyl phenoxy polyethoxy ethanol (NP-40), sodium deoxycholate, 2-mercaptoethanol, bromophenol blue, β -actin primary antibody, anti-MITF antibody produced in rabbit, anti-tyrosinase antibody produced in mouse는 Sigma-Aldrich (USA)로부터 구입하여 사용하였고, tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), sodium dodecyl sulfate (SDS), glycerol은 Biopure (Canada), sodium carbonate (Na_2CO_3), sodium chloride (NaCl)은 Samchun (Korea), ethyl alcohol은 Duksan (Korea), protease inhibitor cocktail은 Roche (Switzerland)에서, arbutin은 Alfa Aesar (USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

3) 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주인 B16F10 melanoma, HDF 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich)과 1% penicillin (100 IU/mL, GE Healthcare Life Sciences, USA), 1% streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, GE Healthcare Life Sciences)을 첨가하여 37°C, 5%의 CO_2 습윤 배양기에서 배양하였다.

2. 항산화 효과 측정

1) Total phenolic compounds 함량 측정

OHF 및 OHS의 총 폴리페놀 함량의 측정은 Association of Official Agricultural Chemists의 Folin & Denis (1912) 방법을 수정하여 Folin-Ciocalteu's phenol reagent가 시료의 페놀성 화합물에 의해 환원되면, 몰리브덴 청색으로 발색되는 원리를 이용하여 정량하였다(Gutfinger, 1981). 각 튜브에 시료의 최종농도가 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL이 되도록 증류수에 녹여 희석하였으며, 희석된 시료 400 μL 와 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 400 μL 를 혼합하여 3 min 반응시켰다. 그런 다음 10% Na_2CO_3 400 μL 를 혼합하여 암실에서 60 min 반응시킨 후 96 well plate에 상등액 200 μL 를 취하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 caffeic acid를 사용하였다.

2) Total flavonoid 함량 측정

OHF 및 OHS의 총 플라보노이드 함량은 Moreno *et al.* (2000) 방법을 이용하여 측정하였다. 최종농도가 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL이 되도록 증류수에 희석한 시료 100 μL 와 10% aluminum nitrate 20 μL , 1 M potassium acetate 20 μL , ethanol 860 μL 를 차례로 혼합하여 실온에서 40 min 방치 후 원심분리기로 부유물을 가라앉힌 다음 96 well plate에 200 μL 씩 분주하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 quercetin을 사용하였다.

3) DPPH radical 소거능 측정

OHF 및 OHS의 radical 소거활성은 Blois (1958) 방법을 이용하여 측정하였다. 시료를 최종농도가 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL이 되도록 증류수에 희석한 후 96 well plate에서 99% ethanol에 녹인 10 mM DPPH 용액 180 μL 와 시료액 20 μL 를 혼합하여 37°C에서 30 min 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{시료 첨가군의 O.D. at 517 nm}}{\text{시료 무첨가군의 O.D. at 517 nm}} \times 100 \right) \right]$$

3. Neutral red assay를 이용한 세포 독성 측정

Neutral red assay (NR assay)를 이용하여 OHF가 세포 독성에 미치는 영향을 측정하였다. B16F10 melanoma, HDF 세포를 96 well plate에 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24 h 동안 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 OHF를 3, 6, 12, 25, 50 µg/mL의 농도로 희석하여 각 well plate에 처리하고 48 h 동안 배양하였다. 세포 배양액을 NR solution 용액이 1% 포함된 무혈청 배지로 교환하여, 3 h 동안 배양한 다음 PBS에 희석한 10% formaldehyde 용액을 각 well에 100 µL씩 분주하여 20 min 동안 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 µL씩 분주하여 세포 내의 NR을 추출하고 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료 무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

4. 멜라닌 생성 억제능 측정

B16F10 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생성 억제능을 측정하였다(Lim *et al.*, 2003). B16F10 세포를 96 well plate에 2×10^3 cells/well의 농도로 분주하고 24 h 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포 부착 확인 후 melanin 생성을 촉진하기 위하여 5% FBS와 100 nM α-MSH가 포함된 배지로 갈아준 후, 시료를 3, 6, 12, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리하여 72 h 배양하였다. 분비된 멜라닌 양은 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 생성 억제량은 100 nM α-MSH로 처리한 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였으며, 양성 대조군으로는 100 µg/mL arbutin을 사용하였다.

$$\text{Melanin 생성 억제능(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 O.D. at 405 nm}}{\text{시료 무첨가군의 O.D. at 405 nm}} \times 100$$

5. MMP1 발현 억제능 측정

MMP1 발현 억제 활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 MMP1 함량을 측정하였다. HDF 세포를 96 well plate에 3×10^4 cells/well 농도로 분주하여 24 h 동안 배양한 후, well plate의 상층액을 제거 한 다음 시료를 3, 6, 12, 25, 50 µg/mL의 농도별로 처리하고 UVB를 100 mJ/cm²로 20 min 조사한 후 24 h 배양하였다. 배양 상층액을 새로운 96 well plate에 옮긴 후, primary antibody (anti-MMP1 mouse antibody), alkaline phosphatase가 접합된 secondary antibody (anti-mouse IgG antibody), 마지막으로 substrate인 p-nitrophenyl phosphate (in 9.7%

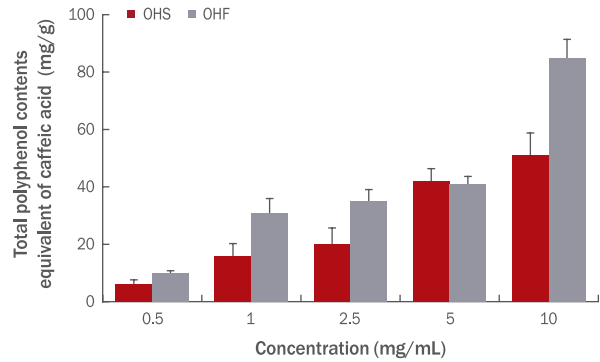


Figure 1. Total polyphenol contents of 70% ethanol extracts of *Opuntia humifusa* fruit and stem.

Total polyphenol contents in *Opuntia humifusa* fruit (OHF) extracts was measured. *Opuntia humifusa* stem (OHS) extracts were used as comparative material. And it was verified that OHF extracts were higher than OHS extracts in polyphenol contents. The results are presented as the mean±S.D. (standard deviation) of three independent experiments.

diethanolamine buffer, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8)으로 각각 처리한 후 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{MMP1 발현 억제능(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 O.D. at 405 nm}}{\text{시료 무첨가군의 O.D. at 405 nm}} \times 100$$

6. Western blotting

OHF에서 α-MSH로 유도된 B16F10 세포 내 MITF, tyrosinase의 활성 억제 변화와 UVB에 의해 발현된 HDF 세포 내 p-JNK, p-ERK의 인산화 정도를 확인하기 위해 western blotting을 수행하였다. B16F10 세포에 α-MSH를 처리한 후 OHF를 25, 50 µg/mL의 농도로 처리하였으며, HDF 세포에 OHF를 25, 50 µg/mL의 농도로 처리한 후 UVB 100 mJ/cm²를 조사한 다음 두 세포 모두 동일한 방법으로 24 h 배양한 세포를 수확하여 PBS로 세척 후 RIPA buffer [50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail]를 첨가하여 세포를 용해하고, 상등액을 회수한 다음 SDS sample buffer [14.4 mM 2-mercaptoethanol, 60 mM Tris (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue]를 첨가하고 단백질을 변성시킨 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 단백질을 분자량 별로 분리하였다. 분리된 단백질은 100 V의 조건에서 nitrocellulose membrane (Whatman, GE Healthcare Life Sciences)으로 이동시켰고, membrane에 옮겨진 단백질은 5% skim milk 용액에서 blocking 한 후 1×tris-buffered saline with tween 20 [TBST; 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (0.2% Tween 20, pH 7.5)]에 희

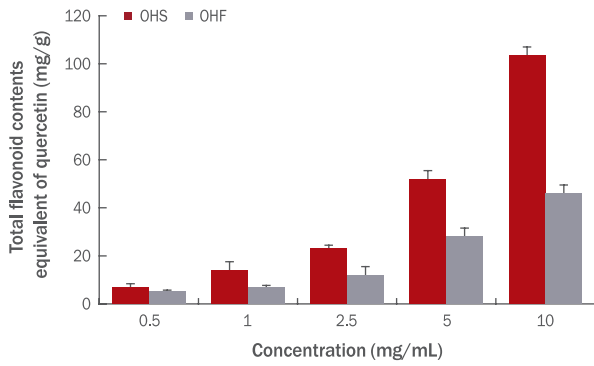


Figure 2. Total flavonoid contents of 70% ethanol extracts of *Opuntia humifusa* fruit and stem.

Total flavonoid contents in *Opuntia humifusa* fruit (OHF) extracts was measured. *Opuntia humifusa* stem (OHS) extracts were used as comparative material. It was verified that flavonoid content increased in a concentration-dependent manner. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments.

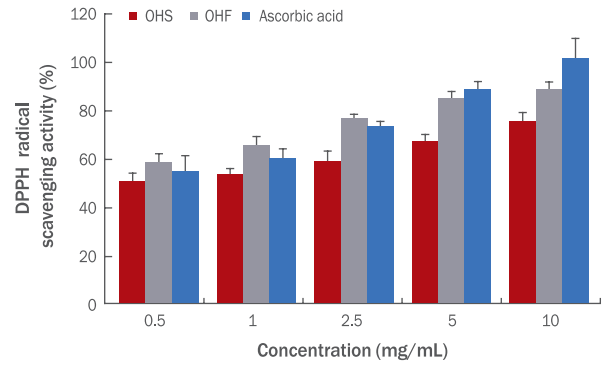


Figure 3. DPPH radical scavenging activity of 70% ethanol extracts of *Opuntia humifusa* fruit and stem.

Anti-oxidant effects was measured by DPPH radical scavenging activity. *Opuntia humifusa* stem (OHS) extracts were used as comparative material. Ascorbic acid was used as a positive control group. And it was verified that OHF extracts had a higher free radical scavenging activity than OHS extracts. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments.

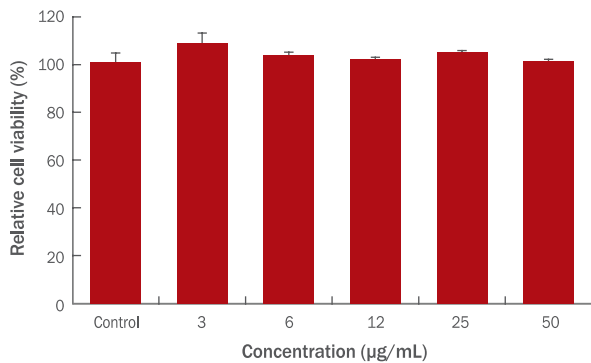


Figure 4. Cytotoxicity in B16F10 melanoma cells.

The cytotoxicity of *Opuntia humifusa* fruit extracts was measured in B16F10 melanoma cells. The cytotoxicity of *Opuntia humifusa* fruit extracts was not shown in all concentrations. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments.

석한 β-actin primary antibody (1:10,000), anti-MITF antibody produced in rabbit (1:3,000), anti-tyrosinase antibody produced in mouse (1:3,000)를 처리하고 24 h 동안 교반하였다. Secondary antibody는 anti-mouse IgG antibody, anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 사용하여 30 min 교반하였으며, 교반이 완료된 membrane은 TBST로 세척하였다. 세척이 완료된 후 실험용 필름(Konica, Japan)에서 Super Signal West Pico solution (Pierce, USA)을 처리하여 필름에 감광을 유도한 다음 암실에서 자동현상기(QX-130II; Konica, Japan)를 이용하여 현상하였다. 현상된 필름상의 단백질량은 Image J (National Institute of Mental Health, USA)를 이용하여 band 농도차이를 비교하였다.

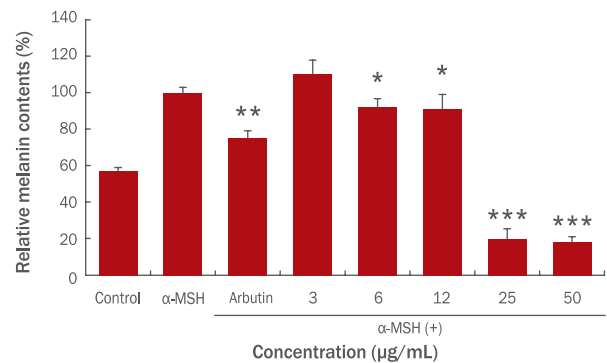


Figure 5. Inhibitory effects of *Opuntia humifusa* fruit extracts on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells.

B16F10 melanoma cells were treated with α-MSH. And inhibitory effects of *Opuntia humifusa* fruit extracts on melanin synthesis were measured. Arbutin (100 µg/mL) was used as a positive control group. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments. And statistical significance was shown (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$).

7. 통계 처리

본 연구의 모든 실험은 동일한 조건하에 독립적으로 3회 이상 실시하여 실험 결과를 얻었으며, 모든 실험 결과는 평균±표준편차(mean ± standard deviation)로 표기하였다. 통계 처리는 SPSS Window Version 17.0 (IBM, USA)을 이용하여 분석하였으며, 유의성 검증은 Student's t-test를 실시하였고, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

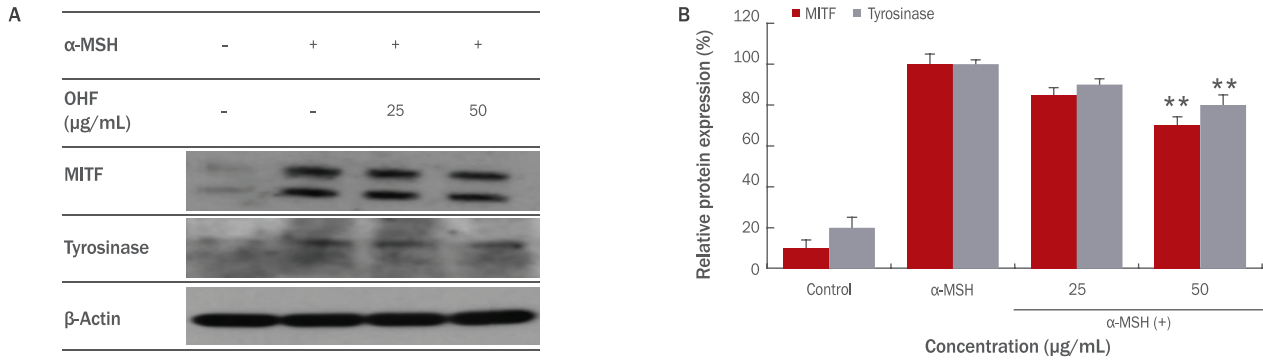


Figure 6. Inhibitory effects of *Opuntia humifusa* fruit extracts on MITF and tyrosinase activation in B16F10 melanoma cells. In order to check the whitening effects of *Opuntia humifusa* fruit extracts, B16F10 melanoma cells were treated with α-MSH. Inhibitory effects on MITF, tyrosinase activity was measured by western blotting (A). Its relative protein expression was expressed with the bar graph (B). The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments. And statistical significance was shown (***p*<.01).

Results and Discussion

1. 항산화 효과 측정 결과

1) 총 폴리페놀 함량 변화

폴리페놀은 노화를 방지하는 물질로 함량이 높을수록 항산화 효과가 높은 것으로 알려져 있다. OHF와 OHS를 70% ethanol로 추출하여 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도로 총 폴리페놀 함량을 측정 한 결과, OHF와 OHS 모두 농도가 높아짐에 따라 총 폴리페놀 함량이 증가하였다. 특히 농도가 10 mg/mL일 때 OHF는 85 mg/g, OHS는 51 mg/g의 폴리페놀 함량을 나타냈으며, 대체적으로 OHF가 OHS보다 높은 폴리페놀 함량을 나타내어 항산화 효과가 우수함을 알 수 있었다(Figure 1). Cha *et al.* (2013)의 연구에서는 천년초 80% ethanol 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정 한 결과 열매 74.89 µg/mg, 줄기 60.72 µg/mg으로 열매의 함량이 줄기 대비 높게 나타났다고 보고하였는데, 이것은 본 실험의 결과와 유사하며 총 폴리페놀 함량을 비교해 볼 때 다소 차이를 보이는 것은 추출 용매의 농도의 영향인 것으로 사료된다.

2) 총 플라보노이드 함량 변화

플라보노이드는 C₆-C₃-C₆를 기본골격으로 하는 폴리페놀의 일종으로, 노란색 또는 담황색을 나타내는 페놀계 화합물을 총칭하며(Hertog *et al.*, 1993), 함량이 높을수록 항산화 효과가 높은 것으로 알려져 있다. OHF와 OHS의 총 플라보노이드 함량을 확인한 결과, OHF와 OHS 모두 농도가 높아짐에 따라 총 플라보노이드 함량이 증가하였으나, 전반적인 플라보노이드 함량은 OHF보다 OHS가 더 높게 나타났다. 특히 10 mg/mL의 농도에서 OHF는 46 mg/g, OHS는 103.5 mg/g의 플라보노이드 함량을 나타냈다(Figure 2). 이와 같은 결과는 Cha *et al.* (2013)가 80% ethanol에서 총 플라보노이드 함량이 OHF 33.7 µg/mg, OHS 29.2 µg/mg로 나타나 줄기와

열매가 큰 차이가 없음을 보고한 것과 차이가 있으나, 이는 추출 용매의 종류와 농도에 따른 차이로 인하여 발생한 것으로 사료된다.

3) DPPH radical 소거능

Free radical은 대표적인 노화 원인물질로, free radical의 소거능이 높을수록 항산화 효과가 높은 것으로 알려져 있다. OHF와 OHS의 DPPH radical 소거능을 측정 한 결과, OHF와 OHS 모두 농도가 높아짐에 따라 DPPH radical 소거능이 증가하여 뛰어난 항산화 효과를 나타내었다. 특히 실험 농도가 10 mg/mL일 때 OHF는 85.7%, OHS는 72.8%의 소거능을 나타내어 OHF가 OHS보다 항산화 효과가 우수하다는 것을 알 수 있었으며, 양성 대조군인 ascorbic acid와 비슷한 DPPH radical 소거능을 확인하였다(Figure 3). 선행 연구에서는 천년초 추출물이 DPPH에 대해 상업적으로 사용되는 항산화제인 butylated hydroxyanisole 및 α-tocopherol과 비슷한 항산화 활성이 나타났으며(Lee *et al.*, 2014), 80% ethanol에서 천년초 열매가 천년초 줄기보다 DPPH radical 소거능이 우수하다고 보고되었는데(Cha *et al.*, 2013), 이와 같은 결과는 본 연구와 유사한 결과를 나타내고 있다.

천년초 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해 본 연구진들은 식물의 부위에 따라 OHF와 OHS로 나누어서 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량, DPPH radical 소거능 확인 실험을 진행하였다. 총 플라보노이드 함량을 제외한 나머지 실험에서는 OHF가 OHS보다 높은 항산화 효과를 나타내어 향후 실험에서는 OHF으로 실험을 진행하였다.

2. 항멜라닌 효과 측정 결과

1) B16F10 melanoma 세포에 대한 세포 독성 측정

OHF가 B16F10 melanoma 세포에 대한 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 B16F10 세포에 OHF를 3, 6, 12, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리한 후 NR assay를 실시하였다(Figure 4). 실험

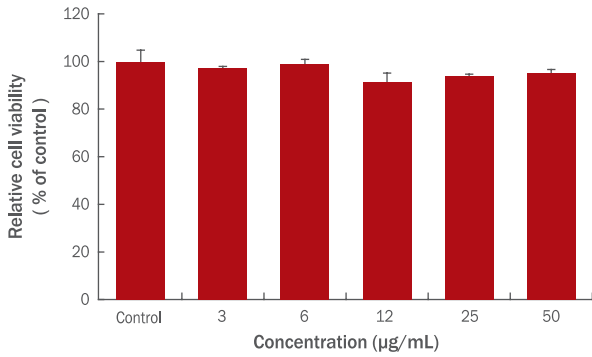


Figure 7. Cytotoxicity in HDF cells.

The cytotoxicity of *Opuntia humifusa* fruit extracts was measured in HDF cells. And the cytotoxicity was not shown in all concentrations. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments.

결과, 실험에 사용된 모든 농도에서 OHF의 B16F10 melanoma 세포에 대한 세포 독성이 나타나지 않아, 추후 실험에서는 50 µg/mL 내에서 실험을 진행하였다.

2) 멜라닌 생성 억제능

멜라닌이 과잉 생성시 색소 침착이 촉진되므로 α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생성량이 감소할수록 미백 효과가 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 B16F10 세포에서 OHF를 3, 6, 12, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리하여 OHF의 멜라닌 생성 억제능을 확인하였다 (Figure 5). 그 결과, OHF의 농도가 높아짐에 따라 멜라닌 생성이 감소하였으며, 특히 양성 대조군으로 사용한 arbutin (100 µg/mL)의 멜라닌 생성 억제능이 33.9%인 것에 비해 OHF (25 µg/mL)는 79.7%의 감소율을 나타내 arbutin 보다 높은 멜라닌 생성 억제능을 확인하였다. 이 수치는 50 µg/mL 농도일 때 나타난 81.4%의 멜라닌 생성 억제능과 대등한 결과로 25 µg/mL의 적은 농도에서도 멜라닌 생성 억제 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

3) MITF, tyrosinase 발현량 변화

B16F10세포에서 α-MSH를 처리하여 발현을 활성화시키고, OHF를 25, 50 µg/mL 농도로 처리한 후 western blotting을 이용하여 MITF, tyrosinase 활성 억제 효과를 확인하였다(Figure 6). 그 결과, 농도가 높아짐에 따라 MITF 및 tyrosinase 활성 억제 효과의 경향성은 확인할 수 있었으나, MITF 및 tyrosinase 활성 억제에 대한 미백 효과는 다소 약한 것으로 확인되었다.

3. 항노화 효과 측정 결과

1) HDF 세포에 대한 세포 생존율 측정

OHF가 HDF 세포에 대한 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하

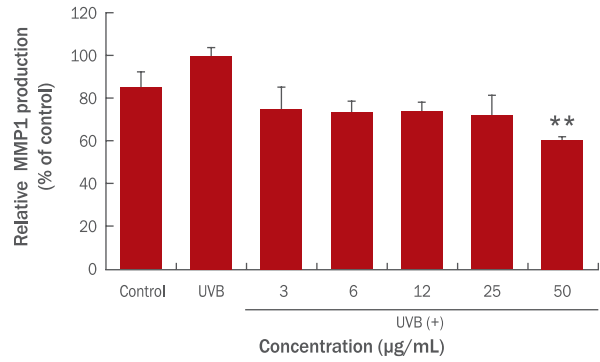


Figure 8. Inhibitory effects of *Opuntia humifusa* fruit extracts on MMP1 expression by UVB in HDF cells.

Inhibitory effects of *Opuntia humifusa* fruit extracts on MMP1 expression was confirmed in all concentrations. The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments. And statistical significance was shown (** $p<.01$).

기 위하여 HDF 세포에 OHF를 3, 6, 12, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리한 후 NR assay를 실시하였다(Figure 7). 실험 결과, 실험에 사용된 모든 농도에서 OHF의 HDF 세포에 대한 세포 독성이 나타나지 않아, 추후 실험에서는 50 µg/mL 내에서 실험을 진행하였다.

2) MMP1 발현 억제능

자외선 UVB가 조사된 HDF 세포에 대한 OHF의 MMP1 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, UVB에 의해 과발현된 MMP1을 3 µg/mL OHF가 24.8% 억제하였다(Figure 8). 이 결과는 농도가 6-25 µg/mL일 때 나타난 MMP1의 발현 억제능과 대등한 결과로서 적은 농도에서도 MMP1 발현 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 현재까지 OHF의 MMP1 단백질 분비억제에 대해서는 아직까지 보고된 바 없으며, 본 연구를 통해 OHF가 MMP1 활성을 효과적으로 저해함으로써 주름 생성을 지연할 수 있을 것으로 보여지고 있다.

3) p-ERK와 p-JNK 발현량 변화

MMP1 유전자 발현에 관련 있다고 알려진 p-ERK와 p-JNK의 인산화 정도를 확인하기 위해 OHF를 25, 50 µg/mL 농도로 각각 처리한 후 자외선 UVB를 조사하였다(Figure 9). UVB 조사 후 p-ERK와 p-JNK의 인산화가 증가된 것을 확인할 수 있었고, p-ERK의 발현 억제는 큰 변화가 없었으나 p-JNK의 경우 50 µg/mL의 농도에서 인산화가 현저히 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 OHF가 HDF 세포에서 자외선 UVB에 의해 유도된 p-JNK의 인산화를 억제함으로써 MMP1 유전자의 발현을 감소시키고, 이는 주름 개선에 도움이 될 것으로 사료된다.

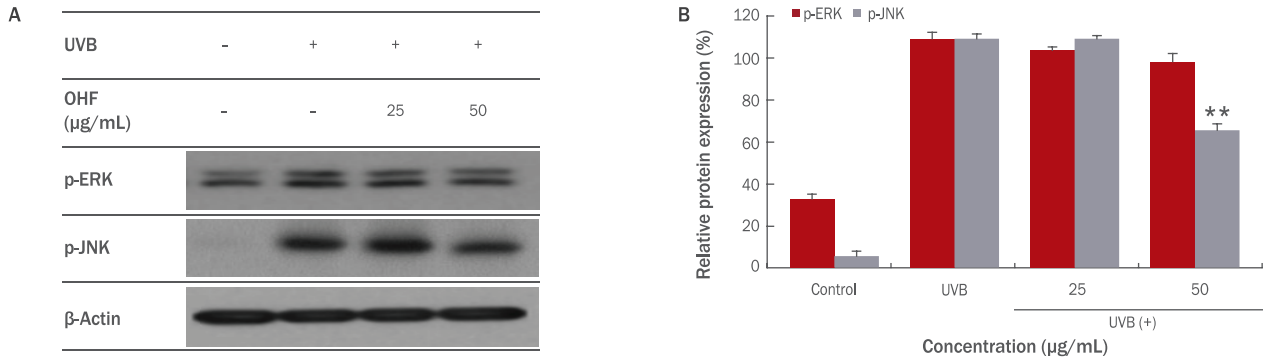


Figure 9. Inhibitory effects of *Opuntia humifusa* fruit extracts on the phosphorylation of ERK and JNK by UVB in HDF cells.

In order to check the anti-aging effects of *Opuntia humifusa* fruit extracts, HDF cells were treated with UVB, and inhibitory effects on p-ERK and p-JNK activity was measured by western blotting (A). In the case of p-ERK expression, there were no changes in all concentrations. However, 50 µg/mL of *Opuntia humifusa* fruit extracts suppressed the p-JNK expression markedly. Its relative protein expression was expressed with the bar graph (B). The results are presented as the mean±S.D. of three independent experiments. And statistical significance was shown (***p*<.01).

Conclusion

본 연구에서는 다양한 기능성 화장품 소재로서 천년초 열매 추출물의 생리활성 효과를 알아보려고 하였다. 항산화 활성 효과를 측정하기 위하여 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 DPPH radical 소거능을 천년초의 부위에 따라 OHF와 OHS로 나누어 확인하였다. 총 폴리페놀 함량은 OHF와 OHS 모두 농도가 높아짐에 따라 증가하였으며, 특히 10 mg/mL의 농도에서 OHF 85 mg/g, OHS 51 mg/g으로 OHF가 OHS보다 높은 폴리페놀 함량을 나타내었다. 총 플라보노이드 함량에서는 10 mg/mL 농도에서 OHF 46 mg/g, OHS 103.5 mg/g을 나타내었으며, DPPH radical 소거능을 확인한 결과, 10 mg/mL 농도에서 OHF가 85.7%로 OHS의 72.8%보다 높은 소거능을 나타내었다.

뛰어난 항산화 효과가 확인된 OHF에 대하여 기능성 화장품 소재로서의 생리활성 효능을 확인하고자 측정한 결과, OHF는 B16F10 melanoma 세포와 HDF 세포에 대한 세포 독성을 나타내지 않았으며, 멜라닌 생성 억제능을 측정한 결과, OHF 25 µg/mL에서 79.7%의 멜라닌 생성 저해 효과가 관찰되었으나, tyrosinase와 MITF 발현량에서는 다소 약한 억제효과가 나타났다. HDF 세포에 자외선 UVB에 의해 과발현을 유도한 MMP1의 양을 측정한 결과, OHF 3 µg/mL 농도에서 24.8%의 발현 억제 효과가 있으며 또한 MMP1 유전자 발현에 관련 있다고 알려진 p-ERK와 p-JNK의 인산화 정도를 측정한 결과, p-JNK에서 인산화가 억제되는 것을 확인하였다.

최근 웰니스 개념이 보편화되면서 화장품 소재로서 친환경적이고 저자극적인 천연성분에 대한 연구의 필요성이 강조되고 있으며, 항멜라닌과 항노화에 효과적인 천연소재의 생리 활성 연구는 피부 미용 분야에서 핵심적으로 다뤄져야 할 부분으로 생각되고 있다. 본 연구 결과를 통해 천년초 열매 추출물의 우수한 항산화 효과를

확인하였으며, 멜라닌 생성 억제와 MMP1 발현 억제 효과를 확인함으로써 미백 개선 및 주름 개선 효과를 가진 다양한 기능성 화장품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

This work is part of the Min-Jung Ha's Ph.D. thesis at the Konkuk University, Seoul, Korea.

References

- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200, 1958.
- Cha MN, Jun HI, Lee WJ, Kim MJ, Kim MK, Kim YS. Chemical composition and antioxidant activity of Korean cactus (*Opuntia humifusa*) fruit. *Food Science and Biotechnology*, 22: 523-529, 2013.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, 12: 239-243, 1912.
- Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58: 966-968, 1981.
- Hertog MG, Hollman PC, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1242-1246, 1993.
- Kang S, Chung JH, Lee JH, Fisher GJ, Wan YS, Duell EA, Voorhees JJ. Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads

- to photoaging in human skin *in vivo*. *Journal of Investigative Dermatology*, 120: 835-841, 2003.
- Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, Kim HK, Char K, Jang YP, Kim JW. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 427-433, 2011.
- Kim TJ. Korean resources plants. Seoul National University Press, Seoul, pp140-141, 1996.
- Kim YJ, Park CI, Kim SJ, Ahn EM. Antioxidant and inflammatory mediators regulation effects of the roots of *Opuntia humifusa*. *Applied Biological Chemistry*, 57: 1-5, 2014.
- Lalli E, Sassone-Corsi P. Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 17359-17362, 1994.
- Lee JN, Kim HE, Kim YS. Anti-diabetic and anti-oxidative effects of *Opuntia humifusa* cladodes. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 43: 661-667, 2014.
- Lee KS, Kim MG, Lee KY. Antimicrobial effect of the extracts of cactus Chounnyuncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 33: 1268-1272, 2004.
- Lee KS, Lee KY. Biological activity of phenol compound from a cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) in Korea. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39: 1132-1136, 2010.
- Lee KS, Oh CS, Lee KY. Antioxidative effect of the fractions extracted from a cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). *Korean Journal of Food Science and Technology*, 37: 474-478, 2005.
- Lee NH, Yoon JS, Lee BH, Choi BW, Park KH. Screening of the radical scavenging effects, tyrosinase inhibition and anti-allergic activities using *Opuntia ficus-indica*. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 31: 412-415, 2000.
- Lim HW, Cho NY, Yoon MY, Cha SB, Kim KW, Park YM, Lee JY, Lee JH, Kim CJ, Sim SS. Effects of citrus essential oils on melanin production in B16 melanoma cells. *Yakhak Hoeji*, 47: 25-30, 2003.
- Min JA, Bae HS. The effect of *Opuntia humifusa* and microneedle therapy system on the women's facial skin. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 11: 149-157, 2013.
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71: 109-114, 2000.
- Park CM, Kwak BH, Sharma BR, Rhyu DY. Anti-diabetic effect of *Opuntia humifusa* stem extract. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 43: 308-315, 2012.
- Shin DS, Han GJ. Chemical compositions and antioxidant activities of Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*) stems and fruit. *Korean Journal of Food Preservation*, 23: 89-96, 2016.
- Yoon MS, Yoo JS, Lee KK, Kim MK. A study on biological activities of *Opuntia humifusa* cladode extracts. *Applied Biological Chemistry*, 55: 117-121, 2012.

국문초록

천년초 열매 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 생리활성 특성

하민정, 유선희*

건국대학교 생물공학과, 서울, 한국

목적: 천년초 열매 추출물(*Opuntia humifusa* fruit extract)의 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. **방법:** 천년초 열매 추출물의 항노화 및 미백 효능을 확인하기 위하여 천년초 열매 추출물의 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능, 멜라닌 생성 억제능, microphthalmia-associated transcription factor (MITF)와 tyrosinase 발현량, matrix metalloproteinase 1 (MMP1), phosphorylated extracellular signal-related kinase (p-ERK)와 phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) 발현량 억제 효과를 측정하였다. **결과:** 천년초 열매 추출물에서 천년초 줄기 추출물 대비 높은 폴리페놀 함량과 우수한 DPPH radical 소거능을 확인하였으며, B16F10, human dermal fibroblast 세포에서 천년초 열매 추출물에 대한 세포 독성 실험을 진행한 결과 모든 처리 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다. 저농도에서도 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였으며, tyrosinase와 MITF 발현량의 미약한 억제 효과를 확인하였다. 또한 MMP1 발현 감소와 JNK의 인산화가 억제되는 것을 확인하였다. **결론:** 천년초 열매 추출물은 항산화 효과가 우수하고, 미백 개선 및 주름 개선 효과를 가지는 다양한 기능성 화장품 소재로서의 가치가 있는 것으로 사료된다.

핵심어: 천년초, 항산화, 폴리페놀, 멜라닌, 항노화

참고문헌

- 김태정. 한국의 자원식물. 서울대학교 출판부, 서울, pp140-141, 1996.
- 민정아, 배현숙. 천년초 손바닥 선인장 추출물을 적용한 MTS관리가 여성피부 개선에 미치는 영향. *아시아뷰티화장품학술지*, 11: 149-157, 2013.
- 박철민, 광병희, 서르마 베스라즈, 류동영. 손바닥선인장(*Opuntia humifusa*) 줄기 추출물의 항당뇨 효과. *생약학회지*, 43: 308-315, 2012.
- 신동선, 한귀정. 천년초의 성분특성과 항산화 활성. *한국식품저장유통학회지*, 23: 89-96, 2016.
- 이경석, 김민규, 이기영. 병원성 식중독 미생물에 대한 천년초 선인장 추출물의 항균 활성. *한국식품영양과학회지*, 33: 1268-1272, 2004.
- 이경석, 오창석, 이기영. 천년초 선인장 추출물의 항산화 효과. *한국식품과학회지*, 37: 474-478, 2005.
- 이경석, 이기영. 천년초선인장으로부터 분리한 페놀성 화합물의 생리활성 효과. *한국식품영양과학회지*, 39: 1132-1136, 2010.
- 이남호, 윤진석, 이봉호, 최병욱, 박관하. 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica*)의 라디칼 소거 활성, Tyrosinase 억제 활성, 항알레르기 활성 검색. *생약학회지*, 31: 412-415, 2000.
- 이지나, 김형은, 김용석. 천년초 선인장 줄기의 항당뇨 및 항산화 효과. *한국식품영양과학회지*, 43: 661-667, 2014.
- 임혜원, 조남영, 윤미연, 차상복, 김경원, 박영미, 이지윤, 이진희, 김창중, 심상수. B16 Melanoma 세포에서 Citrus Essential Oil이 Melanin 생성에 미치는 영향. *약학회지*, 47: 25-30, 2003.

中文摘要

千年草果子提取物作为功效性化妆品原料的生理活性研究

河旻政, 柳宣熙*

建国大学校 生物工学科, 首尔, 韩国

目的: 探索千年草果子提取物作为功效性化妆品原料的活用可行性。方法: 确认千年草果子提取物的抗老化以及美白功效, 测定提取物的总多酚含量和类黄酮的含量, 并对1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)自由基消除能力, 抑制黑色素生成, microphthalmia-associated transcription factor (MITF)及酪氨酸酶的表达, matrix metalloproteinase 1 (MMP1)、phosphorylated extracellular signal-related kinase (p-ERK)、phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK)蛋白表达的抑制效果进行了评价。**结果:** 千年草果子的提取物比茎提取物DPPH自由基消除能力优秀, 总多酚含量也高。在 B16F10, human dermal fibroblast 细胞中对千年草果子提取物进行细胞毒性试验, 结果显示, 在提取物所有处理浓度范围内, 无明显细胞毒性。即使在低浓度也能抑制黑色素的形成, 对酪氨酸酶和MITF的表达也具有微小的抑制作用。此外, 也确认了MMP1的表达明显减少以及抑制JNK的磷酸化。**结论:** 千年草果子提取物具有优秀的抗氧化作用, 因此作为美白及改善皱纹的功效性化妆品原料充分具有价值。

关键词: 千年草, 抗氧化, 多酚, 黑色素, 抗氧化