

니겔라 사티바 오일의 미백 효능에 관한 연구

이수연·이새미·허우범·김진국·김영희[†]

(주)바이올랜드 생명공학연구소

(2011년 9월 15일 접수, 2011년 9월 19일 수정, 2011년 9월 22일 채택)

Effect of *Nigella sativa* Oil on Melanogenesis

Su Yeon Lee, Sae Mi Lee, Woo Beom Heo, Jin Guk Kim, and Young Heui Kim[†]

R&D Center, Bioland, Byongchon, Chonan, Chungnam 330-860, Republic of Korea

(Received September 15, 2011; Revised September 19, 2011; Accepted September 22, 2011)

요약: 니겔라 사티바(*Nigella sativa* Linn.) 오일의 미백 효능을 확인하기 위하여 니겔라 사티바 오일 및 오일에서 분리된 유효성분들을 버섯 타이로시네이즈 효소, B16 멜라노마 세포를 이용하여 멜라닌 생성에 관련된 다양한 실험을 실시하였다. B16-F10 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 저해 활성시험 결과에서 니겔라 사티바 오일은 10 mg/mL의 농도에서 약 86 %의 멜라닌 생성을 억제하였으며, RT-PCR과 Western blot을 통한 멜라닌 생성 기작에 대한 영향을 조사한 결과, 멜라닌 합성의 주요 단백질인 타이로시네이즈 발현 저해효과가 우수하게 나타났다. 또한, tyrosinase related protein-1 (TRP-1) 및 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 따라서, 니겔라 사티바 오일은 멜라닌 생합성 저해 효과뿐만 아니라, 멜라닌 합성에 필수적인 효소(타이로시네이즈, TRP-1, TRP-2)의 발현 저해를 통해 미백 효과를 나타내는 것으로 확인되었으며, 이에 따라 니겔라 사티바 오일은 멜라닌 생합성을 저해하는 미백 소재로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: In order to investigate the potential of *Nigella sativa* (*N. sativa*) oil as an active ingredient for whitening cosmetics, we prepared *N. sativa* oil. We measured its inhibitory effects on mushroom tyrosinase activity, cellular tyrosinase activity, and melanin synthesis inhibitory activity in B16 melanoma cells. *N. sativa* oil and its components showed inhibitory activity against mushroom tyrosinase and melanin synthesis. In a melanin synthesis inhibition assay using mouse B16-F10 melanoma cell, it reduced melanin production up to 86 % at a concentration of 10 mg/mL without cytotoxicity. In the study on the melanogenic protein expressions by using RT-PCR and Western blot, *N. sativa* oil and its components inhibited expression of tyrosinase protein, which is a well-known key protein on melanogenesis, and tyrosinase expression was gradually decreased in a dose-dependent manner. Therefore, this result suggests that *N. sativa* oil could be used as an active ingredient for whitening cosmetics.

Keywords: skin-whitening, *Nigella sativa*, thymoquinone, thymohydroquinone, B16 melanoma

1. 서 론

피부, 머리카락, 눈동자의 색은 멜라닌 함량에 의해 결정되며, 이와 같은 멜라닌은 피부의 가장 아래층에 위치한 멜라노사이트에서 생성된다[1]. 이러한 멜라닌은 태양광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하기 위해 합성

되는데, 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부에 침착되면 기미나 주근깨 등과 같은 다양한 색소침착을 유발한다[2,3].

멜라노솜 내의 멜라닌 생성과정은 멜라닌 생성의 주요 단백질인 타이로시네이즈에 의해 티로신이 도파, 도파퀴논으로 산화됨으로써 시작되고, 이들은 타이로시네이즈 관련 효소(tyrosinase related protein-1, TRP-1; tyrosinase related protein-2, TRP-2)와 도파크롬 토모머

[†] 주 저자 (e-mail: yhkim1st@biolandkorea.com)

라제(DOPAchrome tautomerase, DCT)의 효소작용 및 자동 산화 반응에 의해 도파크롬(DOPAchrome), 인돌 카르복실산(indole carboxylic acid), 인돌퀴논(indole quinone) 등으로 대사되어 멜라닌이 합성된다[4]. 멜라닌은 흑갈색의 유멜라닌(eumelanin)과 적노랑색의 페오멜라닌(pheomelanin)이 있는데, 타이로시네이즈는 위의 두 가지 멜라닌을 합성하는데 필요하고 TRP-1과 TRP-2는 유멜라닌 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 미백 물질의 탐색 방법으로 기존의 타이로시네이즈 활성을 억제하는 물질 연구뿐만 아니라 멜라닌 생성 이전에 관련된 단백질 발현을 조절하는 물질, 멜라노솜 이동을 억제하는 물질, α -melanocyte 자극 호르몬(α -melanocyte stimulation hormone, α -MSH) 길항제, N-glycosylation 억제와 같이 멜라닌 생합성 기전을 방해하여 미백 효과를 나타내는 물질 연구도 많이 진행이 되고 있다[5-8].

니겔라 사티바(*N. sativa* Linn.)는 영어이름으로 "black cummin" 또는 "fennel flower"로 불리는 미나리아재비과(*Ranunculaceae*)의 다년생 식물로써, 주요 서식지는 중동, 서유럽, 동아프리카와 서남 아시아지역에 분포한다. 고대 이집트에서는 죽음을 제외한 모든 질병을 치료할 수 있는 만병통치약으로 믿어져왔고, 과거 중동과 극동 지역에서는 민간치료약으로서 천식, 기관지염, 아토피 등과 같은 질병치료에 사용되어왔다. 최근에는 진통, 항염, 항알러지, 항산화, 항암효과에 관한 연구논문들이 발표되어 있다[9,10].

니겔라 사티바 오일에는 thymoquinone (2-isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone)과 monoterpene이 주로 들어있고, 소량의 thymohydroquinone과 dithymoquinone을 함유하고 있다고 알려져 있다[11].

본 연구는 천연물로부터 미백활성을 가진 물질을 스크리닝하는 과정에서, 니겔라 사티바 오일의 화장품 원료로써의 가능성을 알아보기 위하여 니겔라 사티바 오일 및 thymoquinone, thymohydroquinone을 *in vitro* 타이로시네이즈 효소 실험 및 세포수준에서 멜라닌 생성과 관련된 실험을 실시하였으며, 이들이 멜라닌생합성 기전과 관련하여 미백관련 효소(타이로시네이즈, TRP-1 or -2)의 발현 억제효과에 의해 미백 효과가 있음을 확인하고 그 결과를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 실험

2.1. 실험 재료 및 기기

본 실험에 사용한 니겔라 사티바(*N. sativa*) 종자는 중국에서 구매하여 사용하였고, thymoquinone (TCI, Japan)은 시판 중인 시약을 구입하여 사용하였고, thymohydroquinone은 기 보고된 Asakawa 등의 방법에 따라 합성하여 사용하였다[12]. 표준성분 분석에 사용한 HPLC column은 ACE 5 C₁₈, 5 μ m (250 × 4.6 mm) (ACE, UK)를 사용하였고, 기기는 LC-20AD (SHIMADZU, Japan)를 사용하였다. 버섯 타이로시네이즈는 T-3824 (SIGMA-ALDRICH, USA)를 구입하였고 마우스 B16-F10 멜라노마는 CRL-6475 (America Type Culture Collect (ATCC), USA)를 구입하였으며, 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Invitrogen (USA), Sigma (USA), Nunc (USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 흡광도 측정은 Infinity M200 microplate reader (Tecan, Austria)를 사용하여 측정하였다. Western blot을 위해 western blot kit 및 semi-dry transfer system (Bio-rad, USA)을 사용하였고 image analysis system (Bio-rad, USA)으로 결과를 확인하였다. 항체는 Santa Cruz Biotech (USA)에서 구입하였다.

2.2. 추출

니겔라 사티바 종자 2 kg에 헥산 4 kg 가하고 실온에서 24 h 추출하였다. 추출액을 여과하여 니겔라 사티바 종자를 제거하고 얻은 헥산층을 60 °C에서 감압농축하여 408 g의 오일(수율: 24.5 %)을 얻었다.

2.3. 타이로시네이즈의 저해효과

타이로시네이즈의 저해활성은 일반적으로 분광학적인 방법으로 측정되어지며 본 실험에서는 Vanni 등의 방법에 따라 측정되어졌다[13]. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 0.1 mL, 0.3 mg/mL 농도의 L-tyrosine 수용액 0.1 mL, 1250 unit/mL의 버섯 타이로시네이즈 0.1 mL를 혼합한 후 여기에 시료용액을 농도에 따라 각각 0.1 mL를 첨가하여 37 °C에서 20 min 간 효소반응을 진행 시켰다. 반응용액의 흡광도를 475 nm에서 측정하여 시료의 효소 저해활성을 다음 식에 따라 구하고 효소 활성의 50 %를 저해하는 값을 IC₅₀으로 나타내었다. 대조군으로 알부틴(Bioland, Korea)를 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition rate (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 475 nm에서 흡광도

B : 시료를 첨가한 반응용액의 475 nm에서 흡광도

2.4. B16 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과 측정

B16 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생합성 저해 효과는 Maeda와 Fukuda[14]의 방법을 변형하여 측정하였다. 멜라닌 생성량과 세포수를 동시에 측정하기 위하여 두 set를 준비하였으며 모든 농도에 따른 well 수는 trip-let으로 준비하였다. B16 멜라노마 세포(ATCC CRL6323)를 10 % 소혈청과 1 %의 항생제를 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)에 1×10^5 세포의 밀도로 접종하고 1 day 동안 5 % CO₂, 37 °C 에서 배양시켰다. 그 후 α -MSH (0.34 μ g/mL, Sigma)가 처리된 DMEM 10 % 배지로 갈아준 후 니켈라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone을 농도별로 well에 처리하여 3 day 배양하였고, 3 day 후 멜라닌 양을 측정할 set는 15 mL 플라스크 튜브에 배지를 수거하고 세포들은 트립신을 처리하여 떼어낸 후 배지를 수거한 튜브로 옮겼다. 니켈라 사티바 오일의 경우 물과의 혼화를 용이하게 하기 위하여 계면활성제로서 Amisoft (AJINO-MOTO, Japan)를 1 % 수용액을 배지부피의 1/1,000의 양을 투입하였다. 3,000 rpm에서 30 min 동안 원심 분리하여 상층액을 버리고 1 N NaOH 250 μ L를 처리하여 끓는 물에서 10 min 처리 후 가법계 원심 분리하였다. 다시 10 min 초음파하여 완전히 멜라닌을 용해하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 수 측정용 set는 배지를 제거하고 0.33 mg/mL의 MTT (Sigma M5655)를 1 mL 처리하여 37 °C에서 4 h 반응시키고, 그 후 MTT를 제거한 후 DMSO를 1 mL 첨가하여 발색정도를 575 nm에서 흡광도로 측정하였다.

2.5. 미백 관련 유전자 조사

B16 멜라노마 세포를 10 % 소혈청과 1 %의 항생제를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO, USA)에 1×10^6 세포의 밀도로 100 mm 디쉬에 접종하고 1 day 동안 5 % CO₂, 37 °C에서 배양시켰다. 그 후 새 DMEM 10 % 배지로 갈아준 후 니켈라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone을 농도별로 배양판에 처리하여 3 day 동안 배양하였고, 계면활성제로 Amisoft를 1 % 수용액을 배지부피의 1/1,000의 양을 투입하였다. 3 day 후 미백관련 유전자의 mRNA 발현량

을 조사하기 위해 세포에 Trizol (Invitrogen, USA) 1 mL을 첨가하여 Invitrogen 사의 RNA 분리법에 따라 RNA를 분리하였다. 자외선 검출기를 이용하여 260 nm에서 RNA 양을 정량한 후, Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 실시하였다. RT-PCR은 All-in-one RT-PCR kit (Super bio, Korea)를 사용하였고, 프라이머와 반응 조건은 아래와 같고, All-in-one RT-PCR kit의 메뉴얼에 따라 실험을 진행하였다. Actin의 서열은 sense : 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3'; anti-sense : 5'-GGC CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3'이고, 50 °C에서 30 min간 역전사 후 96 °C에서 3 min 동안 역전사 효소를 불활성화하였으며 94 °C에서 30 s, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min 동안 25 cycle로 PCR 반응하였다. 타이로시네이즈의 서열은 sense : 5'-GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT-3'; anti-sense : 5'-TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC-3'이고, 90 °C에서 30 s 동안 denaturation하였으며 60 °C에서 30 min 동안 역전사 후 94 °C에서 1 min 동안 역전사 효소를 불활성화하였다. 그 후, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min 동안 30 cycle로 PCR 반응하였다. TRP-1의 서열은 sense : 5'-GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC-3'; anti-sense : 5'-AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT-3'이고, 90 °C에서 30 s 동안 denaturation하였으며 60 °C에서 30 min 동안 역전사 후 94 °C에서 1 min 동안 역전사 효소를 불활성화하였다. 그 후 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min 동안 30 cycle로 PCR 반응하였다. TRP-2의 서열은 sense : 5'-TGA CCG TGA GCA ATG GCC-3'; anti-sense : 5'-CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC-3'이고, 50 °C에서 30 min 동안 역전사 후 96 °C에서 3 min 동안 역전사 효소를 불활성화 후 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min 동안 25 cycle로 PCR 반응하였다.

2.6. 미백관련 단백질 발현 조사

마우스 B16-F10 멜라노마를 10 % FBS와 1 % 항생제를 첨가한 DMEM에 5×10^5 세포 밀도로 100 mm 디쉬에 접종하고 5 % CO₂, 37 °C에서 1 day 배양하였다. 그 후 새로운 배지로 교환하고 니켈라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone을 농도별로 처리하여 3 day 배양하였다. 계면활성제로 Amisoft를 1 % 수용액을 배지부피의 1/1000의 양을 투입하였다. 배양한 세포를 PBS로 세척하여 1.5 mL microtube로 옮기고 세포 파쇄 버퍼(40 mM Tris-Cl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 120

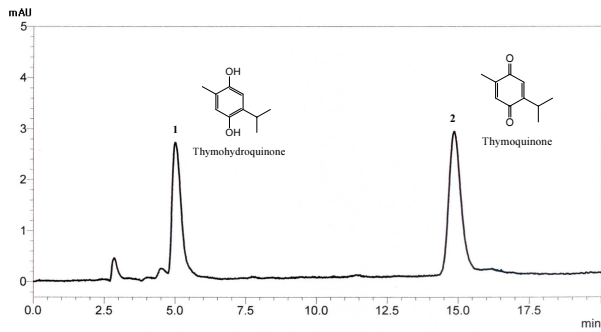


Figure 1. HPLC chromatography of *N. sativa* oil (column: ACE 5 C₁₈, 5 μ m (250 \times 4.6 mm), eluent: acetonitrile : D.I. water = 60 : 40, λ = 270 nm, flow rate : 1 mL/min, oven temp. : 35 $^{\circ}$ C).

mM NaCl, 0.1 % NP-40, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail)를 첨가하여 세포를 파괴한 후 4 $^{\circ}$ C에서 15,000 rpm으로 10 min 원심 분리하고 상층액을 회수하여 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질은 시그마사의 BCA 방법에 따라 정량한 후 SDS-PAGE를 진행하였다. SDS-PAGE 젤을 PVDF 막으로 옮긴 후 일차 항체와 퍼옥시다제가 결합된 2차 항체를 이용하여 단백질을 표지하고 western blot detection kit (Intron, Korea)를 사용하여 X-ray 필름에 감광한 후 단백질 발현 정도를 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 니겔라 사티바 오일의 HPLC 분석

니겔라 사티바 오일의 성분을 분석하기 위하여 thymoquinone과 thymohydroquinone을 메탄올에 녹여 표준

액으로 하였다. 니겔라 사티바 오일은 약 100 mg을 취하여 50 mL의 메탄올에 용해하여 검액으로 하였다. 이동상은 아세토나이트릴 : 증류수 = 40 : 60 (v/v)을 이용하였고, UV detector의 파장은 270 nm, 유속은 1 mL/min으로 하였다. 그 결과, thymohydroquinone (peak 1)의 함량은 0.098 %이고, thymoquinone (peak 2)의 함량은 0.206 %로 나타났다(Figure 1).

3.2. 타이로시네이즈의 저해효과

니겔라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone의 미백활성을 확인하기 위하여 *in vitro* 버섯 타이로시네이즈 실험법에 따라 타이로시네이즈 활성 저해 능력을 평가하였다(Table 1). Thymoquinone은 매우 미약한 타이로시네이즈 활성 저해 효과를 나타내었고, thymohydroquinone은 농도 의존적으로 타이로시네이즈 활성을 저해하며(IC₅₀ : 85 μ g/mL), 미백고시원료인 알부틴(IC₅₀ : 60 μ g/mL)보다 약간 낮은 값을 보여주었다. 니겔라 사티바 오일의 버섯 타이로시네이즈 활성저해능은 실험 조건하에서 오일상과 수상의 혼화성이 매우 낮아서 정확한 실험결과를 얻지 못하였다.

3.3. B16 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과 측정

세포수준에서의 미백효과를 확인하기 위하여 니겔라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone의 세포독성을 우선 평가하였다(Figure 2). 니겔라 사티바 오일은 mg 단위의 고농도에서도 세포독성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 또한 thymoquinone과 thymohydroquinone 모두 2.0 μ g/mL까지는 세포 독성을 나타내지 않았으므로, 세포독성을 나타내지 않는 2.0 μ g/mL

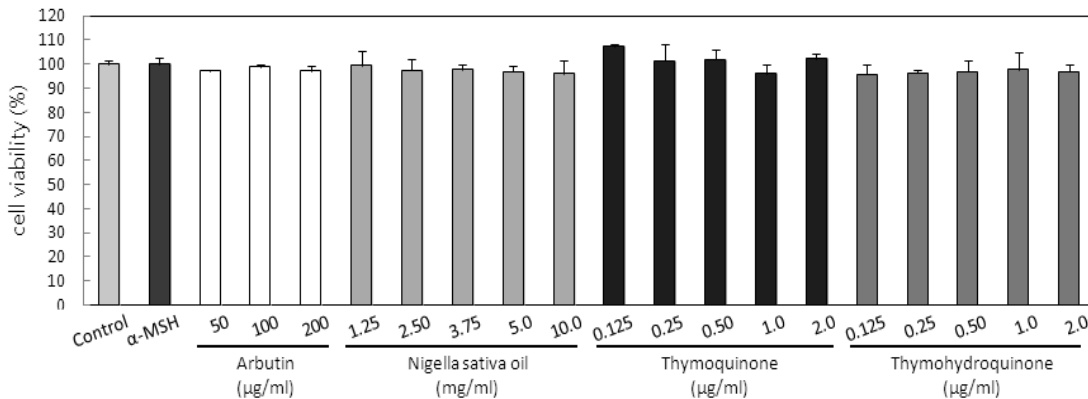


Figure 2. Cytotoxicity of *N. sativa* oil, thymoquinone and thymohydroquinone in B16-F10 melanoma cell.

Table 1. The Mushroom Tyrosinase Inhibition of Thymoquinone and Thymohydroquinone

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Tyrosinase activity inhibition (%)	IC ₅₀
Thymoquinone	33.33	7.58 \pm 1.42	-
	166.67	8.24 \pm 2.01	
Thymohydroquinone	60	38.82 \pm 1.80	85 $\mu\text{g/mL}$
	120	68.82 \pm 3.52	
	200	83.20 \pm 2.93	
Arbutin	40	41.96 \pm 2.58	60 $\mu\text{g/mL}$
	100	68.40 \pm 3.15	
	160	81.70 \pm 1.74	

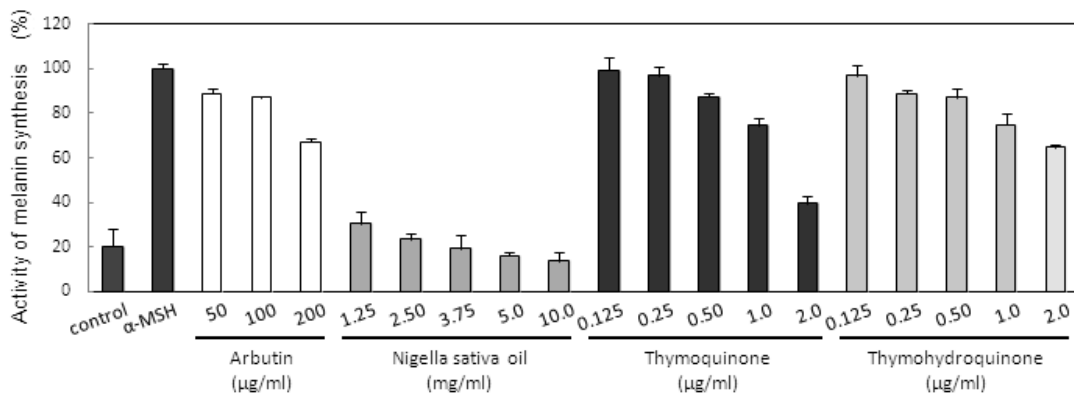


Figure 3. Inhibitory effect of *N. sativa* oil, thymoquinone, thymohydroquinone on melanin synthesis in B16-F10 melanoma cell.

농도범위에서 세포실험을 실시하였다.

니겔라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone의 마우스 B16-F10 멜라노마 세포 내 멜라닌 생성 저해 효과를 확인하였다. 니겔라 사티바 오일은 농도가 증가함에 따라 70 ~ 85 %의 높은 멜라닌 생성 억제효과를 나타내었으며, 특히 10 mg/mL의 농도에서는 멜라닌 생성을 약 86 % 억제하는 매우 우수한 효과를 보였다. 또한 thymoquinone은 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 60 % 이상의 멜라닌생성을 억제하는 우수한 효과를 보여주었고, thymohydroquinone도 농도 증가에 따라 5 ~ 35 %의 멜라닌 생성을 감소시켰다(Figure 3).

3.4. 미백관련 유전자 조사

니겔라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone이 멜라닌 생합성 경로에서 어느 유전자의 발현에 영향을 주어 멜라닌 생합성을 억제하는지 알아보기 위하여 RT-PCR법에 따라 실험을 수행하였으며, 그 결과는 Figure 4에 나타내었다. 음성 대조군으로 α -MSH

를 사용하였으며, 니겔라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone은 타이로시네이즈와 TRP-2의 발현 저해 효능은 나타났으나, TRP-1의 발현 저해 효과는 니겔라 사티바 오일만 약간 보여주었다. 특히, 니겔라 사티바 오일은 타이로시네이즈의 발현을 50 % 이상 저해시켰으며 thymohydroquinone은 20 ~ 30 %의 타이로시네이즈 발현 저해 효능을 보였다. TRP-2 유전자의 경우, 니겔라 사티바 오일은 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약 30 % 발현을 감소시켰으며 thymoquinone은 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약 60 %의 발현 저해효능을 보였다. thymohydroquinone의 경우 농도가 증가함에 따라 TRP-2 발현 저해효능이 감소하는 것으로 나타났으나 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 약 48 %, 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 약 23 %의 발현 저해효능이 있음은 확인하였다. 이 실험결과로부터 니겔라 사티바 오일의 멜라닌생성 억제 효능은 타이로시네이즈와 TRP-2의 발현 억제가 관여되는 것으로 사료되며, thymoquinone은 TRP-2를 강하게 억제함으로써 멜라닌 생성 억제에 관여하는 것으로 사료된다.

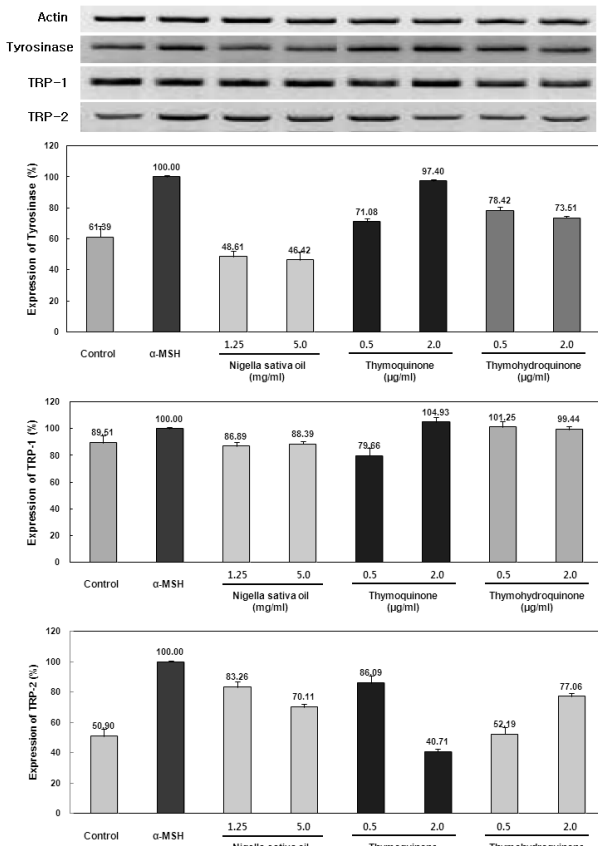


Figure 4. Effects of *N. sativa* oil, thymoquinone and thymohydroquinone on the expression of melanogenesis-related genes.

3.5. 미백관련 단백질 발현 조사

니겔라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone이 멜라닌 생합성 과정에 관여하는 단백질 발현에 미치는 영향을 western blot법을 사용하여 확인하였으며, 그 결과는 Figure 5에 나타내었다. 니겔라 사티바 오일, thymoquinone 및 thymohydroquinone을 음성 대조군인 α -MSH 처리군과 비교하였을 때 저해효과가 있는 것을 확인할 수 있었고, 타이로시네아제는 니겔라 사티바 오일이 가장 저해효과가 높았으며 그 저해정도는 5 μ g/mL 처리 시 약 63 %였다. TRP-1의 경우, thymoquinone의 저해효과가 가장 높았고 2 μ g/mL 처리 시 약 49 %의 효과를 보였다. TRP-2의 경우, thymohydroquinone이 가장 저해효과가 높았으며 그 효과정도는 각각 2 μ g/mL 처리하였을 때 약 84 %였다.

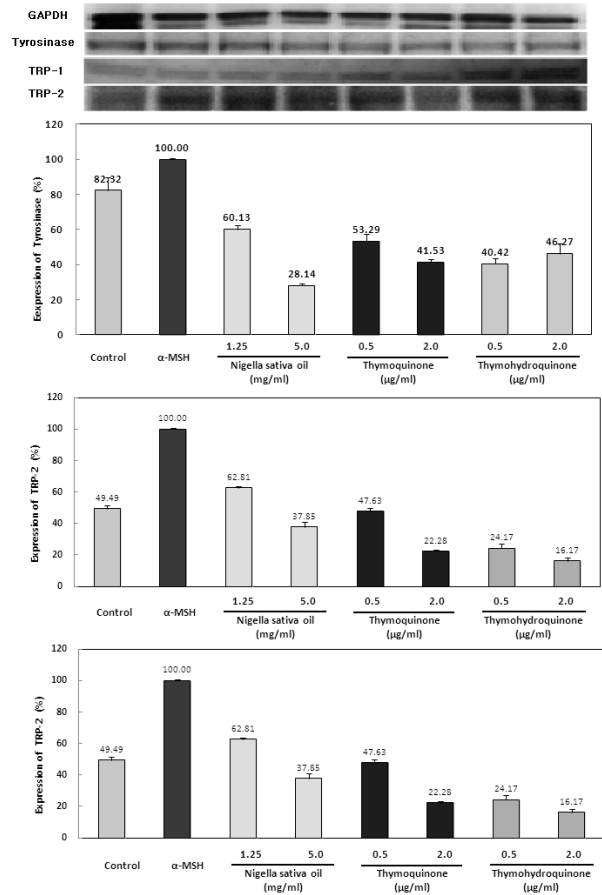


Figure 5. Effects of *N. sativa* oil, thymoquinone and thymohydroquinone on the expression of melanogenic protein.

4. 결 론

본 연구는 니겔라 사티바 오일이 미백원료로써의 활성과 효능을 갖는지 알아보기 위하여 버섯 타이로시네아제 활성 저해 효과, B16 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과 측정과 멜라닌 생합성에 관여하는 효소 (tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2)의 발현 억제 정도를 확인하기 위하여 RT-PCR법과 western blot법을 수행하였다. 더불어, 니겔라 사티바 오일에서 분리한 thymoquinone과 thymohydroquinone의 미백활성 효능평가도 동시에 진행하였다.

Thymoquinone의 타이로시네아제 저해 효능은 167 μ g/mL 농도에서 8.2 %로 아주 적었으나, thymohydroquinone (IC₅₀ : 85 μ g/mL)은 미백 고시 원료인 알부틴 (IC₅₀ : 60 μ g/mL)보다는 약간 떨어지지만 우수한 저해 효능을 보여주었다. 따라서 멜라닌 생성의 초기 단계

인 타이로시네이즈의 활성이 저해되어 그에 따른 산물인 Dopaquinone의 생성에 억제되어 멜라닌 생성이 억제된다는 것을 확인하였다. B16 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과 측정실험에서는 thymoquinone은 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 60 %, thymohydroquinone은 동일농도에서 32 %의 억제효과를 나타내었다. 특히, 니켈라 사티바 오일은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 처리하였을 때 멜라닌 생성을 약 86 % 억제하는 매우 뛰어난 효과를 보였고, RT-PCR 및 western blot 실험에서 타이로시네이즈 및 TRP-1, TRP-2의 발현을 RNA 수준과 단백질 수준에서 우수하게 억제하는 것으로 나타났다. RT-PCR의 결과로 보아, thymoquinone과 thymohydroquinone에 의한 TRP-1의 RNA 발현 억제 효능은 미비한 것으로 사료되나, tyrosinase의 발현 억제율은 20 ~ 50 %, TRP-2의 발현 억제율은 30 ~ 60 %로 나타났다. 그리고 western blot의 결과에서 타이로시네이즈의 발현 억제효능은 40 ~ 70 %로 나타났고, TRP-1은 40 ~ 50 %, TRP-2는 50 ~ 80 %로 나타났다.

따라서, 니켈라 사티바 오일 및 thymoquinone, thymohydroquinone은 멜라닌 생성 효소인, 타이로시네이즈 및 TRP-1, TRP-2의 생성을 유전자 단계 및 단백질 단계에서 억제하여 멜라닌 생합성을 억제하는 것으로 사료된다. 특히, western blot 실험의 결과에서 보듯, 니켈라 사티바 오일 및 thymoquinone, thymohydroquinone이 멜라닌 생성과 관련된 효소의 발현을 단백질 수준에서 우수하게 억제하는 것으로 사료된다.

앞의 실험 결과 중에서 멜라닌 생성 억제 실험의 결과를 살펴보면 니켈라 사티바 오일은 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약 70 %의 멜라닌 생성을 억제하였고, thymoquinone은 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약 60 %의 멜라닌 생성 억제를 나타내었다. 니켈라 사티바 오일 중의 thymoquinone의 함량이 0.206 %인 것을 고려할 때, 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 니켈라 사티바 오일에는 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도의 thymoquinone를 함유하고 있음을 알 수 있다. 이것으로 보아, thymoquinone의 양이 증가함에 따라서 멜라닌 생성 억제 효과도 증가함을 보였고, 따라서 니켈라 사티바 오일의 미백능력은 thymoquinone에서부터 기인하는 것으로 사료되어진다. 또한 thymohydroquinone도 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 멜라닌 생성을 약 35 % 억제시켰기에 위와 같은 추론으로 볼 때 thymohydroquinone 또한 니켈라 사티바 오일의 미백 능력에 크게 기여하는 것으로 사료된다.

우리는 본 연구에서 니켈라 사티바 오일과 오일에 함

유되어 있는 thymoquinone 및 thymohydroquinone의 미백 효과를 확인하였다. 따라서 미백기능성 화장품 소재로써 thymoquinone 또는 thymohydroquinone을 함유하는 니켈라 사티바 오일의 사용이 기대되어진다.

참 고 문 헌

1. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, and J. J. Voorhees, Molecular mechanism of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid, Blackwell Publishing Ltd., (1999).
2. H. Z. hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin : a two edged sword, *Pigment Cell Res.*, **10**, 158 (1997).
3. B. W. Choi, B. H. Lee, K. J. Kang, E. S. Lee, and N. H. Lee, Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants, *Kor. J. pharmacogn.*, **29**(3), 237 (1998).
4. V. J. Hearing and M. Jimenez, Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigment., *Int. J. Biochem.*, **19**, 1141 (1987).
5. H. M. Aoki, Identifiacation of a new microphthalmia(Mi)-interacting protein, rKr2, involved in the regulation of melanogenesis, IFSCC (1998).
6. M. Seibers, C. Paine, E. Sharlow, P. Andrade Gordon, M. costanzo, M. Eisinger, and S. S. Shapiro, The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interaction, *Experimental Cell Res.*, **254**, 25 (2000).
7. T. Motogawa, Inhibition of α -MSH induced melanogenesis by Sophorae radix extracts, *Frangrance J.*, **9**, 38 (2000).
8. G. Negroiu, N. Branza-Nichita, A. J. Petrescu, R. A. Dwek, and S. M. Petrescu, Protein specific N-glycosylation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 in B16 mouse melanoma cells, *Biochem. J.*, **344**, 659 (1999).
9. D. R. Worthen, O. A. Ghosheh, and P. A. Crooks, The *in vitro* anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *L. Anticancer Res.*, **18**(3A), 1527 (1998).
10. B. H. Alil and G. Blunden, Pharmacological and

- toxicological properties of *Nigella sativa*, *Phytotherapy Res.*, **17**(4), 299 (2003).
11. T. M. El-Hadiyah, M. Raza, O. Y. Mohammed, and A. A. Abdallah, Evaluation of *Nigella sativa* seed constituents for their *in vivo* toxicity in mice., *Natural Products Sci.*, **9**(1), 22 (2003).
12. Y. Asakawa, R. Matsuda, M. Tori, and M. Sono, Efficient preparation of some biologically active substances from natural and nonnatural aromatic compounds by m-chloroperbenzoic acid oxidation, *J. Org., Chem.*, **53**(23), 5453 (1988).