

Down-regulation of Tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 Expressions by *Juniperus rigida* Sieb. in Murine B16F10 Melanoma

Soo-Yeon Lee¹, Hye-Ji Jun¹, In-Chul Lee² and Jin-Young Lee^{1*}

¹Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Asan, Chungnam, 336-795, Korea

²Department of Cosmetic Science & Technology, Seowon University, Cheongju, Chungbuk, 361-742, Korea

Received October 23, 2013 / Revised November 14, 2013 / Accepted November 14, 2013

Human skin is constantly exposed to ultraviolet (UV) radiation, polluted air, and chemical products. UV rays, in particular, will affect the skin in a variety of ways, including causing wrinkles, fine lines, rough skin, and xeroderma, thereby resulting in skin aging. This study aimed to investigate the whitening effects of *Juniperus rigida* Sieb., which is a cedar tree that is found throughout the world. The whitening efficacy that was measured by tyrosinase inhibition revealed 49.4% efficacy in water extract and 80.0% efficacy in ethanol extract. Among the B16F10 black cells, the effect of the ethanol extract was higher than the effect of the water extract in the restrain creation of melanin pigment, tyrosinase, microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), and tyrosinase related protein-2 (TRP-2). Thus, the results of these studies demonstrated that the ethanol extract had greater efficacy than the water extract and *Juniperus rigida* Sieb. Ethanol extracts could be utilized as materials for functional cosmetics, such as whitening products.

Key words : *Juniperus rigida* Sieb., microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)

서 론

자외선을 받으면 피부에서 색소침착이 증가되는데, 색소침착이 증가하는 것은 자외선 흡수에 의한 피부 세포의 손상을 억제할 목적으로 melanin 생성이 증가된 결과이다. Melanin은 피부와 머리카락의 색상을 결정하는 주요한 인자이며 자외선으로부터 피부세포를 보호하기 위한 역할을 가지고 있지만, 과도한 멜라닌의 축적은 주근깨, 기미와 같은 과색소 현상을 유발하고 피부노화를 촉진시킨다[9]. Melanin 합성은 아미노산의 하나인 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 공중합체인 멜라닌을 생성하게 된다[21]. 또한 melanin 형성의 조절인자로 잘 알려진 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 tyrosinase 및 TRPs의 M-box sequences에 결합하여 멜라닌 형성에 관여하는 효소들의 발현을 조절하는 것으로 잘 알려져

있다[3]. 따라서 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 활성 억제 실험은 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다[8]. 현재 arbutin 및 ascorbic acid와 이들 유도체가 의약품외품과 기능성 화장품의 미백 원료로 사용되고 있으나[25], 현재 의학계나 화장품업계에서는 피부 안전성, 제형 안정성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있어[7], 경제적이고 효율적인 약용식물 등 천연 미백제에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.

전 세계적으로 향나무과의 일종인 다년생 수목인 노간주나무속은 노가지나무, needle juniper로도 불리며, 측백나무과에 속하는 늘푸른키나무로 한국, 중국, 시베리아 전역에 분포되어 있다. 노간주나무(*Juniperus rigida* Sieb.)는 한국에서 석회암 지대에서 자라며, 원대가 옆으로 뻗으며 그 중간에서 뿌리가 나오는 갯노간주(*J. conferta*), 높이 15 m의 소교목이지만 대개 줄기가 여러 갈래로 나오는 높이 3-5 m의 관목상으로 자라며 수피는 회갈색인 두송(*J. communis*), 기본종에 비해 잎의 길이가 4-8 mm로 짧고 열매가 6-7 mm로 잎보다 긴 곱향나무(*J. communis* var. *montana*) 그리고 바닷가에서 자라는 해변노간주(*Juniperus rigida* Sieb. et Zucc var. *koreana* (Nakai) T. Lee) 등이 있다[13]. 노간주나무는 껍질이 붉은 갈색이고 4월에 꽃이 피며 열매는 흑갈색의 공 모양으로 맛은 좀 달며, 건조한 곳에서 잘 자랄 수 있을 뿐만 아니라 종자가 새들에 의하여 잘 전파될 수 있는 특성이 있으며, 어릴 때에는 맹아력이 강하고 또 잎이 뾰족하여 동물의 침해가 어려워 능히 살아남을 수 있다고 한다[14]. 이러한 노간주나무의 종자에서 채취한 기름은 이노제 등의 약리적 효과가 있다고 알려져 있어 부종,

*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.

통풍, 요로 생식기 질환에 사용하며, insect repellent로 이용하기도 하며, 서양에서는 노간주나무의 열매인 두송실(juniper berry)을 열매량의 3-4배가 되게 독한 술을 넣고 밀봉하여 6개월 정도 보관 후 건더기는 건져 버리고 술만 따로 보관해서 마시거나 향으로 이용하였다. 중국 본초도감에 따르면 과실에는 α -pinene, mycene, limonene 등이 들어있으며 거풍, 제습, 이뇨에 효능이 있고, 수종, 통풍, 요로질환 등을 치유시킨다고 하였다[12].

본 연구에서는 미백활성이 있으며, 피부에 안전한 소재인 천연물에 대한 연구가 활발하게 진행됨에 따라 한국 전역에 자생하고 있는 노간주나무 추출물을 이용하여 화장품약리활성 및 피부메커니즘을 검증한 후, 새로운 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 탐색하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용된 노간주나무(*Juniperus rigida* Sieb.)는 충북 괴산에서 2012년 봄에 생산된 견채를 구입하여 추출시료로 사용하였다. 시료의 에탄올 추출물은 70% 에탄올 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였고, 열수 추출물은 증류수 10배의 양을 가하여 80°C에서 3시간 가량 환류냉각 추출해 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 완전히 제거한 후 동결 건조하여 -20°C에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였으며, 효소 실험 후 활성이 우수한 에탄올 추출물을 이용하여 세포실험을 실시하였다.

시약 및 기기

미백효과 측정에 사용된 시약인 tyrosinase mushroom, dimethyl sulfoxide (DMSO), L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였으며, MMP-1, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, GAPDH, primary antibody와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibody는 Santacruz (CA, USA)에서 구입하였으며, MITF는 Abcam (USA)에서 구입하였다. Real-time PCR에 사용된 HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix (2X)는 USB Products Affymetrix (Inc, Cleveland, Ohio USA)에서 구입하였다.

실험에 사용된 기기는 ELISA Reader (Tecan, Austria), PCR (C-100, Bio-Rad, USA), Real-time PCR (StepOnePlus, Applied Biosystems, Germany), Multilabel plate Reader (VICTOR X5, PerkinElmer, USA), Multi Shaker (FINEPCR, Korea),

ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), Semi-Dry Transfer unit (TE77XP, Hoefer, USA)을 사용하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[24]에 따라 측정하였다. 반응구는 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 μ l에 10 mM L-DOPA (sigma, USA)를 녹인 기질액 40 μ l 및 시료용액 40 μ l의 혼합액에 mushroom tyrosinase (200 U/ml) (sigma, USA) 40 μ l을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

세포 배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에 적응시켜 계대 배양하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[4]에 따라 측정하였다. 멜라노마세포(B16F10)를 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(\frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

멜라닌 생성에 관여하는 유전자 중 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2, GAPDH의 활성을 확인하기 위하여 cell line B16F10을 100 mm tissue culture dish에 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24~48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척해주었다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에

complete mini 1 tab를 가한 100 μ l로 용해해서 4 $^{\circ}$ C 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 μ l의 단백질을 10% SDS-PAGE사에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell 기기(Hofer, USA)를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 Tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 washing하고 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 3회 washing한 후 LAS 4,000 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 cell seeding한 뒤 24시간 동안 배양한 후 sample을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각 well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 μ l를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 μ l이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거 한 후 75% EtOH-diethylpyrocyanate water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC를 50 μ l씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 μ l와 멸균수 195 μ l를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 μ g/ml) 1 μ l, 추출한 RNA (2 μ g)와 nuclease free water로 10 μ l를 맞추고 75 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 5분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

Tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5 \times green GoTaq flexi buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix (10 mM), primer, GoTaq DNA polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. Tyrosinase는 94 $^{\circ}$ C 3분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 5분(40 cycles)를 하였으며, TRP-1, TRP-2, MITF은 94 $^{\circ}$ C 3분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 58 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 5분(40 cycles)를 하였으며, GAPDH는 94 $^{\circ}$ C 3분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 5분(35 cycles)를 하였다. PCR로 합성 시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

Real-time RT-PCR

멜라노마 세포로부터 추출 되어진 RNA를 260 nm, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 μ g/ml) 1 μ g, 추출한 RNA (2 μ g)와 nuclease free water로 10 μ l를 맞추고 75 $^{\circ}$ C에서 5분, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 5 \times reaction buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix, recombinant rnasin ribonuclease inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여(총 20 μ l) 25 $^{\circ}$ C 5분, 42 $^{\circ}$ C 60분, 70 $^{\circ}$ C 15분, 4 $^{\circ}$ C 유지로 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 그 후 cDNA와 2 \times SYBR green mix, primer, ROX를 각각 넣어 ABI step one plus (Applied biosystem, USA) 기기를 이용하여 95 $^{\circ}$ C 10분, 95 $^{\circ}$ C 3초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 95 $^{\circ}$ C 15초(45 cycles)로 실시간 정량 분석을 한 뒤 analysis program을 이용하여 결과를 분석하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해활성 측정 결과

피부에서는 세포 내의 티로시나아제라는 효소의 생합성 과

Table 1. Sequence of the primers used for PCR

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC AGA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC
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
GAPDH	Forward	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTC GC
	Reverse	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC

정에서 만들어지는데 melanosome 내에 티로신을 산화시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 만드는 tyrosine hydroxylase로 DOPA를 산화시켜 dopachrome을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 최종적으로 melanin polymer를 합성하므로, 이 반응을 억제하게 되면 멜라닌 생합성을 억제 할 수 있어, 기미, 주근깨, 반점과 같은 과잉색소증 치료 등 광범위하게 이용 될 수 있다. 그러므로 tyrosinase 저해는 화장품 산업에 있어서 매우 중요한 부분이다[10, 19, 20].

본 연구에서 노간주 나무 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같이 나타내었다. 노간주나무 열수 추출물의 경우 1,000 µg/ml에서 49.4%, 노간주나무 에탄올 추출물의 경우 1,000 µg/ml에서 80.0%로 노간주나무 에탄올 추출물의 저해효과가 더 높다는 것을 확인하였다. 이는 An 등[1]의 진달래꽃 추출물의 1,000 µg/ml에서 열수 추출물과 에탄올 추출물이 각각 24%, 48%의 효과가 나타났으며, Jeon 등[11]의 비자 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 1,000 µg/ml의 농도에서 21.32%(물 추출물), 3.38%(에탄올 추출물), 4.09%(열수 추출물)의 효과가 나타났으며, Choi 등[5]의 치자, 행인, 지실에서 36%, 33%, 15%의 저해효과를 나타낸다는 결과와, 싸리 추출물이 1,000 µg/ml의 농도에서 6.17~27.61%라는 Lee 등[16]과 당귀, 토사자, 숙지황 등이 40% 미만의 tyrosinase 저해율을 나타낸다는 결과와 비교하여 노간주나무 추출물의 tyrosinase 저해효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

멜라노마세포(B16F10)의 생존율 확인

세포 생존율을 확인하기 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 담황색의 기질로서 생 세포의 미토콘드리아 내의 호흡연쇄 효소에 의해 환원되어 암적색의 formazan을 생성한다. 죽은 세포에서는 반응

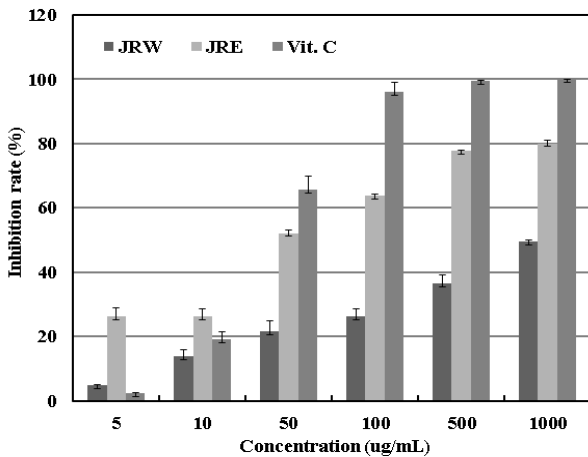


Fig. 1. Inhibition rate of *Juniperus rigida* Sieb. extracts on tyrosinase. ■ JRW: *J. rigida* Sieb. extracted with water, ■ JRE: *J. rigida* Sieb. extracted with ethanol, ■ Vit. C: ascorbic acid. Results are means ± SD of triplicate data.

이 일어나지 않으므로 이 formazan의 생성량을 생 세포 측정 에 이용되는 검색법[23]으로 96 well plate를 사용하며, 검사결과를 ELISA reader (multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있는 방법 중의 한 방법이다[18].

노간주 나무 에탄올 추출물의 멜라노마 세포의 생존율을 확인한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 노간주나무 에탄올 추출물의 경우 10 µg/ml 이하에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었으므로 본 실험에서 50 µg/ml 이하의 농도에서 실험을 하였다. Choi 등[6]의 산수유 추출물이 100 µg/ml에서 50%의 저해율이 나타났으며, An 등[2]의 내소황련탕 복합처방의 경우 100 µg/ml에서 열수 추출물의 55%, 에탄올 추출물은 38% 이하의 낮은 증식억제 효과가 나타났으며, Lee 등[15]이 보고한 국내산 백화사설초 전초와 뿌리의 항암효과에서 0.4 mg/ml의 농도에서 32.6%, 37.0%의 암세포 증식억제효과와 비교하여 노간주나무 에탄올 추출물의 melanoma 세포에 대한 세포 독성이 적은 것을 확인할 수 있었다.

멜라닌 합성에 관여하는 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현 및 mRNA 발현억제 효과 확인

생체 내 tyrosine으로부터 멜라닌 생성은 주로 산화적 반응에 의해서 일어나는데 이와 관련된 효소로는 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 등이 있다[22]. TRP-1은 TRP-2에 의해 생성된 5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid (DHICA)를 oxidation 시켜 indole-2-carboxylic acid (IQCA)를 생성하는데, IQCA는 흑갈색을 나타낸다. MITF는 microphthalmia transcription factor로서 tyrosinase 발현을 조절하므로 MITF의 억제는 ty-

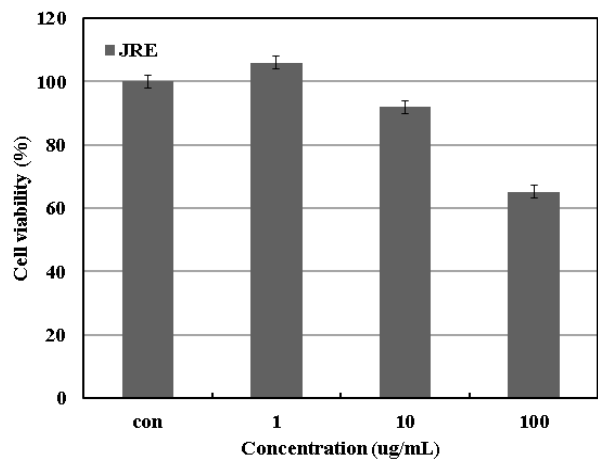


Fig. 2. Cell viability of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in medium for 24 h the cells were treated with 1, 10 and 100 µg/ml of extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. Each value represents mean ± SD of three individual experiments.

rosinase의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다[17].

본 연구에서는 노간주나무 추출물이 멜라닌 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 단백질과 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하였다(Fig. 3~Fig. 6의 A, B). 노간주나무 에탄올 추출

물이 melanin 합성에 관계된 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma 세포에 농도별로 5, 25, 50 µg/ml 처리 한 후 24시간 후에 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 protein 발현을 western blotting으로 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사

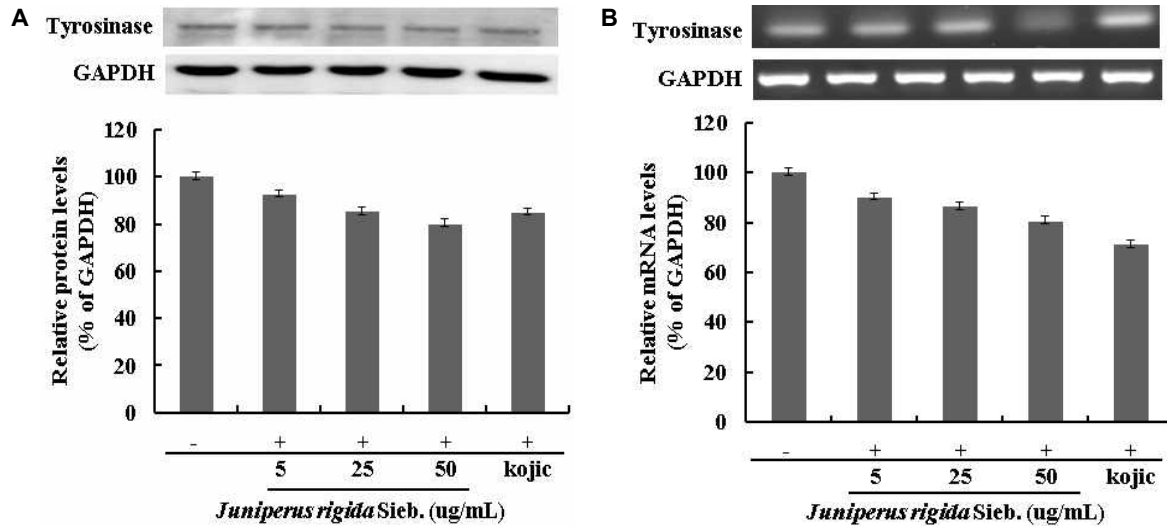


Fig. 3. Tyrosinase protein & mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). A: Tyrosinase protein expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). B: Tyrosinase mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 µg/ml of ethanol extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. Tyrosinase was detected by western blotting and RT-PCR, respectively. It show the densitometric of tyrosinase protein & mRNA normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

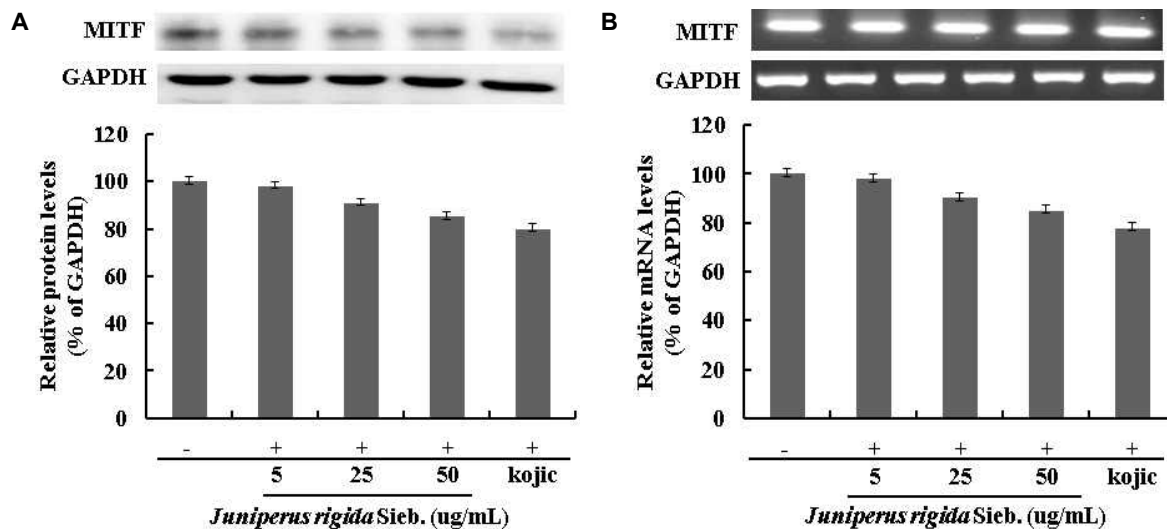


Fig. 4. MITF protein & mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). A: MITF protein expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). B: MITF mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 µg/ml of ethanol extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. MITF was detected by western blotting and RT-PCR, respectively. It show the densitometric of MITF protein & mRNA normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

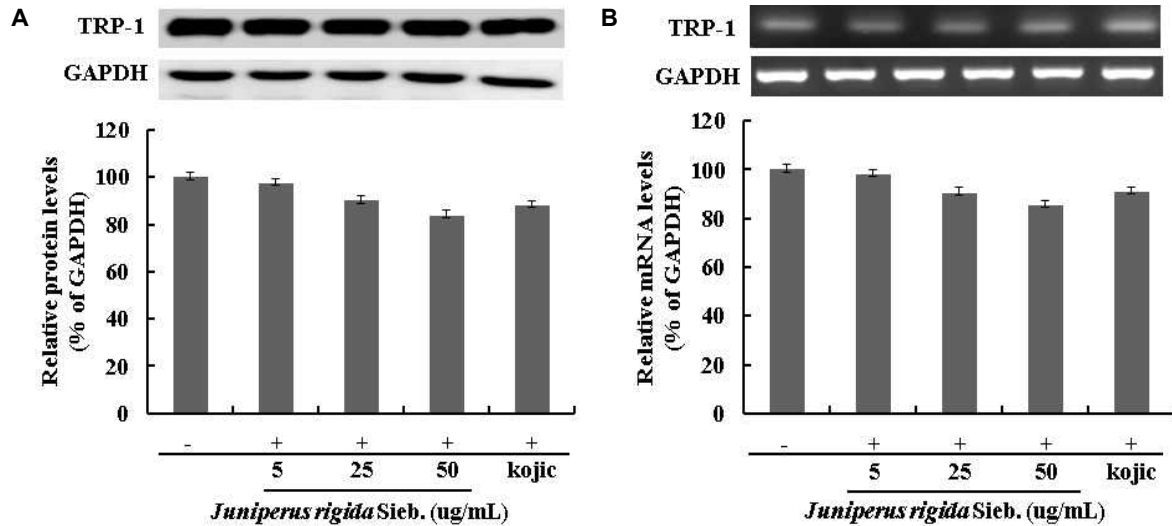


Fig. 5. TRP-1 protein & mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). A: TRP-1 protein expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). B: TRP-1 mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ of ethanol extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. TRP-1 was detected by western blotting and RT-PCR, respectively. It show the densitometric of TRP-1 protein & mRNA normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

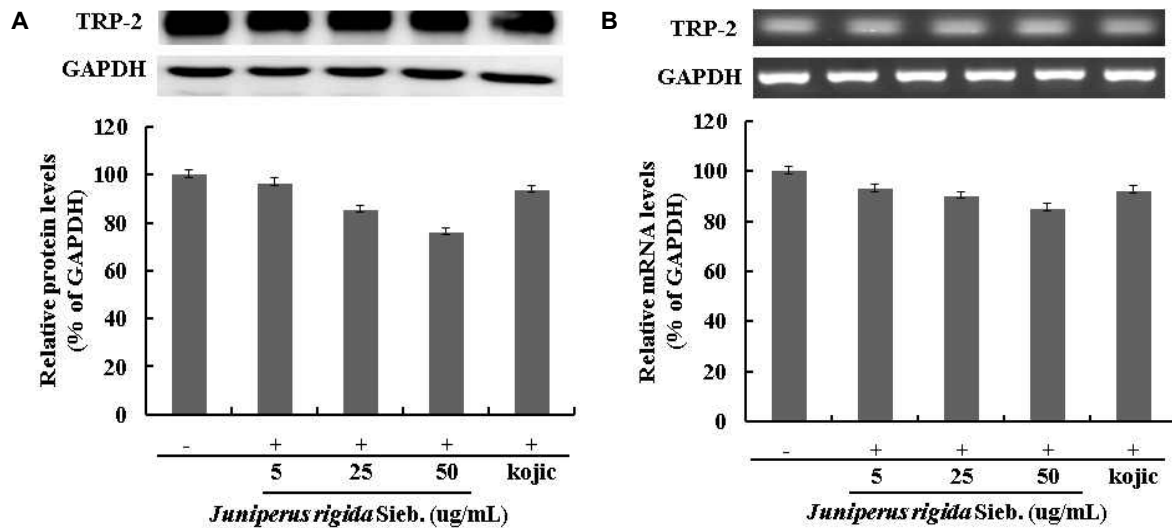


Fig. 6. TRP-2 protein & mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). A: TRP-2 protein expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). B: TRP-2 mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ of ethanol extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. TRP-2 was detected by western blotting and RT-PCR, respectively. It show the densitometric of TRP-2 protein & mRNA normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

용하였다. Fig. 3~Fig. 6의 각 A결과에서 보는 바와 같이 노간주나무 에탄올 추출물을 농도별로 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 B16F10에서는 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 protein의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 노간주나무 에탄올 추출물이 melanin 합성에 관계된 key enzyme인 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2 mRNA에 미치는 영향을 알아보기 위하

여 B16F10 mouse melanoma 세포에 농도별로 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 후 24시간 후에 polymerase chain reaction (PCR)으로 mRNA 발현양을 측정하였다. 이때 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. Fig. 3~6의 각 B결과에서 보는 것과 같이 노간주나무 에탄올 추출물을 농도별로 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 B16F10세포에서는 tyrosinase,

MITF, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 노간주나무 에탄올 추출물이 B16F10 흑세포종에 대하여 멜라닌 색소 생성 억제 및 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 억제 효과를 가지고 있는 것으로 보임에 따라 미백 관련 기능성 화장품 소재로서의 가능

성이 있음을 보여준다.

Real-time PCR 검증

Real-time polymerase chain reaction (PCR)은 thermal cycler로 분광 형광 광도계가 일체화된 장치로, 실시간으로 PCR

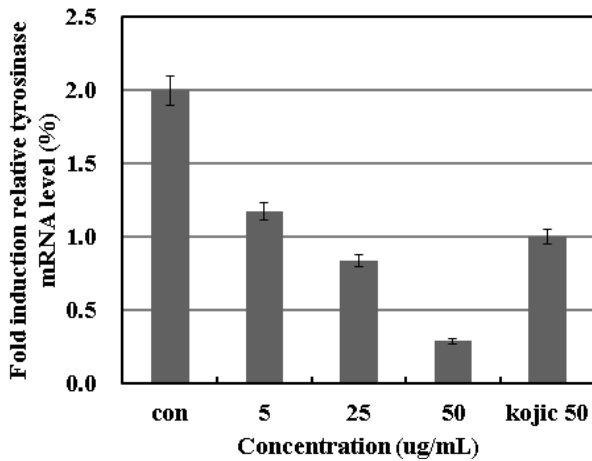


Fig. 7. Tyrosinase related quantitative mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ of ethanol extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. Melanin related mRNA was detected by real-time PCR. It show the densitometric of tyrosinase protein normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

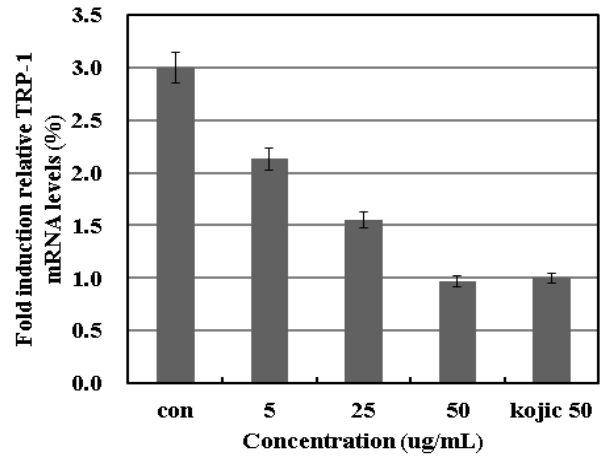


Fig. 9. TRP-1 related quantitative mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ of ethanol extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. Melanin related mRNA was detected by real-time PCR. It show the densitometric of TRP-1 protein normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

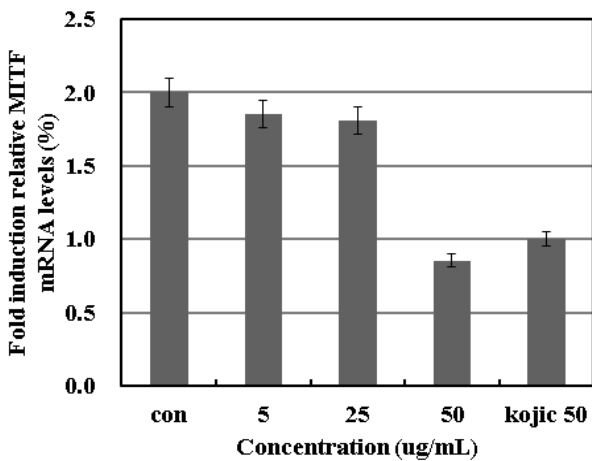


Fig. 8. MITF related quantitative mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ of ethanol extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. Melanin related mRNA was detected by real-time PCR. It show the densitometric of MITF protein normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

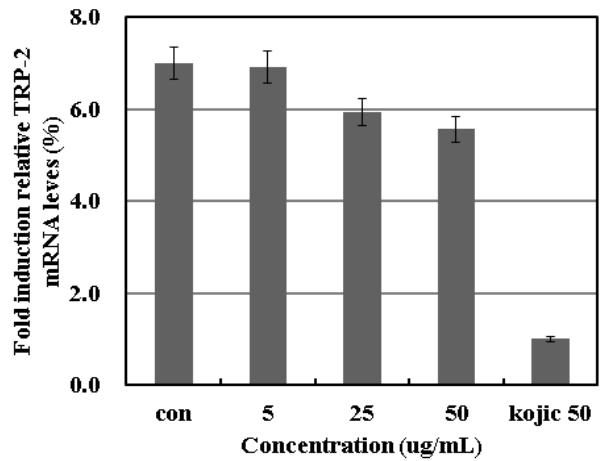


Fig. 10. related quantitative mRNA expression rate of *Juniperus rigida* Sieb. extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ of ethanol extracted of *J. rigida* Sieb. for 24 h. Melanin related mRNA was detected by real-time PCR. It show the densitometric of TRP-2 protein normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

증폭산물의 생성과정을 모니터링하여 target DNA의 양을 분석하는 실험이다. 본 실험에서 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 mRNA를 노간주나무 에탄올 추출물을 처리하여 실시간으로 분석한 결과 농도 의존적으로 mRNA 발현이 줄어들음을 확인할 수 있었다(Fig. 7~Fig. 10).

이러한 결과로 미루어 보아 노간주나무 에탄올 추출물이 tyrosinase, MITF, TRP-1 및 TRP-2 단백질 발현 및 mRNA 발현량 등에서 효능이 있음을 확인할 수 있었으며, 미백개선용 화장품 소재로 응용이 가능할 것으로 판단된다. 차후 화장품 제형에서 노간주나무 추출물이 얼마나 안정하게 피부에 적용이 되는지에 대한 연구가 계속된다면 우수한 미백개선용 화장품 천연 소재가 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A103017).

References

- An, B. J., Lee, C. E., Son, J. H., Lee, J. Y., Choi, G. H. and Park, T. S. 2005. Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **48**, 280-284.
- An, B. J., Lee, C. E., Son, J. H., Lee, J. Y., Park, T. S., Park, J. M., Bae, H. J. and Pyeon, J. R. 2005. Antioxidant, anticancer and antibacterial activities of Naeshwangryntang and its ingredients. *Korean J Herbology* **20**, 17-26.
- Bentley, N. J., Eisen, T. and Goding, C. R. 1994. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol* **14**, 7996-8006.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**, 936-942.
- Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, E. S. and Lee, N. H. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J Pharmacogn* **29**, 237-242.
- Choi, W. H., Chun, H. J., Seung, H. B. and Woo, H. W. 2003. Effect of proliferation inhibition on B16F10 melanoma cell by chloroform extract from *Cornis fructus*. *Appl Pharmacol* **11**, 151-156.
- Chun, H. J., Choi, W. H., Baek, S. H. and Woo, W. H. 2002. Effect of quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte cells. *Korean J Pharmacogn* **33**, 245-251.
- Curto, E. V., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing, V. J. Jr. and Dooley, T. P. 1999. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem Pharmacol* **57**, 663-672.
- Gilchrest, B. A. and Eller, M. S. 1999. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J Invest Dermatol Symp Proc* **4**, 35-40.
- Ivengar, R. and McEvily, A. J. 1992. Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends Food Sci Technol* **3**, 60-63.
- Jeon, H. S., Lee, Y. S. and Kim, N. W. 2009. The antioxidative activities *Torreya nucifera* seed extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 1-8.
- Jo, J. O., Kim, S. M. and Kim, K. S. 1999. Analysis of asarone, coumarin and thujone in medicinal plants used in brewing a Korean traditional folk Wine. *Agric Chem Biotechnol* **42**, 210-217.
- Kim, T. W. 1996. *The woody plants of Korea*. pp. 49, Kyohaksa, Seoul, Republic Korea.
- Lee, C. B. 1990. *Dendrology*. pp. 110-112, Hyangmoonsa, Seoul, Republic Korea.
- Lee, H. J., Lee, E. O., Lee, Y. H., Kim, K. H., Lee, J. H., Baek, N. I., Ra, J. C. and Kim, S. H. 2004. Anti-tumor activity of Korean oldenlandiae Herba and Radix. *Korean J Pharmacogn* **35**, 110-115.
- Lee, Y. S., Joo, E. Y. and Kim, N. W. 2006. Polyphenol contents and physiological activity of the *Lespedeza bicolor* extracts. *Korean J Food Preserv* **13**, 616-622.
- Oh, H. C., Lim, K. S., Hwang, C. Y., Youn, I. H. and Kim, N. K. 2007. A study on the melanin synthesis inhibition and whitening effect of *Bombysis Corpus*. *J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* **20**, 1-13.
- Park, J. G., Kramer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* **47**, 5875-5879.
- Pavel, S. and Muskiet, F. A. 1983. Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma: a preliminary report. *Cancer Detect Prev* **6**, 311-316.
- Prota, G. 1980. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* **75**, 122-127.
- Seo, E. J., Hong, E. S., Choi, M. H., Kim, K. S. and Lee, S. J. 2010. Antioxidant and skin whitening effects of *Ramnus yoshinoi* extracts. *Korean J Food Sci Technol* **42**, 750-754.
- Spitzer, J. A. 1994. Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and non-parenchymal cells of endotoxemic rats. *Hepatology* **19**, 217-228.
- Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T. and 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**, 206-209.
- Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med* **53**, 515-517.
- Yang, E. S., Hwang, J. S., Choi, H. C., Hong, R. H. and Kang, S. M. 2008. The effect of genistein on melanin synthesis and *in vivo* whitening. *Korean J Microbiol Biotechnol* **36**, 72-81.

초록 : 멜라노마세포(B16F10)에서 노간주나무의 tyrosinase, MITF, TRP-1 및 TRP-2 발현 저해능

이수연¹ · 전해지¹ · 이인철² · 이진영^{1*}

(¹호서대학교 한방화장품학과, ²서원대학교 화장품학과)

사람의 피부는 자외선, 오염된 공기, 화학제품 등 환경에 끊임없이 노출된다. 특히 자외선은 피부에 다양한 형태로 영향을 주어 주름, 잔주름, 피부거침, 피부건조와 같은 현상을 발생시켜 피부노화를 유발시킨다. 미백효과를 확인하기 위하여 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 열수 추출물에서 49.4%, 에탄올 추출물에서 80.0%의 효과를 나타내어 열수 추출물에 비해 에탄올 추출물의 효과가 높게 나타났으며, 노간주나무 에탄올 추출물이 B16F10 흑세포종에 대하여 멜라닌 색소 생성 억제 및 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 억제 효과를 가지고 있는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 열수 추출물보다 에탄올 추출물이 더 높은 효과를 나타냄을 확인할 수 있었으며, 노간주나무 추출물의 미백효과를 이용하여 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.