

멜라노마 세포(B16F10)에서 청미래 덩굴 뿌리 추출물의 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 및 mRNA 발현 억제 효과

이수연¹, 유단희¹, 주다혜¹, 조희선², 이진영^{1*}

¹호서대학교 한방화장품과학과

²호서대학교 나노바이오트로닉스학과

Received: November 10, 2015 / Revised: December 8, 2015 / Accepted: December 14, 2015

Inhibitory Efficacy of *Smilax china* L. on MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase Protein and mRNA Expression in Melanoma Cell (B16F10)

Soo-Yeon Lee¹, Dan-Hee Yoo¹, Da-Hye Joo¹, Hui-Seon Jo², and Jin-Young Lee^{1*}

¹Department of Herbal Cosmetic Science, ²Department of Nanobiontronics, Hoseo University, Asan 31499, Republic of Korea

The purpose of this study was to assess the whitening effects of an extract from *Smilax china* L., which is a vine shrub belonging to the lily family. With regard to the whitening effects, 70% ethanol and water extracts from *Smilax china* L. showed more than 77.6% and 40.2% tyrosinase inhibition at a concentration of 1,000 μ l. Furthermore, the 70% ethanol extract showed cytotoxicity of 89% at a concentration of 100 μ g/ml in melanoma cells. Western blot showed that the inhibitory effect of the 70% ethanol extract on MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase protein expression decreased by 89.9%, 46.2%, 57.6%, and 55.8%, respectively, at a concentration of 50 μ g/ml. Moreover, reverse transcription-PCR showed that the inhibitory effect of the 70% ethanol extract on MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase mRNA expression decreased by 78.5%, 58.0%, 78.8%, and 70.8%, respectively, at the same concentration of 50 μ g/ml concentration. Further, real-time PCR showed that the 70% ethanol extract-induced decrease in MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase quantitative mRNA expression rate was concentration-dependent. The findings suggest that the extract from *Smilax china* L. has great potential as a cosmetic ingredient with whitening effects.

Keywords: *Smilax china* L., microphthalmia-associated transcription factor, tyrosinase related protein-1, tyrosinase related protein-2, tyrosinase

서론

최근 고령화 사회로 인한 평균 수명 연장과 레저 활동의 증가로 인해 자외선 노출이 증가되고 있으며, 환경오염 및 오존층의 파괴로 인해 자외선에 의해 야기되는 피부변화가 증가되고 있다[16, 23]. 자외선으로부터 피부가 자극을 받으면 keratinocyte에서 endothelin-1(ET-1), 부신피질 자극 호르몬, 일산화질소(NO) 등이 분비되어 피부 색소가 증가하게 된다[7]. 피부 색소는 피부색을 결정하는 근본적인 멜라닌 세포가 만들어내는 멜라닌의 함량에 의해 결정되며[8, 12] 이

러한 멜라닌은 자외선이나 자유 라디칼과 같은 외부자극으로부터 피부를 보호하기 위해 만들어진다[15]. 과도한 멜라닌 합성과 축적은 기미, 주근깨와 같은 질병을 일으키게 되고 멜라닌 생성은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2(TRP-2)의 세 효소에 의해 조절된다[13]. 그 중 멜라닌 생성과정에서 주요 효소인 tyrosinase는 L-DOPA가 합성되는 단계와 L-DOPA로부터 DOPA quinone이 합성되는 단계를 촉진하여 멜라닌 합성을 촉진한다[6]. 멜라닌 생합성에 관여한 인자로는 tyrosinase, dopachrome conversion factor, prostaglandin(PG), interferon (IFN), melanocyte stimulating hormone(MSH), Vitamin D₃, histamine 등이 보고되어 있으며 현재 tyrosinase 저해제로서 kojic acid와 albutin이 미백제로 많이 사용되고 있으나 세포독성, 돌연변이 유발 등의 부작용 등이 보고되고 있

*Corresponding author

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

E-mail: jylee@hoseo.edu

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

다[4, 11]. 이러한 메커니즘을 토대로 최근 화장품업계에서도 여러가지 미백, 주름개선, 자외선 차단제 등의 기능성을 가진 제품들이 많이 출시되고 있고, 다양한 천연소재를 이용한 화장품의 개발이 이루어져 천연화장품, 한방화장품에 대한 관심과 욕구가 증가하고 있는 추세이다.

청미래덩굴(*Smilax China L.*)은 한국, 일본, 중국, 필리핀 및 인도차이나 등의 지역에 분포하며, 우리나라 대부분의 산야에서 서식하는 백합과(Lilaceae)에 속하는 덩굴성 관목으로 지역에 따라 청미래덩굴, 명감나무, 매발톱가시, 참열매덩굴, 종가시덩굴 등 다양하게 불리고 있으며, 원예 분야에서는 명개나무 또는 망개나무로 잘 알려져 있다. 어린순과 열매는 식용을 하고, 뿌리와 나무는 해열, 해독, 이뇨 등의 증상 완화, 체력증강 및 피부염, 신장염, 방광염, 항균작용, 관절염, 유방암 등에 효과가 있다고 알려져 있다[3, 18-20]. 청미래덩굴의 함유 성분으로는 pseudoprotodioscin, dioscin, protodioscin, sieboldogenin, glycoside 등이 있다. 또한 청미래덩굴(*Smilax China L.*)의 근경을 지칭하는 토복령의 성분에 관한 연구는 아직 많지는 않지만 saponin, tannin 등이 주성분이라고 알려져 있으며, 뿌리에서 분리된 배당체 ophiopogonin과 점액성 물질이 많이 포함되어 인체의 면역증진과 각종 세균의 감염으로부터 장기를 보호하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 또한 중금속 중독에 대한 해독 작용에 효과적이라고 알려져 있다[14, 22].

따라서 본 연구에서는 청미래 덩굴 뿌리 추출물의 미백에 대한 효소 및 세포 실험을 실시하여 그 효능을 입증하고 기능성화장품 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용된 청미래 덩굴 뿌리는 (주)청명약초에서 구입하여 Fig. 1의 절차에 따라 에탄올과 열수 추출을 실시하였다. 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 환류 냉각 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 동결건조하여 -20°C에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[21]에 따라 측정하였다. 반응구는 67 mM sodium phosphate buffer

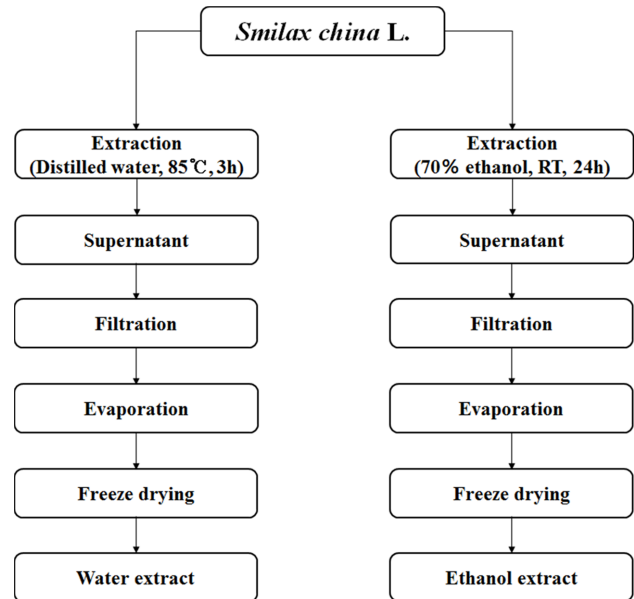


Fig. 1. The procedure for extraction from *Smilax china L.*

(pH 6.8) 80 μ l에 10 mM L-DOPA(Sigma, USA)를 녹인 기질액 40 μ l 및 시료용액 40 μ l의 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase(Sigma, USA) 40 μ l을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

세포 배양

본 실험에 이용한 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[2]에 따라 측정하였다. 멜라노마 세포(B16F10)를 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 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 독성 측정은 시료용액의 첨가구과

무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

Western blot을 통한 단백질 발현양상 측정

미백인자인 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein 1(TRP-1), tyrosinase related protein 2(TRP-2), tyrosinase의 활성을 보기 위하여 멜라노마 세포를 100 mm tissue culture dish에 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24-48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(PBS)로 2번 세척해 주었다. Radio-immunoprecipitation assay(RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab를 가한 100 µl로 용해해서 4°C 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하여 20 µl의 단백질을 10% SDS-PAGE 사에서 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°C에서 over night 한 다음, 다시 10분간격으로 tris-buffered saline and tween 20(TBST)로 3회 세척하고 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 3회 세척한 후 LAS 4,000 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 세포를 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 샘플을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각

well에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 µl를 분주하여 20초간 위아래로 흔들여주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 µl이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC를 50 µl씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 µl와 멸균수 195 µl를 첨가하여 260, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA 양을 측정하였다. Oligo(dT) 15 primer(500 µg/ml) 1 µl, 추출한 RNA(2 µg)와 nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 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 합성시켰다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction

미백인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 Go Flexi DNA polymerase, primer 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)는 94°C에서 30초, 55°C에서 45초, 72°C에서 45초(35 cycles), tyrosinase는 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C 45초(40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 45초(40 cycles)을 하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

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

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

Real-time PCR

각 세포로부터 추출된 RNA를 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 추출한 RNA(2 µg)와 Oligo (dT) 15primer(500 µg/ml) 1 µl, nuclease free water와 혼합한 뒤 75°C에서 5분, 얼음에서 5분 반응시킨 후 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 합성시켰다. 합성한 cDNA와 2X SYBR green mix, primer, ROX를 각각 넣어 ABI step one plus(Applied biosystem, USA) 기기를 이용하여 실시간 정량 분석을 한 뒤 analysis program을 이용하여 결과를 분석하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해활성 측정 결과

Tyrosinase는 tyrosin으로부터 3,4-dihydroxy-L-phenylalanin (DOPA)과 DOPA-quinone을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 melanin 색소 생성에 관여하는 효소로 자외선에 의하여 melanocyte의 유사분열이 일어나고 이어서 melanocyte가 활성화 된다. 활성화 된 melanocyte에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고, melanin의 생성이 항지되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 되어 기미, 주근깨와 같은 색소 침착이 일어나게 된다. 그러므로 tyrosinase 활성억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성억제 실험은 유용한 평가법으로 인정되고 있다[5, 9, 10]. 이러한 방법으로 청미

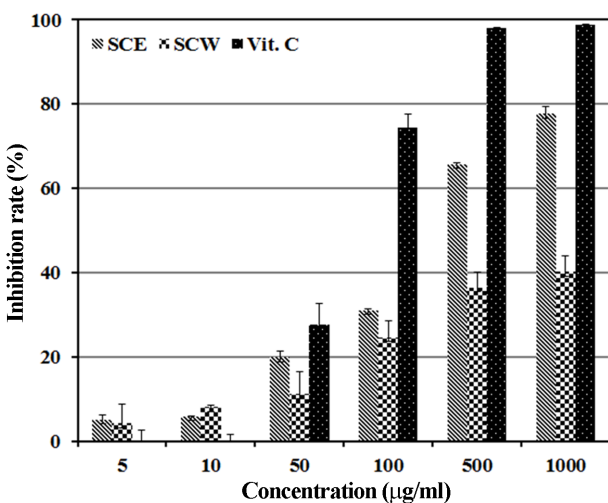


Fig. 2. Inhibition rate of *Smilax china* L. extracts on tyrosinase. SCE: *Smilax china* L. extracted with ethanol, SCW: *Smilax china* L. extracted with water, Vit. C: ascorbic acid. Results are means ± S.D. of triplicate data.

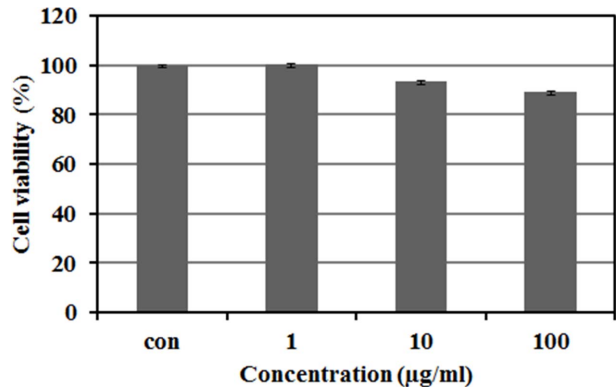


Fig. 3. Cell viability of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). Results are means ± S.D. of triplicate data.

래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물과 열수 추출물의 tyrosinase 저해효과를 측정한 결과 Fig. 2와 같이 청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물과 열수 추출물은 각각 1,000 µl/ml에서 77.6%, 40.2%의 활성을 나타내었다. 이는 An 등[1]의 연구에서 진달래꽃의 에탄올 추출물과 열수 추출물이 같은 농도에서 각각 24%, 48%의 활성을 나타낸 결과와 비교하였을 때 청미래 덩굴 뿌리 열수 추출물의 활성은 조금 낮았지만, 청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물의 tyrosinase 억제 활성은 우수함을 확인할 수 있었다.

멜라노마 세포(B16F10)의 생존율 확인

세포 수준의 연구에 많이 이용되고 있는 dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium(MTT) 검색법은 96 well plate를 사용하며, cell proliferation과 viability의 in vitro 분석에 매우 유용하게 사용되고 있는 방법 중 하나이다[2]. 암세포의 경우 대사과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띄는 비 수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다[17].

청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물에 의한 멜라노마 세포의 생존율을 MTT assay에 의해 확인할 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. 청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물은 100 µg/ml에서 89% 이상의 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 따라서 이하의 멜라노마 세포의 미백관련 신호전달 인자 측정은 생존율이 100%에 가까운 농도인 5, 25, 50 µg/ml의 농도로 확인하였다.

MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현억제 효과 확인

청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물이 멜라닌 합성에 관계된 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma cell에 농도별로 5, 25, 50 µg/ml

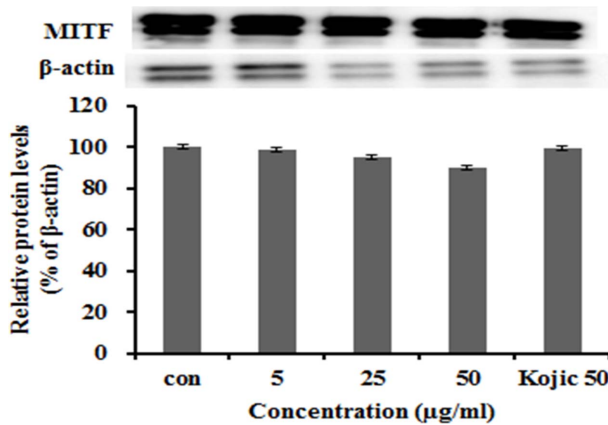


Fig. 4. MITF protein expression rate of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (5×10^5 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25 and 50 µg/ml of ethanol extracted of *Smilax china* L. (SC) for 24 h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

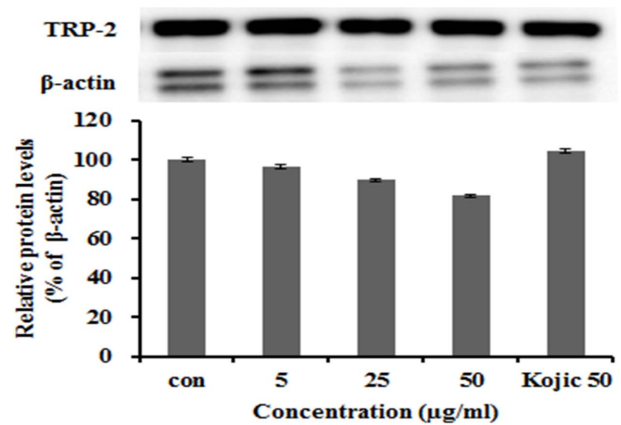


Fig. 6. TRP-2 protein expression rate of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (5×10^5 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25 and 50 µg/ml of ethanol extracted of *Smilax china* L. (SC) for 24 h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

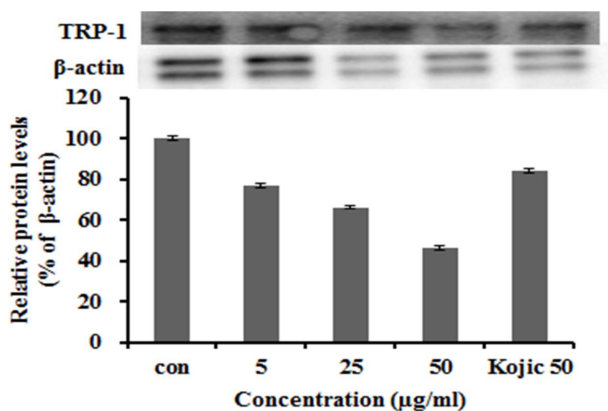


Fig. 5. TRP-1 protein expression rate of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (5×10^5 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25 and 50 µg/ml of ethanol extracted of *Smilax china* L. (SC) for 24 h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

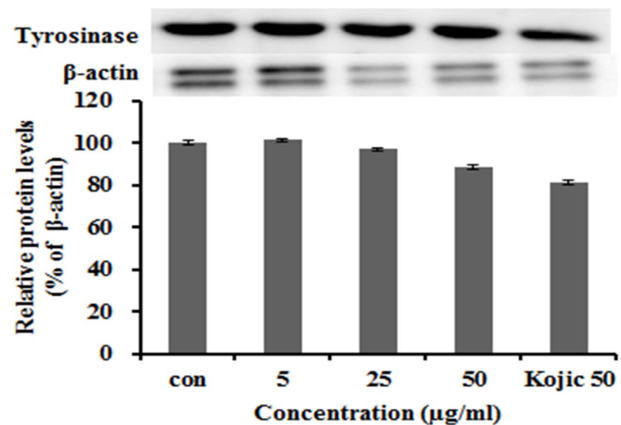


Fig. 7. Tyrosinase protein expression rate of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (5×10^5 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25 and 50 µg/ml of ethanol extracted of *Smilax china* L. (SC) for 24 h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

처리 한 후 24시간 뒤에 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 발현을 western blotting으로 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. Fig. 4-7과 같이 청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 농도별로 5, 25, 50 µg/ml을 처리한 B16F10군에서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 발현이 추출물을 처리하지 않은 군보다 감소하였고 대조군인 kojic acid와 비교적 비슷한 발현을 나타내었음을 확인할 수 있었다.

MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현억제 효과 확인

청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물이 멜라닌 합성에 관계된 key enzyme인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse melanoma cell에 농도별로 5, 25, 50 µg/ml 처리한 후 24시간 뒤에 reverse transcription-polymerase chain reaction(PCR)으로 mRNA 발현량을 측정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene

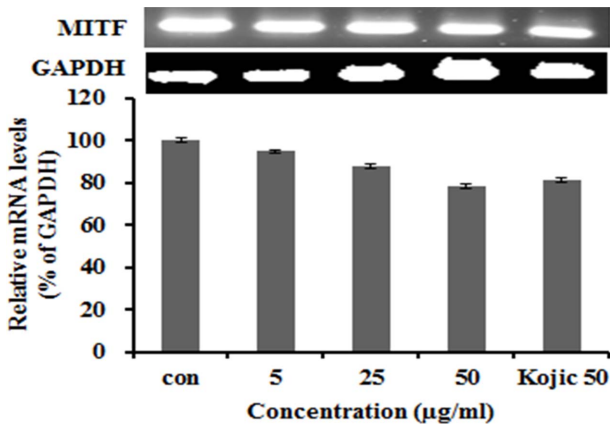


Fig. 8. MITF mRNA expression rate of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (5×10^5 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25 and 50 µg/ml of ethanol extracted of *Smilax china* L. (SC) for 24 h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

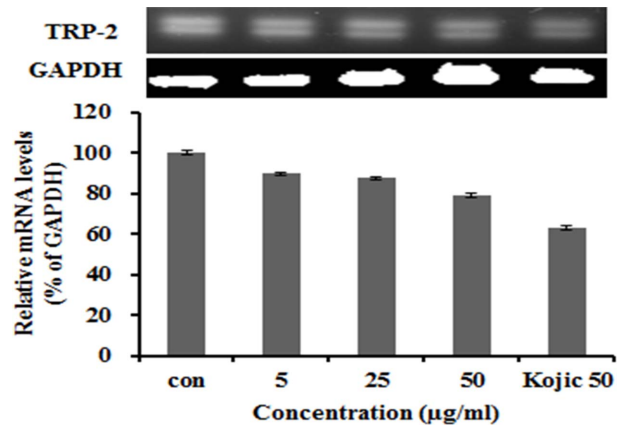


Fig. 10. TRP-2 mRNA expression rate of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (5×10^5 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25 and 50 µg/ml of ethanol extracted of *Smilax china* L. (SC) for 24 h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

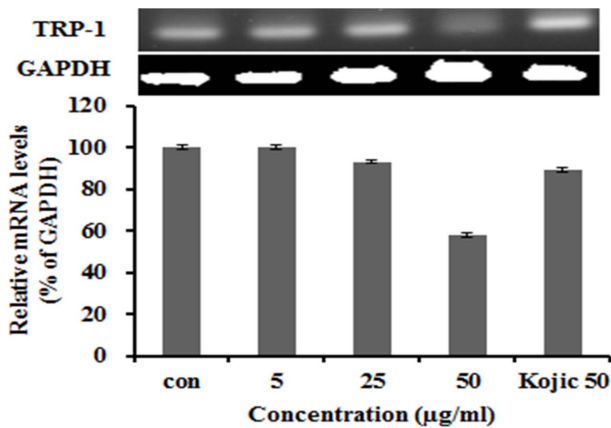


Fig. 9. TRP-1 mRNA expression rate of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (5×10^5 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25 and 50 µg/ml of ethanol extracted of *Smilax china* L. (SC) for 24 h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

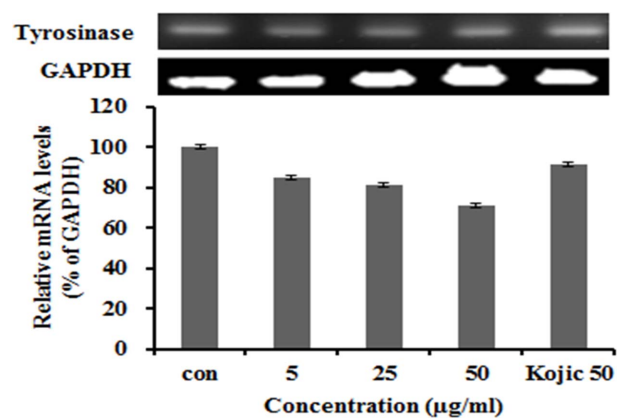


Fig. 11. Tyrosinase mRNA expression rate of extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (5×10^5 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated with 5, 25 and 50 µg/ml of ethanol extracted of *Smilax china* L. (SC) for 24 h. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments.

인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. Fig. 8-11에서 보는 바와 같이 청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 농도별로 5, 25, 50 µg/ml을 처리한 B16F10군에서는 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA 발현이 처리하지 않은 군보다 억제되었음을 확인하였다.

Real-time PCR 검증

Real-time polymerase chain reaction(PCR)은 thermal cyclor와 분광형광 광도계가 일체화된 장치로, 실시간으로

target DNA 분자의 증폭과 양의 측정을 동시에 분석하는 실험이다. 본 실험에서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA를 실시간으로 분석한 결과 Fig. 12-15와 같이 나타내었다. 청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출에서 모두 농도 의존적으로 감소 되었음을 확인할 수 있었다. 특히 MITF, TRP-1, tyrosinase의 mRNA 발현이 현저하게 억제되었으며 mRNA 역전사 반응, 실시간 정량 분석을 시행한 결과, 청미래 덩굴 뿌리 에탄올 추출물이 멜라닌 생성 억제에 효과가 있는 것으로 사료된다.

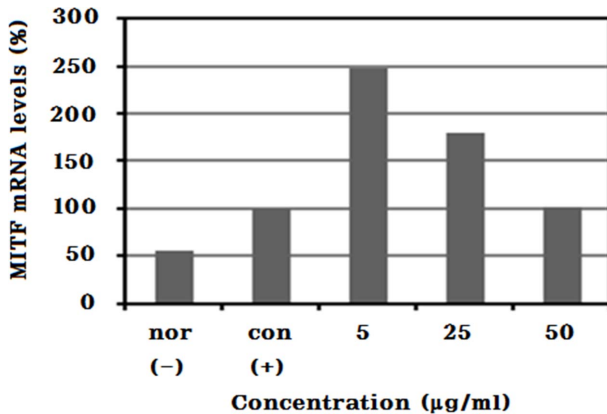


Fig. 12. MITF related quantitative mRNA expression rate of ethanol extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10).

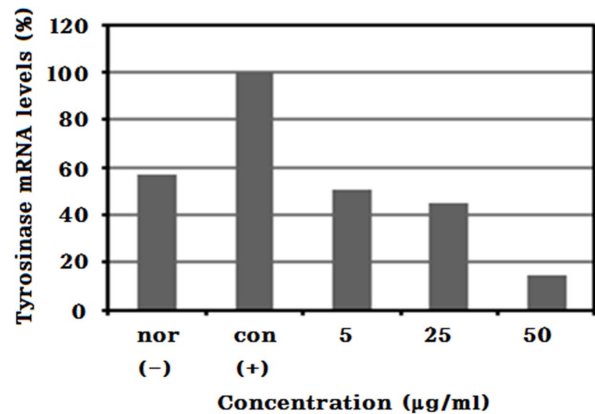


Fig. 15. Tyrosinase related quantitative mRNA expression rate of ethanol extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10).

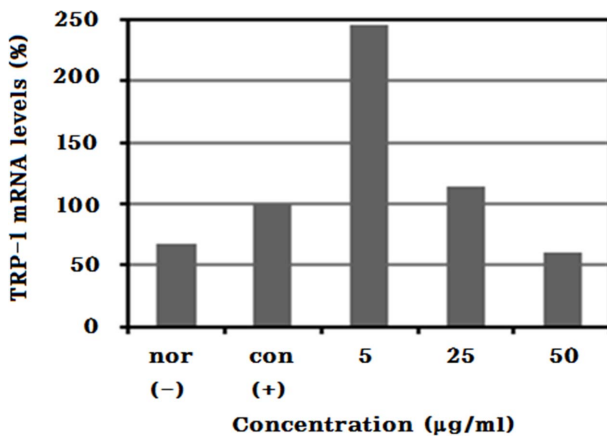


Fig. 13. TRP-1 related quantitative mRNA expression rate of ethanol extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10).

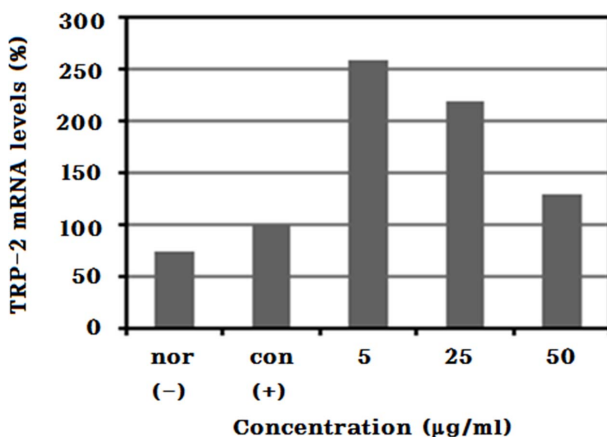


Fig. 14. TRP-2 related quantitative mRNA expression rate of ethanol extract from *Smilax china* L. on melanoma cell (B16F10).

요약

본 연구에서는 청미래 덩굴 뿌리 추출물의 미백효과를 확인하기 위해서 tyrosinase 저해활성 및 미백관련 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 및 유전자 발현 억제 효과를 western blot, reverse transcription-PCR 및 real time-PCR을 측정하였다. 그 결과 우수한 tyrosinase 저해활성을 확인하였고, 미백관련 인자 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 및 유전자 발현측정에서도 4가지 인자 모두 발현이 억제됨으로써 미백 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 청미래 덩굴 뿌리 추출물이 미백 효능을 가짐으로써 화장품 소재로 응용이 가능할 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This research was supported by the Ministry of Trade, Industry and Energy(MOTIE) through the Special Education program for Industrial Convergence.

References

1. An BJ, Lee CH, Lee JY, Choi GH, Park TS. 2005. Antioxidant, Anti-cancer and Tyrosinase inhibition activities of extracts for from *Rhododendron mucronulatum* T. *J. Korean Soc. Appl. Boil. Chem.* **48**: 280–284.
2. Carmichael J, Degraff WG, Gadzar AF. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautimate colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer. Res.* **47**: 936–942.
3. Choi YS. 2008. The 108 wild Plants for Drug. pp. 1–279. Hanam company. Seoul. Korea.
4. Duncan CL, Foster EM. 1968. Effect of sodium nitrite, sodium

- chloride and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. *Appl. Microbiol.* **16**: 406–411.
5. Han HS, Park JH, Choi HJ, Son JH, Kim YH, Kim S, et al. 2004. Biochemical analysis and physiological activity of perilla leaves. *Korean J. Food. Culture.* **19**: 94–105.
 6. Hearing VJ, Jimenez M. 1989. Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level. *Pigment. Cell. Res.* **2**: 75–85.
 7. Hwang JY, Park TS, Son JH. 2012. Whitening effect of extracts and fractions from *Diospyros kaki* calyx. *J. Life. Sci.* **23**: 383–388.
 8. Im SB, Lee ES, Kim WK, On WY, Kim JH, Lee MO, et al. 2002. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocyte. *J. Korean Med. Sci.* **17**: 58–64.
 9. Imokawa G, Mishima Y. 1981. Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br. Japan Dermatol.* **104**: 531–539.
 10. Imokawa G, Mishima Y. 1980. Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors and their differential action on melanogenic subcellular compartments in amelanotic and melanomas. *Br. Japan Dermatol.* **103**: 625–633.
 11. Imokawa G, Mishima Y. 1982. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer. Res.* **42**: 1994–2002.
 12. Jeung MH, Kim SS, Kim JS, Lee HJ, Chio GP, Lee HY. 2005. Skin Whitening and skin immune activities of different parts of *Acer mono* and *Acer okamotoanum*. *J. Korean For. Soc.* **99**: 470–478.
 13. Kameyama K, Sakai C, Kuge S, Nishiyama S, Tomita Y, Ito S, et al. 1995. Expression of tyrosinase, tyrosinase related protein-1 and 2 (TRP-1 and TRP-2), silver protein and a melanogenic inhibitor regulates melanogenesis in human melanoma cells. *Pigment. Cell. Res.* **8**: 97–104.
 14. Kim TJ. 2009. Korean Plant Edition. Yearim Company. Seoul, Korea.
 15. Lee HH, Bae S, Chin JE. 2005. Inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **34**: 1325–1329.
 16. Mastumura Y, Ananthaswamy HN. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied. Pharmacology* **195**: 298–308.
 17. Park JG, Karmer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, et al. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer. Res.* **47**: 5875–5879.
 18. Shao B, Guo H, Cui Y, Ye M, Han J, Guo D. 2007. Steroidal saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities. *Phytochem.* **68**: 623–630.
 19. Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee MK, et al. 2006. Antioxidant activity of extracts from *Smilax china* Root. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **35**: 1133–1138.
 20. Wu LS, Wang XJ, Wang H, Yang HW, Jia AQ, Ding Q. 2010. Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax China* L. *J. Ethnopharmacol.* **130**: 460–464.
 21. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta. Medica.* **39**: 517–519.
 22. Yang KH. 2004. Studies on the antioxidation and antimicrobial effect of *Smilacis glabrae rhizoma*. *J. Korean Oriental. Med.* **25**: 1–8.
 23. Yu YG, Jeong MS, Choe JY, Kim JY. 2005. A study on whitening effect of *Ephedra sinica* extracts. *Korean J. Design. Cult. Soc.* **31**: 153–159.