

밀싹 추출물이 MMP-1의 유전자 발현 억제효과 및 미백효과에 관한 연구

유선희^a · 문지선^{b†}

건국대학교 생물공학과^a, 중원대학교 뷰티헬스학과^b
(2016년 2월 11일 접수; 2016년 3월 2일 수정; 2016년 3월 4일 채택)

Study on the whitening effect and deterrent effect on gene expression of MMP-1 in wheat sprout extracts

Seon-hee You^a · Ji-sun Moon^{b†}

^aDepartment of Bioengineering, Konkuk University,
1, Hwayang-dong, Kwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea

^bDepartment of Beauty Health, Jungwon University,
85, Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun, Chungbuk, 28024, Korea
(Received February 11, 2016; Revised March 2, 2016; Accepted March 4, 2016)

요약 : 밀싹 추출물의 생리활성 및 화장품 소재로서의 가능성 여부를 규명하고자 하였다. 본 연구는 세포실험을 통해 밀싹 추출물의 피부 세포에 대한 독성을 확인하고, 피부 세포 미백 활성 및 노화에 대한 연구를 수행하여 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 본 연구 결과 밀싹 추출물이 HDF, B16F10 세포에 대한 독성이 적은 것으로 확인되었다. 멜라닌 생합성 억제에 대한 효과는 약한 것으로 확인되었으나, 자외선에 유도되는 MMP-1의 발현을 저해함으로써 피부의 광노화를 억제하는 효과를 통해 광노화에 의한 피부 주름과 자연 노화에 의한 피부 주름을 예방하는데 유의한 효과를 가질 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구는 밀싹 추출물의 기능성 화장품 소재로 사용 시 피부 노화 예방 관점에서의 기능성 화장품 소재로 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 밀싹 추출물, 항산화, 화장품, 피부, MMP-1

Abstract : This study set its purpose on to specify whether it is possible to use wheat sprout extracts for source of cosmetics, and its biological activity. Cellular experiment was conducted to apprehend toxicity of wheat sprout extracts and through study on the whitening and aging activity of skin cell. As a result, it is appeared that wheat sprout extracts have weak toxicity for HDF, B16F10 cells. Also, it is appeared that wheat sprout extracts have weak deterrent effect on melanin biosynthesis, but since the extracts impede expression of MMP-1, which is induced UV ray, the extracts hold down the aging effect by UV rays. Hence the extracts are effective on preventing

†Corresponding author
(E-mail:

wrinkles caused by UV ray and aging. Therefore, this study is expected to be utilized usefully, if the wheat sprout extracts are used as source of functional cosmetics from the perspective of preventing skin-aging in the future.

Keywords : Wheat sprout, Antioxidant, Cosmetics, Skin, MMP-1

1. 서론

현대인들의 생활수준 향상은 단순한 아름다움이 아닌 효과와 효능을 중시하는 기능성 화장품 수요를 크게 증가시키고 특히 천연물에 함유된 유용성분들의 다양한 효능이 알려지면서, 고부가가치의 기능성 천연신소재로서 가능성에 대하여 주목하고 있다. 이러한 식물자원들은 단순히 인간의 수명연장을 넘어서 건강한 삶과 활동을 유지하려는 현대인에게 질병을 예방하고 노화 예방과 건강 유지에 도움을 줄 수 있는 천연자원으로 인식되고 있다[1-3].

피부노화는 시간의 흐름에 따라서 피부의 구조 변화 즉, 생리적인 기능이 감소하여 발생하는 자연노화(intrinsic aging, 내인성노화)와 주위환경, 특히 오랜 시간 자외선 노출로 인하여 발생하는 임상적 또는 조직학적인 피부 변화가 일어나는 광노화(photo aging, 외인성 노화)로 나눌 수 있다[4]. UV가 Human dermal fibroblast (HDF)에 조사되면 광노화 현상을 발생하게 되는데, HDF에 조사된 UV는 reactive oxygen species (ROS)를 증가시켜 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)를 활성화시키고, 활성화된 NF- κ B는 핵내로 이동하여 Matrix metalloproteinase (MMP)의 발현을 촉진하게 된다[5]. 발현된 MMP는 진피층으로 분비되어 collagen의 분해와 elastin의 감소를 촉진하여 다양한 기질 단백질 분해 효소와 발현이 증가하게 되는데, 이러한 기질 단백질의 결핍은 진피층의 주름 생성과 탄력 감소를 야기시킨다[6,7]. 또한 자외선 노출로 인하여 피부는 항산화 효소, glutathione, vitamin E and C, ubiquinol 등과 같은 항산화제의 감소로 인하여 다량의 유해한 활성 산소 종(ROS, reactive oxygen species)을 생성하게 된다. 이렇게 생성된 활성 산소 종은 피부의 항산화 방어체계를 손상시키고, 이와 같은 산화적 스트레스는 지질과 단백질 산

화, 피부 염증 반응, 피부의 면역 기능 억제 및 세포의 손상과 광노화를 촉진시킨다. 이와 같이 광노화를 유발시키는 활성산소 종은 멜라닌 생성을 촉진시키고, 주름을 유발시키는 원인으로 알려져 있다[8,9]. 따라서 피부 세포를 보호하는 항산화제와 피부를 구성하고 있는 콜라겐을 분해하는 단백질 분해효소인 MMPs (matrix-metalloproteinases)의 생합성을 억제할 수 있는 물질을 사용하여 멜라닌 생성 억제 및 피부 노화를 완화할 수 있는 천연 소재 개발에 대한 관심과 연구가 높아지고 있다. 현재까지 알려진 피부 항노화 주름개선 메카니즘으로는 항산화 효소 감소, Collagen 합성 감소, Cytokines에 의한 조절, MMPs 증가 및 TIMP-1 감소, ECM의 interaction감소 등이 보고되고 있다[10-14].

밀싹(wheat sprout or wheat grass)은 밀의 마디 부위가 생성되기 전의 어린 새싹을 말한다[15]. 밀싹은 미국의 앤 위그모어(1909~1994)와 미국의 의사인 버지니아 리빙스턴(1906~1990)등에 의해 사람과 동물의 건강을 증진 시키는 탁월한 효과를 발휘하여 난치병을 치료한 사례가 보고되고 있으며[16], 밀싹에는 생체 내에서 효소의 역할을 분담할 수 있는 외래효소 및 산화방지 역할을 하는 Vitamin A, C, E 등의 10가지가 넘는 비타민과 20가지가 되는 아미노산(필수 아미노산 8가지 함유)과 시금치의 18배의 미네랄(칼슘, 칼륨, 마그네슘, 인, 무기물, 아연, 셀레늄)과 효소를 함유 하고 있다. 또한 손상된 세포와 심장 동맥의 조직을 수리해 주는 무코 다당류를 함유 하고 있어 건강식품 중 최고의 알칼리 식품으로 알려져 있으며, 미국과 유럽에서는 밀싹이 각종 성인병에 효과가 있다는 것이 알려져 분말 또는 생즙의 형태로 건강 보조식품으로 많이 응용되고 있다[16]. 밀싹과 관련한 생리활성 연구로 밀싹에 다량의 폴리페놀과 플라보노이드가 함유되어 있어 산화 억제 효과[17], superoxide scavenger 활성과 ferricyanide에 대한 환원능이 뛰어난 항산화 작용[18], 비스페놀-A에 의한 산화적 스트레

스 억제[19], 카탈라아제(catalase) 및 퍼옥시데이즈(oxidase) 활동에 의한 노인성 백내장 감소[20], DNA 손상 보호효과[21], 대장암 효과[22], 발암성 물질에 대한 억제 효과[23], wheat glass 주스가 암 환자의 항암제 투여에 대한 부작용 개선[24], 중증성 지중해 빈혈(Thalassemia Major)에 대한 효과[25] 등에 대하여 알려져 있다.

현재까지 밀싹에 대한 연구로는 주로 건강 기능성 소재로서 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 밀싹 추출물의 화장품 소재로서의 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 밀싹 추출물의 피부 세포에 대한 독성을 확인하고, 피부 세포 미백 활성 및 노화에 대한 연구를 수행하여 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 알아보려고 하였다.

2. 실험

2.1. 재료 및 기기

2.1.1. 시료 준비

본 실험에서 사용된 밀싹(*Wheat Sprout*)은 경기도 성남시 분당 밀싹 농장에서 구입하여 음건 후 분쇄하여 사용하였다.

2.1.2. 사용시약

실험에 사용된 시약은 PBS (phosphate buffered saline solution), anti-collagen type 1-Ab mouse Ig G, anti-mouse Ig G-Ab, p-nitrophenyl phosphate α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)를 Sigma Chemical (USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외의 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

2.1.3. 추출 및 분리

음건한 밀싹 20g에 50% ethanol을 20배로 가한 후 37°C 인큐베이터 안에서 72시간 추출하였다. 추출액만을 분리하기 위하여 원심분리한 후 여과지(Whatman No.2)로 여과하였으며 추출용매인 ethanol을 제거하기 위하여 진공 감압을 한 후 동결 건조하여 사용하였다.

2.1.4. 세포주 및 세포 배양

실험에 사용한 세포주인 B16F10(melanoma),

HDF (human dermal fibroblast) 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 구입하여 사용하였으며, High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA)과 1% antibiotic-antimycotic (Sigma, USA)를 첨가하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 습윤 배양기에서 배양하였다.

2.1.5. Neutral red assay를 이용한 세포독성 측정

밀싹이 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 neutral red (NR) assay를 이용하여 측정하였다[26]. HDF, B16F10 세포를 96 well plate에 well 당 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양기에서 부착시켰다. 세포 부착 확인 후 시료를 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 희석하여 처리한 후 37°C에서 CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양한 세포 배양액을 NR solution (Sigma, USA)이 1% 포함된 무 혈청배지로 교환하여 3시간 동안 배양한 다음 현미경하에서 NR의 결정화 유무를 확인하였다. 세포고정액으로 10% formaldehyde 용액이 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100 mL로 20 min 처리하여 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 mL로 분주하여 세포 내의 NR을 추출하고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

세포생존율(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

2.1.6. Melanin 생합성능 측정

B16F10 melanoma 세포를 이용하여 밀싹 에탄올 추출물의 멜라닌 생성 저해능을 측정하였다[27]. B16F10 melanoma 세포를 96 well plate에 well당 2×10^3 cell/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 37°C에서 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포 부착 확인 후 melanin 생성을 촉진하기 위하여 혈청 5%와 α -MSH 100 nM이 포함된 배지로 갈아준 후, 시료를 6.25, 12.5, 25, 50 μ g

/mL의 농도로 처리하여 72시간 배양하였다. 분비된 멜라닌의 양은 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 멜라닌 생성량을 α -MSH 100 nM을 처리한 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

Melanin 생합성 억제율(%) =

$$100 - \frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 405 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 405 nm}} \times 100$$

2.1.7. MMP-1 발현능 측정

밀싹 에탄올 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 MMP-1 함량을 측정하였다. HDF 세포를 96 well plate에 well당 3×10^4 cell/well 농도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, well plate의 상층액 제거 후 시료를 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리하고 UVB를 100 mJ/cm^2 로 20분 조사 한 후 24시간 배양하였다. 배양 상층액을 수확하여 ELISA 방법을 사용하여 생성된 타입 I 콜라게나제의 양을 정량한 후 반응시켜 405 nm로 흡광도를 측정하였다.

MMP-1 발현 저해능(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 405 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 405 nm}} \times 100$$

2.1.8. Western blot analysis

밀싹이 α -MSH에 유도된 B16F10 세포 내 MITF, tyrosinase 활성 억제 변화, UVB에 의해 발현된 HDF 세포 내 p-JNK, p-ERK의 인산화 정도를 확인하기 위해 Western blotting을 수행하였다. 밀싹 25, 50 mg/mL 의 농도로 처리한 후 UVB 100 mJ/cm^2 를 조사한 다음 24시간 배양하였다. 농도별로 처리된 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 (Roche, Switzerland)를 첨가하고 ice에서 30분간 방치하여 세포를 용해하였다. 용해된 세포는 12,000 rpm, 4°C 조건으로 30분간 원심분리하여 상등액을 회수하였고, 상등액은 SDS sample buffer (14.4 mM 2-mercaptoethanol,

60 mM Tris (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue)를 이용하여 단백질을 변성시킨 후 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분자량별로 분리하였다. 단백질을 1시간 동안 100 V의 조건에서 nitrocellulose membrane (Whatman, UK)으로 transfer 한 다음 membrane에 옮겨진 단백질은 5% skim milk 용액에서 1시간 동안 교반하여 blocking 처리하였다. Membrane은 primary antibody (β -actin primary antibody (Sigma, USA), primary antibody (Santa Cruz, USA)용액에서 18시간 교반하였으며, 교반이 완료된 membrane은 TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (0.2% Tween 20, pH 7.5)로 세척하였다. 세척이 된 membrane을 상온에서 2시간 동안 secondary antibody 용액에 처리한 후 TBS-T로 세척하였으며, super signal west pico solution (Pierce, USA)를 secondary antibody가 처리된 membrane에 처리하고 암실에서 실험용 필름 (Konica, Japan)으로 덮어 필름에 감광을 유도한 다음 자동현상기(QX-130II, Konica)를 이용하여 현상하였다. 현상된 필름상의 단백질양은 ImageJ (NIH, USA)를 이용하여 band intensity 차이를 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 밀싹 추출물의 항 노화 효능

3.1.1. HDF 세포에 대한 세포독성

HDF 세포에서 밀싹 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 50% 에탄올을 이용한 밀싹 추출물 5, 10, 20, 50, 100 mg/mL 의 농도로 처리하고, 48시간 배양하여 NR assay를 시행하여 세포 생존율을 측정하였다. 실험 결과 밀싹 추출물 5, 10, 20, 50 mg/mL 농도까지 90% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 100 mg/mL 에서 세포 생존율이 16% 감소함을 확인하였다. 이와 같은 결과로 본 연구에서는 밀싹 추출물이 HDF 세포에 대한 독성이 거의 나타나지 않는 것을 확인하였고, 추후 실험은 밀싹 추출물의 세포 생존율이 91% 이상인 50 mg/mL 농도 범위에서 세포 실험을 진행하였다(Fig. 1).

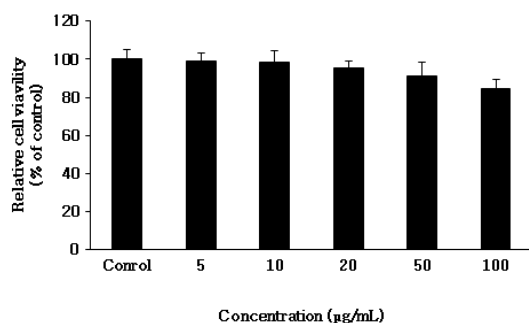


Fig. 1. Effects of wheat sprout extract on cell viability in HDF cells. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements.

3.1.2. HDF 세포에서 MMP-1 발현에 미치는 영향

HDF 세포에 대한 밀싹 추출물의 주름개선 효능을 확인하기 위하여 주름생성에 직접적으로 관여하는 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 발현 저해 효능을 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법을 이용하여 측정하였다. HDF 세포에 24시간 동안 처리한 후 배양 상층액을 사용하여 분비된 MMP-1의 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. HDF 세포에 50% 에탄올로 추출한 밀싹 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL 농도로 각각 처리한 후 UVB lamp를 이용하여 100 mJ/cm²의 강도로 조사하였다. 실험 결과 밀싹 추출물 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL 모든 농도에서

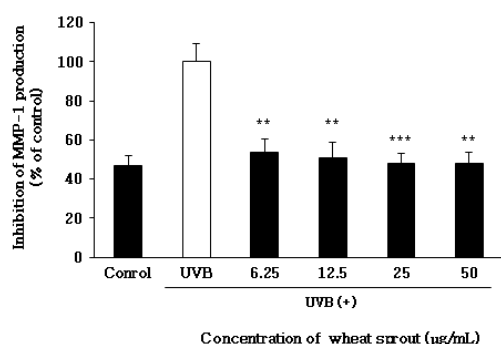


Fig. 2. Inhibitory effects of wheat sprout extract on UVB-induced secretion of MMP-1 in HDF cells. Result is represented as mean \pm SD. **p<0.01, ***p<0.001.

46.5%, 50%, 52.2%, 52%의 MMP-1의 발현이 유의하게 ($p<0.001$) 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 인체의 주름생성에는 MMP-1 효소가 매우 중요한 인자가 되며 따라서 MMP-1의 발현을 저해하는 화합물은 주름개선 화장품으로 효과가 있다는 것은 이미 많은 연구를 통해 알려져 있으나[28-31], 밀싹의 MMP-1 단백질 분비 억제에 관한 연구는 아직까지 보고된 바는 아직까지 없었으며, 본 연구를 통해 앞으로 밀싹을 이용한 항노화 화장품 신소재 개발에 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

3.1.3. 밀싹 추출물이 p-ERK, p-JNK 활성화에 미치는 영향

HDF 세포에 UVB가 조사되면 세포 내 DNA 손상 뿐 아니라 광노화 현상이 발생하며, HDF 세포의 광노화는 성장을 저해하며 MMP의 발현을 촉진하여 진피 층에 존재하는 콜라겐의 분해를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[32]. MMP의 발현은 UVB로 인해서 활성화되는 전사인자인 NF- κ B에 의하여 촉진되며, HDF 세포에 조사된 UVB는 ROS를 증가시켜 염증성 전사인자 NF- κ B를 활성화시키고, 활성화된 NF- κ B는 핵 내로 이동하여 MMP의 발현을 촉진하게 된다. NF- κ B 활성화에 중요한 영향을 미치는 MAPK는 세포 성장 및 분화, 세포 사멸 등의 다양한 세포 내 기전에 관여하며, 염증성 cytokine의 발현에서 필수적으로 작용하는 extracellular signal regulated kinase (p-ERK), p-JNK, p38을 포함하고 있다[33-34].

밀싹 추출물이 p-ERK와 p-JNK의 인산화를 통한 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 UVB 100 mJ/cm²가 조사된 HDF에 밀싹 추출물을 25, 50 mg/mL 농도로 각각 처리하여 MMP-1 유전자 발현에 관련 있다고 알려진 p-JNK와 p-ERK의 활성화 정도를 western blot analysis를 이용해 조사하였다. 실험 결과 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 UVB 조사 후 p-JNK와 p-ERK의 인산화가 증가된 것을 확인할 수 있었고, p-JNK의 발현 억제는 큰 변화가 없었으나, 저농도인 25 mg/mL의 처리에 의해서 p-ERK의 인산화가 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 밀싹 추출물이 HDF 세포에서 UVB에 의해 유도된 p-ERK의 인산화를 유의하게 억제함으로써 MMP-1 유전자의 발현을 저해한 것으로 사료된다.

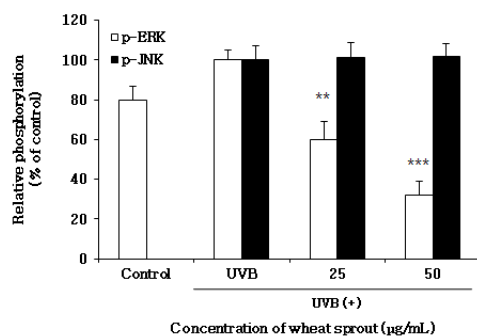
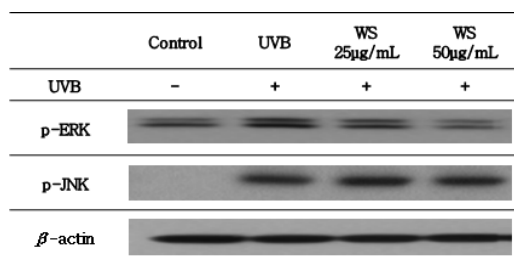


Fig. 3. Inhibitory effect of wheat sprout extract on UVB-induced activation of p-JNK and p-ERK in HDF cells. Result is represented as mean \pm SD. ** p <0.01, *** p <0.001, WS: wheat sprout extract.

3.2. 밀싹 추출물의 항 멜라닌 효과

3.2.1. B16F10 세포에 대한 세포독성

마우스 피부 유래 멜라닌 형성 세포인 B16F10 세포에 대한 밀싹 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 50% 에탄올을 이용한 밀싹 추출물 5, 10, 20, 50, 100 mg/mL의 농도로 처리하고, 48시간 배양하여 NR assay를 시행하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 밀싹 추출물 5, 10, 20, 50, 100 mg/mL 농도까지 90% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로 본 연구에서는 밀싹 추출물의 세포 생존율이 93% 이상인 50 mg/mL 농도 범위에서 세포 실험을 진행하였다(Fig. 4).

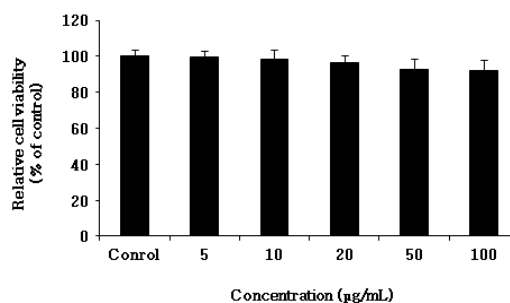


Fig. 4. Effect of wheat sprout extract on cell viability in B16F10 cells. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements.

3.2.2. B16F10 세포에 대한 멜라닌 생합성능 측정

α -MSH는 생체 내에서 다양한 생리적 기능에 관여하고 있는 호르몬으로서, 특히 염증이나 자외선에 의해 국소적으로 분비되어 멜라닌 세포를 자극하여 tyrosinase의 활성을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 실험을 통하여 밀싹 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하기 위해 α -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포에 밀싹 추출물을 농도별로 처리하여 멜라닌 생합성 억제능을 측정하였다(Fig. 5). α -MSH 10 nM을 처리한 B16F10 세포에 멜라닌 생성을 유도하고 동시에 50% 에탄올로 추출한 밀싹 추출물 6.25, 12.5, 25, 50 mg/mL 농도별로 처리한 후 positive control로 arbutin을 사용하여 멜라닌 세포에 의해 생산된 멜라닌 생성량을 비교하였다. 실험 결과 밀싹 추출물 50 mg/mL 농도에서 20%의 멜라닌 생합성 억제율을 확인하였으며, 저농도에서 멜라닌 생합성이 효과적으로 억제된 후 12.5 mg/mL 농도에서 멜라닌 생합성이 약간 증가하는 현상이 나타났으나 이후 농도 의존적으로 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하였다. 본 실험에 대조군으로 사용된 arbutin 100 mg/mL 농도에서 46%로 유의하게(p <0.01) 감소하였다. 하지만 본 실험에 사용된 농도를 비교해 보았을 때 밀싹 추출물에 비해 arbutin의 높은 농도로 실험에 사용되었기에 차이를 보이는 것으로 사료되며, B16F10 세포에 α -MSH를 처리한 negative control과 비교해 보았을 때 약 20% 미만으로 밀싹 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과는 다소 약한 것을 확인할 수

있었다.

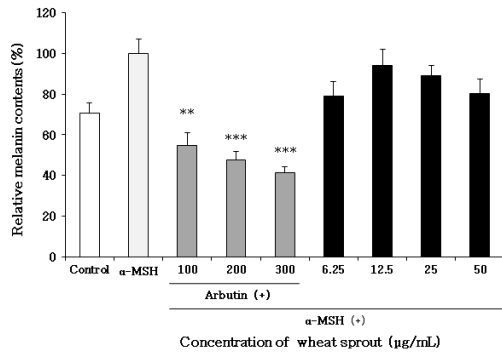


Fig. 5. Inhibition of melanin synthesis in B16F10 melanoma cells treated with wheat sprout extract. Result is represented as mean ± SD. **p<0.01, ***p<0.001.

3.2.3. 멜라닌 생성 단백질 MITF 및 Tyrosinase 발현에 미치는 영향

Tyrosinase는 자연계에 널리 분포하는 효소로 polyphenol oxidase에 속하며, 생체 내에서 두 가지의 다른 반응을 촉매한다. 하나는 tyrosine oxidase의 역할로서 monophenol 물질을 o-diphenol로 산화시키는 것이고, 다른 하나는 o-diphenol을 o-quinone으로 산화시키는 DOPA oxidase로서의 기능이다. Tyrosinase는 이러한 두 가지 기능 때문에 melanin polymer를 합성하는데 매우 중요한 역할을 하게 되며, tyrosinase의

활성 저해제를 찾는 것은 피부 melanin 생성 억제제를 개발함에 있어서 매우 큰 의미를 갖게 된다 [35-36]. 밀싹 추출물의 멜라닌 생성 저해 기작을 규명하기 위해 western blot을 이용하여 MITF와 tyrosinase 단백질 발현과 활성억제 효과를 확인하기 위하여 멜라닌 합성을 자극 호르몬인 α-MSH 10 nM을 멜라닌 형성세포인 B16F10 세포에 처리하였다. α-MSH를 처리 후 멜라닌 함량이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 밀싹 추출물을 25, 50 μg/mL의 농도별로 처리한 후 Western blot을 이용하여 MITF와 tyrosinase의 활성억제 효과를 Fig. 6에 나타내었다. 실험 결과 밀싹 추출물의 MITF 억제 효과는 큰 차이를 나타내지 않아 MITF와 tyrosinase 활성 억제에 대한 미백 효과는 약한 것으로 확인되었다.

4. 결론

본 연구는 밀싹 추출물에 대한 기능성 화장품 소재로서 다양한 생리활성효과를 검토하고자 하였다. 밀싹 추출물이 피부세포에 대한 활성을 보고자 세포독성, Melanin 생합성능, MMP-1 발현능을 통해 저해활성에 대한 작용기전 연구를 수행하여 다음과 같은 결과를 확인하였다.

1. HDF, B16F10 세포 총 2가지 세포에 대한 밀싹 추출물의 세포독성을 확인한 결과 0~100 mg/mL 농도까지 처리한 결과 모든 농도에서

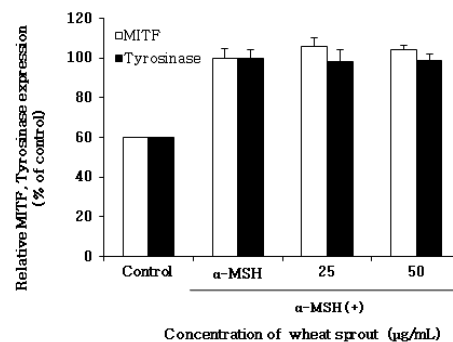
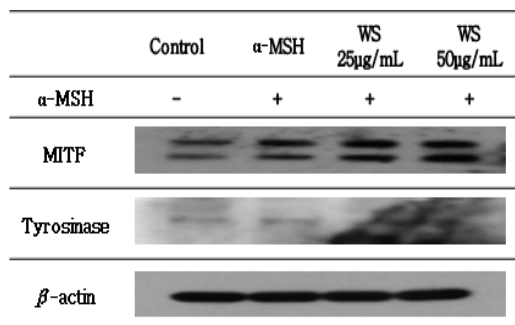


Fig. 6. Effect of wheat sprout extract on the MITF and tyrosinase expression in B16F10 melanoma cells. Result is represented as mean ± SD. ***p<0.001, α-MSH: α-melanocyte stimulating hormone, WS: wheat sprout extract.

유익한 세포독성이 나타나지 않았으며, 모든 세포의 50 mg/mL 농도까지 90% 이상의 높은 생존율을 확인하였다.

2. 밀싹 추출물이 멜라닌 생합성 억제능 실험 결과 B16F10 melanoma 세포에 α -MSH를 처리하여 멜라닌 생합성을 유도한 후 밀싹 추출물을 농도별로 처리한 결과 멜라닌의 생합성 억제효과, MITF, tyrosinase 활성 억제에 대한 밀싹 추출물의 효과는 약한 것으로 확인하였다.
3. HDF 세포에 대한 밀싹 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 밀싹 추출물이 저농도에서도 MMP-1 발현이 억제시키는 것으로 확인하였으며, MMP-1 발현에 관련 있다고 알려진 p-JNK와 p-ERK의 인산화를 확인한 결과, 밀싹 추출물은 저농도의 25 μ g/mL 농도에서 p-ERK 신호전달 경로를 통하여 MMP-1 발현이 억제되는 것을 확인하였다.

이상의 결과로부터 본 연구에서는 밀싹 추출물이 세포에 대한 독성이 적고, 자외선에 유도되는 MMP-1의 발현을 저해함으로써 피부의 광노화를 억제하는 효과를 통해 광노화에 의한 피부 주름과 자연 노화에 의한 피부 주름을 예방하는데 유의한 효과를 가질 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구는 밀싹 추출물의 기능성 화장품 소재로 사용 시 피부 노화 예방 관점에서의 기능성 화장품 소재로 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. T. H. Youm, H. B. Lim, Antimicrobial activities of organic extracts from fruit of thuja orientalis L, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **18(5)**, 315-322(2010).
2. E. J. Kim, J. Y. Choi, M. Y. Yu, M. Y. Kim, S. H. Kim and B. H. Lee, Total polyphenols, total flavonoid contents and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44(3)**, 337-342(2012).
3. J. W. Kim, J. K. Kim, I. S. Song, E. S. Kwon, K. S. Youn, Comparison of antioxidant and physiological properties of jerusalem artichoke leaves with different extraction processes. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.*, **42(1)**, 68-75 (2013).
4. J. H. Chung, V. N. Hanft, S. Kang, Aging and photoaging. *J. American Acad. Dermatol*, **49**, 690-697(2003).
5. J. Y. Bae, J. S. Choi, Y. J. Choi, S. Y. Shin, S. W. Kang, S. J. Han, Y. H. Kang, (-)Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase, *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 1298(2008).
6. G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. W. Kang, J. J. Voorhees, Molecularbasis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, **379**, 335(1996).
7. M. H. Shin, H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo, *J. Invest. Dermatol*, **125**, 221-229(2005).
8. C. Garrel, M. Fontecave, Nitric oxide, chemistry and biology, *analysis of free radicals in biological systems*, 21-35(1995).
9. N. HOGG, Pro-oxidant and antioxidant effects of nitric oxide. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, 37-49(1995).
10. G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. Kang, J. J. Voorhees, Molecular basis of sun induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, **379**, 335-339(1996).
11. E. M. Burke, W. E. Horton, J. D. Pearson, M. T. Crow, G. R. Martin, Altered transcriptional regulation of human interstitial collagenase in cultured skin fibroblasts from older donors, *Experimental gerontology*, **29**, 37-53 1994).
12. V. Bizot-Foulon, B. Bouchard, W.

- Hornebeck, L. Dubertret, B. Bertaux, Uncoordinate expressions of type I and III collagens, collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 along in vitro proliferative life span of human skin fibroblasts: Regulation by all-trans retinoic acid, *Cell biology international*, **19**, 129-136(1995).
13. W. Hornebeck, Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival, *Pathologie Biologie*, **51**, 569-573 (2003).
 14. S. Kondo, The roles of cytokines in photoaging, *Journal of Dermatological Science*, **23**, S30-S36(2000).
 15. S. Meyerowitz, Wheat grass nature's finest medicine the complete guide to using grasses to revitalize your health, *The Book Publishing Company*, Summertown (1999).
 16. B. K. Lee, Quality characteristics of sponge cake with added wheat and barley sprout, Master's thesis, Department of Food Engineering, *Seoultech University, Republic of Korea*, 1-51(2015).
 17. O. S. Aydos, A. Avcl, T. Ozkan, A. Karadag, E. Gurleyik, B. Altinok, A. Sunguroglu, Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheat grass (*Triticum aestivum L.*) extract on CML (k562) cell line. *Turk. J. Med. Sci.*, **41(4)**, 657-663(2011).
 18. I. Calzuola, F. Giavarini, P. Sassi, L. De Angelis, G. L. Gianfranceschi, V. Marsili, Short acidic peptides isolated from wheat sprout chromatin and involved in the control of cell proliferation: Characterization by infrared spectroscopy and mass spectrometry. *Peptides.*, **26(11)**, 2074-2085(2005).
 19. Y. L. Binta, K. Hiroshi, H. S. Lee, Y. K. Kang, J. Y. Park, M. Yang, Inhibition by wheat sprout (*Triticum aestivum*) juice of bisphenol A-induced oxidative stress in young women, *Mutat. Res.*, **724**, 64-68(2011).
 20. K. Singh, M. S. Pannu, P. Singh, J. Singh, Effect of wheat grass tablets on the frequency of blood transtusions in thalassemia major, *Indian J. Pediatr.*, **77(1)**, 90-91(2010).
 21. G. D. Falcioni, L. Fedeli, I. Tiano, L. Calzuola, Manclnelli, G. Gianfranceschi, Antioxidant activity of wheat sprout extract in vitro: inhibition of DNA oxidative damage, *J. Food Sci.*, **67(8)**, 2918-2922(2002).
 22. N. Okarter, Phenolic compounds from the insoluble-bound fraction of whole grains do not have any cellular antioxidant activity, *Life Sci. Med. Res.*, **LSMR-37**, 1(10), (2012).
 23. B. Tudek, B. Peryt, J. Miloszevska, T. Szymczyk, M. Przybyszewska, P. Janik, The effect of wheat sprout extract on benzo(a)pyrene and 7,2-dimethylbenz(a)anthracene activity, *Neoplasma.*, **35(5)**, 515-523(1998).
 24. G. Bar-Sela, M. Tsalic, G. Fried, H. Goldberg, Wheat grass juice may improve hematological toxicity related to chemotherapy in breast cancer patients: a pilot study, *Nutr. Cancer.*, **58(1)**, 43-48 (2007).
 25. R. K. Marawaha, D. Bansal, S. Kaur, A. Trehan, Wheat grass juice reduces transfusion requirement in patients with thalassemia major: a pilot study, *Indian Pediatr.*, **41(7)**, 716-720(2004).
 26. E. Borenfreund, J. A. Puerner, Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicol. Lett.*, **24(2)**, 119-124(1985).
 27. H. W. Lim, N. Y. Cho, M. Y. Yoon, S. B. Cha, K. W. Kim, Y. K. Park, J. Y. Lee, Effects of citrus essential oils melanin production in B16 melanima cell, *J. YakhakHoeji.*, **47**, 15-30(2003).
 28. M. Farwick, R. E. Watson, A. V. Rawlings, U. Wollenweber, P. Lersch, J. J. Bowden,

- Salicyloyl-phytosphingosine: a novel agent for the repair of photoaged skin, *Int J. Cosmet. Sci.*, **29(4)**, 319-329(2007).
29. Y. H. Kim, C. B. Chung, J. G. Kim, K. I. Ko, S. H. Park, J. H. Kim, S. Y. Eom, Y. S. Kim, Y. I. Hwang, K. H. Kim, Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71(2)**, 303-311(2008).
30. Y. H. Kim, K. H. Kim, C. S. Han, H. C. Yang, S. H. Park, H. I. Jang, J. W. Kim, Y. S. Choi, N. H. Lee, Anti-wrinkle activity of *Platycarya strobilacea* extract and its application as a cosmeceutical ingredient, *J. Cosmet. Sci.*, **61**, 211-214 (2010).
31. N. Maity, N. K. Nema, M. K. Abedy, B. K. Sarkar, P. K. Mukherjee, Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity, *J. Ethnopharmacol.*, **137(3)**, 1300-1305(2011).
32. Y. M. Yoon, Anti-photoaging effects of silibinin on human dermal fibroblasts, *Konkuk University*, (2012).
33. C. L. Manthey, S. W. Wang, S. D. Kinney, Z. Yao, SB202190, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, is a powerful regulator of LPS-induced mRNAs in monocytes, *J. Leukocyte Biol.*, **64(3)**, 409-417(1998).
34. L. Shapiro, C. A. Dinarello, Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92(26)**, 12230-12234(1995).
35. K. Ichiro, Development of recent melanin control agents and whitening cosmetics, *Fragrance J.*, **6(39)**, (1990).
36. T. Yasushi, Chemical function of melanin and its biological role in epidermis, *Fragrance J.*, **6(20)**, (1990).