

Anti-oxidant Function and Inhibitory Effects of the Expression of MITF, TRP-1, TRP-2 and Tyrosinase of *Sesamum indicum* L. in B16F10 Melanoma Cells

Dan-Hee Yoo, Da-Hye Joo and Jin-Young Lee*

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

Received October 13, 2016 / Revised February 10, 2017 / Accepted February 13, 2017

This study was performed to improve the antioxidant and skin-whitening activities of 70% ethanol extract from *Sesamum indicum* L. (SIL). The electron-donating ability of the SIL extract was 71.7% at a concentration of 1,000 µg/ml. The whitening effects that was measured by tyrosinase inhibition assay. As a result, SIL extract was shown 42% at 1,000 µg/ml concentration. The cell toxicity on B16F10 melanoma cells of SIL of 70% ethanol extract showed 84.3% at 1,000 µg/ml concentration. The microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) and Tyrosinase protein and mRNA expression inhibitory effect of SIL extract were measured by western blot and reverse transcription- polymerase chain reaction (PCR) at 50, 250, 500 µg/ml concentration. Consequently, the MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase protein expression inhibitory effect of SIL extract was decreased by 68.3%, 39.2%, 89.7%, 22.3%, respectively, at 500 µg/ml concentration. Moreover, MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase mRNA expression inhibitory effect by reverse-transcription-PCR of SIL extract was decreased by 81.8%, 66.5%, 84.2%, 68.1%, respectively, at 500 µg/ml concentration. Therefore, we excellently identified the antioxidant activities and whitening effect of SIL extract, and this finding suggested that SIL extract has great potential as a cosmetic ingredients.

Key words : Antioxidant activities, Microphthalmia-associated transcription factor, *Sesamum indicum* L., tyrosinase related protein-1, tyrosinase related protein-2, Tyrosinase

서 론

최근 현대인의 생활수준의 향상과 수명의 연장으로 미용에 대한 관심이 증가 되었고, 환경오염으로 인한 오존층의 파괴가 가속화되면서 자외선으로부터 깨끗한 피부와 미백에 대한 관심이 남성과 여성을 불문하고 높아지고 있다. 이러한 시대 관심에 따라 천연에서 유래한 소재로부터 유효성분을 추출하여 생리활성을 밝혀내고 미백 기능성 소재로서 활용하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다[8].

피부 미백에 대한 연구는 tyrosinase의 활성 억제, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) 산화 억제, 자외선 차단 등에 대해서 연구가 진행되고 있으며, keratinocyte에 있는 멜라닌의 양과 분포에 따라 피부색과 색소침착이 결정되므로 미백 효과를 검증하기 위해서는 멜라닌의 형성을 억제하는지를 확인하는 것이 중요하다[4]. 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이며, 인체

내에서 독성물질에 대한 제거 작용을 하여 세포를 보호하는 역할도 한다. 하지만 여러 외적인 요인으로 인한 멜라닌의 과잉 생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하여 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다. 멜라닌의 생성 기전은 멜라닌세포 내 소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA로 전환되고, 다시 tyrosinase에 의해 DOPA quinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌을 생성하게 된다[6, 7]. 대표적인 미백제인 알부틴은 강력한 미백효과가 있는 것으로 알려져 왔으나, 일부 부작용으로 인하여 천연 물질로부터 미백활성을 가지는 물질에 대한 개발과 연구가 진행되고 있다[20].

참깨(*Sesamum indicum* L.)는 참깨과(Pedaliaceae)의 1년생 초본식물로서 *Sesamum* 속은 30종 이상으로 분류되며 주요 재배종은 *Sesamum indicum* L.이다[14]. 참깨의 원산지는 고온 건조한 에티오피아와 인도로 추정되며, 아프리카에서 동쪽으로, 인도에서 서쪽으로 전파되었다[1]. 우리나라에서는 유지작물로 재배되어 왔으며, 깨소금 참기름 등으로 많이 이용되고 있다. 일반적인 참깨의 성분은 지질 44~58%, 단백질 18~25%, 탄수화물 13.5%, 회분 5%로 구성되어 있으며, 참깨에는 sesamol, sesamin, sesamolol, sesaminol과 같은 lignin 화합물이 함유되어 있어 체내에서 항산화 작용과 같은 생리활성을 보인다고 알려져 왔다[9, 10]. 또한 네팔에서는 전통적으로 신생아의 피부장벽형성에 참깨기름 마사지가 우수한 효과를 나타내

*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.

는 것으로 알려져 있고, 우리 한방에서는 참깨를 흑지마라 하여 피부 점막이 손상되었을 때 피부 재생 혹은 회복 촉진의 목적으로 이용되는 것으로 알려져 있다[16, 17]. 그러나 이에 대한 과학적으로 입증된 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 참깨 추출물을 이용하여 이 물질의 항산화 기능과 미백유전자인 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 발현을 억제하는 효과를 관찰하여 새로운 기능성 미백화장품 소재로서의 개발 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용한 참깨는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입하여 사용하였다. 참깨를 파쇄 후 참깨 300 g의 10배의 70% ethanol 3,000 ml 가하여 3시간 진탕 혼합하여 이후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 분리한 상등액은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 동결 건조기를 이용하여 완전히 건조된 참깨 에탄올 추출물 33.2g을 -20℃에 보관하여 사용하였다.

시약 및 기기

항산화 및 tyrosinase활성억제 측정에 사용된 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), tyrosinase mushroom, L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. 세포 독성 및 mRNA 발현억제 측정에 사용된 세포주는 melanoma cell인 B16F10을 ATCC (U.S.A)에서 구입하여 사용하였고, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. Tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), Tyrosinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), β -actin, primary anti body와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibody는 Santacruz (CA, U.S.A)에서 구입하였으며, microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 Abcam (U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 ELISA reader (Tecan, Austria), Image Quant LAS 4,000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), CO₂ incubator (vision scientific, Korea), pH meter (Mettler-Toledo AG, Swtzerland), centrifuge (Hanil Science Industrial Co. Korea), autoclave (JS Research Inc, Korea), Davinch-Chemi™ imager CAS-400SM System (Davinch-K Co, Korea), PCR (C-100, Bio-Rad. U.S.A), image-Quant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) 등을 사용하였다.

실험 방법

전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities) 측정 실험은 Blois의 방법[2]을 변형하여 시행하였다. 에탄올에 용해한 0.2 mM DPPH용액 60 μ l와 농도 별로 조제한 시료용액 120 μ l를 micro well plate에 넣어 실온에서 15분 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 60 μ l와 농도별 시료를 120 μ l를 넣고 혼합한 후 실온에서 15분간 방치한 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자 공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[22]에 따라 측정하였다. 반응구는 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 μ l에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 40 μ l 및 시료용액 40 μ l의 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase 40 μ l을 첨가하여 37℃에서 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 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37℃, 5% CO₂ incubator에 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[3]에 따라 시행하였다. Melanoma cell (B16F10)을 96 well plate에 1×10^5 cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 농도 별로 조제한 시료를 0.02 ml 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 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 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

멜라닌 생성에 관여하는 미백인자 중 microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase related protein 2 (TRP-2), Tyrosinase의 활성을 확인하기 위해 melanoma cell (B16F10)을 100 mm tissue culture dish에 1×10⁶ cells/well을 seeding한 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도 별로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척하였다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 protease & phosphatase inhibitor 1 tab을 가한 lysis buffer로 용해하여 4℃, 13,200 rpm에서 20분 간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액을 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였으며, 20 µl의 단백질을 10% SDS-PAGE사에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell 기기를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 1시간 배양하였다. 1차 항체를 희석하여 4℃에서 over night한 다음, 10분 간격으로 tris-buffered saline과 tween 20 (TBST)로 3회 washing하고 2차 항체를 1:2000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 다시 TBST로 3회 세척한 후 Davinchi-Chemi™ Imager CAS-400SM System를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

Melanoma cell (B16F10)을 100 mm culture dish에 1×10⁶ cells/well을 시딩하고 24시간 동안 배양한 후 샘플을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각 dish에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 µl를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 µl이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 4℃, 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거 한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각

튜브에 1 ml씩 분주하여 4℃, 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 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 µg/ml) 1 µl, 추출한 RNA (2 µg)와 nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75℃에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl₂, PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25℃에서 5분, 42℃에서 60분, 70℃에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

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 섞어 준 후 PCR을 실행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 94℃에서 30초, 55℃에서 45초, 72℃에서 45초(35 cycles), Tyrosinase는 94℃에서 30초, 60℃에서 45초, 72℃ 45초(40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94℃에서 30초, 58℃에서 45초, 72℃에서 45초(40 cycles)을 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.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance ANOVA)을 한 후 α=0.05 수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

Table 1. Sequence of the primers used for reverse transcription-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

결과 및 고찰

전자공여능 측정 결과

DPPH radical 소거 활성법은 항산화 활성 물질이 DPPH의 radical을 소거시켜 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 쉽게 측정하는 방법이다. DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 cysteine-glutathion과 같은 황 아미노산과 l-ascorbic acid·BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다[11].

참깨 추출물의 전자공여능을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 참깨 추출물의 경우 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가되는 것을 나타내었고, 1,000 µg/ml에서 71.7%의 활성을 나타내었다.

Tyrosinase 저해활성 측정 결과

멜라닌 생성에서 가장 중요한 역할을 하는 효소는 tyrosinase로서 melanosome 내의 tyrosine을 산화시켜 DOPA, DOPA quinone으로 바꾸고, 이들은 효소의 작용 및 자동 산화 반응에 의하여 DOPA chrome, indole carboxylic acid, indole quinone 등으로 대사되어 최종적으로 멜라닌 합성에 관여하게 된다[13]. 피부 내에서 melanin 중합체 생합성 억제효과를 측정하기 위해 참깨 추출물의 tyrosinase 활성 억제 정도를 측정하여 Fig. 2에 나타내었으며, 참깨 추출물의 경우 농도별로 증가하는 것으로 보였고, 1,000 µg/ml에서는 42%의 활성을 나타내었다.

Melanoma cell (B16F10)의 세포 독성 측정.

세포 독성을 확인하기 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 담황색의 기질로서 생 세포의 미토콘드리아 내의 호흡연쇄 효소에 의해 환원

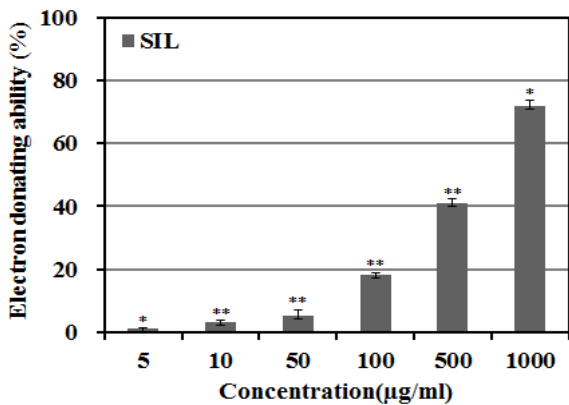


Fig. 1. Electron donating ability of *Sesamum indicum* L. extract. ■ SIL : *Sesamum indicum* L. extracted with 70% ethanol. Results are means ± S.D. of triplicate data. (Significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

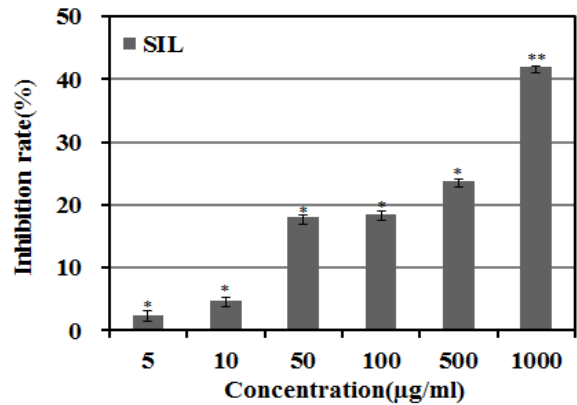


Fig. 2. Inhibition rate of *Sesamum indicum* L. extract on tyrosinase. ■ SIL : *Sesamum indicum* L. extracted with 70% ethanol. Results are means ± S.D. of triplicate data. (Significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

되어 암적색의 formazan을 생성한다. 죽은 세포에서는 반응이 일어나지 않으므로 이 formazan이 환원되는 정도를 측정하여 세포 생존율을 측정하였다[21].

참깨 에탄올 추출물의 melanoma cell (B16F10)의 MTT assay를 통한 세포 독성을 확인한 결과 Fig. 3와 같이 나타내었다. 참깨 추출물은 1,000 µg/ml 농도에서 84.3%의 높은 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 따라서 미백관련 신호전달인자의 측정은 90% 이상의 세포 생존율을 보이는 500 µg/ml 이하의 농도에서 실험을 실시하였다.

MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 단백질 발현 및 mRNA 발현억제효과 확인

멜라닌 합성은 아미노산의 하나인 tyrosine을 기질로 하여

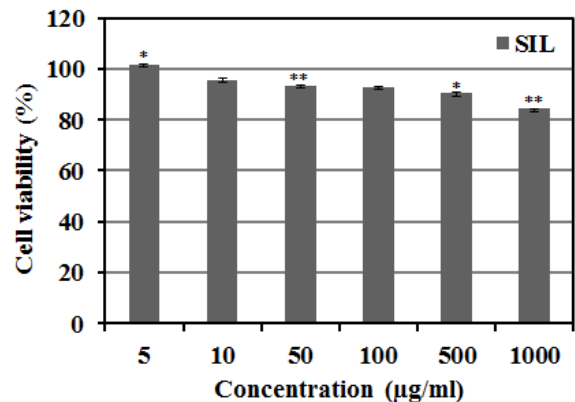


Fig. 3. Cell viability of extract from *Sesamum indicum* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^5 cells) were started in medium for 24 hr the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml of extracted *Sesamum indicum* L. for 24 hr. Each value represents mean ± SD of three individual experiments. (Significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

tyrosinase, TRP-1, TRP-2에 의해 DOPA를 거쳐 DOPA quinone으로 전환되고 비효소적 반응과 자발적 산화 과정을 거쳐 아미노산 혹은 단백질과의 중합 반응에 의해 멜라닌이 합성된다[19]. TRP-1과 TRP-2는 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 흑갈색으로 나타내는 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid (IQCA)로 전환시켜 최종적으로 멜라닌을 합성하며, 이들은 피부 미백제의 효능에 있어서 멜라닌의 생성을 억제하는 경로와 생성된 멜라닌의 분해를 촉진하는 단계에 관여하는 효소의 활성이 중요시 되고 있어 미백 효과 검증에 많이 연구되고 있다[12, 15]. 또한 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 뿐만 아니라 MITF 등과 같은 단백질을 이용하여 멜라닌 합성을 억제하는 연구가 이루어 지고 있다. 세포 내 신호전달 경로를 보면 cyclic monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) 경로로서, cAMP는 PKA, cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)을 경유하여 MITF의 발현을 촉진하고, MITF는 멜라닌 합성 과정 중에서 중요한 전사 조절 인자로 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다[5, 18].

본 연구에서는 참깨 추출물이 melanin 합성에 관련 있는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 MITF, TRP-1,

TRP-2, Tyrosinase의 단백질과 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하였다. mouse melanoma cell (B16F10)에 참깨 추출물을 농도별로 50, 250, 500 µg/ml 처리하여 24시간 뒤에 western blotting으로 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 발현 측정 결과를 Fig. 4와 같이 나타내었다. 이 때, 세포의 종류나 환경에서도 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β-actin을 positive control로서 사용하였다. 또한 비교군으로서 기존에 미백 화장품에 첨가물로서 사용하는 kojic acid 500 µg/ml를 사용하여 나타내었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 참깨 추출물을 50, 250, 500 µg/ml의 농도로 처리한 melanoma cell (B16F10)에서 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 단백질 발현이 농도가 높아짐에 따라서 억제됨을 확인하였으며, 500 µg/ml에서 각각 68.3%, 39.2%, 89.7%, 22.3%의 발현 억제를 보여주었다. 또한 MITF, TRP-1의 단백질 발현은 비교군인 kojic acid 500 µg/ml에 비해 감소한 것을 확인하였고, TRP-2, Tyrosinase은 kojic acid 500 µg/ml와 유사한 결과를 나타내어 우수한 억제 효과를 확인할 수 있었다.

또한 본 연구에서는 참깨 추출물이 melanin 합성에 관여하는 효소인 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 mRNA에 미치

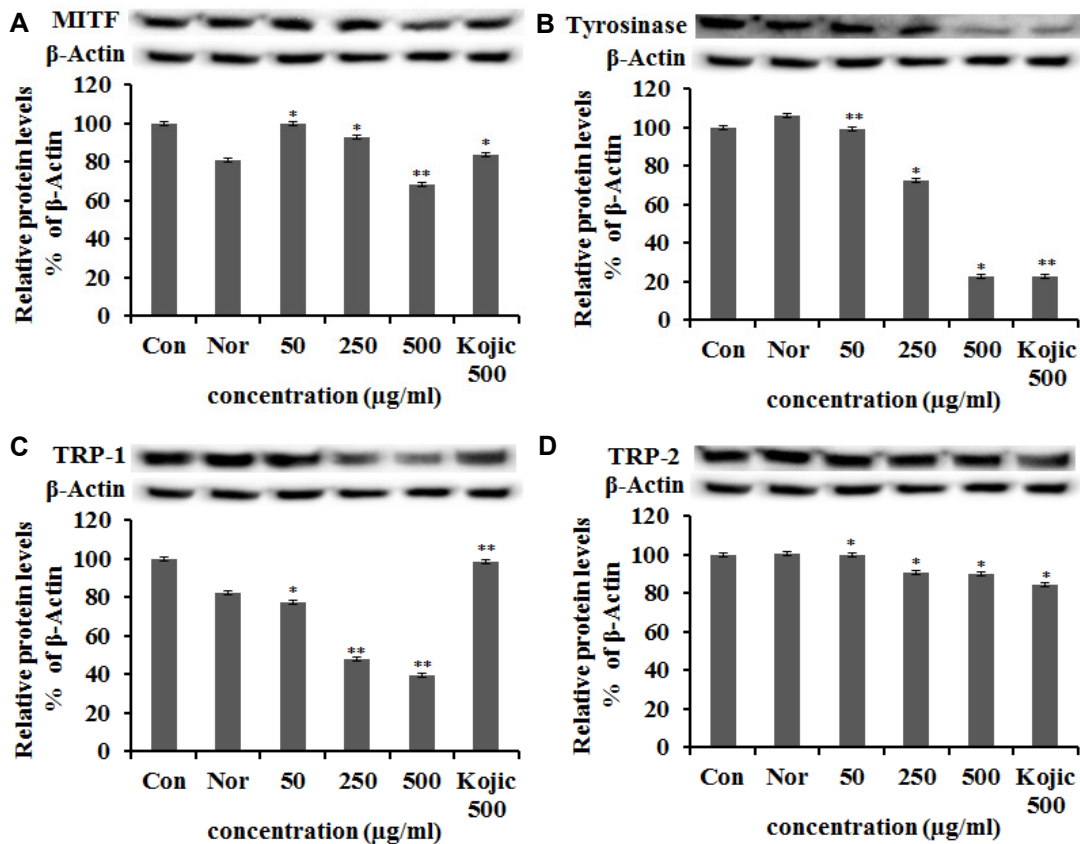


Fig. 4. MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase protein expression rate of extract from *Sesamum indicum* L. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 hr the cells were treated with 50, 250 and 500 µg/ml of extract of *Sesamum indicum* L. for 24 hr. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments. (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

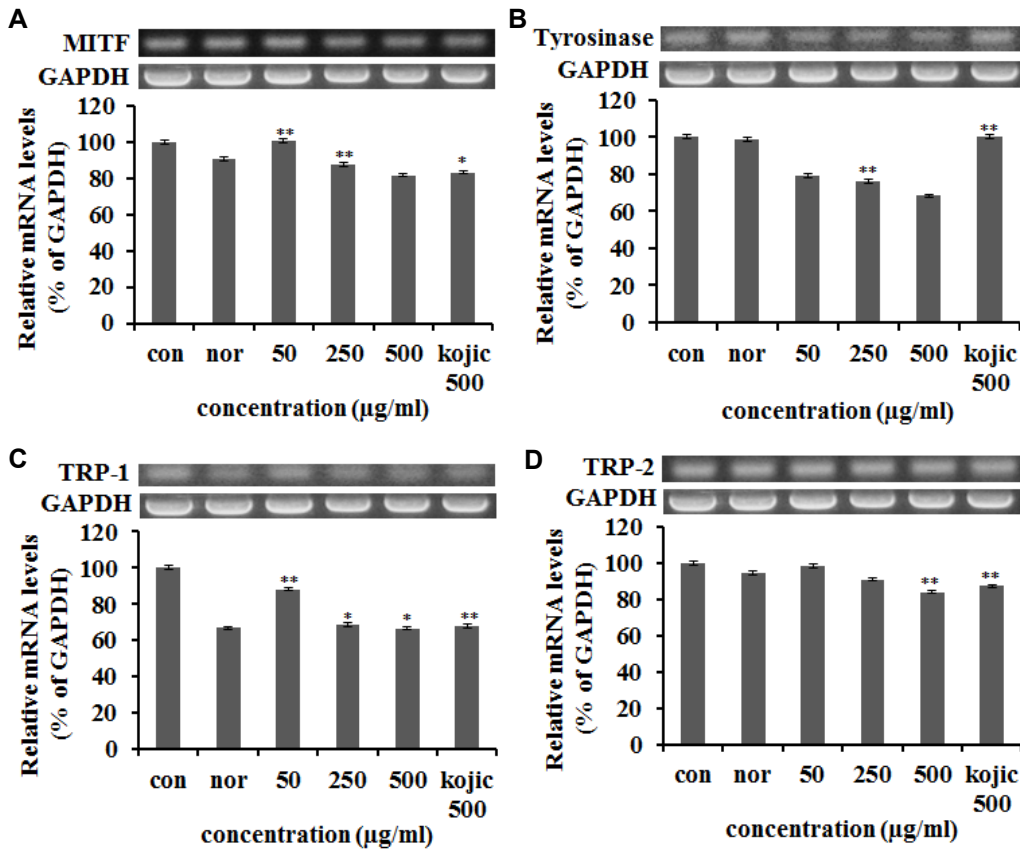


Fig. 5. MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA expression rate of extract from *Sesamum indicum L.* on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 hr the cells were treated with 50, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ of extract of *Sesamum indicum L.* for 24 hr. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments. (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

는 영향을 알아보기 위하여 melanoma cell (B16F10)에 50, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 샘플을 농도별로 처리한 후 24시간 뒤에 PCR으로 mRNA 발현량을 측정하여 Fig. 5과 같이 나타내었다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 housekeeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 참깨 추출물을 50, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 melanoma cell (B16F10)에서 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 mRNA 발현이 농도가 높아짐에 따라서 억제됨을 확인하였으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 81.8%, 66.5%, 84.2%, 68.1%의 발현 억제를 보여주었다. 또한 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 mRNA 발현은 비교군인 kojic acid 500 $\mu\text{g/ml}$ 에 비해 감소하거나, 유사한 결과를 나타내어 우수한 억제효과를 확인할 수 있었다.

본 논문에서는 참깨 추출물의 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 단백질 및 mRNA 발현을 측정하여 화장품 소재로의 활성을 검증하였고 유의한 결과를 얻을 수 있었다. 추후 Q-PCR을 실시하여 참깨 추출물의 활성을 좀 더 심도있게 검증한다면 우수한 화장품 소재로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

References

- Ashri, A. 1998. Sesame breeding. *Plant Breed. Rev.* **16**, 179-228.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1120.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Cho, J. H., Kim, H. J. and Kim, Y. B. 2003. The study on depigmentation effects of salt, acetum, sesami semen nigrum. *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **16**, 79-95.
- Han, G. S., Kim, D. S., Woo, W. H. and Mun, Y. J. 2010. Inhibitory effect of Fructus ligustri lucidi on tyrosinase and MITF expressions. *Kor. J. Ori. Physiol. Pathol.* **24**, 296-301.
- Hearing, V. J. 1999. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 24-28.
- Hwang, J. and Lee, B. M. 2007. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **70**, 393-407.

8. Jin, K. S., Oh, Y. N., Park, J. A., Lee, J. Y., Jin, S. J., Hyun, S. K., Hwang, H. J., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2012. Anti-oxidant, anti-melanogenic, and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* extract and its solvent fractions. *Ko. J. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 317-379.
9. Kamal Eldin, A. and Appelqvist, L. Å. 1994. Variation in fatty acid composition of the different acyl lipids in seed oils from four *Sesamum* species. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 135-139.
10. Kikugawa, K., Arai, M. and Kurechi, T. 1983. Participation of sesamol in stability of sesame oil. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1528-1533.
11. Kim, D. H., Moon, Y. S. and Son, J. H. 2015. Verification of anti-oxidative activity of *Aruncus dioicus*, a native plant of Ulleungdo. *J. Plant Biol.* **42**, 55-59.
12. Kim, H. H., Park, G. H., Park, K. S., Lee, J. Y., Kim, T. H. and An, B. J. 2010. The effects of *Aster glehni* Fr. Schm. Extracts on whitening and anti-wrinkle. *J. Life Sci.* **20**, 1034-1040.
13. Lin, C. B., Babiarz, L., Liebel, F., Roydon-Price, E., Kizoulis, M., Gendimenico, G. J., Fisher, D. E. and Seiberg, M. 2002. Modulation of microphthalmia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 1330-1340.
14. Makinde, F. M. and Akinoso, R. 2014. Comparison between the nutritional quality of flour obtained from raw, roasted and fermented sesame (*Sesamum indicum* L.) seed grown in Nigeria. *Acta. Sci. Pol. Technol. Aliment.* **13**, 309-319.
15. Mallick, S., Singh, S. K., Sarkar, C., Saha, B. and Bhadra, R. 2005. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins *in vitro*. *Pigment Cell Res.* **18**, 25-33.
16. Mullany, L. C., Darmstradt, G. L., Khattry, S. K. and Tittsch, J. M. 2005. Traditional massage of newborns in Nepal: implications for trials of improved practice. *J. Trop. Pediatr.* **51**, 82-86.
17. Park, C. G. 2002. Korean Oriental Medicine special lecture, Jipmoondang, Korea.
18. Park, S. H., Kim, A. H., Park, B. J. and Kim, J. J. 2013. Whitening effect of Biochanin A. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **39**, 289-294.
19. 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. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **42**, 750-754.
20. Son, H. U., Lee, S. H., Kim, M. A., Parl, H. J. and Lee, S. H. 2012. Comparison of melanogenesis-inhibiting activity by extracts of *Prunus persica* flower and Calyx. *Kor. J. Food Preserv.* **19**, 946-950.
21. 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.
22. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.

초록 : 참깨 추출물의 항산화 활성 및 melanoma cell (B16F10)에서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 발현 저해

유단희 · 주다혜 · 이진영*

(호서대학교 한방화장품과학과)

본 연구는 참깨 70% 에탄올 추출물의 항산화 효과와 미백효과를 검증하여 나타내었다. 참깨 추출물의 전자공여능 측정실험은 1,000 µg/ml에서 71.7%의 효과를 나타냈으며, tyrosinase 저해활성 측정은 1,000 µg/ml의 농도에서 42%의 효과를 보였다. 참깨 추출물의 세포 생존율을 melanoma cell (B16F10)에서 확인하기 위하여 MTT assay를 진행하였으며, 세포 생존율을 측정한 결과, 1,000 µg/ml 농도에서 84.3%의 독성을 보였다. 이하의 세포실험에서는 세포 생존율이 90% 이상되는 농도인 500 µg/ml 이하에서 실험을 진행하였다. 참깨 추출물의 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현 효과를 50, 250, 500 µg/ml 농도에서 측정하였으며, 그 결과 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 각각 500 µg/ml 농도에서 68.3%, 39.2%, 89.7%, 22.3%의 단백질 발현 억제 효과를 보였다. 또한, MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA발현을 RT-PCR로 50, 250, 500 µg/ml 농도에서 측정하였고, 양성 대조군으로 GAPDH를 사용하였다. 그 결과, 참깨 추출물의 500 µg/ml 농도에서 각각 81.8%, 66.5%, 84.2%, 68.1%의 mRNA 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 참깨 추출물의 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.