

Inhibitory Effects of *Polyopes affinis* Ethanol Extract on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells

Hyang Suk Kim¹, Yung Hyun Choi^{2,3} and Hye Jin Hwang^{1*}

¹Department of Food and Nutrition, Dongeui University, Busan 47340, Korea

²Anti-aging Research center, Dongeui University, Busan 47340, Korea

³Department of Oriental Medicine Dongeui University, Busan 47227, Korea

Received July 24, 2019 / Revised August 5, 2019 / Accepted August 16, 2019

Polyopes affinis is a kind of red algae found in the South coast and near Jeju Island of Korea. The purpose of this study was to investigate the effects of *Polyopes affinis* ethanol extract (PAEE) on melanogenesis in α -MSH stimulated B16F10 melanoma cells. Melanoma cells were cultured for 72 hr treated with PAEE. Total melanin content and the activity of tyrosinase, a key enzyme in melanogenesis, were measured. When the melanin content in B16F10 melanoma cells was tested, PAEE was decreased in a dose-dependent manner: treatment with 100, 300, and 500 μ g/ml caused 25%, 30%, and 35% reduction, respectively. Treatment of 100, 300, and 500 μ g/ml of PAEE caused 6%, 12%, and 21% reduction of tyrosinase activities in B16F10 melanoma cells. Also, PAEE suppressed the expression of tyrosinase, tyrosinase-related protein-1, tyrosinase-related protein-2, and melanocyte-inducing transcription factor in B16F10 melanoma cells. A concentration of 500 μ g/ml of PAEE showed a greater decrease in tyrosinase activity, melanin content, and melanogenic enzyme protein expression. These results indicate that PAEE inhibits melanin synthesis and tyrosinase activity, and *Polyopes affinis* ethanol extract could be used as a functional whitening agent.

Key words : Melanogenesis, *Polyopes affinis*, tyrosinase, whitening agent

서 론

멜라닌은 동식물계에 널리 존재하는 고분자의 천연색소로서 자외선 조사 등에 의한 피부손상에 대항하는 기작으로 생합성이 촉진된다[22]. 그러나 멜라닌이 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지면 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 등과 같은 다양한 색소 침착으로 나타난다[8].

멜라닌 생성은 멜라닌 세포(melanocyte) 내의 멜라노솜(melanosome)에서 단계적인 효소의 작용을 통해 이루어지는데 이 때 tyrosinase가 중요한 역할을 한다. Tyrosinase는 tyrosine hydroxylase에 의하여 tyrosine으로부터 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPAquinone으로 전환되고 효소적 자동산화반응으로 DOPAchrome을 거쳐 멜라닌을 생합성한다[1, 2]. 이 과정은 tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 효소의 작용에 의해

조절된다. 멜라닌은 갈색과 검은색을 띠는 유멜라닌(eumelanin)과 적색과 황색을 띠는 페오멜라닌(pheomelanin)이 있는데, tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 멜라닌 합성에 필요하며, TRP-1과 TRP-2는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다. 생성된 멜라닌은 각질형성 세포(keratinocyte)에 전달되는 과정을 거친 후 표피에 색을 드러내게 되는데, 이 때 분포하는 멜라닌 색소의 유형과 분포에 따라 피부 색이 결정된다[4, 8].

최근 여성뿐만 아니라 남성들도 외모에 대한 관심이 증가하면서 미백 기능성 제품에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있으며, 특히 안정적이고 효과적인 소재인 천연물을 활용한 제품개발이 급속히 진행되고 있다. 다양한 천연물 중에 해조류는 피부 건강 기능성을 지니는 유용한 생리활성물질이 풍부한 자원으로 여겨져 왔다. 해조류 유래 기능성 소재는 항산화, 항암, 항노화, 항염증, 미백과 같은 다양한 피부 건강 기능성을 가지는 것으로 보고되어 왔으며 이는 해조류 유래 다당류에 의한 것으로 알려졌다[3, 15]. 갈조류 유래 다당인 라미나란(laminaran)과 후코이단(fucoidan) 그리고 점성, 보수력이 뛰어난 홍조류 유래 다당인 카라기난(carrageenan)에 대한 연구가 많이 보고되어 있다[19-21].

참까막살(*Polyopes affinis*)은 조간대 바위에서 주로 자라는 식용 가능한 홍조류이며, 우리나라에서 주로 남해안이나 제주도에서 서식하고 있다. 참까막살에 대한 연구는 알레르기성 천식 억제[14], 아토피성 알레르기 반응 조절 효과[16], 항염증

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1594, Fax : +82-51-890-2646

E-mail : hhj2001@deu.ac.kr

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.

효과[11, 13], 항산화 활성[7], 각질형성세포에 대한 광보호 효과[10]에 대해 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 참깨막살 추출물의 생리활성물질이 미백 기능성 소재로의 활용 가능성을 검토하기 위해 α -MSH 자극에 의해 유도된 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성 및 멜라닌 합성 관련 단백질에 대한 영향을 확인하기 위하여 western blot으로 미백관련 전사인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase 발현을 조사하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용된 참깨막살 에탄올 추출물(*Polyopes affinis* ethanol extracts, PAEE)은 제주 유용생물자원추출물은행(Jeju Bio-Resource Extract Bank, Jeju, Korea)에서 구입하여 이용하였다.

세포주 및 세포 배양

한국 세포주은행에서 B16F10 mouse melanoma cell을 분양받아 10% FBS (fetal bovine serum, WELGENE, Daegu, Korea)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL)이 첨가된 DMEM (WELGENE, Daegu, Korea)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 배양한 B16F10 세포를 trypsin (Hyclone, Utah, USA)을 이용하여 적정수의 세포를 유지하였다.

시약 및 항체

단백질 분석을 위하여 사용된 Tyrosinase, MITF, TRP1, TRP2 및 actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Cell Signaling Technology (Beverly, Ma, USA)에서 구입하였다. Immunoblotting을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Life Science Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다. α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH)과 L-DOPA는 Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포생존능(cell viability)의 측정

세포 배양용 6 well plate에 B16F10 melanoma 세포를 3×10^4 /ml로 분주하여 참깨막살 에탄올 추출물을 각 well 당 적정농도로 처리하였다. 72시간 후 희석된 0.5 mg/ml 농도의 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 200 μ l씩 분주하고 2시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 배지와 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 DMSO를 2 ml씩 분주하여 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 μ l씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular

Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포에 대한 독성은 각각의 대조군의 평균 흡광도 값을 구하여 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

멜라닌 생성 저해 활성 측정

B16F10 세포에 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)와 참깨막살 에탄올 추출물을 함께 처리하여 3일간 배양하고 세포를 수거하여 phosphate-buffered saline (PBS)로 2번 세척하였다. 그 후에 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Amersco, Solon, Ohio, USA)가 함유된 1 N NaOH를 적정량 넣고 80°C에서 1시간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포내 tyrosinase 저해 활성 측정

B16F10 세포에 α -MSH와 참깨막살 에탄올 추출물을 함께 처리하여 3일간 배양하고 세포를 수거하여 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1 M PMSF)를 첨가하여 1시간 얼음에서 반응시켜 세포들을 용해시킨 후 원심 분리하여 상층액을 수집하였다. 수집한 단백질을 정량한 후 L-DOPA (mg/ml)을 첨가한 뒤 37°C에서 반응시키고 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하면서 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis에 의한 단백질 발현의 분석

동일한 방법으로 준비된 B16F10 mouse melanoma cell에 적당량의 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1 M PMSF)를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액에 있는 총 단백질을 분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 동량의 sample을 sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, PVDF membrane (Bio-Rad, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시켰다. 분리된 단백질이 전이된 PVDF membrane을 5% skim milk를 처리하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 1차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:1,000으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 반응이 끝난 후 암실에서 Enhanced Chemiluminescence (ECL) solution (Amersham Life Science Corp.)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

Statistical analysis

모든 실험 결과는 Statistical Package for the Social Sciences

(SPSS) 통계 프로그램을 이용하여 평균(mean)±표준편차(S.D.)로 나타냈다. 각 실험군의 분석 항목별 통계의 유의성은 Duncan's multiple range test 를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

참까막살 에탄올 추출물이 B16F10 melanoma cell 생존율에 미치는 영향

세포 생존율을 측정하는 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석은 노란색을 띠는 수용성 물질로서 미토콘드리아의 reductase에 의해 물에 녹지 않는 암청색의 formazan의 형태로 변형된다. 미토콘드리아의 reductase는 살아있는 세포에 존재하므로 세포에 MTT 시약을 처리할 경우 생성되는 formazan의 양은 살아있는 세포의 양에 비례해서 변화량은 흡광도를 측정함으로써 정량화할 수 있다[5].

참까막살 에탄올 추출물이 melanoma cell 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포독성을 측정한 결과 100 µg/ml~500 µg/ml의 농도에서 80% 이상의 생존율을 보였다. 따라서 생존율 및 증식에 큰 영향을 미치지 않는다고 판단하여 500 µg/ml 농도까지를 실험 조건으로 설정하였다(Fig. 1).

참까막살 에탄올 추출물이 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 영향

Tyrosinase는 피부 내 멜라닌 생성에 매우 중요한 역할을 하는데, tyrosine에서 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyl-Phenylalanine), L-DOPA에서 dopaquinone으로 전환되는 일련의 과정에서 촉매작용을 통해 멜라닌 합성의 초기단계에 관여한다[18]. 멜라닌 합성 과정에서 핵심 역할을 하는 효소인 tyrosinase의

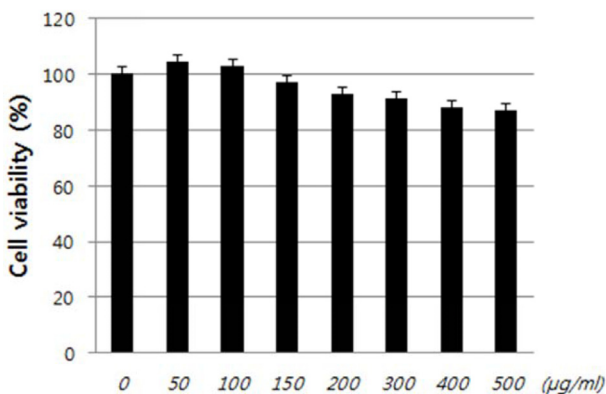


Fig. 1. Effect of *Polyopes affinis* ethanol extract on the cell viability in B16F10 melanoma cell by the MTT assay. B16F10 cells were cultured with *Polyopes affinis* ethanol extract for 72 hr. Data were expressed as percentage of control. Con; *Polyopes affinis* ethanol extract 0 µg/ml.

저해 활성을 알아보기 위해 참까막살 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 tyrosinase의 활성을 측정하였다. 참까막살 에탄올 추출물을 100, 300, 500 µg/ml의 농도별로 각각 처리한 결과 α-MSH만 처리한 것에 비해 6%, 12%, 21%로 농도 의존적으로 감소하는 효과를 보였다(Fig. 2).

참까막살 에탄올 추출물이 B16F10 melanoma cell의 Melanin 생성에 미치는 영향

피부의 keratinocyte가 자외선에 노출되면 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH), adrenocorticotropic hormone (ACTH) 등의 신호전달물질을 melanocyte로 분비하게 된다 [9]. 멜라닌 세포의 melanocortin type 1 receptor (MC1R)에서는 이러한 자극을 받아들여 melanocyte에서 cyclic adenosine monophosphate/ protein kinase A (cAMPK)경로에 의해 멜라닌이 합성된다[6]. 멜라닌 생성 유도 물질인 α-MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 조직에서 분비되며, 멜라닌 합성에 있어서 tyrosinase의 활성을 촉진시켜 tyrosine을 DOPA로 DOPA를 DOPAquinone으로 전환시키는 것을 촉진시킬 뿐만 아니라 eumelanin을 형성하는 단계에서 반응속도를 증가시킨다[12].

참까막살 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 합성된 멜라닌의 양을 측정한 결과를 Fig. 3에 제시하였다. MTT assay 결과를 참고하여 멜라닌 생성량 측정 실험과 동일한 농도 범위에서 실험을 진행하였다. 멜라닌 생성은 대조군에 비하여 α-MSH만 처리한 경우 뚜렷하게 증가하였고, 참까막살 에탄올 추출물을 100, 300, 500 µg/ml의 농도로 각각 처리한 결과 α-MSH만을 처리한 것에 비해 25%, 30%, 35%로 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서 참까막살 에탄올 추출물은 α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생성 억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

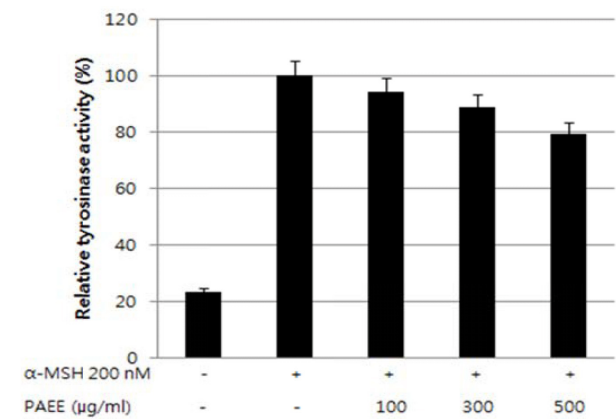


Fig. 2. Effect of *Polyopes affinis* ethanol extract on tyrosinase activity in B16F10 cells. Cells were treated with 200 nM α-MSH in presence or absence of *Polyopes affinis* ethanol extract at the indicated concentrations for 72 hr. Tyrosinase activity was measured by absorbance at 475 nm.

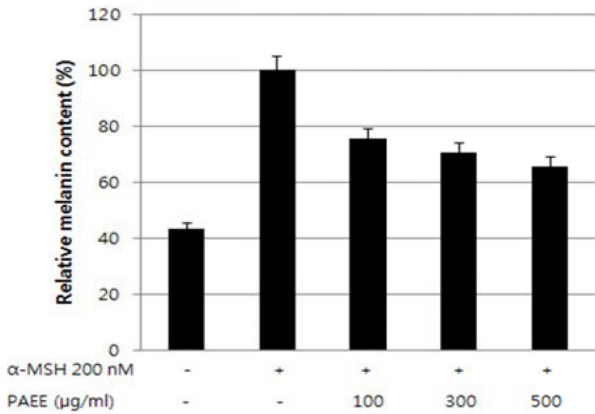


Fig. 3. Effect of *Polyopes affinis* ethanol extract on cellular melanin synthesis in B16F10 cells. Cells were treated with 200 nM α-MSH in presence or absence of *Polyopes affinis* ethanol extract at the indicated concentrations for 72 hr. melanin content was measured by absorbance at 405 nm.

참깨막살 에탄올 추출물이 멜라닌 합성 관련 효소의 단백질 발현량에 미치는 영향

참깨막살 에탄올 추출물이 α-MSH 자극에 의해 유도된 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 억제 시키는 것을 확인한 후 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에 대해 영향을 확인하기 위하여 미백관련 전사인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase 발현을 Western blot으로 분석하였다. Melanin 형성의 조절인자로 잘 알려진 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 tyrosinase 및 TRPs의 M-box sequences에 결합하여

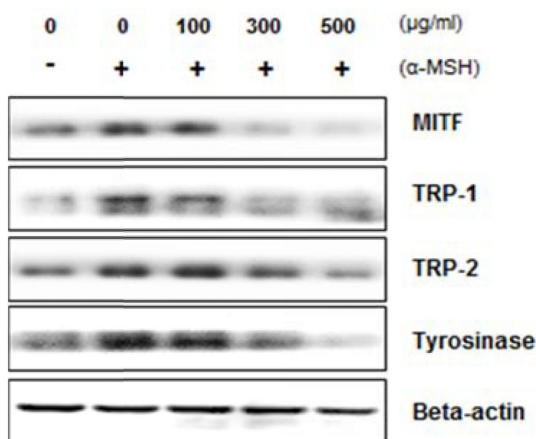


Fig. 4. Western blot analysis of the expression of MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase in B16F10 melanoma cells. β-actin was served as a loading control. Cells were treated with 200 nM α-MSH in presence or absence of *Polyopes affinis* ethanol extract. Cells were lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using an ECL detection system.

멜라닌 형성에 관여하는 효소들의 발현을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다[17]. MITF의 억제는 tyrosinase의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다[18]. Fig. 4에 나타난 결과를 보면, B16F10 melanoma cell에 α-MSH을 단독 처리한 경우 각 단백질의 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 참깨막살 에탄올 추출물을 처리한 경우 멜라닌 생합성에 관여하는 효소인 MITF, tyrosinase와 TRP-1 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 500 µg/ml의 농도에서는 매우 뚜렷하게 억제되는 것을 확인하였다. 본 실험결과 참깨막살 에탄올 추출물은 MITF, tyrosinase와 TRP-1과 TRP-2에 의한 멜라닌 생성을 일으키는 단백질의 발현을 억제하여 멜라닌 합성을 억제함을 확인하였고 향후 기능성 미백 화장품 소재로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2019년 동의대학교 교내연구비(201902090001)에 의해 연구되었음.

References

- 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.
- Briganti, S., Camera, E. and Picardo, M. 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**, 101-110.
- Chu, W. L., Thevanayagam, H. and Mohamed, S. M. 2013. Assessment of UVB-photoprotective and antioxidative activities of carrageenan in keratinocytes. *J. Appl. Phycol.* **26**, 1813-1821.
- Cui, R., Widlund, H. R., Feige, E., Lin, J. Y., Wilensky, D. L., Igras, V. E., D'Orazio, J., Fung, C. Y., Schanbacher, C. F., Granter, S. R. and Fisher, D. E. 2007. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* **128**, 853-864.
- Gross, J. and Lapiere, C. M. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **48**, 1014-1022.
- Han, S. B., Kwon, S. S., Kong, B. J., Kim, K. J. and Park, S. N. 2013. Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of the unripened fruit extract of *Rubus coreanus* Miquel. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **39**, 295-302.
- Heo, S. J., Cha, S. H., Lee, K. W. and Jeon, Y. J. 2006. Antioxidant activities of red algae from Jeju Island. *Algae* **21**, 149-156.
- Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Mitchell, D. L. 1997. Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**, 158-161.
- Hunt, G., Todd, C., Cresswell, J. E. and Thody, A. J. 1994. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activ-

- ity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell. Sci.* **107**, 205-216.
10. Hyun, Y. J., Piao, M. J., Kim, K. C., Zheng, J., Yao, C. W., Cha, J. W., Kang, H. K., Yoo, E. S., Koh, Y. S., Lee, N. H., Ko, M. H. and Hyun, J. W. 2014. Photoprotective effect of a *Polyopes affinis* (Harvey) Kawaguchi and Wang (Halymeniaceae)-derived ethanol extract on human keratinocytes. *Trop. J. Pharm. Res.* **13**, 863-871.
 11. Jayasooriya, RGPT., Jang, Y. J., Kang, C. H., Dilshara, M. G., Moon, D. O., Nam, T. J., Choi, Y. H. and Kim, G. Y. 2013. Inhibition of nitric oxide and prostaglandin E2 expression by methanol extract of *Polyopes affinis* in lipopolysaccharide-stimulated BV2 Microglial cells through suppression of Akt-dependent NF- κ B activity and MAPK pathway. *Trop. J. Pharm. Res.* **12**, 63-70.
 12. Jin, Y. H., Lee, S. J., Chung, M. H., Park, J. H., Park, Y. I., Cho, T. H. and Lee, S. K. 1999. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *J. Arch. Pharm. Res.* **22**, 232-238.
 13. Kim, M. J., Kim, K. B. W. R., Park, S. H., Park, S. Y., Choi, H. D., Choi, J. S., Jang, M. R., Im, M. H. and Ahn, D. H. 2017. Anti-Inflammatory effect of ethanolic extract from *Polyopes affinis* through suppression of NF- κ B and MAPK activation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **46**, 537-544
 14. Lee, D. S., Park, W. S., Heo, S. J., Cha, S. H., Kim, D., Jeon, Y. J., Park, S. G., Seo, S. K., Choi, J. S., Park, S. J., Shim, E. B., Choi, I. W. and Jung, W. K. 2011. *Polyopes affinis* alleviates airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *J. Biosci.* **36**, 869-877.
 15. Marudhupandi, T., Kumar, T. T., Senthil, S. L. and Devi, K. N. 2014. *In vitro* antioxidant properties of fucoidan fractions from *Sargassum tenerrimum*. *Pak. J. Biol. Sci.* **17**, 402-407.
 16. Na, H. J., Moon, P. D., Lee, H. J., Kim, H. R., Chae, H. J., Shin, T., Seo, Y., Hong, S. H. and Kim, H. M. 2005. Regulatory effect of atopic allergic reaction by *Carpopeltis affinis*. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 43-48.
 17. 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. Kor. Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **20**, 1-13.
 18. Prota, G. 1995. The chemistry of melanins and melanogenesis. *Fortschr. Chem. Orga. Naturst.* **64**, 93-148.
 19. Ruperez, P., Ahrazem, O. and Leal, J. A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 840-845.
 20. Wang, J., Wang, F., Zhang, Q. B., Zhang, Z. S., Shi, X. L. and Li, P. C. 2009. Synthesized different derivatives of low molecular fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity *in vitro*. *Int. J. Biol. Macromol.* **44**, 379-384.
 21. Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z. and Li, Z. 2008. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **42**, 127-132.
 22. Yoneta, A., Yamashita, T., Jin, Y. H., Kondo, S. and Jimbow, K. 2004. Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma (FAMMM) patients. *Melanoma Res.* **14**, 387-394.

초록 : 참깨막살 에탄올 추출물이 B16F10 흑색종 세포에서의 멜라닌합성에 미치는 영향연구

김향숙¹ · 최영현^{2,3} · 황혜진^{1*}

(¹동의대학교 식품영양학과, ²동의대학교 항노화연구소, ³동의대학교 한의학과)

본 연구는 참깨막살 에탄올 추출물이 천연 미백 소재로의 가능성을 알아보기 위해 멜라닌 합량, 세포내 tyrosinase 활성 측정 및 Western blotting 실험이 수행되었다. 참깨막살 에탄올 추출물의 농도에 따른 MTT assay를 통해 세포 생존율 및 증식에 큰 영향을 미치지 않는 500 μ g/ml 농도까지를 실험 조건으로 설정하였다. B16F10 melanoma cell의 melanin 생성에 미치는 영향을 측정된 결과 대조군에 비하여 α -MSH만 처리한 경우 뚜렷하게 증가하였고, 참깨막살 에탄올 추출물을 100, 300, 500 μ g/ml의 농도로 각각 처리한 결과 α -MSH만을 처리한 것에 비해 25%, 30%, 35%로 농도 의존적으로 감소하였다. Tyrosinase 활성도 100, 300, 500 μ g/ml의 농도로 처리한 결과 α -MSH만을 처리한 것에 비해 6%, 12%, 21%로 감소하였다. 참깨막살 에탄올 추출물의 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에 대한 영향을 확인하기 위하여 Western blot으로 미백관련 전사인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase 발현을 조사하였다. α -MSH를 단독 처리한 경우에 각 단백질의 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었고 반면 참깨막살 에탄올 추출물을 처리한 경우 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났으며 특히 500 μ g/ml의 농도에서 매우 효과적으로 억제되었다. 본 연구 결과 참깨막살 에탄올 추출물은 멜라닌 생합성에 관련된 유전자인 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase의 발현을 억제하는 것으로 나타나, 향후 기능성 화장품 개발에 있어 효과적인 미백 기능성 해양 소재로 활용될 것으로 기대된다.