약학회지 제41권 제4호 518~523(1997)
Yakhak Hoeji Vol. 41, No. 4

수종 생약의 티로시나제 억제효과

박정일# · 신영근 · 신언경 · 백선경* · 이승기 · 정명희** · 박영인*#
서울대학교 약학대학, *고려대학교 생명공학원, **서울대학교 의과대학
(Received June 5, 1997)

Tyrosinase Inhibition Activity of Some Herbal Drugs

Jeong Hill Park#, Young Geun Shin, Un Kyung Shin, Sun Kyung Baek*
Seung Ki Lee, Myung Hee Chung** and Young In Park*#
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742
**Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701*
***College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea*

Abstract—To isolate biologically active compounds which exhibit tyrosinase inhibition activity and ultimately express skin whitening effect, 14 oriental herbal drugs were screened in terms of tyrosinase inhibition. For this purpose, *in vitro* enzyme assay system for tyrosinase, so called Pomerantz method with some modifications has been established. Crude methanolic extracts from 14 herbal drugs were made and examined for their inhibitory activity against tyrosinase. Those extracts from *Cnidii Rhizoma, Arecae Semen, Caryophylli Flos*, and *Ephedrae Herba* showed strong inhibitory activities on mushroom tyrosinase. Therefore, crude methanolic extracts from those 4 herbal drugs were further fractionated using ether, butanol and water, respectively. The ether and n-butanol extracts from *Arecae Semen* and the n-butanol and water extracts from *Caryophylli Flos*, respectively, showed relatively strong tyrosinase inhibitory activity compared to arbutin.

Keywords □ Whitening effect, tyrosinase inhibition, herbal drugs.

경제 개발에 의한 지구환경의 지속적 파괴는 많은 문제들을 표면화하고 있는데 그 중에서도 화석원료와 냉매가스의 다량 사용에 따른 대기권의 오존층 파괴는 날로 심화되어 심각한 수준에 이르고 있다. 특히 오존층의 파괴는 지상에 도달하는 자외선의 조사량을 증가시키는 결과를 유발하는데 자외선은 피부 반점, 기미, 주근깨등 피부의 갈변 또는 흑화 현상을 일으킬 뿐만 아니라 피부암의 발생 원인이 되므로 커다란 사회 문제가 되고 있다. 이러한 측면에서 자외선에 대한 저항 기작으로 인체에서 생산되는 멜라닌 색소에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.[1-3]

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7857 (팩스) 02-874-8928
(전화) 02-920-1359 (팩스) 02-923-9923

피부 갈변현상은 멜라닌 합성세포인 melanocyte에서 멜라닌 색소의 과잉 생산에 따른 멜라닌 색소의 이상적 피부 침착에 주로 기인된다.[1] 멜라닌 색소는 tyrosinase(EC 1.14.18.1)에 의해 L-tyrosine이 산화되는 과정에 의해 그 생합성이 시작되며 일단 반응이 개시되면 매우 빠르게 진행된다.[4-5] 즉, Fig. 1에 나타낸 것처럼 tyrosinase는 첫단계로 tyrosine을 hydroxylation시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)을 합성하고 이어서 2단계에서 4-(2-carboxy-2-aminoethyl)-1,2-benzoquinone(dopaquinone)으로 산화시키며 indole-5,6-quinone의 합성 단계를 거쳐 멜라닌 색소가 합성되게 된다. 멜라닌 색소는 tyrosinase에 의해 tyrosine으로 부터 생산된 여러 종류의 중간체들이 모여 형성된 복합체의 형태로 이루어져 있지만 이들이 어떻게 멜라닌 색소의 구성성분이 되는지에 대해서는

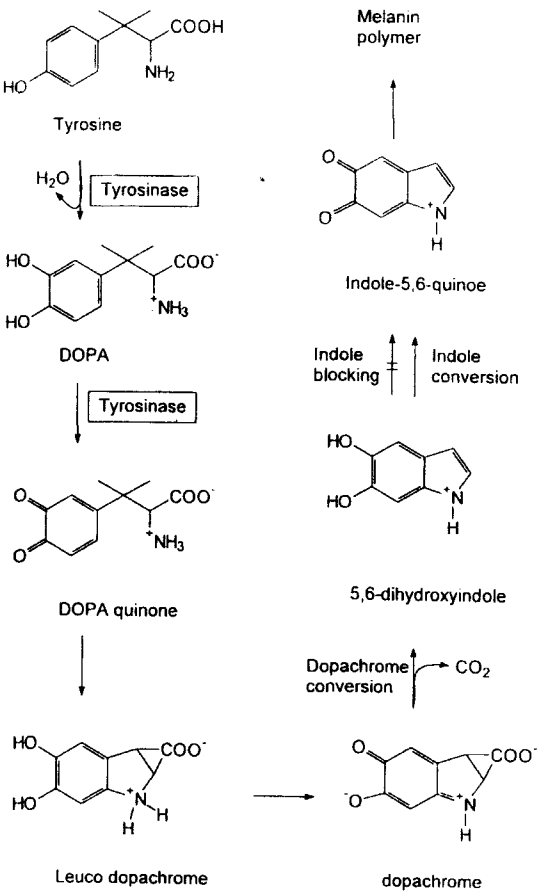

Fig. 1 — Biosynthetic pathway of melanin.
DOPA: 3,4-dihydroxyindolephenylalanine
Dopaquinone: 4-(2-carboxy-2-aminoethyl)-1,2-benzoquinone
Dopachrome: 2-carboxyl-2,3-dihydroindole-5,6-quinone

현재까지 정확한 기전이 알려져 있지 않다. 이와 같은 일련의 멜라닌 색소의 생합성 과정에서 핵심인 처음 두 단계의 반응을 촉매하는 tyrosinase는 생합성 과정상의 주요 효소로서 피부 갈변과 밀접한 연관이 있다.

Tyrosinase는 melanosome의 막에 결합되어 있는 66 kDa의 당단백질[6]인데 melanocyte stimulating hormone(MSH)에 의해 활성화된다고 알려져 있다.[7] Mouse melanoma 세포를 이용한 연구결과에 의하면 세포내에는 활성화되어 있지 않은 tyrosinase가 다량 존재하는데 이들이 MSH에 의해 활성화되며 이는 MSH에 의한 adenylate cyclase의 활성 변화로 설명되고 있다. 즉, 아직까지 그 정체가 밝혀지지는 않았지만 AMP-dependent protein kinase로 간주되는 효소에 의해 tyrosinase가 활성화되는 것으로 이해되고 있다.[8] 이러한 MSH에 의한 조절 기작 이외에도 tyrosinase의 생산 단계에서의 조절작용이 멜라닌 색소 생성에 영향을 미친다는 것이 밝혀졌다.[8] 실제로 post transcriptional regulation에 의해 3가지 종류의 tyrosinase 이성체가 만들어지는데 생성되는 tyrosinase mRNA 양과 멜라닌 색소의 생산량 사이에 비례관계가 없음이 증명되었다. 본 연구에서는 버섯의 티로시나제를 이용하였는데, 버섯의 티로시나제는 사람의 것과 서로 유사한 이화학적 성질을 갖고 있으며 동일한 저해제에 의하여 활성이 억제되는 것으로 알려져 있다.[10]

Tyrosinase의 효소 활성을 억제하는 저해제의 개발은 상업성과 melanization 기작의 이해라는 차원에서 연구되고 있다. 우선 melanization 과정을 이해하고자 하는 측면에서의 연구는 피부암의 발생 기작과 연관지어져 왔는데 이는 피부암의 원인 중 하나가 tyrosinase의 효소 활성에 관여하는 생체내 glutathione의 감소로 밝혀진 이후 더욱 활발해졌다.[11-14] Glutathione은 tyrosinase가 함유하고 있는 구리 이온과 결합하여 효소의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는 물질로서 효소 활성 저해제가 피부암의 발생과 관여 되어 있음을 보여주는 예가 되고 있다. 또한, 최근의 생활 수준 향상에 따라 피부미용에 대한 관심이 고조되고 있는데 특히 단순히 도포하고 채색하는 화장품으로 부터 피부에 직접 작용하여 피부에 변화를 주는 화장품, 즉 화장품의 의약품화가 이루어지고 있다. 그 중에서도 레저 및 스포츠 등 야외활동의 증가에 따른 과다한 자외선 조사에 기인한 피부의 갈변현상을 방지하려는 목적으로 자외선 차단제와 병용하여 미백물질을 사용하는 추세이다. 이러한 관점에서 미백효과를 가지는 화장품은 급격히 그 중요성이 증대되고 있다. 이제까지 피부미백의 목적으로 사용되어 왔거나, 피부미백 작용이 있다고 알려진 생약으로서는 월귤엽(*Vaccinum vitis*)의 추출성분인 arbutin, kojic mold 추출물인 kojic acid등이 있는데 이들은 모두 tyrosinase의 효소활성의 억제효과가 검증되었으며 이 중 arbutin은 이미 상업화되어 시판되고 있다[15-16] 이외에도 lactic acid는 tyrosinase 효소의 전사과정을 억제함으로써 효소 활성을 억제하고 ascorbic acid, 알로에신과 그 유도체들의 활성 억제 효과도 관찰되었다.[17-21] 뿐만 아니라 최근 천연성분에 대한 선호도가 높아짐에 따라 다양한 종류의 식물로부터 tyrosinase 효소활성 억제작용을 나타내는 물

실들을 분리하여 이용하고자 하는 시도가 많이 보고되고 있다.[22,23]

본 연구에서는 tyrosinase의 효소활성을 저해하는 기능이 있는 미백물질을 확인하고 분리하고자 미백효과가 기대되는 14종의 생약들을 대상으로 tyrosinase 저해 활성을 검색하고, 활성이 있는 생약으로부터 활성 물질을 추적하고자 하였다.

실험방법

생약의 추출 – 검색에 사용한 14종의 생약은 경동시장에서 구입하였다. 이들 생약을 세절하여 100 g 씩을 methanol(MeOH) 300 m*l*로 50℃에서 30분간 추출한 후 여과하였다. 같은 방법으로 2회 더 추출한 후 여과액을 합하여 감압 농축한 다음 tyrosinase 효소 억제 활성의 검색에 사용하였다.

미백 활성 생약의 분획 – 14종 생약의 메탄올 추출물에 대한 활성을 검색한 후 현저한 활성을 보이는 4가지 생약, 즉, 천궁, 마황, 정향 및 빈랑자를 용매 추출하여 3가지 분획으로 나누었다. 4종의 생약들의 메탄올 추출물을 물 200 m*l*에 현탁시킨 후 에텔 200 m*l* 씩으로 3회 추출하여 에텔 가용 분획을 얻고, 남은 수층을 계속하여 수포화 n-butanol(n-BuOH) 200 m*l* 씩으로 3회 추출하여 부탄올 가용 분획을 얻었다. 남은 수층을 감압 농축하여 물 가용 분획을 얻었다.

Tyrosinase 억제 활성 측정 – Pomerantz가 사용한 charcoal adsorption 방법[24]을 변형하여 이용하였다. L-3, 5-^{3}H tyrosine(Amersham)이 버섯 유래의 tyrosinase(Sigma)에 의하여 DOPA(L-Dihydroxyindole phosphate, Sigma)로 변형되는 과정에서 ^{3}HOH가 생산되는 원리를 이용하여 이 반응액에 생약 추출물을 가하였을 때의 반응 억제를 확인하였다. 1 μCi/m*l*의 tyrosine, 100 unit/m*l*의 tyrosinase와 1 μg/m*l*, 10 μg/m*l*, 100 μg/m*l* 농도의 생약 추출물을 각각 혼합하고 0.1 M sodium phosphate(pH 6.8) 완충용액으로 최종 용적을 100 μ*l*로하여 37℃에서 30 분간 반응시켰다. 0.1 M citric acid에 50 mg/m*l*의 농도로 현탁시킨 charcoal을 동량 가하여 잘 섞어준 후 5000 rpm에서 원심분리하여 상징액만을 취하였다. 상징액을 0.1 M citric acid로 씻어낸 Dowex 50 W resin(Sigma) 250 μ*l*와 섞은 후 5000 rpm에서 원심분리하였다. 분리된 상징액중 100 μ*l*를 취하여, 생산된 ^{3}HOH의 양을 liquid scintillation counter(Packard, model No. 1600)로 측정하였다.

실험결과 및 고찰

마황(*Ephedrae Herba*), 천궁(*Cnidii Rhizoma*), 빈랑자(*Areca Semen*), 정향(*Caryophylli Flos*), 인삼(*Ginseng Radix*), 계피(*Cinnamomi Cortex*), 시호(*Bupleuri Radix*), 목향(*Saussureae Radix*), 방풍(*Ledebouriellae Radix*), 하고초(*Prunellae Spica*), 황금(*Scutellariae Radix*), 오매(*Mume Fructus*), 강활(*Angellicae koreana Radix*), 익지인(*Alpiniae Frutus*) 등 14종의 검색대상 생약의 메탄올 추출물에 대하여 tyrosinase의 효소 활성에 대한 억제 효과를 검색하였다. 그 결과 Table I에 나타난 바와 같이 익지인, 인삼, 하고초는 전혀 활성이 없었으며 황금, 시호, 목향, 강활, 오매, 방풍, 계피는 매우 미약한 활성을 보였다. 반면에 천궁, 빈랑자, 정향과 마황은 상당히 강한 tyrosinase 효소 억제 활성을 보였는데, 특히 빈랑자와 정향의 메탄올 추출물은 단일 물질로의 정제가 되지 않은 조추출물 상태임에도 불구하고 동일 농도에서 기지 물질로 사용한 arbutin과 비교할 만한 정도의 효소활성 억제 효과를 보였다.

현저히 높은 효소 억제 활성을 나타낸 천궁, 빈랑자, 정향 및 마황에 대하여 에텔, 부탄올로 순차적으로 추출하여 3가지 분획을 얻고 각각의 활성을 검색하였다. 그 결과 빈랑자의 에텔 분획과 부탄올 분획, 정향의 부탄올 분획과 물 분획이 강한 효소활성 억제 효과를 나

Table I— Inhibitory effects of methanolic extracts from 14 herbal drugs on tyrosinase

Herbal drugs	IC_{50}(mg/m*l*)
Ephedrae Herba	0.99
Cnidii Rhizoma	1.16
Areca Semen	0.29
Caryophylli Flos	0.69
Ginseng Radix	–
Cinnamomi Cortex	2.41
Bupleuri Radix	4.20
Saussureae Radix	6.69
Ledebouriellae Radix	16.78
Prunellae Spica	–
Scutellariae Radix	4.36
Mume Fructus	2.13
Angellicae *koreanae Radix*	4.30
Alpiniae Frutus	–
Arbutin	0.88

* '–' means that substance has no inhibitory effect.

Table II — Inhibitory effects of fractions of 4 herbal drugs on tyrosinase

Herbal Drug	Fraction	IC_{50}(mg/ml)
Ephedrae Herba	Ether	1.26
	BuOH	–
	H_2O	–
Cnidii Rhizoma	Ether	4.57
	BuOH	0.69
	H_2O	–
Caryophylli Flos	Ether	0.94
	BuOh	0.19
	H_2O	0.20
Areca Semen	Ether	0.076
	BuOH	0.6
	H_2O	–

* '–' mean that substance has no inhibitory effect.

타내었다(Table II). 정향의 경우 부탄올 추출물과 탈이온수 추출물은 1 mg/ml의 농도에서 arbutin과 유사한 효소활성 억제 효과를 나타내었으며 에텔 추출물은 불규칙적이고 낮은 억제 효과를 보여 arbutin보다 3배 정도의 ^{3}HOH를 생산하였다. 따라서 정향의 추출물에는 효소활성 억제효과가 강력한 물질이 포함되어 있는 것으로 예측된다(Fig. 2). 빈랑자의 경우에는 에텔 분획과 물 분획 모두에서 농도의존적으로 저해 효과

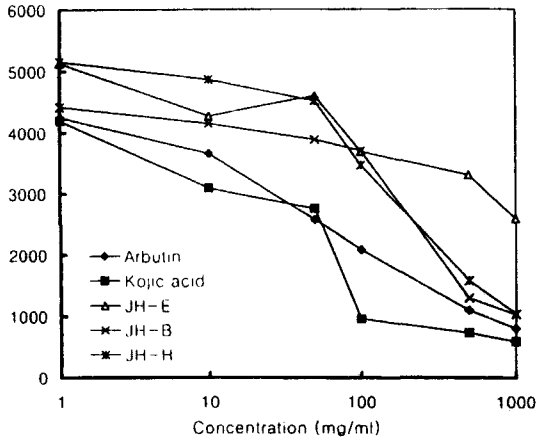

Fig. 2 — Tyrosinase inhibitory activity of *Caryophylli Flos* extracts. JH-E, JH-B and JH-H represent ether, butanol, and water soluble fractions of *Caryophylli Flos*, respectively. Using mushroom tyrosinase as enzyme source, assay were carried out with 1 μCi/mL of L-3,5-^{3}H-tyrosine as substrate dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), and each extract was added various concentration. The ^{3}HOH formation was measured by liquid scintillation counter.

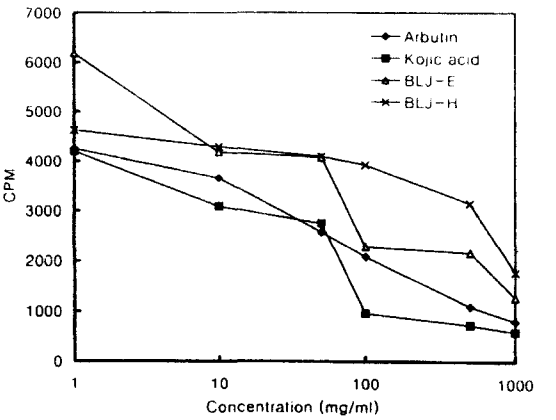

Fig. 3 — Tyrosinase inhibitory activity of *Areca Semen* extracts. BLJ-E and BLJ-H represent ether and water soluble fractions of *Areca Semen*, respectively. Experimental procedure is as in Fig. 2.

를 보였으나 정향보다는 낮은 효소확성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). 반면에 마황의 에텔 추출물은 억제 효과를 나타내지 않았고, 천궁의 경우는 전체적으로는 부탄올, 에텔, 물 추출물 모두가 억제효과를 나타내기는 하지만 arbutin에 비하여 억제 효과가 별로 높지 않은 것으로 평가되었다(Fig. 4). 위의 결과들로 보아 tyrosinase의 효소 활성 억제제의 검색 대상은 정향과 빈랑자의 두 가지로 축소되었으며 현재 활성을 보이는 분획으로 부터 미백 활성 성분을 단일 물질로 분리하는

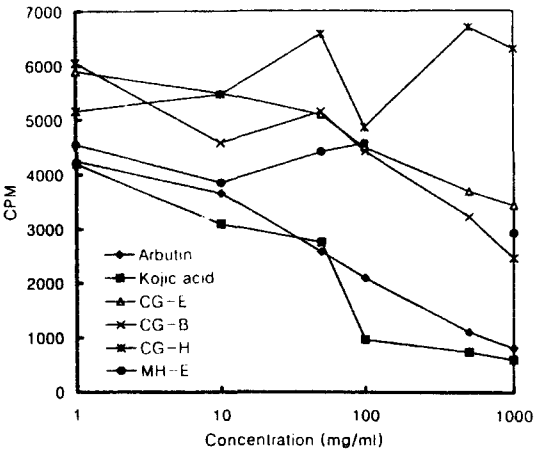

Fig. 4 — Tyrosinase inhibitory activity of *Cnidii Rhizoma* and *Ephedrae Herba* extracts. CG-E, CG-B and CG-H represent ether, butanol, and water soluble fractions of *Cnidii Rhizoma*, respectively. MH-E represents ether soluble fraction of *Ephedrae Herba*. Experimental procedure is as in Fig. 2.

연구를 계속 진행하고 있다.

감사의 말씀

이 연구는 과학 기술처의 연구비 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1) Pavel, S. : Dynamics of melanogenesis intermediate. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 162S (1993).
2) Gilcherst, B. A., Zhai, S., Eller,M. S., Yarosh, D. B., and Yaa, r. M. : Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 666 (1993).
3) Kaufman, R. J. : Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. Enzymol.* **205**, 487 (1991).
4) Romsdahl, M. M., and O'Neill, P. A. : Tyrosinase inhibition studies in human malignent melanoma grown in vitro. *Pigment Cell* **1**, 111 (1973).
5) Mason, H. S. : The chemistry of melanin. *J. Biol. Chem.* **172**, 83 (1947).
6) Bause, E. : Structural requirement of N-glycosylation of proteins. *Biochem. J.* **209**, 331 (1982).
7) Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S., and Nishiyama, S. : Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), DOPAchrome tautomerase (TRP 2), and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 126 (1993).
8) Kornor, A., and Pawelek, J. : Activation of melanoma tyrosinase by a cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell free system. *Nature* **267**, 444 (1977).
9) Naeyaert, J. M., Eller, M., Gordon, P. R., Park, H. Y., and Gilchrest, B. A. : Pigment content of cultured human melanocyte does not correlate with tyrosinase messeage level. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 297 (1991).
10) Chen, Y. M., Chavin, W. : Melanogenesis in human melanomas. *Cancer Res.* **35**, 606 (1975).
11) CRC-BACR-AICR international workshop. Melanogenesis it's chemistry as a therapeutic strategy in melanoma. *Br. J. Cancer* **64**, 793 (1991).
12) Benedetto, J. P., Ortonne, J. P., Voluto, C., Khatchdourian, C., Prota, G., and Thivolet, J. : Role of thiol compounds in mammalian melanin pigmentation. II. glutathione and related enzymatic activities. *J. Invest. Dermatol.* **79**, 422 (1982).
13) Prota, G. : Regulation mechanism of melanogenesis: beyond the tyrosinase concept. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 156S (1993).
14) Maeda, K., and Fukuda, M. : *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**, 361 (1991).
15) Suzuki, T., and Imokawa, G. : Depigmenting cosmetics and the future. *Nippon Koshohin Kagakkaishi* **19**, 183 (1995).
16) Mishima, Y., Kondoh, H., and Hatae, S. : Overview for development of future innovative skin whitening agents. *Fragrance J.* **24**, 13 (1996).
17) Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y., and Mishima, Y. : Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 150S (1993).
18) Yagi, A., Kanbara, T., and Morinobu, N. : Inhibition of mushroom-tyrosinase by *Aloe* extract. *Planta Medica* 515 (1987).
19) Hider, R. C., and Lerch, K. : The inhibition of tyrosinase by pyridinones. *Biochem. J.* **257**, 289 (1989).
20) Shirota, S., Miyazaki, K., Aiyama, R., Ichioka, M., and Yokokura, T. : Tyrosinase inhibitors from crude Drugs. *Biol. Pharm. Biochem.* **17**, 266 (1994).
21) Maeda, K., and Fukuda, M. : *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**, 361 (1991).
22) Morita, H., Kayashita, T., Takeya, K., and

Itokawa, H. : Cyclic peptides from higher plants. Conformational anaysis of tyrosinase inhibitory cyclic penta-peptide, pseudostellarin A, from *Pseudostellaria heterophylla*. *Tetrahedron* **50**, 12599 (1994).

23) Morita, H., Kayashita, T., Kobata, H., Gonda, A., Takeya, K., and Itokawa, H. : Cyclic peptides from higher plants. 7. Pseudostellarin D-F, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*. *Tetrahedron* **50**, 9975 (1994).

24) Pomerantz, S. H. : Charcoal adsorption method. *Science* **164**, 838 (1964).