

천연물로부터 5 α -Reductase 활성억제 및 면포용해효과의 검색

최승만* · 김창덕 · 이민호 · 최영호 · 량문정 · 안호정 · 윤여표 *

(주) LG 화학 생활과학연구소, * 충북대학교 약학대학

(Received April 7, 1999)

Screening of 5 α -Reductase Inhibition and Comedolytic Effects from Natural Products

Seung-Man Choi*, Chang-Deok Kim, Min-Ho Lee, Young-Ho Choi,
Moon-Jeong Rang, Ho-Jung Ahn and Yeo-Pyo Yun*

LG Household and Personal Care R & D Institute, Daejeon, Korea

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract — The antibacterial activity against *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), 5 α -reductase inhibition and comedolytic effects are the important pharmacological target sites of antiacne drugs. We previously reported on the antibacterial activities against *P. acnes* by natural products. In the present study the screening of 5 α -reductase inhibition and comedolytic effects from natural products were performed. Seven natural products such as *Angelica koreana*, *Sophora flavescens*, *Prunus persica*, *Bombyx mori*, *Areca catechu*, *Galla rhois* and *Gleditschia koraiensis* perfectly inhibited the activity of 5 α -reductase at the concentration of 0.01% (w/v). Sixteen natural products which were shown to have the potent antibacterial activities against *P. acnes* or 5 α -reductase inhibition activities were assayed for the comedolytic test. In the results of comedolytic effects on experimentally-induced comedones (EIC), *Sophora flavescens* showed the strongest comedolytic effect on EIC, and *Polygonum cuspidatum* and *Angelica koreana* showed stronger comedolytic effects on EIC than azelaic acid used for a positive control at the concentration of 3% (w/v). These results suggest that several natural products including *Sophora flavescens* can be developed as noble antiacne agents.

Keywords □ 5 α -reductase, comedolytic effect, antiacne agent, *Sophora flavescens*, natural product.

피부에는 비활성 스테로이드 전구물질을 활성 안드로젠으로 전환시키는 데 필요한 효소가 존재한다.^{1,7)} Testosterone 5 α -reductase는 그 중의 하나로서 피지선세포 내에서 활성이 약한 안드로젠인 testosterone을 강력한 활성을 갖는 안드로젠인 dihydrotestosterone으로 환원시키는 작용을 한다. Dihydrotestosterone으로 환원되면 이것을 신호로한 유전자 발현 등 다단계 기전이 발생하게 되고 일련의 경로를 통하여 피지 생합성이 일어나게 된다. 피지 생합성 기전을 면밀히 고찰하면 이론적인 몇 가지의 피지 생합성 억

제점을 발견할 수 있으며 최근에는 testosterone 5 α -reductase 수준에서의 피지 생합성 억제 연구결과가 활발히 보고되고 있다.⁸⁻¹²⁾

피부조직에는 두 가지 형태(type I, type II)의 steroid 5 α -reductase isozymes이 존재하며 이들 두 단백질은 서로 약 60% homology를 갖고 있다.^{13,14)} 사람의 경우, 정상 피부에는 type I이 type II에 비하여 더욱 현저히 발현되지만 type II는 주로 전립선에 특이적으로 분포하고, 쥐 간의 steroid 5 α -reductase isozymes의 분포양상은 human nongenital skin 내의 것과 비슷하다. 5 α -reductase는 여러가지 피지관련 질환의 발병에 있어서 중요한 역할을 하는데, 이 효소의 활성에 의해서 발병되는 피부질환은 남성형

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-860-8864 (팩스) 042-863-2077

본 의존성 질환으로서 여드름 이외에 지루, 남성형 대머리 및 자연성 조모증 등¹⁵⁻¹⁷이 있고, 최근 이러한 피지관련 질환의 예방 및 치료를 위한 시도로서 강력한 5 α -reductase의 활성억제제 탐색 연구가 보고되어 있다.⁸⁻¹²

면포용해효과는 여러 가지 동물모델을 통하여 평가되고 있으며 그 중 현재까지 가장 많은 기초 실험자료와 임상자료를 갖는 것은 토끼 귀에 실험적으로 유발시킨 면포를 이용한 시험방법이다.¹⁸⁻²² 실험적으로 유도된 면포의 모낭상피에 있어서 몇 가지의 구조학적 변화는 인간 면포에 있어서의 그것과 유사하게 관찰되는 것으로 보고²⁰되고 있으나 이렇게 토끼 귀에 유발된 면포의 정확한 발생기전은 현재까지 잘 밝혀지지 못한 실정이다.²² 토끼 귀 모델을 이용한 면포용해효과의 평가에 있어서 면포유발물질로는 squalene, oleic acid, tetradecane, isopropyl myristate(IPM) 및 liquid paraffin 등이 소개되고 있으며, 이들 물질은 토끼 귀에 적용되어 모낭과각화, 미세면포, 흑두 및 백두를 현저히 유발시키며 이들 면포를 생검하여 현미경적 관찰평가를 실시한 결과 모낭 상피를 현저히 과각화시킬 뿐만 아니라 피지선 역시 현저히 증식시키는 것으로 보고되었다.²³⁻²⁵

저자들은 여드름 등의 피부질환에 전통적으로 사용되어온 97종 천연물을 대상으로 수행된 *P. acnes*에 대한 항균효과를 보고한 바 있다.²⁶ *P. acnes*에 대한 항균효과 이외에 피지생성 억제효과와 모낭벽의 과각화에 의해 생성된 면포에 대한 면포용해효과는 현재 여드름 치료제 개발에 있어서의 핵심 요소이다.²⁷ 본 연구에서 저자들은 우선 97종의 천연물을 대상으로 이들의 피지생성 억제효과를 검색하였으며 이 연구로부터 피지생성 억제효과가 우수한 것으로 검색된 천연물과 *P. acnes*에 대한 항균효과가 우수한 것으로 검색된 천연물 중에서 각각 그 효능이 우수한 것으로 평가된 16종의 천연물을 대상으로 면포용해효과를 검색하였다.

실험방법

Testosterone 5 α -Reductase 활성억제효과 평가

시험물질 - 본 연구에 사용된 시험물질은 산지가 확인되고, 표시된 가자(*Terminalia chebula*) 등 97종의 천연물이며, 비교물질로는 대표적 여드름 의약품의 주성분인 azelaic acid(Sigma, USA), 양성대조군으

로는 finasteride^{28,29}(Merck, USA)를 사용하였다.

시료의 조제 - 천연물에서 불순물을 제거하고 생약 마쇄기를 이용하여 잘게 마쇄하여 균일한 분말입자로 한 후 비이커에 100 g 씩 넣고 추출용매를 1,000 ml 씩 가하여 천연물이 충분히 잠기게 하여 추출하였으며 추출용매로는 70% 에탄올을 사용하였다. 상온에서 72 시간 동안의 냉침을 통하여 용매 추출된 조 추출물을 수율 및 순도를 높이기 위하여 감압여과(Whatman 41, England) 시켜 순수한 70% 에탄올 추출물로 제조하였으며, rotary vacuum evaporator(Büchi, Switzerland)로 각 추출물의 양이 100 ml 될 때까지 감압 농축한 추출물을 이용하여 각 추출물의 1차적인 5 α -reductase 활성억제력을 평가하였고, 여기서 우수한 활성억제력을 갖는 것으로 인정된 추출물을 동결건조기(Labconco, USA)로 동결건조하여 건조분말을 제조하였으며, 이들을 사용하여 각 추출물의 정량적인 5 α -reductase 활성억제효과를 평가하였다.

Testosterone 5 α -Reductase의 조제 - 본 실험에 사용한 흰쥐는 Sprague-Dawley계로서 7 주령 된 성숙한 암컷을 골라서 사용하였다. 흰쥐를 에테르로 호흡 마취한 후 경추이탈로 희생시켰으며 간을 절취하여 phosphate-buffered saline(PBS)로 3회 세척한 후 3~4배 용량의 ice-cold buffer(50 mM Na₂HPO₄, 0.25 M sucrose)에서 Pyrex-glass homogenizer로 간세포를 분쇄하여 현탁액을 조제하였다. 이 현탁액에서 5 α -reductase를 분리하기 위하여 현탁액을 초음파분쇄(ultrasonication, 5 min)한 후 유효 단백질 층을 얻기 위하여 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 5 min)하여 상등액을 취하였으며 이 모든 과정은 0~4°C의 저온상태에서 수행하였다. 상기의 방법으로 얻어진 단백질 현탁액의 단백질의 정량은 Bradford method로 수행되었고 ELISA reader를 사용하여 정확한 단백질 양을 결정하였다.

활성억제효과 평가 - 반응용액 50 μ l에 시험물질 10 μ l를 첨가한 후 단백질 현탁액 200 μ l/40 μ l를 가하여 반응 용액을 100 μ l로 하였으며 이때 반응용액의 조건은 50 mM Na₂HPO₄(pH 7.0), 25 mM KCl, 500 μ M NADPH 및 50 nM [³H] testosterone 이었다. 37°C 배양조에서 10 분간 반응시킨 후 250 μ l의 반응종결시액(70% cyclohexane, 30% ethylacetate)을 가하여 반응을 종결시켰다. 반응종결시액에 추출된 steroids를 얻기 위하여 원심 분리한 후 상등액을 취하여 hood에

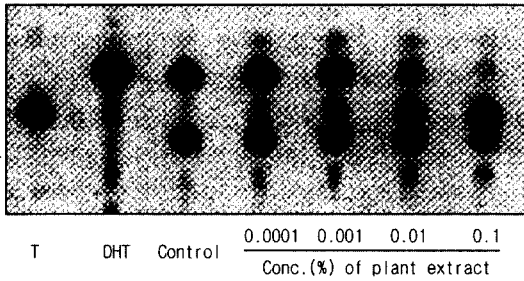


Fig. 1 - Representative autoradiograph of TLC of transformation of 50 nM [³H] testosterone(T) to dihydrotestosterone (DHT).

서 하루 방치하여 반응 용매를 날려 버린 후 잔류물을 chloroform 20 μ에 녹이고 이를 TLC plate(Merck silica plastic sheet kieselgel 60F₂₅₄, USA)상에 spotting 하고 TLC chamber에서 30분간 전개(전개 용매 (toluene : acetone=1 : 4)) 시킨 후 전개된 plate를 hyperfilm에 3일간 감광시키고 감광된 면적을 densitometer(Imagemaster, Pharmacia Biotech, England)로 측정하였으며(Fig. 1) 아래의 방법으로 testosterone 5α-reductase의 활성억제효과를 측정하였다.

Testosterone 5α-reductase의 활성억제율 계산 방법은 다음과 같다.

$$\text{활성억제율(\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A=시험물질 미 첨가시 testosterone에서 dihydrotestosterone으로의 전환율

B=시험물질 첨가시 testosterone에서 dihydrotestosterone으로의 전환율

면포용해효과 평가시험

시험물질 - 시험군은 16종의 3%(w/w) 천연추출물/50%에탄올을 사용하였고 양성대조군과 음성대조군은 3%(w/w) azelaic acid/50%에탄올과 50%에탄올 용액으로 각각 하였다.

시험계 - 시험동물로는 많은 병리해부학적 자료가 있는 약 3개월령된 수컷 토끼(New Zealand White, 2.0~3.0 kg)를 사용하였으며 동물입수 후 1주일간의 순화 기간을 거친 후 일반적인 건강 상태를 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

사육환경 - 본 시험은 온도 25±3°C, 상대습도 55±5%, 환기 회수 10~12회/hr, 조명(07:00~19:00), 조도 150~200 Lux로 설정된 실험동물실에서 실시되었다.

사료는 토끼용 고형사료((주)퓨리나사료)를 자유 급식 시켰고 음수는 상수도 수를 자유 섭취시켰다.

시험계의 구분과 시험물질 투여 방법 - 면포유발물질로 isopropyl myristate(IPM) (Sigma, USA)을 사용하였고 IPM을 토끼의 양쪽 귀에 1일 1회, 0.5 ml 씩, 2주일 간 매일 도포하여 면포를 형성시켰으며, 이 중에서 육안적으로 관찰하여 전형적인 면포가 관찰되는 토끼를 선정 한 후 각 토끼의 면포 정도를 고려하여 각 군당 5 마리가 되도록 17 군으로 분류하여 시험하였다.

시험물질의 투여방법은 토끼의 오른쪽 귀에는 시험군 및 양성대조군을 왼쪽 귀에는 음성대조군을 1일 1회, 0.7 ml씩, 3주일 간 매일 투여하였으며 투여 후 면포으로 가볍게 도포하는 방법으로 적용하였다.

육안적인 관찰 - 시험물질을 투여하면서 매일 육안적으로 면포의 진행 정도를 평가하여 면포용해효과를 평가하였으며 관찰평가 척도는 다음과 같다.

Grade	관찰평가척도
0	모낭확대(×), 면포형성(×), 과각화(×), 염증반응(×)
1	약한정도의 모낭확대(○), 약한정도의 면포형성(○), 과각화(×), 염증반응(×)
2	중간정도의 모낭확대(○), 중간정도의 면포형성(○), 약한정도의 피부과각화(○), 염증반응(×)
3	심한정도의 모낭확대(○), 심한정도의 면포형성(○), 중간정도의 피부과각화(○), 약간의 염증(상처(Scar)) 반응(○)
4	심한정도의 모낭확대(○), 심한정도의 면포형성(○), 심한정도의 피부과각화(○), 심한정도의 염증반응(○)

Whole mount 및 화상분석 - 시험물질 적용 3주일 후 각 시험계를 sodium pentobarbital로 안락사 시키고 각 동물의 양귀를 잘라 낸 후 약 2.5 cm×1.5 cm 정도로 오른쪽 귀와 왼쪽 귀의 기저부(외이도의 바깥부위)를 잘라 냈다. 잘라 낸 조직을 60°C의 물에 약 5분 간 담갔다 꺼내어 표피만을 박리한 후 slide glass에 거품이 생기지 않게 조심하면서 표피 안쪽면이 위로 올라오도록 잘 펴서 올린 다음 글리세린젤리로 조직을 고정하였으며, 상온 건조 후 입체현미경(Leica, Germany) 하에서 20 배로 사진 촬영하였고 화상분석기(Ultimage Pro, Graftek, USA)를 이용하여 면포의 수와 면적을 계산하여 단위 면포 당 면적을 평가하였다.

세포독성평가 - 각 시험물질은 2%(w/w)/50%에탄올로 제조하여 준비하였다. 준비된 시료를 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media, GIBCO BRL, USA)

Table I - Screening of testosterone 5 α -reductase inhibition

일반명	학명또는 생약명	사용부위	산지	The Degree of Inhibition ¹
가자	<i>Terminalia chebula</i>	Fructus	중국	-
감국	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Flos	중국	--
강활	<i>Angelica koreana</i>	Radix	한국	++
건강	<i>Zingiber officinale</i>	Rhizoma	한국	-
계지	<i>Cinnamomum cassia</i>	Branch	중국	-
고본	<i>Ligusticum tenuissimum</i>	Radix	한국	+++
고삼	<i>Sophora flavescens</i>	Radix	한국	+++
괘루근	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Radix	중국	-
괴화	<i>Sophora japonica</i>	Flos	중국	-
구기자	<i>Lycium chinense</i>	Fructus	한국	-
금은화	<i>Lonicera japonica</i>	Flos	한국	-
길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	Radix	한국	-
당귀	<i>angelica gigas</i>	Radix	한국	+
대황	<i>Rheum undulatum</i>	Radix	중국	+++
도인	<i>Prunus persica</i>	Semen	중국	++
마두령	<i>Aristolochia contorta</i>	Fructus	중국	-
마전자	<i>Strychnos nux-vomica</i>	Semen	중국	-
맥문동	<i>Liriope platyphylla</i>	Tuber	한국	-
목단피	<i>Paeonia moutan</i>	Radicis Cortex	중국	+
목통	<i>Akebia quinata</i>	Caulis	한국	-
목향	<i>Saussurea lappa</i>	Radix	중국	-
몰약	<i>Commiphora molmol</i>	Resin	중국	-
백강잠	<i>Bombyx mori</i>	Bombyx mori	중국	++
백개자	<i>Brassica alba</i>	Semen	중국	-
백급	<i>Bletilla striata</i>	Tuber	중국	+++
백두옹	<i>Pulsatilla koreana</i>	Radix	한국	-
백렴	<i>Ambelopsis japonica</i>	Radix	중국	-
백반	<i>Alumen</i>	Alumen	한국	-
백부근	<i>Stemona japonica</i>	Radix	중국	-
백부자	<i>Aconitum koreanum</i>	Rhizoma	한국	-
백선피	<i>Dictamnus dasycarpus</i>	Radicis Cortex	중국	-
백지	<i>Angelica dahurica</i>	Radix	한국	-
백하수오	<i>Cynanchum wilfordii</i>	Radix	한국	-
봉출	<i>Curcuma zedoaria</i>	Rhizoma	중국	-
부자	<i>Aconitum carmichaeli</i>	Tuber	중국	-
붕사	<i>Borax</i>	Borax	한국	-
빈랑자	<i>Areca catechu</i>	Semen	중국	++++
사상자	<i>Cnidium monnieri</i>	Fructus	중국	-
산사	<i>Crataegus pinnatifida</i>	Fructus	중국	-
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	Herba	한국	+
상백피	<i>Morus alba</i>	Cortex	한국	-
소엽	<i>Perilla frutescens</i>	Herba	한국	+++
애엽	<i>Artemisia argyi</i>	Folium	한국	+
야국	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Flos	중국	-
여정실	<i>Ligustrum lucidum</i>	Fructus	중국	-
연교	<i>Forsythia viridissima</i>	Fructus	중국	-
영지	<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderma lucidum	한국	-
오배자	<i>Galla Rhois</i>	Galla Rhois	한국	++++
오수유	<i>Evodia officinalis</i>	Fructus	한국	+
우방자	<i>Arctium lappa</i>	Fructus	중국	-
운지	<i>Coriolus versicolor</i>	Coriolus versicolor	한국	-
울금	<i>Curcuma longa</i>	Rhizoma	중국	++
유황	<i>Sulfur</i>	Sulfur	한국	-
은행	<i>Ginkgo biloba</i>	Semen	한국	-

¹ The symbols in the degree of inhibition are represented as follow : - : no inhibition occurred, + : slight, ++ : moderate, +++ : significant, +++++ : perfect

Table I – Continued

일반명	학명또는 생약명	사용부위	산지	The Degree of ¹ Inhibition
선복화	<i>Inula britannica</i> var. <i>chinensis</i>	Flos	중국	-
의이인	<i>Coix lachryma-jobi</i>	Semen	한국	+++
인동	<i>Lonicera japonica</i>	Stem	한국	-
인진	<i>Artemisia messer-schmidtiana</i>	Herba	한국	-
자원	<i>Aster tataricus</i>	Radix	중국	-
자초	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Radix	중국	-
저령	<i>Polyporus umbellatus</i>	Polyporus	중국	-
적작약	<i>Paeonia lactiflora</i>	Radix	한국	++++
적하수오	<i>Polygonum multiflorum</i>	Radix	한국	-
정향	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Flos	중국	++++
조각자	<i>Gleditsia koraiensis</i>	Spina	한국	+++
죽여	<i>Phyllostachys nigra</i> var. <i>henonis</i>	Caulis	한국	-
죽엽	<i>Susa borealis</i>	Folium	한국	-
지골피	<i>Lycium chinense</i>	Radicis cortex	중국	-
지모	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	Rhizoma	한국	-
지부자	<i>Kochia scoparia</i>	Fructus	한국	-
지실	<i>Poncirus trifoliata</i>	Cortex	한국	-
지유	<i>Sanguisorba officinalis</i>	Rhizoma & Radix	중국	+++
진피	<i>Citrus</i> SP.	Pericarpium	한국	-
차전자	<i>Plantago asiatica</i>	Semen	중국	++++
창이자	<i>Xanthium strumarium</i>	Fructus	중국	-
창출	<i>Atractylodes japonica</i>	Rhizoma	한국	-
천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	Tuber	중국	-
천초	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	Pericarpium	한국	-
청상자	<i>Celosia argentea</i>	Semen	중국	-
초결명	<i>Cassia obtusifolia</i>	Semen	한국	-
치자	<i>Gardenia jasminoides</i>	Fructus	한국	++++
토사	<i>Cuscuta australis</i>	Herba	중국	+++
패장근	<i>Patrinia scabiosaefolia</i>	Radix	중국	-
포공영	<i>Taraxacum platycarpum</i>	Herba	중국	+++
필발	<i>Piper longum</i>	Fructus	중국	-
하고초	<i>Prunella vulgaris</i>	Herba	한국	++
해금사	<i>Lygodium japonicum</i>	Spora	중국	-
향유	<i>Elscholtzia patrim</i>	Herba	한국	-
현삼	<i>Scrophularia oldhami</i>	Radix	중국	-
현초	<i>Geranium thunbergii</i>	Herba	중국	+
호장근	<i>Polygonum cuspidatum</i>	Radix	중국	++++
화피	<i>Betula platyphylla</i> var. <i>jatifolia</i>	Cortex	한국	++++
활석	<i>Tarcum</i>	Tarcum	한국	-
황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	Radix	한국	-
황련	<i>Coptis chinensis</i>	Rhizoma	중국	+
후박	<i>Machilus thunbergii</i>	Cortex	한국	+

배지에 200~1600 μM 농도로 희석한 다음, 10^4 cells/well의 인간섬유아세포에 가하고 24시간 배양하여 총세포단백분석법(BIO-RAD Protein Assay Kit, BIO-RAD, USA)으로 세포 증식을 50% 억제하는 농도(EC_{50})를 구하였다.

통계학적 분석 - 실험결과에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test를 이용하여 분석하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의성 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

Testosterone 5α -reductase 활성억제시험은 두 단계의 시험으로 나누어 실시하였다. 1차 시험에서는 97종의 천연 추출물 원액을 그대로 사용하여 천연추출물의 5α -reductase 활성억제력을 검색하였다. 시험결과, Table I에서 보는 바와같이 97종의 천연물 중 31종 추출물(강활, 고본, 고삼, 당귀, 대황, 도인, 목단피, 백

Table II – The inhibition rate of testosterone 5 α -reductase

학명 (생약명)	Inhibition rate(%) in various conc.(%) ^{1,2}			
	0.1	0.01	0.001	0.0001
<i>Angelica koreana</i> (강활)	100.0	100.0	31.3	20.9
<i>Ligusticum tenuissimum</i> (고본)	100.0	84.9	51.1	31.1
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	100.0	100.0	48.0	34.7
<i>Rheum undulatum</i> (대황)	100.0	82.3	17.7	9.6
<i>Prunus persica</i> (도인)	100.0	100.0	29.7	16.9
<i>Bombyx mori</i> (백강잠)	100.0	100.0	37.7	3.4
<i>Bletilla striata</i> (백급)	100.0	68.2	13.8	1.9
<i>Areca catechu</i> (빈랑자)	100.0	100.0	17.6	1.9
<i>Perilla frutescens</i> (소엽)	100.0	51.6	10.6	0.6
<i>Galla Rhois</i> (오배자)	100.0	100.0	61.8	24.1
<i>Curcuma longa</i> (울금)	89.4	64.7	15.4	0.0
<i>Coix lachryma-jobi</i> (의이인)	100.0	90.4	33.3	13.1
<i>Paeonia lactiflora</i> (적작약)	100.0	60.5	18.7	2.9
<i>Eugenia caryophyllata</i> (정향)	100.0	72.1	39.9	5.7
<i>Gleditsia koraiensis</i> (조각자)	100.0	100.0	14.3	1.4
Azelaic acid	83.5	20.4	11.3	5.2
Finasteride	100.0	100.0	100.0	100.0

¹Inhibition Rate (%)=[(A-B)/A] × 100; A=conversion rate from testosterone to dihydrotestosterone with no test sample, B=conversion rate from testosterone to dihydrotestosterone with each test sample

² Each result represents the mean of three values

강잠, 백급, 빈랑자, 삼백초, 소엽, 애엽, 오배자, 오수수, 울금, 의이인, 적작약, 정향, 조각자, 지유, 차전자, 치자, 토사, 포공영, 하고초, 현초, 호장근, 화피, 황련, 후박)이 5 α -reductase의 활성을 억제하는 것으로 확인되었으며, 이들 천연추출물을 그들의 활성억제정도에 따라 임의의 4개 degree (+ : slight (당귀 등 8종), ++ : moderate (강활 등 5종), +++ : significant (고본 등 10종), ++++ : perfect (빈랑자 등 8종)로 구분하여 이 중 slight (+)을 나타내는 8종을 제외한 23종의 천연물을 대상으로 그들의 5 α -reductase에 대한 정량적인 활성억제율을 평가하였다.

이들 23종의 천연추출물은 이들의 원액을 동결 건조하여 분말상으로 한 후 50% 에탄올 용액에 실험농도(0.1, 0.01, 0.001, 0.0001%(w/w))로 제조하여 사용하였다. 시험물질의 농도에 따른 5 α -reductase 활성억제율 평가 결과에서 보는 바와같이 강활, 고삼, 도인, 백강잠, 빈랑자, 오배자, 조각자 등 7종의 천연 추출물은 0.01 %(w/w)의 농도에서 5 α -reductase의 활성을 완벽히 억제하는 것으로 평가되었으며, 나머지 시험물질도 모두 azelaic acid보다는 높은 5 α -reductase 활성억제율을 갖는 것으로 평가되었으나 양성대조군인 finasteride 보다 높은 활성억제력을 갖는 시험물질은 없었다(Table II).

면포용해효과 시험에 있어서 시험기간 중 시험결과

에 영향을 줄 수 있는 유의할 만한 임상증상의 발견이나 환경적인 요인의 변화는 없었다. IPM 적용 2주 후IPM에 의한 토기 귀의 외관적인 상태는 개체에 따라 약간의 차이가 있었으나 대부분 심한정도의 모공 확대 및 면포형성, 심한정도의 외피, 모공의 과각화 및 가피의 형성 그리고 중등도 이상의 염증발생이 관찰되었다.

면포용해효과는 기전적으로 모공각질의 제거, 모공과각화 예방 및 모공유연효과를 포함하며 시험물질을 적용하면서 점진적으로 토기 귀 표면의 가피 및 과각화가 감소, 모공각질의 제거, 모공유연성 증가 및 모공 크기의 감소 등 면포용해효과의 전형이 관찰되었으며 시험 종료시에는 면포의 상태가 눈에 띄게 개선되었다. 시험물질의 면포용해효과의 평가는 육안적인 관찰 및 화학분석을 이용한 면포크기분석 등 2가지 방법으로 실시하였다. 시험물질 적용 3주 후 육안적인 관찰결과, 육안적으로 음성대조군에 비하여 유의한 개선효과를 보인 것은 시험군 중 강활, 고삼, 치자 및 호장근 등 4종의 천연추출물과 양성대조군인 azelaic acid 등의 총 5종이었다. 오배자와 적작약은 음성대조군에 비하여 개선된 것으로 평가되었으나 유의한 차이는 없었으며 나머지 시험군은 면포호전이 관찰되지 않거나 오히려 악화된 것으로 평가되었다(Table III).

화학분석결과, 양성대조군인 azelaic acid(15.75%)보다

Table III – Gross findings before and after 3 weeks treatment

학명 (생약명)	Mean Score ¹	
	Control (Left Ear), Treatment (Right Ear)	
	Before treatment	After treatment
<i>Angelica koreana</i> (강활)	(3.6, 3.6)	(1.6, 1.0) ²
<i>Ligusticum tenuissimum</i> (고본)	(3.8, 3.8)	(1.6, 1.6)
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	(3.6, 3.6)	(1.8, 0.8) ²
<i>Rheum undulatum</i> (대황)	(3.4, 3.4)	(1.4, 1.4)
<i>Prunus persica</i> (도인)	(3.2, 3.2)	(1.4, 1.4)
<i>Bletilla striata</i> (백급)	(3.8, 3.8)	(1.6, 1.6)
<i>Areca catechu</i> (빈랑자)	(4.0, 4.0)	(1.8, 1.8)
<i>Galla Rhois</i> (오배자)	(3.4, 3.4)	(1.4, 1.0)
<i>Paeonia lactiflora</i> (적작약)	(3.6, 3.6)	(1.6, 1.2)
<i>Eugenia caryophyllata</i> (정향)	(4.0, 4.0)	(1.8, 1.8)
<i>Gleditschia koraiensis</i> (조각자)	(3.6, 3.6)	(1.8, 1.8)
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (지모)	(3.6, 3.6)	(1.6, 1.6)
<i>Sanguisorba officinalis</i> (지유)	(3.4, 3.4)	(1.4, 1.6)
<i>Gardenia jasminoides</i> (치자)	(3.6, 3.6)	(1.6, 1.0) ²
<i>Polygonum cuspidatum</i> (호장근)	(3.8, 3.8)	(1.8, 1.0) ²
<i>Betula platyphylla</i> var. <i>jatifolia</i> (화피)	(3.2, 3.2)	(1.6, 1.6)
Azelaic Acid	(3.6, 3.6)	(1.6, 1.0) ²

¹ Each result represents mean of five rabbits

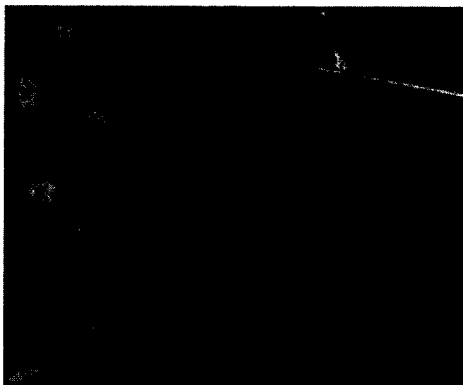
² P<0.05 as compared to control

³ Criterion for scoring in gross findings is explained at the experimental method;

면포감소율(area/count ratio)이 큰 것으로 확인된 천연 추출물은 고삼(Fig. 2, 29.85%), 호장근(21.09%) 및 강활(19.66%) 등 3종이었다. 치자(13.95%)는 azelaic acid에 비하여 면포용해효과가 우수하지 못하였지만 음성대조군에 비하여 유의성 있는 면포용해효과가 인정되었으며 백급 등 나머지 시험물질들의 면포용해효과는 유의성이 없는 것으로 평가되었다(Table IV). 본 연구를 통하여 whole mount를 이용한 화상분석결과는 육안적인 평가결과와 상호 연관성이 있음이 나타났다.

일반적인 총세포단백분석법(total cell protein assay)을 이용한 시험물질의 세포독성평가결과(Table V)에서 독성 비교물질로는 치약, 비누, 샴푸 등 피부세정용품의 대표적인 계면활성제인 Sodium Lauryl Sulfate (SLS)로 하였으며 시험물질 모두 SLS에 비하여 세포독성이 현저히 낮아 안전성이 매우 우수한 것으로 평가되었다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때, 여드름 발병의 3대 발병원인인 여드름균에 대한 우수한 항균효과, 강



Negative control group (left ear)



Sophora flavescens treated group (right ear)

Fig. 2 – Stereoscopic pictures of comedones after 3 weeks treatment of *Sophora flavescens* and negative control (× 20).

Table IV – Area of comedones after 3 weeks treatment

학명 (생약명)	Area of comedones (mm ² ; mean \pm SD) ¹		Reduction Rate(%) ²
	Control (Left Ear)	Treatment (Right Ear)	
<i>Angelica koreana</i> (강활)	1.17 \pm 0.12	0.94 \pm 0.09	19.66 ³
<i>Ligusticum tenuissimum</i> (고본)	1.23 \pm 0.13	1.28 \pm 0.15	-4.07
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	1.34 \pm 0.09	0.94 \pm 0.06	29.85 ³
<i>Rheum undulatum</i> (대황)	1.21 \pm 0.12	1.25 \pm 0.15	-3.31
<i>Prunus persica</i> (도인)	1.13 \pm 0.13	1.16 \pm 0.19	-2.65
<i>Bletilla striata</i> (백급)	1.35 \pm 0.23	1.36 \pm 0.23	-0.74
<i>Areca catechu</i> (빈랑자)	1.32 \pm 0.24	1.38 \pm 0.12	-4.55
<i>Galla Rhois</i> (오배자)	1.17 \pm 0.12	1.06 \pm 0.09	9.40
<i>Paeonia lactiflora</i> (적작약)	1.21 \pm 0.12	1.06 \pm 0.05	12.40
<i>Eugenia caryophyllata</i> (정향)	1.34 \pm 0.14	1.35 \pm 0.17	-0.75
<i>Gleditschia koraiensis</i> (조각자)	1.31 \pm 0.15	1.32 \pm 0.15	-0.76
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (지모)	1.37 \pm 0.13	1.36 \pm 0.08	0.73
<i>Sanguisorba officinalis</i> (지유)	1.34 \pm 0.24	1.41 \pm 0.21	-5.22
<i>Gardenia jasminoides</i> (치자)	1.29 \pm 0.08	1.11 \pm 0.08	13.95 ³
<i>Polygonum cuspidatum</i> (호장근)	1.28 \pm 0.12	1.01 \pm 0.08	21.09 ³
<i>Betula platyphylla</i> var. <i>jatifolia</i> (화피)	1.13 \pm 0.13	1.19 \pm 0.23	-5.31
Azelaic Acid	1.27 \pm 0.06	1.07 \pm 0.07	15.75 ³

¹ Each result represents mean of five rabbits

² Reduction Rate (%)=(mean area of control group-mean area of treatment group)/(mean area of control group) \times 100

³ P<0.05 as compared to control.

Table V – Cytotoxicity of natural product extracts

학명 (생약명)	EC ₅₀ (%) ¹
<i>Angelica koreana</i> (강활)	708
<i>Ligusticum tenuissimum</i> (고본)	694
<i>Sophora flavescens</i> (고삼)	421
<i>Rheum undulatum</i> (대황)	1269
<i>Prunus persica</i> (도인)	1207
<i>Bletilla striata</i> (백급)	1160
<i>Areca catechu</i> (빈랑자)	>2000
<i>Galla Rhois</i> (오배자)	813
<i>Paeonia lactiflora</i> (적작약)	> 2000
<i>Eugenia caryophyllata</i> (정향)	1123
<i>Gleditschia koraiensis</i> (조각자)	895
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (지모)	1034
<i>Sanguisorba officinalis</i> (지유)	733
<i>Gardenia jasminoides</i> (치자)	921
<i>Polygonum cuspidatum</i> (호장근)	863
<i>Betula platyphylla</i> var. <i>jatifolia</i> (화피)	675
<i>Sodium Lauryl Sulfate</i>	76

¹ Each result represents mean of three values

력한 피지 생합성억제효과 및 면포용해효과를 갖고 있으면서도 안전성이 매우 우수한 고삼 등 수종의 천연물은 향후 유효성분의 분리 및 동정 등을 통하여 우수한 신규 여드름 예방 및 치료제로서의 개발이 기대된다.

문 헌

1) Baillie, A. H., Thomson, J. and Milne, J. A. : The distribution of hydroxysteroid dehydrogenases in human sebaceous glands. *Br. J. Dermatol.* **78**, 451 (1966).

2) Pochi, P. E. and Strauss, J. S. : Sebaceous gland response in man to the administration of testosterone, Δ^4 -androstenedione and dehydroisoandrosterone. *J. Invest. Dermatol.* **52**, 32 (1969).

3) Labrie, F. : Intracrinology-At the cutting edge. *Mol. Cell. Endocrinol.* **78**, C113-C118 (1991).

4) Dumont, M., Luu-The, V., Dupond, E., Pelletier, G. and Labrie, F. : Characterization, expression and immunohistochemical localization of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 415 (1992).

5) Gomez, E. C. and Hsia, S. L. : In vitro metabolism of testosterone-4-[¹⁴C] and Δ^4 -androstene-3,17-dione-4-[¹⁴C] in human skin. *Biochemistry* **7**, 24 (1968).

6) Andersson, S. and Russell, D. W. : Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3640 (1990).

7) Hay, J. B. and Hodgins, M. B. : Metabolism of androgens in vitro by human facial and axillary skin. *J. Endocrinol.* **59**, 475 (1973)

8) Chen, C., Li, X., Singh, S. M. and Labrie, F. :

- Activity of 17 β -(N-alkyl/ arylformamido) and 17 β -[(N-alkyl/aryl)alkyl/arylamido]-4-methyl-4-aza-5 α -androstane-3-ones as 5 α -reductase inhibitors in the hamster flank organ and ear. *J. Invest. Dermatol.* **111**(2), 273 (1998).
- 9) Harris, G. S. and Kozarich, J. W.: Steroid 5 α -reductase inhibitors in androgen-dependent disorders. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**(2), 254 (1997).
 - 10) Schwartz, J. I., Tanaka, W.K., Wang, D. Z., Edell, D. L., Geissler, L. A., Dallob, A., Hafkin, B. and Gertz, B. J.: MK-386, an inhibitor of 5 α -reductase type 1, reduces dihydrotestosterone concentrations in serum and sebum without affecting dihydrotestosterone concentrations in semen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**(5) 1373 (1997).
 - 11) Guarna, A., Belle, C., Machetti, F., Occhiato, E.G., Payne, A. H., Cassiani, C., Commerci, A., Danza, G., De Bellis, A., Dini, S., Marrucci, A. and Serio, M.: 19-nor-10-azasteroids: a novel class of inhibitors for human steroid 5 α -reductases 1 and 2. *J. Med. Chem.* **40**(7) 1112 (1997).
 - 12) Ellsworth, K., Azzolina, B., Baginsky, W., Bull, H., Chang, B., Cimisi, G., Mitra, S., Toney, J., Bakshi, R. K., Rasmusson, G. R., Tolman, R.L. and Harris, G. S.: MK386, a potent, selective inhibitor of the human type 1 5 α -reductase. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **58**(4) 377 (1996)
 - 13) Andersson, S., Bergman, D. M., Jenkins, E. P. and Russell, D. W.: Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* **354**, 159 (1991).
 - 14) Chakraborty, J., Thompson, J., MacSween, M. P., Muir, M. V., Calman, K.C., Grant, J. K. and Milne, J. A.: The in-vitro metabolism of [7 α -³H]dehydroepiandrosterone by human skin. *Br. J. Dermatol.* **83**, 477 (1970).
 - 15) Sansone, G. and Reisner, R. M.: Differential rates of conversion of testosterone to dihydrotestosterone in acne and in normal human skin-a possible pathogenic factor in acne. *J. Invest. Dermatol.* **56**, 366 (1971).
 - 16) Bingham, K. D. and Shaw, D. A.: The metabolism of testosterone by human scalp skin. *J. Endocrinol.* **57**, 111 (1973).
 - 17) Kuttann, E., Mowszowicz, I., Schaison, G. and Mauvais-Jarvis, P.: Androgen production and skin metabolism in hirsutism. *J. Endocrinol.* **75**, 83 (1977).
 - 18) Motoyoshi, K.: Enhanced comedo formation in rabbit ear skin by squalene and oleic acid peroxide. *Br. J. Dermatol.* **109**(2), 191 (1983).
 - 19) Woo-Sam, P. C.: The effect of vitamin A acid on experimentally induced comedones: an electron-microscope study. *Br. J. Dermatol.* **100**(3), 267 (1979).
 - 20) Maeda, T.: An electron microscopic study of experimentally-induced comedo and effects of vitamin A acid on comedo formation. *Br. J. Dermatol.* **18**(7), 397 (1991).
 - 21) Lee, S., Choi, B., Lee, S. H. and Lee, J. B.: Effect of isotretinoin on experimentally induced comedones. *Arch. Dermatol. Res.* **279**(2), 120 (1986).
 - 22) Oh, C. W. and Myung, K. B.: An Ultrastructural study of the retention hyperkeratosis of experimentally induced comedones in rabbits: the effects of three comedolytics. *J. Dermatol.* **23**(3), 169 (1996).
 - 23) Woo-Sam, P. C.: A quantitative study of membrane coating granules in follicles undergoing experimental comedo formation. *Br. J. Dermatol.* **99**(4), 387 (1978).
 - 24) Ito, M., Motoyoshi, K., Suzuki, L. and Sato, Y.: Sebaceous gland hyperplasia on rabbit pinna induced by tetradecane. *J. Invest. Dermatol.* **85**(3), 249 (1985).
 - 25) Motoyoshi, K.: The correlation between surface microscopy and dermal histology in tetradecane-induced comedones in rabbit ear skin. *Br. J. Dermatol.* **108**(5), 573 (1983).
 - 26) 최승만, 김민주, 최영호, 안호정, 윤여표: *Propionibacterium acnes*에 대한 천연물의 항균효과 검색. 약학회지 **42**(1), 89 (1998).
 - 27) 이승현, 박태현: 여드름의 최신지견. 항공우주의학 **6**(4), 57 (1996).
 - 28) Ellish, J. A., Stebbing, M. and Harrap, S. B.: Genetic analysis of male pattern baldness and the 5-alpha reductase genes. *J. Invest. Dermatol.* **110**(6), 849 (1998).
 - 29) Hoffmann, R. and Happle, R.: Finasteride is the main inhibitor of 5 α -reductase activity in microdissected dermal papillae of human hair follicles. *Arch. Dermatol. Res.* **291**(2) (1999).