

## 2종 식물 추출물이 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

차은정 · 김안근<sup>#</sup>

숙명여자대학교 약학대학

(Received January 2, 2003; Revised February 7, 2003)

### The Effects of Two Plant Extracts on Tyrosinase Activity

Eun Jung Cha and An Keun Kim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — The purpose of this work was to study the effect of extracts from pharbitidis seed and watermelon's inner shell on tyrosinase activity. For this purpose, the effects of plant extracts on total melanin synthesis and tyrosinase activity were measured. The results showed that the extracts effectively inhibited the tyrosinase activity and total melanin synthesis. The non-cytotoxicity of the plant extracts was confirmed by MTT assay.

**Keywords** □ Tyrosinase activity, melanin synthesis, B16 melanoma cell

Melanin은 동물의 조직 및 피부에 존재하는 갈색 또는 흑색의 색소로서,<sup>1)</sup> 이러한 멜라닌은 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인물질로 피부가 광노화 되는 것이나 일광 각화증을 억제하는 등 긍정적인 기능과 더불어 미용 상 문제를 일으키는 과다한 색소 침착이나 멜라닌 전구체의 독성으로 인한 세포 사멸 등 부정적인 면도 가지고 있다.<sup>2,3)</sup> 멜라닌(melanine)은 멜라노사이트(melanocyte) 내의 소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 합성되며, 멜라노사이트의 수지상 돌기를 통하여 주위의 케라티노사이트(keratinosite)로 이행한다. Melanosome내에서의 합성과정은 tyrosine이 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 quinone과 indolquinone 화합물들의 여러 중간체를 거쳐 알칼리에 난용성 물질인 흑, 갈색의 멜라닌(eumelanin)과 알칼리에 가용성인 황색 혹은 적색의 멜라닌(pheomelanin)의 혼합물로 합성된다.<sup>4)</sup> 이러한 합성 과정 중에서 tyrosine에서 dopaquinone까지는 tyrosinase가 가장 크게 관여하고, 그 이후에는 자동산화가 큰 역할을 한다고 알려져 있다.<sup>5)</sup> 이렇게 생성된 멜라닌의 양이 많아지면 기미, 주근깨, 검버섯 등 과다 색소증(hyperpigmentation)으로 인한 질환을 일으키게 된다. 또한 환경오염이 심해짐에 따라 자외선 노출의 증가로 인한 피부 노화가 촉진되어 과다 색소증이 점점 증가하고 있는 추세이다. 이러한 과다 색소증이 얼굴 부위에 일어

나게 되면 중요한 미용상의 결함과 더불어 많은 질병의 원인이 되기도 하는 정신적인 스트레스를 유발하므로 치료가 필요하다.<sup>6)</sup>

Tyrosinase<sup>5)</sup>는 자연계에 널리 분포하는 효소로 polyphenol oxidase이며, 생체 내에서 두 가지의 다른 반응을 촉매한다. 그 한가지는 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 되는 것이다. 그러므로 tyrosinase의 활성을 억제하는 것은 피부 멜라닌 생성을 억제시키는데 중요한 역할을 할 것이며 이러한 tyrosinase 억제 효과가 있다고 알려진 물질로는 우바우르시의 arbutin, 상백피에서 분리한 oxyresveratrol, dihydromorin, artocarbene, 4-prenyloxy resveratrol, 누룩곰팡이의 이차 대사물인 kojic acid 그리고 감초의 성분인 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol 등이 있다.<sup>7)</sup> 본 연구에서는 멜라닌 형성에 가장 결정적인 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 활성을 억제하여 미백 효과를 나타내는 물질을 찾아 부작용이 없는 미백물질을 개발하고자 하여<sup>8,9)</sup> 수박 속껍질과 흑축의 두 가지 식물 추출물을 실험에 사용하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료의 제조

한약재인 흑축은 서울 경동시장 내의 한약 건재상에서 구입하

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-710-9566 (팩스) 02-715-9498  
(E-mail) akkim@sdic.sookmyung.ac.kr

여 사용하였고, 수박 속껍질은 시중에서 구입하여 걸 껍질을 제거한 후 실험에 사용하였다. 흑측에는 80% 메탄올을, 수박 속 껍질에는 100% 메탄올을 넣은 후 3시간씩 3회 가열, 추출하고 3M 여과지를 이용하여 여과하였다. 이 여과액을 감압 농축하고 동결 건조하여 그 분말을 사용하였다.

#### 시약

FPMI 1640 powder medium, fetal bovine serum(FBS), antibiotics(penicillin G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml), trypsin-EDTA(0.25% trypsin, 1 mM EDTA·4Na), sodium pyruvate, trypan blue는 Gibco BRL Life Technologies Inc. 제품을 사용하였고, sodium bicarbonate, N-2-hydroxyethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt(EDTA), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), tyrosine, L-DOPA, tyrosinase, protein assay kit는 Sigma chemical Co. 제품을 사용하였다. Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)은 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 1L로 조제하여 멸균 여과한 다음 사용하였고, 이들 시약들은 모두 특급 및 일급 시약을 사용하였다. 모든 실험에서 deionized water를 사용하였다.

#### 세포 배양

한국 세포주 은행(KCLB)에서 분양 받은 mouse melanoma 세포 B16F10을 10% FBS와 항생제(penicillin G 100 sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 µg/ml), 1 mM sodium pyruvate를 포함하는 RPMI 1640 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양액의 pH는 10 mM HEPES와 2 mg/ml sodium bicarbonate를 사용하여 7.2~7.4로 조정하였다. 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask나 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask에서 계대 배양하고 confluent되었을 때 trypsin-EDTA 용액을 처리하여 실험에 사용하였다.

#### Total melanin 합성 억제율 측정

B16 melanoma cells을 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 6-well plate에 각각의 test agent와 동량으로 넣어 37°C에서 3일간 배양한다 배지를 제거하고, PBS로 세척한 후 1N의 NaOH 1 ml를 넣어 pipetting하였다. 이렇게 얻어진 crude cell extract를 405 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 농도를 결정하였다.

#### Mushroom tyrosinase의 활성 억제율 측정

실험관에 150 µl의 mushroom tyrosinase(150 unit), 225 µl(2.5 mM)의 L-tyrosine, 225 µl의 0.4 M HEPES buffer(pH

6.8), 그리고 300 µl의 PBS 혹은 각 농도의 시료를 섞은 후 배양 전 과 15분 간 배양한 후 475 nm에서의 흡광도를 각각 측정하여 억제되는 정도를 알아보았다.

#### B16 melanoma cell tyrosinase의 활성 억제율 측정

Maeda<sup>10)</sup>의 방법을 약간 변형하여 실험하였다. B16 melanoma cell을 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 6 well에 넣어서 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 전 배양한 후, 각각의 시료 용액과 기준 용액을 세포액과 같은 양을 넣어 주었다. 2일 방치 후, PBS로 세척하고 90 µl의 1% triton-X와 10 µl의 10 mM L-dopa를 넣고 30분 배양하였다. 475 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 억제 정도를 측정하였다.

#### 세포 생존율 측정

B16 melanoma cells을 2.5×10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 96-well plate의 well에 100 µl씩 가한 후, 배양기(37°C, humidified 5% CO<sub>2</sub>)에서 24시간 동안 안정화시킨다. 각각의 시료 용액을 농도 별로 각 well에 100 µl씩 넣어 실험군으로 하고, 각 시료를 녹인 용매 100 µl씩 가한 것을 대조군으로 하여 시료 용액을 넣은 후 24시간 배양하였다. MTT 용액을 well 당 50 µl씩 넣어 4시간 동안 배양기에 방치한 후 원심 분리하여 상등액을 제거한다. 여기에 DMSO 원액을 well 당 50 µl씩을 가하여 1분간 shaking하면서 formazan을 완전히 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 흡광도(570 nm)를 측정하였다.

#### 통계처리

그래프의 모든 수치는 각 실험횟수에 대한 평균과 표준 오차로 나타내었으며, 통계적 유의성에 대한 검증은 t-Student test를 사용하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

아미노산의 일종인 tyrosine은 tyrosinase의 작용을 받아 몇 단계를 거쳐 피부의 주된 색소인 멜라닌으로 합성된다.<sup>5,10)</sup> 이런 total melanin 합성 억제에 대한 효과를 보면 control의 멜라닌 합성 저해율을 0%로 했을 때 positive control인 kojic acid의 저해율은 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.15 mg/ml, 0.2 mg/ml에서 각각 22%, 24.5%, 29.8%, 33.1%로 나타났고 수박 속껍질용 대조군과 비교하여 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.15 mg/ml, 0.2 mg/ml에서 각각 17.4%, 21.3%, 34.7%, 39.2%로 우수한 저해효과를 보였다. 감초의 경우, 농도가 증가할수록 저해율도 증가하는 경향을 보였고, 실험한 모든 농도에서 kojic acid와 비슷하거나 약간 낮은 저해율을 보였다. 특히 0.15 mg/ml 이상의 농도에서는 수박 속 껍질이 kojic acid 보다 높은 저해율을 나타냈다(Fig. 1). 흑측의

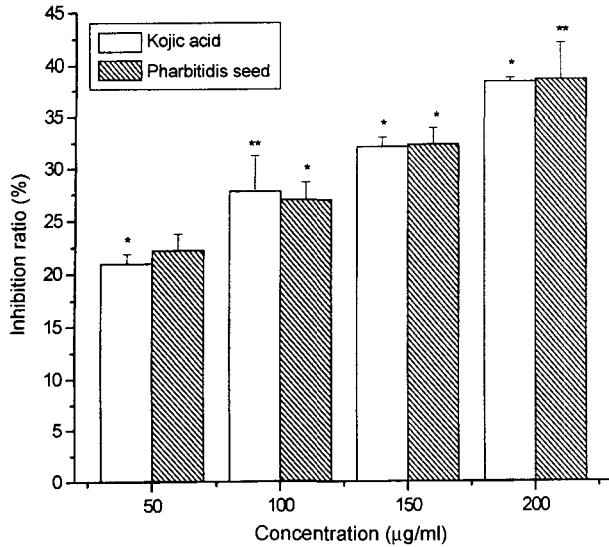


Fig. 1 - Inhibitory effects of pharbitidis seed on total melanin synthesis. The cells were treated with various concentration of pharbitidis seed (Ph) for 12 hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.01$  compared with control.

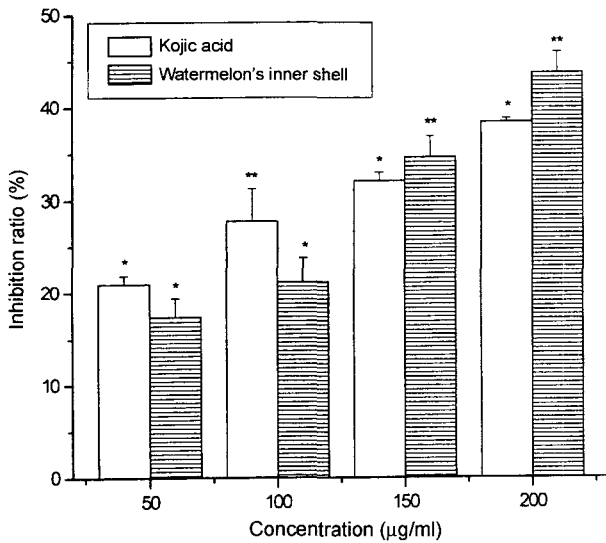


Fig. 2 - Inhibitory effects of watermelon's inner shell on total melanin synthesis. The cells were treated with various concentration of watermelon's inner shell (W) for 12 hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.01$  compared with control.

경우, 농도가 증가할수록 저해율도 증가하는 경향을 보였고 실험한 모든 농도에서 kojic acid와 비슷하거나 약간 낮은 저해율을 보였다(Fig. 2). 수박 속껍질과 흑축 추출물은 총 멜라닌 생성 억제 실험에 있어서 농도의존적으로 멜라닌 합성을 억제하였으며 멜라닌 합성에 있어 가장 중요한 효소인 tyrosinase의 활성은 투여한 식물 추출물의 농도에 의존적이면서 효과적으로 억제

됨을 보였다.

Tyrosine을 hydroxylation시키는 동시에 dopa를 합성하는 과정과 dopa를 oxidation시켜 dopaquinone을 만드는 과정에 모두 관여하는 tyrosinase의 작용을 억제한다면 멜라닌 합성을 효과적으로 억제할 수 있게 되는데 mushroom tyrosinase의 활성 억제 효과를 보면 수박 속껍질과 흑축추출물 모두에서 농도 의존적으

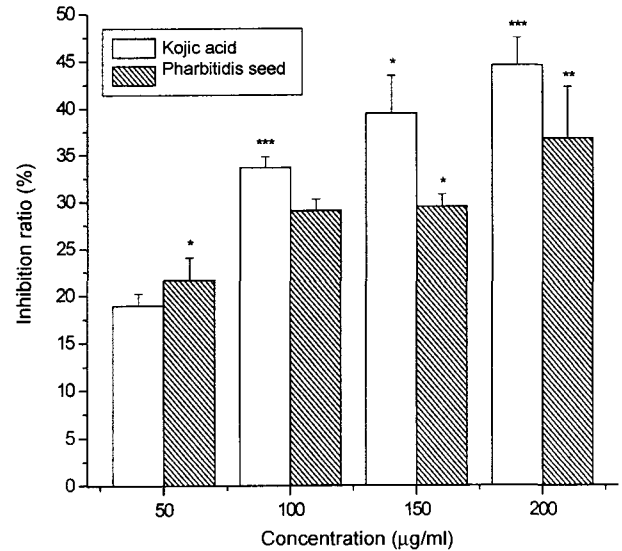


Fig. 3 - Inhibitory effects of pharbitidis seed on mushroom tyrosinase. The cells were treated with various concentration of pharbitidis seed (Ph) for 12 hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  compared with control.

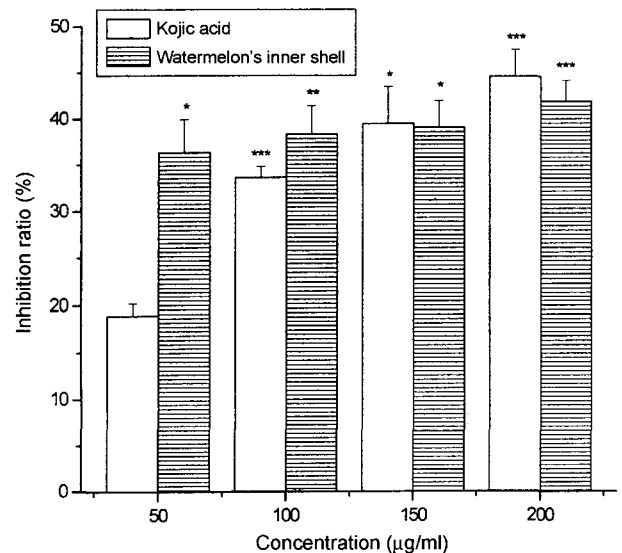


Fig. 4 - Inhibitory effects of watermelon's inner shell on mushroom tyrosinase. The cells were treated with various concentration of watermelon's inner shell (W) for 12 hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  compared with control.

로 tyrosinase 활성의 억제효과가 있음을 관찰할 수 있었다. 특히 0.15 mg/ml의 농도 이상에서는 tyrosinase의 활성저해율이 40%(control의 저해율 0%) 정도까지 증가하여 positive control인 kojic acid와 유사하게 억제하였다(Figs. 3, 4). 또한 B16

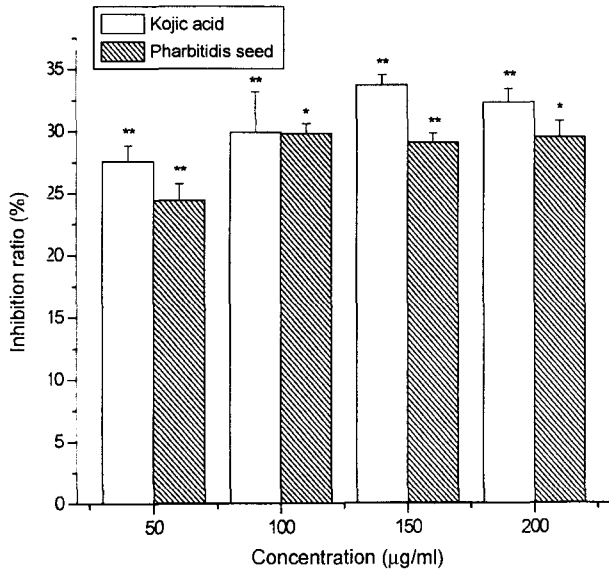


Fig. 5 – Inhibitory effects of pharbitidis seed on B16 melanoma cell tyrosinase. The cells were treated with various concentration of pharbitidis seed (Ph) for 12 hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\*P<0.001, \*P<0.01 compared with control.

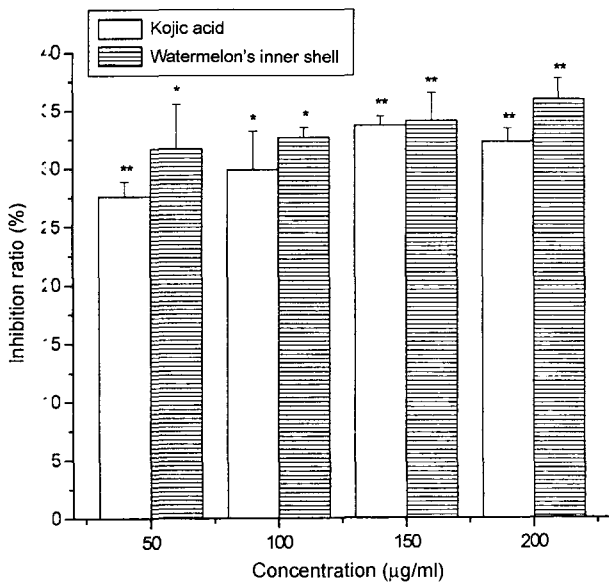


Fig. 6 – Inhibitory effects of watermelon's inner shell on B16 melanoma cell tyrosinase. The cells were treated with various concentration of watermelon's inner shell (W) for 12 hr. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\*P<0.001, \*P<0.01 compared with control.

melanoma에서의 tyrosinase활성 억제 효과를 보면 mushroom tyrosinase를 가지고 활성을 측정한 실험과 대체적으로 비슷한 결과를 나타냄을 알 수 있다. 0.2 mg/ml의 농도에서 kojic acid은 30.3%의 저해율을, 흑축과 수박 속껍질의 저해율은 각각 25.3%와 31.1%로 나타났다(Figs. 5, 6). 이것은 이들 물질이 여러 가지 미백 기전 중 tyrosinase를 억제하는 기전을 통하여서도 멜라

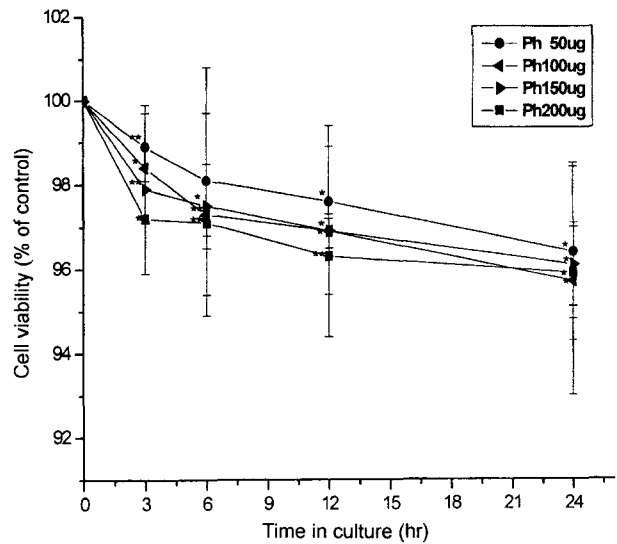


Fig. 7 – Effects of pharbitidis seed on proliferation of B16 melanoma cells. The cells were treated with various concentration of pharbitidis seed (Ph) for indicated times. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\*P<0.01, \*P<0.05 compared with control.

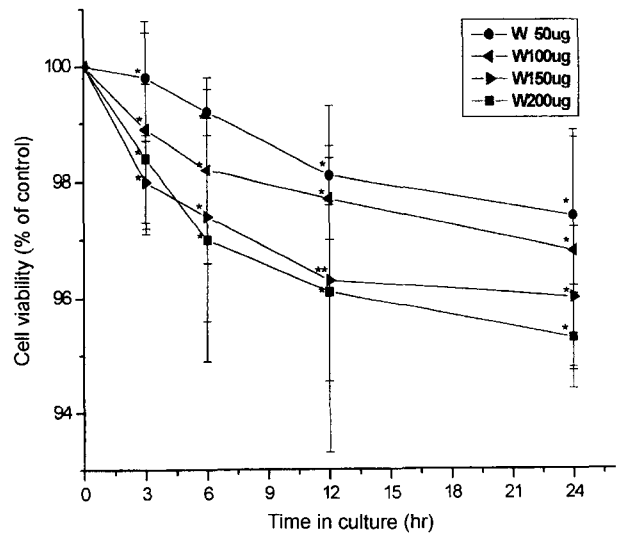


Fig. 8 – Effects of watermelon's inner shell on proliferation of B16 melanoma cells. The cells were treated with various concentration of watermelon's inner shell (W) for indicated times. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 compared with control.

닌 생성을 억제한다는 것을 나타내주는 결과라 생각할 수 있다.

B16 melanoma cell의 proliferation에 미치는 영향을 MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정해 본 결과 0.2 mg/ml의 농도에서 24시간 배양 시 흑축과 수박 속껍질의 세포 생존율은 각각 95.9%와 95.9%로 이들 식물 추출물이 세포에 미치는 영향은 거의 없음을 알 수 있다(Figs. 7, 8). 세포 생존율을 측정한 결과, 실험에 사용한 가장 높은 농도의 식물 추출물에 의한 세포 독성은 매우 작았다. 멜라닌 생성 억제는 세포 독성으로 인한 세포 사멸과 효소 활성의 억제에 의한 것으로 나눌 수 있는데,<sup>12-14)</sup> 본 실험에 사용한 추출물들은 세포 독성을 나타내지 않았으므로 tyrosinase의 활성의 억제와 dopa 자동산화 억제와 같은 방법으로 미백 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 숙명여자대학교 2001년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

### 인용문헌

- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. : Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902 (1991).
- Kaufman, R. : Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol.* **205**, 87 (1991).
- Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S. and Nishiyama, S. : Pigment production in murine melanoma cells in regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), dopachrome taturerase (TRP2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 12 (1993).
- 三島豊 : “色素異常症: 總論” 現代皮膚科學大系, 第 15卷, 山本雄他論, 東京, 中山書店 3 (1983).
- Hearing, V. J. and Jimenez, M. : Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigment. *Int. J. Biochem.* **19**(12), 1131 (1987).
- Cho, JoonHwan, Lee, KiMoo, Kim, NamSoo and Kang, WonHyung : The effects of bamboo extract on human melanocytes and B16 melanoma cells in vitro. 4<sup>th</sup> Scientific Conference of the Asian Societies of Cosmetic Scientists (1999).
- 김정아 : 고등식물로부터 Tyrosinase 활성 억제 물질의 탐색 및 분리. 영남대학교 약학 대학원 (1998).
- Ichiro, Koisi : Development of recent melanin control agents and whitening cosmetics. *Fragrance J.* **6**, 39 (1990).
- Yasushi, Tomita : Chemical function of melanin and its biological role in epidermis. *Fragrance J.* **6**, 20 (1990).
- Maeda, K. Tomita, Y., Fukuda, M. and Tagami, H. : Effects of staurosporine, PMA and A23187 on human melanocyte culture with dibutyryl cyclic AMP. *Br. J. Dermatol.* **126**, 118 (1992).
- Korner, A. M. and Pawelek, J. : Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in biosynthesis of melanin. *Science* **217**, 1163 (1982).
- Palumbo, A. kand d'Isxhia, M. : Skin depigmentation by Hydroquinone; a chemical and biochemical in sigh. *Pigment Cell Res. suppl.* **2**, 299 (1992).
- Rilay, P. A. and Sawyer, B. : The melanocytotoxic action of 4-Hydroxy anisole. *J. Invest. Dermatol.* **64**, 84 (1975).
- Menter, J. M., Etemed, A. A., Chapman, W. and Holins, T. D. : In vivo depigmentation by hydroxybenzen derivatives. *Melanoma Res.* **3**, 443 (1993).