

장미과 식물 추출물의 생물학적 활성

서 정 민 · 안 정 엽[†]

(주)생그린 기술연구소

Biological Activities of Rosaceae Plants Extracts

Jeong Min Seo and Jeung-Youb Ahn[†]

Section of Bioscience, Saeng-Green R&D Center, 224-1, Jeongchon-ri, Seonggeo-eup, Chonan-si, Chungnam 330-833, Korea

요 약: 장미과 식물(에탄올 추출)의 항산화력을 측정하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 자유 라디칼 생성 시스템을 이용하여 하였다. 또한 산화 환원 과정을 통하여 피부의 과잉 색소 생성에 관련된 멜라닌 생합성 과정의 조절 가능성을 조사하였다. 장미과 식물중에서 *Prunus sargentii*, *Rubus coreanus*, *Chaenomeles sinensis*, *Photinia glabra*와 *Pyrus pyrifolia*은 생합성 과정에서 dopa [3-(3,4-dihydroxyphenyl) alanine]를 도파크롬으로 변환시켜 주는 tyrosinase 저해 효과를 나타내었다. MTT 실험법은 장미과 에탄올 추출물의 사람 섬유아세포에 미치는 독성정도를 실험하기 위해 사용되었다. 장미과 식물중 특히 *Prunus sargentii*의 껍질, *Photinia glabra*의 껍질과 나무 그리고 *Chaenomeles sinensis*의 잎, 껍질, 나무 모든 부분에서 mushroom tyrosinase에 대해 100 µg/mL에서 50% 이상의 저해 활성을 보였으며, 10 µg/mL 농도에서 강한 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 또한 이들 추출물은 사람 섬유아 세포에 대해 높은 생존율을 나타냄으로써 멜라닌 형성 과정을 조절할 수 있을 것으로 기대한다.

Abstract: DPPH radical-generating system was used to evaluate the antioxidant properties of the Rosaceae. The inhibitory effects of ethanolic extracts from Rosaceae plants were investigated on melanin biosynthesis which is closely related to hyperpigmentation. Of the Rosaceae extracts, *Prunus sargentii*, *Rubus coreanus*, *Chaenomeles sinensis*, *Photinia glabra* and *Pyrus pyrifolia* showed a potent inhibition of tyrosinase, the enzyme which converts 3-(3,4-dihydroxyphenyl) alanine (dopa) to dopachrome in the melanin biosynthetic process. Furthermore, MTT assay was used to check the cytotoxicity of extracts on the human foreskin fibroblast cell line, Hs68. Among the Rosaceae, bark of *Prunus sargentii*, bark wood of *Photinia glabra* and all parts of *Chaenomeles sinensis* showed more than 50% inhibition of mushroom tyrosinase activity at 100 µg/mL and more than 80% of strong DPPH radical-scavenging activity at 10 µg/mL. In addition to, they had no cytotoxic activity on Hs68. These results suggest that these extracts might be except a controller in pigmentation.

Keywords: rosaceae, tyrosinase, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), MTT

1. 서 론

활성 산소(reactive oxygen species, ROS)는 자외선에 의한 피부의 손상을 매개하며, 이런 산화적 손상은 광노화의 주 원인이 되며 피부암 같은 극도의 피부 질환을 유발하게 하기도 한다. 작은 분자량의 항산화제(vitamin C, glutathione, tocopherol and ubiquinol)나 항산화 효소(superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and thioredoxin reductase)들은 이러한 ROS로부터 피부를 보호한다. 이러한 결과들로 항산

화를 지닌 물질은 산화 환원 작용을 통해 피부의 방어기능에 중요한 역할을 할 수 있으며, 이러한 산화 환원 작용은 피부에서 색소 형성 과정의 조절에도 많은 영향을 끼칠 수 있는 것으로 사료된다. 이런 피부 착색에 관련된 멜라닌 생합성 경로는 주로 tyrosinase 작용에 의한 보고가 대다수를 이루고 있다[1]. Tyrosinase 효소는 tyrosine을 DOPA quinone으로 전환시키는 효소로써 멜라닌 생성시 rate-limiting step에 관여하며 멜라닌 생성을 조절하는 중요한 단계로 알려져 있다[2]. Tyrosinase는 tyrosine에 hydroxylation을 일으켜 L-DOPA를 생성하는 tyrosine hydroxylase와 L-DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 생성하는 DOPA oxidase의 복합체로 구성되어 멜라닌 합

[†] 주 저자 (e-mail: ahnahnjy@hotmail.com)

성에 관여한다. 이러한 과정을 거쳐 생성된 멜라닌은 멜라닌 세포에서 endothelin, α -MSH, NO 등 여러 요인들에 의해 생성이 증가되고 이로 말미암아 만들어진 다량의 멜라닌이 각질형성세포로 전달되어 피부 상피층에 축적된다[3,4]. 멜라닌 생성 억제물질은 멜라닌 생성의 주요 소인 tyrosinase를 직접 억제하거나 tyrosinase에 대해서는 직접적인 억제를 나타내지 않지만 세포내에서 멜라닌 생성단계를 조절한다. 따라서 tyrosinase 활성저해 실험이 멜라닌 중합체 억제제 개발의 초기 탐색단계에서 많이 활용되고 있다.

장미과는 세계에 널리 퍼져 있으며 특히 유럽, 북아메리카, 아시아에 많으며 6아과 115속 3,200종으로 구성되는 것으로 알려져 있으며 한국에는 4아과 35속 207종이 자란다. 그 종류로는 *Fragaria* (딸기), *Rubus* (블랙베리, 로건베리, 라즈베리), *Prunus* (살구나무, 벚꽃, 복숭아, 자두, 산벚나무), *Malus* (사과), *Pyrus* (배), *Photinia* (홍가시나무), *Chaenomeles* (모과나무)[5] 등이 있으며 항산화[6], 항침해수용성[7], 항염증[8], 항소양증[9], tyrosinase의 저해제[10]와 항암성[11]을 증진시키는 효과를 가진다고 보고된 바 있다.

본 연구에서는 항산화성을 가진 장미과 식물로부터 에탄올 추출을 하여 얻어진 물질이 멜라닌 생성에 있어서 주요소인 tyrosinase에 저해 활성 정도를 실험하였으며 또한 이들의 세포에 대한 독성정도를 조사하였다.

2. 실험 방법

2.1. DPPH 라디칼 소거

항산화 활성은 DPPH (Sigma)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하였다. 0.2 mM DPPH methanol 용액에 일정량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 30 min 동안 반응 후 ELISA plate reader (Model 550, Bio-Rad, CA)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다. 대조군은 시료 대신 메탄올을 넣었으며, 자유 라디칼 소거율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(A - B) - (C - D)}{A - B} \times 100$$

A: Absorbance of control solution after incubation

B: Absorbance of control solution before incubation

C: Absorbance of sample solution after incubation

D: Absorbance of sample solution before incubation

2.2. Tyrosinase 활성 억제

67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 사용하여 8.3 mM L-DOPA (ACROS), 50 unit/mL mushroom

tyrosinase (Sigma)를 제조하였으며 96 well에 각각 120 μ L와 40 μ L를 첨가하였다. 여기에 시료를 농도에 따라 40 μ L를 첨가하여 37°C에서 30 min간 효소반응을 진행시켰다. 반응생성물인 도파크롬의 흡수파장인 490 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 효소 저해 활성을 위의 식에 따라 구했다.

2.3. 세포 생존율

사람 섬유아 세포(human normal fibroblast, Hs68, ATCC, CRL-1635)를 이용하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma] 시험법을 수행하였다. 섬유아 세포주 Hs68을 24 well-plate에 5×10^4 cells/well씩 분주하여 10% 우태아혈청/DMEM (GIBCO) 배지로 24 h 배양시킨 다음, 새로운 배지와 적정 농도 범위(10~100 μ g/mL)에서 단계적으로 희석한 시료를 가하고 다시 48 h 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후, MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 첨가한 뒤 2 h 동안 추가 배양하고, MTT가 첨가된 배지를 버린 후, 각 well당 isopropanol을 500 μ L씩 가하여 교반하여 ELISA plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료를 처리하지 않고 배지만으로 배양하여 설정한 후 흡광도를 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

활성 산소는 정상적인 세포 대사 과정, 약물 대사 과정, 허혈 재관류, 염증, 자외선 등에 의해 세포내에서 지속적으로 생성되어 생체는 이들에 의한 자유 라디칼 반응의 유해 효과에 항상 노출되어 있다. 지질 과산화의 연쇄 반응 등에 관여하는 산화성 자유 라디칼을 소거하기 위하여 환원력에 의해 항산화 작용을 검색하는 방법으로, DPPH 자유 라디칼이 이용될 수 있다. 이 라디칼은 환원되어 hydrazine의 형태로 되면서 탈색되어 흡광도 감소로 이를 측정할 수 있다. 본 연구에서는 시료에 의해서 라디칼에 대한 소거 능력을 측정하는 DPPH를 사용하여 천연물들을 검색한 결과 장미과 식물에서 높은 항산화 능력을 나타내었다. Table 1에 장미과 식물의 에탄올 추출물에 대한 DPPH 소거 활성 정도를 정리하였다.

그 중 *Prunus sargentii*의 껍질과 나무, *Chaenomeles sinensis*의 껍질과 잎, *Photinia glabra*와 *Pyrus pyrifolia*의 껍질은 10 μ g/mL에서 α -tocopherol에 비해 다소 우수한 DPPH 라디칼 소거제로서 나타났다. 사용된 식물 부위 중 특히 bark에서 80% 이상(10 μ g/mL)의 소거능을 나타내었으며, *Prunus sargentii*의 껍질은 ascorbic acid와 비슷한 정도의 효과를 나타내었다. 이 결과는 Cho et al.[6]의 데이터와 유사한 양상을 나타낸다.

Table 1. DPPH Radical Scavenging Activity of EtOH Extracts for Rosaceae Family

Plant name	Part used	Radical scavenging activity (%)		
		10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>Prunus sargentii</i>	leaf	4.1	57.1	77.2
	bark	86.1	87.0	85.4
	wood	81.8	87.7	84.7
<i>Rubus coreanus</i>	leaf	31.4	85.5	87.1
	bark	9.4	57.4	82.9
<i>Chaenomeles sinensis</i>	leaf	82.4	88.5	87.6
	bark	82.2	86.3	87.1
	wood	62.9	86.9	88.1
<i>Photinia glabra</i>	leaf	41.6	86.7	85.2
	bark	82.0	85.7	84.7
	wood	73.0	86.5	83.1
<i>Pyrus pyrifolia</i>	leaf	33.8	81.8	83.3
	bark	82.8	86.3	84.7
	wood	7.5	49.0	71.8
References				
L-Ascorbic acid		86.1		
α -Tocopherol		78.3		

Table 2. Tyrosinase Inhibitory Activity of the Plant Extracts

Plant name	Part used	Inhibition of tyrosinase (%)		
		10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
<i>Prunus sargentii</i>	leaf	44.1	54.9	56.4
	bark	20.3	26.4	51.6
	wood	13.9	18.2	28.9
<i>Rubus coreanus</i>	leaf	27.6	40.5	52.7
	bark	39.1	47.9	48.2
<i>Chaenomeles sinensis</i>	leaf	38.3	45.2	52.8
	bark	21.2	31.7	59.7
	wood	18.7	24.9	54.5
<i>Photinia glabra</i>	leaf	34.0	44.0	49.4
	bark	47.3	48.5	52.0
	wood	39.3	50.0	52.4
<i>Pyrus pyrifolia</i>	leaf	28.6	33.7	42.3
	bark	24.6	32.5	40.8
	wood	35.5	41.1	53.4
References				
Kojic acid		26.7	51.5	90.2
L-Ascorbic acid		16.7	41.3	101.0
Resveratrol		21.7	24.7	51.9

Table 3. Effects of Rosaceae Plant Extracts on Cell Growth of Hs68 Cells

Plant name	Part used	Cell viability (%)	
		10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>Prunus sargentii</i>	leaf	97.7	38.1
	bark	97.4	92.9
	wood	104.2	97.1
<i>Rubus coreanus</i>	leaf	102.8	10.4
	bark	103.7	40.3
<i>Chaenomeles sinensis</i>	leaf	107.8	109.8
	bark	109.7	105.7
	wood	101.7	91.2
<i>Photinia glabra</i>	leaf	98.8	99.9
	bark	108.4	90.6
	wood	105.4	94.7
<i>Pyrus pyrifolia</i>	leaf	102.8	101
	bark	105.3	118
	wood	95.8	77.2

한편, 멜라닌 생성 과정은 비교적 안정한 물질인 tyrosine에서 출발하는 일련의 산화 중합 반응이다. 이 과정에서 tyrosinase가 중요한 역할을 하며, 이 효소의 작용으로 생성되는 중간체인 dopa quinone은 불안정하여 도파 크롬을 거쳐 멜라닌 색소로 산화 중합하게 된다. 따라서 이 tyrosinase 효소를 저해하거나 그 중간체들의 산화 반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 보여지고 있다. 장미과의 에탄올 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 검토하기 위해 tyrosinase 효소에 의한 dopa의 산화에 대한 영향을 조사한 대부분의 시료 1000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 kojic acid나 ascorbic acid보다 높지 않으나 resveratrol보다는 높은 억제 작용을 하는 것이 다소 나타났다(Table 2). 그러나 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 *Prunus sargentii*는 kojic acid보다 높은 저해활성을 나타내었으며 *Photinia glabra*, *Rubus coreanus*, *Chaenomeles sinensis*의 잎, *Pyrus pyrifolia*의 나무는 ascorbic acid와 비슷하거나 높은 저해 작용을 하는 것이 관찰되었다. 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 대부분의 시료가 kojic acid나 ascorbic acid보다 dopa의 자동 산화를 저해하였다. 즉, 이 시료들은 주로 낮은 농도에서 효소 저해 활성을 보임을 추측할 수 있었다. 이런 멜라닌 생성 저해는 항산화 저해와 깊은 관련을 나타내는데, 실제로 kojic acid나 arbutin 등의 물질은 tyrosinase 저해 작용과 항산화 작용에 의해 멜라닌 생성을 감소시킨다고 보고된 바 있다.

또한 세포의 증식이나 독성 실험을 위해 MTT를 사용하여 장미과의 에탄올 추출물을 사람 섬유아 세포에 처

리하여 실험을 수행하였다. 대부분이 100 µg/mL 농도를 제외하고는 독성을 나타내지 않았다(Table 3). 그리고 *Pyrus pyrifolia*의 껍질은 다른 시료에 비해 세포 증식 효과를 나타내었다.

4. 결 론

이상의 결과로부터 장미과 중 *Prunus sargentii*의 껍질, *Chaenomeles sinensis*의 모든 부분, *Photinia glabra*의 껍질과 나무는 높은 항산화력과 tyrosinase 활성 저해능을 가지며 또한 사람 섬유아 세포에서 독성을 나타내지 않아 멜라닌 색소의 과잉 생성에 의해 진행되는 여러 단계를 조절할 수 있을 것이라고 사료된다. 특히 *Photinia glabra*의 경우 생물학적인 연구보고가 미흡하여 앞으로의 연구가 주목된다.

참 고 문 헌

1. A. Korner and J. Pawelek, Mammalian tyrosinase catalases three reaction in the biosynthesis of melanin, *Science*, **217**, 1163 (1983).
2. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**, 2902 (1991).
3. V. J. Hearing, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *Soc. Invest. Dermatol.*, **4**(1), 24 (1999).
4. G. C. Romero, E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne, and R. Ballotti, Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis, *J. Clin. Invest.*, **99**(4), 635 (1997).
5. S. Jung, C. Jesudurai, M. Staton, Z. Du, S. Ficklin, I. Cho, A. Abbott, J. Tomkins, and D. Main, GDR (genome database for Rosaceae): integrated web resources for Rosaceae genomics and genetics research, *BMC Bioinformatics*, **5**, 130 (2004).
6. E. J. Cho, T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, S. C. Kim, N. Shibahara, and J. C. Park, Study on the inhibitory effects of korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Phytomedicin*, **10**, 544 (2003).
7. J. Choi, K. T. Lee, J. Ha, S. Y. Yun, C. D. Ko, H. J. Jung, and H. J. Park, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1436 (2003).
8. H. Oku, Y. Ueda, and K. Ishiguro, Antipruritic effects of the fruits of *Chaenomeles sinensis*, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1031 (2003).
9. H. Matsuda, S. Nakamura, and M. Kubo, Studies of cuticle drugs from natural sources. II. Inhibitory effects of prunus plants on melanin biosynthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1417 (1994).
10. H. Gao, L. Wu, M. Kuroyanagi, K. Harada, N. Kawahara, T. Nakane, K. Umehara, A. Hirasawa, and Y. Nakamura, Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells, *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, **51**, 1318 (2003).
11. Y. M. Kim, J. Yun, C. K. Lee, H. Lee, K. R. Min, and Y. Kim, Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds, inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action, *J. Biol. Chem.*, **277**, 16340 (2002).