

테린계 화합물의 미백 및 자외선 손상방어 효능에 관한 연구

김 남 경[†] · 김 미 화 · 강 내 임 · 최 신 욱

(주) 래디안

(2007년 2월 28일 접수, 2007년 3월 13일 채택)

Studies on Whitening and UV Damage Protection Effect of the Pterin Compounds

Nam-Kyoung Kim[†], Mi-Hwa Kim, Nae-Im Kang, and Shin Wook Choi

Radiant Inc., Bioindustry Innovation Center, Hi-Tech Venture Town 198-53, Hupyung-dong, Chuncheon-si,
Gangwon-do 200-957, Korea

(Received February 28, 2007; Accepted March 13, 2007)

요약 테린 계열의 화합물은 생체 내에 존재하여 여러 가지 효소들의 cofactor로서의 역할을 담당하며, 활성 산소에 대하여 제거 작용을 갖는 비단백질 화합물로서 널리 알려져 있다. 테린 계열의 화합물은 (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (이하 6-BH₄)인 완전히 환원된 형태로 활성을 가지며 공기에 노출되었을 경우 쉽게 산화 형태로 전환된다. 6-BH₄의 결핍 증상으로서는 정신 질환 관련된 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 우울증 등의 증상이 있으며, 피부 질환으로는 백반증이 있다. 최근에는 6-BH₄의 멜라닌 합성 저해와 관련된 연구가 수행되어지고 있다. 본 연구에서는 6-BH₄와 유도체인 (6R)-5-methyl-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (이하 methyl-BH₄)의 항산화 효능과 미백 효능 및 자외선 손상 방어 효능에 관한 연구를 수행하였다. 테린 화합물의 DPPH 라디칼 소거능 평가 결과 항산화 표준 물질인 quercetin과 유사한 효능을 갖는 항산화 물질임을 확인하였으며, 피부 세포주에서의 세포 독성이 없는 안전한 물질임을 확인하였다. 또한 미백 효능을 평가하기 위하여 효소 수준에서의 tyrosinase 활성 저해능과 세포 수준에서의 tyrosinase, TRP-1 단백질의 발현 저해 효능을 확인하였다. *In vivo*에서의 미백 효능 평가 결과 역시 증류수 처리군과 비교시 테린 화합물 처리군에서 멜라닌 수치가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 테린 화합물의 또 다른 효능으로서 항산화 효능을 기반으로 하는 자외선 손상 방어 효능을 평가한 결과, 자외선에 의해 유도되는 cytokines의 발현양을 감소시켰으며, 멜라닌의 합성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로부터 테린 화합물의 화장료적 특성을 확인할 수 있었다.

Abstract: (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (6-BH₄) cofactor is essential for various process, and is present in probably every cell or tissue of higher organism. 6-BH₄ is required for various enzyme activities, and for less defined functions at the cellular level. And it is well known about the antioxidant effects as a non-protein compound. Recently, scientists proposed another roles for 6-BH₄ in melanogenesis. 6-BH₄ is a well known tyrosinase inhibitor. In this study, we found that methyl-BH₄ and 6-BH₄ have antioxidant activities and inhibitory activity for melanin synthesis. These pterin compounds were not toxic in HaCaT and B16F10 cells and showed scavenging activity against DPPH radicals. We also showed that pterin compounds decreased protein levels of tyrosinase and TRP-1. In a clinical test, pterin compounds showed the significant skin whitening effect after treatment for 3 weeks. Furthermore pterin compounds significantly suppressed the UVB-induced expression of PGE₂ and IL-6 genes induced UVB in HaCaT and inhibited UVB-induced melanogenesis in B16F10 cells. These results showed the effect of pterin compounds as a cosmeceutical ingredient.

Keywords: pterin compounds, (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, antioxidant, tyrosinase, UVB

1. 서 론

테린 물질은 2-amino-4-oxo-pyrimidine을 기본구조로 가지는 고리화합물로서 다양한 종류의 유도체 물질들이

존재한다. 테린 물질 중 가장 환원된 형태인 (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (이하 6-BH₄)과 산화된 형태인 6-biopterin이 존재하며, 중간체인 7,8-dihydrobiopterin 등 여러 형태의 화합물들이 존재한다[1]. 테린계 화합물의 생합성은 GTP를 출발 물질로 하여 만들어지며, 6-BH₄의 전구체인 sepiapterin이 sepiapterin reductase에 의해 6-

[†] 주 저자 (e-mail: research01@eradiant.co.kr)

BH₄가 만들어진다[2]. 6-BH₄의 가장 널리 알려진 기능 중 하나는 tyrosine hydroxylase와 phenylalanine hydroxylase를 포함하는 몇몇 효소의 redox-active cofactor로서의 기능이다[3]. 이러한 효소들은 산소를 이용해 기질을 산화시키는 기능을 가진 산화효소들이다. 이 효소반응에서 6-BH₄는 BH₄-4 α -carbinolamine을 거쳐 q-dihydrobiopterin으로 산화되고, q-dihydrobiopterin은 dihydrobiopterin reductase라는 효소에 의해 다시 6-BH₄로 환원된다. 이러한 재합성 되는 과정의 순환이 깨어지게 되면 피부의 탈색소가 일어나게 된다고 알려져 있다[4,5]. 또한 상피세포에서 멜라닌 색소가 결핍되는 백반증 환자의 경우 피부 세포내의 catalase 효소의 부족으로 인하여 H₂O₂가 축적이 되며, H₂O₂에 의해 6-BH₄가 산화되어 결과적으로 biopterin이 형성된다[6]. 6-BH₄의 결핍이 일어나면 phenylalanine hydroxylase의 활성이 저하되어 혈액내 phenylalanine의 농도가 증가되고, 그 결과 중추신경계의 발달이 저하되어 정박아가 되는 부정형의 페닐케톤요증(atypical phenylketonuria; PKU) 질환이 발생할 수 있다. 또한 tyrosine hydroxylase와 tryptophan hydroxylase는 뇌에서 도파민, 세로토닌과 같은 신경전달물질들의 생합성에 작용하므로, 6-BH₄ 결핍은 여러 가지 신경질환을 유발할 수 있다. 따라서 6-BH₄는 정신질환으로서 부정형 PKU 질환의 치료약, 파킨슨씨병, 우울증, 알츠하이머 질환등에 사용되며, 혈관장애 질환의 치료약으로도 가능성을 나타내고 있다.

최근에는 멜라닌 합성 과정에서의 6-BH₄의 또 다른 기능이 제안되고 있다. Wood 등은 6-BH₄가 tyrosinase의 allosteric site에 결합함으로써 이 효소의 활성을 저해시킨다고 하였으며[7], Jung 등은 6-BH₄에 의한 tyrosinase의 활성저해를 멜라닌 합성 과정에 중간물질인 dopaquinone을 6-BH₄가 환원시킴으로써 dopachrome의 생성을 저해시키고, 이것이 tyrosinase의 활성을 저해시킨다고 하였다[8]. 또 이와 유사한 tyrosinase 활성 저해 기작으로 amino-(3,4-dihydrophenyl)methyl phosphonic acid가 dopaquinone을 환원시킴으로써 효소의 활성을 저해시킨다고 알려져 있다[9].

멜라닌 생합성은 melanocyte의 melanosome에서 합성되며, melanosome에는 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. Melanocyte는 외부 신호전달 물질 및 호르몬 수용체를 지니고 있어 자외선 등의 외부 조건이나 alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) 등의 호르몬, endotherin과 같은 cytokine과 멜라닌 합성에 필요한 특이적 효소인 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), dopachrome tautomerase (DCT, TRP-2) 등의 효소들이 활성화되어 멜라닌을 형성한다. 이 중 tyrosinase는 멜라닌 합성의 속도결

정 단계에 작용하는 효소로서[10], tyrosine을 DOPA로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 dopaquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 indol-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이다. DCT는 초기에는 TRP-2로 불려졌던 효소로서 dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다[11-13]. 멜라닌에는 eumelanin과 pheomelanin이 있으며, tyrosinase는 eumelanin과 pheomelanin의 합성에 관여, TRP-1, TRP-2는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다[14].

최근 오존층의 파괴로 인한 지구 자외선량의 증가로 피부암 및 광노화의 발생 가능성이 증가되고 있다. 피부는 UVB (290 ~ 320 nm)에 노출되면 혈압 상승과 혈관 투과성이 증가하여 결과적으로 홍반과 부종현상 등이 나타나게 된다[15,16]. 피부에서의 홍반현상을 일으키는 첫 번째 매개체로는 prostaglandin E₂ (PGE₂)가 알려져 있으며, 이 외에도 IL-1, IL-6, TNF- α 등의 cytokine이 존재한다. PGE₂는 COX-2의 발현에 의해 생성되어지는 cytokine으로 피부에서 일어나는 염증 반응에서의 공지된 매개체이며, IL-6 역시 피부에서 다양한 자극 매개 인자들에 의해 증가되는 cytokine으로 IL-6의 발현을 조절하는 원료의 탐색이 지속적으로 이루어지고 있다[17]. 이러한 일련의 염증 반응은 자외선에 의해 생성되는 reactive oxygen species (ROS)에 의한 것이며, ROS에 의한 신호 전달 과정을 거치게 된다. 따라서 항산화 물질이 자외선에 의한 피부 손상을 감소시켜 줄 수 있다는 연구가 수행되고 있으며, alpha-tocopherol acetate (ATA), (-)-epigallocatechin-3-gallate, resveratrol이 그 효능이 있다고 알려져 있다[18-20].

따라서 본 연구에서는 테린 계열 화합물인 6-BH₄, 6-(5-methyl)-BH₄ (이하 methyl-BH₄)(Figure 1)의 미백 효능과 광노화 손상 방지 효능을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

주요 시약인 6-BH₄는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 6-(5-methyl)-BH₄는 Schircks Laboratories (Jona, Switzerland)에서 구입하였다. Mushroom tyrosinase, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), quercetin은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, actin의 anti-body 및 2차 anti-body는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하였으며, PGE₂와 IL-6의 발현 정

도의 측정은 R&D system (USA)의 제품을 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 세포 배양

실험에 주로 사용된 세포로는 HaCaT (Human Keratinocytes cell line), B16F10 (Mouse melanoma cell line)을 사용하였으며 HaCaT 세포주는 강원대학교 생화학과 김병철 교수로부터 B16F10은 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank: KCLB)에서 분양받아 사용하였다. 10% fetal bovine serum, penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 units/mL)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지로 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 배지는 3 ~ 4일 간격으로 교체하고 배양용기에 90% 이상 자라게 되면 계대 배양하여 사용하였다.

2.2.2. DPPH Radical 소거능 측정

메탄올에 용해시킨 0.1 mM DPPH 용액 0.5 mL에 시료를 각 농도별로 희석하여 동량을 넣어주고 잘 혼합하여 주었다. 실온에서 10 min간 반응시키고 ELISA reader를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다[21].

2.2.3. 세포 독성 평가

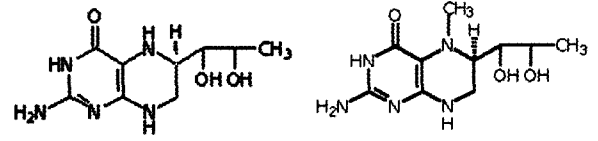
96 well plate에 1×10^5 mL의 HaCaT세포와 B16F10 세포가 들어있는 부유액 100 μ L를 넣고 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 적당한 농도(1 ~ 100 μ M)로 희석되어진 시료가 첨가된 무혈청 배지에서 24 h 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 첨가하고, 2 h 동안 항온기에서 반응시킨 후, MTT 시약이 함유된 배지를 제거하였다. 100 μ L의 acid iso-propanol (0.04 N HCl in iso-propanol)을 첨가하여 30 min간 교반하여 주고, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광 값을 측정하였다[22].

2.2.4. Tyrosinase 활성 측정

Mushroom tyrosinase의 최종 농도가 40 U/mL되게 넣어주고 각 시료들도 정해진 농도가 되게 넣어주었다. 기질인 tyrosine과 dopa를 최종 부피 1 mL이 되도록 0.1 M KPi buffer (pH 7.4)로 채워준 후 ELISA reader를 이용하여 480 nm에서 흡광을 측정하였다.

2.2.5. Melanogenesis 관련 단백질의 발현 측정

B16F10을 6-well 배양접시에 1×10^5 cells/well로 접종하고 24 h 배양하였다. 시료를 적당한 농도로 희석하여 넣어준 후 48 h 추가 배양하였으며, 배양 후 세포를 PBS로 세척하고 radio immuno precipitation assay (RIPA) buffer를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 12% SDS-PAGE



(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin

(6R)-5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin

Figure 1. Structure of Pterin compounds (6-BH₄, Methyl-BH₄).

를 이용하여 단백질을 전개시킨 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) 막에 이전시켰다. 이후 1차 항체와 peroxidase conjugated 되어 있는 2차 항체를 이용하여 단백질을 표지하고 western blot 확인 시약과 Kodak (Chalon sur Saone Cedex, France)사의 BioMax XAR 필름을 이용하여 결과를 확인하였다.

2.2.6. *In vivo*에서의 미백 효능 평가

평균연령 29세의 20 ~ 30 대 남녀 20 명을 대상으로 각 시료(50 μ M)를 3 주 동안 팔 안쪽에 1 일 2 회 도포하고 Mexameter (MX18)를 이용하여 시료의 도포 전과 후의 멜라닌 수치를 비교하였다. 이때의 습도와 온도는 45 ~ 60%, 26 ~ 27°C를 유지하여 주었다.

2.2.7. UVB 처리에 의한 Cytokine 발현 측정

HaCaT 세포를 2×10^5 /well의 농도로 35 mm 배양 접시에 분주하여 24 h 배양하였다. PBS로 세척한 후 PBS 1 mL을 넣고 UVB를 10 mJ/cm²의 농도로 쬐여주었다. 무혈청 배지에 시료를 적당한농도가 되도록 희석하여 처리하여 주고 24 h 배양 후 배양액을 이용하여 PGE₂, IL-6의 발현양을 평가하였다[24]. PGE₂의 발현양은 competitive binding technique의 원리를 이용하여 96-well 배양 접시에 세포 배양 배지 100 μ L와 PGE₂ conjugate, PGE₂ antibody 용액을 각 50 μ L 넣어 준 후 2 h 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 각 well을 세척하여 pNPP substrate을 200 μ L 넣어주고 30 min간 반응시키고 반응을 중지시키기 위하여 1 N H₂SO₄를 50 μ L씩 넣어준 후 405 nm에서 흡광값을 측정하였다. IL-6의 발현양은 sandwich ELISA의 원리를 이용하여 측정하였으며, 세포 배양액 100 μ L를 IL-6 antibody가 pre-coated 된 plate에 넣고 2 h 실온에서 반응시켰다. 반응 후 well을 세척하고 HRP가 결합된 IL-6 conjugate를 100 μ L씩 넣어주고 2 h 실온에서 반응시켰으며, 반응 후 substrate solution을 넣어주고 30 min간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위하여 1 N H₂SO₄를 50 μ L씩 넣어준 후 405 nm에서 흡광값을 측정하였다.

Table 1. DPPH Radical Scavenging Activity (%) of Pterin Compounds. Quercetin was Used as a Positive Control. The Data are Expressed as the Mean Value (\pm S.D.) of Three Experiments

	Concentration (μ M)			IC ₅₀ values (μ M)
	5	10	20	
Quercetin	24.19 \pm 1.41	45.42 \pm 1.15	53.69 \pm 2.49	15.1
Methyl-BH ₄	17.79 \pm 2.56	34.42 \pm 4.48	57.94 \pm 2.57	15.8
6-BH ₄	27.37 \pm 1.40	55.49 \pm 0.98	74.74 \pm 2.79	9.2

2.2.8. UVB 처리에 의한 Melanocyte 내의 Melanin 함량 측정

B16F10을 35 mm 배양 접시에 2×10^5 cells/well로 접종하고 24 h 배양하였다. PBS로 세척한 후 PBS 1 mL을 넣고 UVB를 30 mJ/cm^2 의 농도로 쬐여주고, 시료가 포함되어 있는 배지를 넣어준 후 48 h 배양하였다. 세포를 trypsin-EDTA로 회수하고 10,000 rpm으로 10 min간 원심분리하여 상등액을 제거 후 pellet을 65°C에서 1 h 정도 건조하였다. 1 M NaOH 수용액 100 μ L를 첨가하고 65°C에서 1 h 반응시켜 세포내의 melanin을 얻었다. 그 후 96 well plate에 lysate를 각각 100 μ L씩 넣어준 후, ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 melanin양을 측정하였으며, 단백질 정량도 함께 수행하여 melanin양을 보정하여 주었다.

2.2.9. 자료 분석 및 통계처리

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH Radical 소거능 측정

6-BH₄ 및 유도체인 methyl-BH₄의 항산화 활성은 DPPH의 환원성을 이용하여 시료의 DPPH 라디칼 소거효과를 측정하였다. Methyl-BH₄와 6-BH₄를 농도별로 처리하여 본 결과 methyl-BH₄와 6-BH₄의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 IC₅₀값이 각각 15.8 μ M, 9.9 μ M을 보였으며, 양성 대조군으로 사용된 quercetin의 IC₅₀값은 15.1 μ M으로 quercetin과 동등한 혹은 더 우수한 라디칼 소거능을 확인할 수 있었다(Table 1).

3.2. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에서 반응속도를 결정 짓는 단계에 작용하는 효소이며 멜라닌 합성의 주요 조

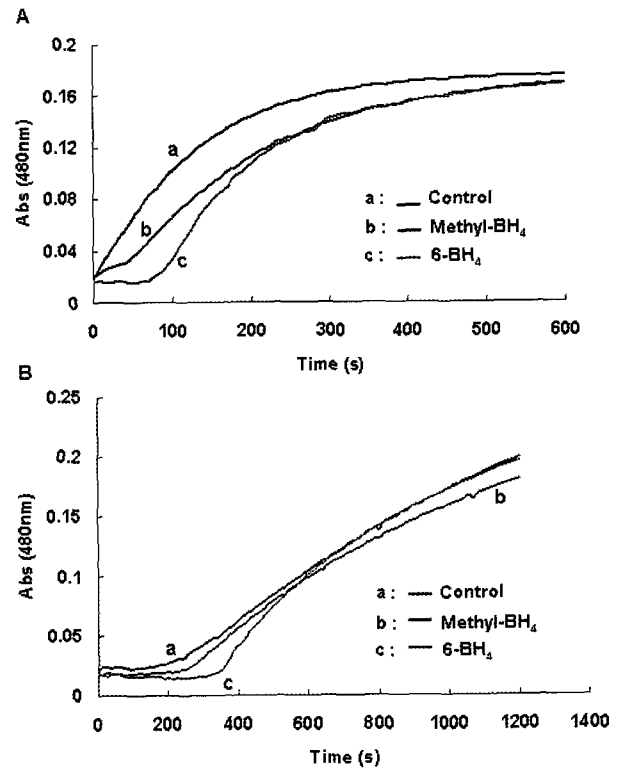


Figure 2. Dopachrome formation by tyrosinase using tyrosine (A), dopa (B) as the substrate is inhibited by pterins compounds (100 μ M).

절단계에 관여하는 효소이다[23]. 시료의 미백 효과에 대한 효소 수준에서의 효과를 확인하기 위하여 tyrosinase의 활성 저해능을 평가하였다. DOPA와 tyrosine 두 가지 기질을 모두 사용하였으며, 두 가지의 기질에 대한 효소의 활성저해가 6-BH₄ > methyl-BH₄의 순으로 나타났다(Figure 2). DOPA를 기질로 사용하였을 때 6-BH₄의 경우 tyrosinase의 활성을 반응 초기 약 100 s 정도 저해하는 것을 확인하였으며, methyl-BH₄의 경우 약 60 s 정도 효소 활성을 저해하는 것으로 알수 있었다. Tyrosine을 기질로 했을 때 tyrosinase에 의한 dopachrome의 생성속도는 dopa를 기질로 했을 때보다 반응 속도가 느리게 된다. 이는 비활성상태의 효소(mettyrosinase)가 tyrosine과 반응하여 dead-end complex를 형성하기 때문이다. 이것은 tyrosine을 기질로 했을 때만 나타나는 현상이며 이것을 lag phase라고 한다. lag phase가 지난 후 효소활성에 미치는 영향은 6-BH₄의 경우 tyrosinase의 활성을 반응 초기 약 200 s 정도 저해하는 것으로 나타났고 methyl-BH₄의 경우 약 100 s 정도 효소 활성을 저해하는 것으로 확인하였다.

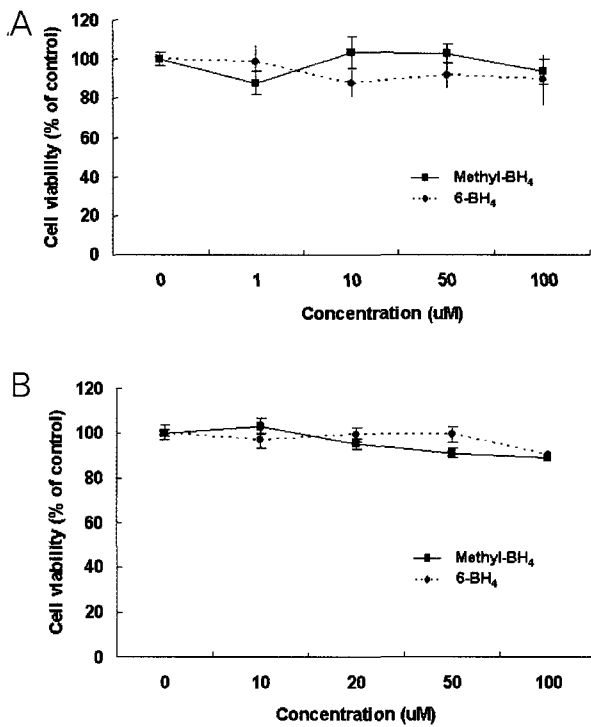


Figure 3. Cytotoxicity of the pterin compounds to HaCaT (A), B16F10 (B) cells by MTT assay. The data are expressed as the mean value (\pm S.D.) of three experiments.

3.3. Melanogenesis 관련 단백질의 발현 측정

테린 계열 화합물의 효소 수준에서의 tyrosinase 활성 저해를 확인하고 세포수준에서의 효능을 확인하고자 tyrosinase 단백질의 발현을 western blotting으로 평가 하였으며, 이와 관련된 단백질인 TRP-1, TRP-2 단백질의 발현 역시 같은 방법을 이용하여 확인하였다. 두 시료의 처리 농도는 50 μ M ~ 100 μ M을 사용하였으며, 이 농도에서 HaCaT, B16F10 두 세포에 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Figure 3). Methyl-BH₄ 처리군에서 농도 의존적으로 tyrosinase와 TRP-1 단백질의 발현을 감소시켰으며, 이는 양성대조군으로 사용되어진 arbutin과 유사한 효능을 나타냄을 확인하였다(Figure 4). 6-BH₄ 처리 결과 tyrosinase 단백질의 발현을 감소시키는 것을 알 수 있었으며, TRP-1과 TRP-2 단백질에는 영향을 나타내지 않음을 확인하였다(Figure 3). 두 시험 시료 모두 TRP-2 단백질의 발현에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

3.4. In vivo에서의 미백 효능 평가

Methyl-BH₄와 6-BH₄의 미백 효능 평가를 위하여 20 ~ 30 대 남녀 20 명을 선발하여 임상 실험을 수행하였다. 피실험자의 methyl-BH₄와 6-BH₄ 도포 전과 후의 멜

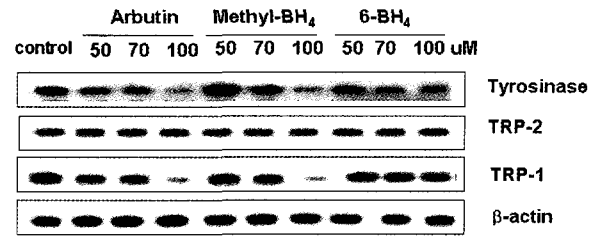


Figure 4. Effect of pterin compounds on tyrosinase, TRP-1, TRP-2 expression in B16F10 by western blotting. B16F10 cells were treated for 48 h with pterin compounds. Arbutin was used as a positive control.

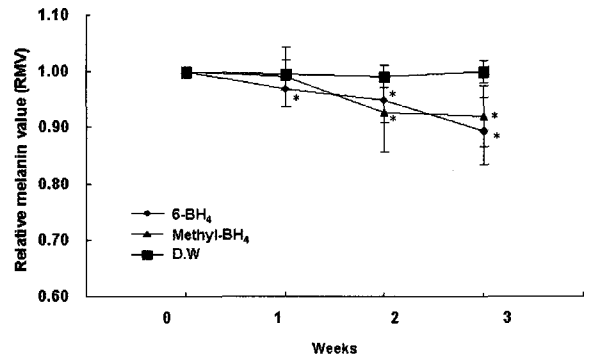


Figure 5. Evaluation of pigmentation during 3 weeks by Mexameter for pterin compounds (50 μ M). The data are expressed as the mean value (\pm S.D.) of twenty experiments. * $p < 0.05$ compared with control.

라닌 수치를 Mexameter를 이용하여 측정하였다. 피시험자들의 개인별 멜라닌 함량 수치 정도의 차이가 크게 존재함으로 0 주 차의 멜라닌 함량수치를 1로 보정하여 모든 값을 상대평가 하였다. 피시험자들의 개인마다 정도의 차이가 있으나 시료도포 후 증류수 처리군에서는 3 주 동안 멜라닌 수치가 일정하게 나타났으며, 6-BH₄와 methyl-BH₄ 모두 3 주 동안 멜라닌 수치가 감소함을 확인하였다(Figure 5).

3.5. UVB 처리에 의한 Cytokine 발현 측정

시료의 자외선에 의한 손상 방어 효능을 평가하고자 불멸화 각질형성세포인 HaCaT 세포를 이용하여 평가하였다. 자외선으로써 320 nm의 파장을 가지는 UVB를 사용하였으며, 10 mJ/cm²의 양으로 처리하여 주었다. 세포에 UVB 처리시 ROS가 생성되고 ROS에 의한 신호전달 과정이 거치면서 여러 가지 염증성 cytokine이 분비된다. 그 중 PGE₂와 IL-6의 발현양을 평가하였다. UVB 처리시 UVB 처리하지 않은 대조군에 비하여 PGE₂와 IL-6 각각 75, 60% 상승하였으며, 6-BH₄와 methyl-BH₄ 처리시 대조군과

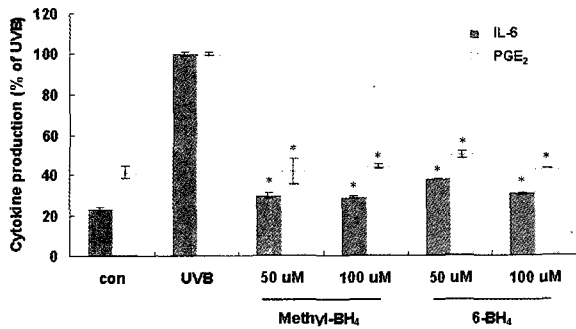


Figure 6. Effect of the pterin compounds on UVB (10 mJ/cm^2) induced PGE₂, IL-6 synthesis in HaCaT. The data are expressed as the mean value (\pm S.D.) of three experiments. * $p < 0.05$ compared with control.

유사한 수준으로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 6).

3.6. UVB 처리에 의한 멜라닌 생성 측정

UVB 처리 없이 두 시료의 B16F10 세포에서의 멜라닌 생성 저해능 평가시 $100 \mu\text{M}$ 의 농도에서 두 시료 모두 10% 정도의 미미한 멜라닌 생성 저해능을 나타내었다 (data not shown). UVB 처리 후 두 시료의 멜라닌 생성 저해능 평가 결과 methyl-BH₄의 경우 UVB 처리 이전의 효능과 마찬가지로 10% 정도의 효능을 나타내었으며, 6-BH₄의 경우 20% 정도의 멜라닌 생성 저해를 확인할 수 있었다(Figure 7). 6-BH₄의 세포내에서의 멜라닌 생성 저해는 UVB에 의해 melanogenesis 메커니즘이 활성화된 세포에서 효능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에 관여하는 중요한 효소로써 초기 멜라닌 합성과정에서 dopa나 tyrosine을 dopaquinone으로 산화시키는 역할을 하며 이는 멜라닌 합성의 시작이며 속도 결정단계이므로 이 효소의 조절을 통한 멜라닌 생성 억제에 관한 많은 연구가 되어져 왔다. 테린 계열 화합물 중 6-BH₄는 직접 또는 간접적으로 tyrosinase의 활성을 저해한다는 연구들이 수행되어졌다. 본 연구에서는 이러한 6-BH₄와 유도체 물질인 methyl-BH₄의 항산화 효능과 이와 관련된 미백, 광노화 손상 방지 효능을 살펴보았다. 각 시료의 농도별 DPPH radical 소거능을 살펴본 결과 항산화 표준 물질인 quercetin과 유사한 혹은 더 우수한 효능을 나타내었으며, 미백효능에 대한 효소 수준에서의 검증은 위하여 멜라닌 합성과정에 주요 효소인 tyrosinase의 활성 저해능을 살펴보았다. tyrosinase 효소의 기질인 DOPA와 tyrosine을 사용하였을 때 두 시료 모두 초기 반응 단계를 지연시키는 것을

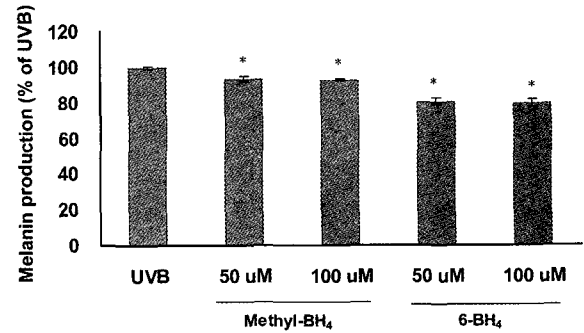


Figure 7. Effect of the pterin compounds on UVB (30 mJ/cm^2) induced melanin synthesis in B16F10. The data are expressed as the mean value (\pm S.D.) of three experiments. * $p < 0.05$ compared with control.

확인할 수 있었다. 세포 수준에서 tyrosinase 단백질의 발현을 확인한 결과 methyl-BH₄에서 농도 의존적으로 단백질 발현을 감소시켰으며, 6-BH₄ 역시 tyrosinase의 발현을 감소시킴을 확인하였다. melanogenesis와 관련된 또 다른 단백질인 TRP-1, TRP-2의 발현을 확인한 결과 methyl-BH₄에서 TRP-1의 저해능을 확인하였을 뿐, 6-BH₄는 두 단백질의 발현에 영향을 미치지 않았다. 3주에 걸친 임상 실험결과 역시 두 시료의 미백 효능을 확인할 수 있었다. 항산화 효능이 높은 테린 화합물의 광노화 손상 방지 효능 평가 결과 UVB에 의해 유도되는 염증성 cytokine의 발현을 감소를 확연히 감소시킴을 확인하였으며, 또한 UVB에 의한 멜라닌 생성 억제 효능도 갖고 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 연구를 통하여 테린 계열 화합물을 이용한 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하였다. 하지만 효능이 확인된 6-BH₄의 경우에는 공기와의 접촉이나 빛 등에 의해서 쉽게 산화되는 불안정한 특징을 가지고 있다. 따라서 테린 계열 화합물의 소재 개발시 효능을 오랫동안 지속시킬 수 있는 안정한 형태의 제형 개발이 필수적으로 수행되어야 하며, 고가에 판매되고 있는 테린 계열 화합물을 저렴하고 대량으로 생산할 수 있는 공정 개발이 수반되어야 한다.

참 고 문 헌

1. C. A. Nichol, G. K. Smith, and D. S. Duch, Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin, *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 729 (1985).
2. B. Thöny, G. Auerbach, and N. Blau, Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions, *Biochem. J.*, **1**, 1 (2000).
3. O. A. Andersen and T. E. Hough, Crystal structure

- of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation, *J. Mol. Biol.*, **320**, 1095 (2002).
4. T. Flatmark, B. Almas, P. M. Knappskog, S. V. Berge, R. M. Svebak, R. Chehin, A. Muga, and A. Martinez, Tyrosine hydroxylase binds tetrahydrobiopterin cofactor with negative cooperativity, as shown by kinetic analyses and surface plasmon resonance detection, *Eur. J. Biochem.*, **262**, 840 (1999).
 5. K. U. Schallreuter, J. M. Wood, I. Ziegler, K. R. Lemke, M. R. Pittelkow, N. J. Lindsey, and M. Gutlich, Defective tetrahydrobiopterin and catecholamine biosynthesis in the depigmentation disorder vitiligo, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1226**, 181 (1994).
 6. H. Rokos, K. U. Schallreuter-Wood, and W. D. Beazley, Oxidative stress in vitiligo: photo-oxidation of pterins produces H₂O₂ and pterin-6-carboxylic acid, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 805 (2002).
 7. J. M. Wood, K. U. Schallreuter-Wood, N. J. Lindsey, S. Callaghan, and M. L. Gardner, A specific tetrahydrobiopterin binding domain on tyrosinase controls melanogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 480 (1995).
 8. J. H. Jung, S. W. Choi, and S. Han, Indirect oxidation of 6-tetrahydrobiopterin by tyrosinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 937 (2004).
 9. B. Gasowska, H. Wojtasek, J. Hurek, M. Drag, K. Nowak, and P. Kafarski, Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl) methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4098 (2002).
 10. C. Jimenez-Cervantes, F. Solano, T. Kobayashi, K. Urabe, V. J. Hearing, J. A. Lozano, and J. C. Garcia-Borron, A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1), *J. Biol. Chem.*, **269**, 17993 (1994).
 11. A. Liber, Use of alpha-melanocyte-stimulating-hormone analogue to improve alpha-melanocyte-stimulating-hormone receptor binding assay in human melanoma, *Pigment. Cell Res.*, **2**, 510 (1989).
 12. J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 982 (1994).
 13. M. Veronique and B. Friedrich, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
 14. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *J. Invest. Dermatol.*, **4**, 24 (1999).
 15. H. J. Park, H. J. Kim, H. J. Kwon, J. Y. Lee, B. K. Cho, W. J. Lee, Y. Yang, and D. H. Cho, UVB-induced interleukin-18 production is downregulated by tannic acids in human HaCaT keratinocytes, *Exp. Dermatol.*, **15**, 589 (2006).
 16. M. Na, B. S. Min, R. B. An, K. S. Song, Y. H. Seong, and K. Bae, Effect of Astilbe koreana on ultraviolet B (UVB)-induced inflammatory response in human keratinocytes, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1301 (2004).
 17. M. W. Greaves and R. D. Camp, Prostaglandins, leukotrienes, phospholipase, platelet activating factor, and cytokines: an integrated approach to inflammation of human skin, *Arch. Dermatol. Res.*, **280**, 33 (1988).
 18. Y. Saral, B. Uyar, A. Ayar, and M. Naziroglu, Protective effects of topical alpha-tocopherol acetate on UVB irradiation in guinea pigs: importance of free radicals, *Physiol. Res.*, **51**, 285, (2002).
 19. S. K. Katiyar, F. Afaq, A. Perez, and H. Mukhtar, Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress, *Carcinogenesis*, **22**, 287 (2001).
 20. F. Afaq, V. M. Adhami, and N. Ahmad, Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1**, 28, (2003).
 21. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 19 (2002).
 22. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immunol. Methods*, **65**,

- 55 (1983).
23. J. Xia, X. Song, Z. Bi, W. Chu, and Y. Wan, UV-induced NF-kappaB activation and expression of IL-6 is attenuated by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cultured human keratinocytes *in vitro*, *Int. J. Mol. Med.*, **16**, 943 (2005).
24. J. N. Rodriguez-Lopez, L. G. Fenoll, M. J. Penalver, P. A. Garcia-Ruiz, R. Varon, F. Martinez-Ortiz, F. Garcia-Canovas, and J. Tudela, Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol, *Biochim. Biophys. Acta*, **1548**, 238 (2001).