

# 멜라닌 생합성 억제제로서 수용성 Oleanolic Acid 유도체의 합성 및 활성 평가

안현진\*\*\* · 윤영경\*\* · 이재덕\*\* · 정노희\*†

\*충북대학교 공업화학과, \*\*여명바이오텍(주)  
(2020년 9월 17일 접수, 2020년 11월 10일 수정, 2020년 11월 11일 채택)

## Synthesis and Biological Evaluation of Water-Soluble Oleanolic Acid Derivatives for use as Melanogenesis Inhibitors

Hyun-Jin An\*\*\*, Young-kyung Yoon\*\*, Jae-Duck Lee\*\* and Noh-Hee Jeong\*†

\*Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

\*\*Yeomyung Biochem Co., Ltd., Cheongju 28171, Korea

(Received September 17, 2020; Revised November 10, 2020; Accepted November 11, 2020)

### 초 록

본 연구에서는 메톡시폴리에틸렌글리콜(methoxy polyethylene glycol)과 올레아놀산(Oleanolic acid) 유도체(mPEG-OA derivative)를 합성하였으며, 합성된 유도체에 대하여 수용액에서의 용해도와 멜라닌 생합성억제 효과를 평가하였다. mPEG-OA 유도체의 합성된 구조는 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR 및 FT-IR로 확인하였다. 수용액에서 mPEG-OA 유도체와 OA의 용해도를 측정된 결과, mPEG-OA 유도체는 13 mg/mL, OA는 0.013 mg/mL로서, mPEG-OA 유도체의 수용성이 OA보다 1,000배 높게 나타났다. 세포생존율은 B16F10 melanoma cells에서, mPEG-OA 유도체의 세포생존율(250 μM)이 OA로 처리한 세포생존율(62.5 μM)과 비교하여 4배 증가하였다. 멜라닌 생합성 억제 효과는 세포생존율이 영향을 받지 않는 농도에서 측정하였으며, mPEG-OA 유도체는 50 μM의 농도에서 36%, OA는 10 μM의 농도에서 35%의 억제 효과를 나타내었다. B16F10 melanoma cells에서 MITF (microphthalmia-associated transcription factor)의 발현 억제 수준은 mPEG-OA 유도체는 50 μM의 농도에서 59%, OA는 10 μM의 농도에서 49%의 억제 효과를 나타내었다. 종합적으로 mPEG-OA 유도체와 OA의 수용성 및 미백활성을 비교한 결과, mPEG-OA 유도체는 OA보다 뛰어난 수용성을 가지며, 멜라닌 생합성을 억제하는 효과를 나타냄으로써 미백 기능성 화장품 소재로서 응용 가능성이 있음을 시사한다.

### Abstract

This study was focused on the synthesis of methoxy polyethylene glycol-oleanolic acid ester (mPEG-OA derivative) and investigation of its water solubility and anti-melanogenic effects. mPEG-OA derivative was identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and FT-IR spectroscopic measurements. The water solubilities of mPEG-OA derivative and OA were found to be 13 and 0.013 mg/mL and that of mPEG-OA was found to be 1000-fold higher than that of OA. The effects of mPEG-OA derivative and OA on cell viability were measured using B16F10 melanoma cells. The viability of cells treated with mPEG-OA derivative (250 μM) increased 4-fold compared to that of cells treated with OA (62.5 μM). At mPEG-OA derivative and OA concentrations where the cell viability was unaffected, the inhibitory effect of mPEG-OA derivative and OA on the melanogenesis in B16F10 melanoma cells were 36 and 35% at 50 and 10 μM, respectively. The expression level of microphthalmia-associated transcription (MITF) was also reduced in B16F10 melanoma cells treated with mPEG-OA and OA. Overall, mPEG-OA derivative showed excellent water solubility and inhibitory effects of the melanogenesis, which could be used as a potential formulation for use in whitening functional cosmetic material.

**Keywords:** Oleanolic acid, Water solubility, Pegylation, Melanogenesis, Cosmetics material

## 1. 서 론

멜라닌(melanin)은 인간의 아름다운 매력과 영향을 주는 피부색의 주요한 결정인자로서 멜라닌 생합성(melanogenesis)에 의해 멜라닌세포(melanocyte)를 생성하고[1,2], UV radiation으로부터 피부를 보호하지만, 병리학적, 환경적 요인으로 과도한 축적은 주근깨, 기미 등의 멜라닌 색소 침착은 심미학적으로 피부 문제의 원인이 될 수 있다[3].

† Corresponding Author: Chungbuk National University,  
Department of Engineering Chemistry, Cheongju 28644, Korea  
Tel: +82-43-261-2440 e-mail: nhjeong@cbnu.ac.kr

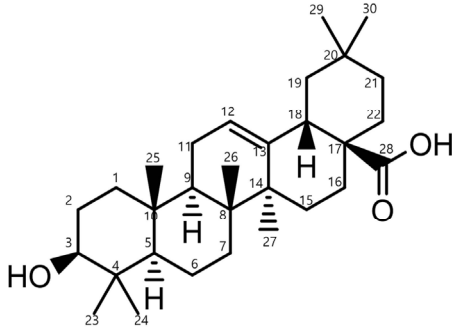


Figure 1. Structure of oleanolic acid.

멜라닌을 만드는 세포인 멜라노사이트(melanocyte)는 피부의 맨 밑에 있는 기저층에 있다. 자외선 과다로 피부가 자극을 받으면 티로시나아제 효소가 멜라노사이트안에 있는 단백질인 티로신을 산화시킨다. 산화된 티로신은 멜라닌을 만들게 되며 멜라닌이 있는 피부 세포 각 질층에서 색소침착이 나타난다.  $\alpha$ -MSH는 뇌하수체 중엽에서 분비되며 멜라닌 세포에서만 발현되는 막 수용체인 MC1R과 결합하여 adenylyl cyclase를 활성화시키고, 세포내 cAMP 신호를 증폭시켜, protein kinase A (PKA)의 활성화를 유도하며, 세포내 cAMP response element binding protein (CREB)을 활성화시킴으로써 멜라닌 세포에 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 증가시킨다[3-6].

Oleanolic acid (OA), (3 $\beta$ )-3-hydroxyolean-12-en-28-oic acid는 많은 식물에 널리 존재하며, 5환 탄화수소 골격을 포함하고 있기 때문에 매우 소수성이다(Figure 1). OA는 항암(antitumor), 항산화(antioxidant), 항염증(anti-inflammatory) 및 간 보호(hepatoprotective) 효과와 같은 다양한 생물학적 활성을 갖고 있다[7-11]. OA는  $\alpha$ -MSH로 자극된 B16F10 melanoma cells에서 tyrosinase, TRP-1,2, MITF 등 멜라닌 생성관련 인자의 발현을 억제한다[12]. 그러나 OA는 수용성이 낮아 피부 미용 및 제약 분야에서 사용이 제한되고 있다[13]. 이러한 단점을 극복하기 위해, 많은 약물에 수용성 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)을 약물의 담체로 사용하고 있다[14]. PEG는 에틸렌옥사이드의 중합에 의해 형성되며, pegylation 과정에서 약물과 화학적으로 결합될 수 있다. PEG-drug conjugates (methoxy PEG-OA, mPEG-OA)를 기반으로 하는 self-assembled nano particle이 OA의 특성을 향상시킨다고 보고되었다[15]. 하지만 OA에 수용성 개선을 통한 미백활성에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 mPEG-OA 유도체를 합성하여, 멜라닌 생성억제 효과와 증가된 수용성을 확인하여 화장품에서 새로운 기능성 미백 소재로서 가능성을 평가하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 기기 및 시약

합성에 사용한 Methoxy polyethylene glycol (mPEG, M.W. 2000), *p*-nitrophenyl chloroformate (NPC), 4-dimethyl aminopyridine (DMAP)는 Sigma Aldrich, Korea, oleanolic acid (batch No. 20171015, Qingdao Fraken International Trading Co., Ltd)를 사용하였다. 그 밖에 사용된 용매 및 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. 수용성 및 효소 가수분해 평가에는 porcine esterase (Sigma-Aldrich, Inc, USA)를 사용하였다. 세포생존율과 멜라닌 생성량 평가에는 B16F10 세포(한국세포주은행), 1,3-(4,5-di-methyl thiazoyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT,

Sigma, USA)를 사용하였다. Western blot에는 BSA kit (Bio-rad Protein Assay Standard II, Korea), 1 × Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween 20 Detergent (TBST) for Western Blotting (Merck, Germany), SDS-PAGE (Merck, Germany), PVDF membrane (Thermo Fisher), 96-well microplates (390, Corning, USA), 96-well cell culture plates (3595, Corning, USA), 6-well cell culture plates (3516, Corning, USA), Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Korea), ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Korea)을 사용하였다. 합성한 유도체 분석에는 NMR (Bruker 500 MHz spectrometer, Billerica, MA, USA), FT-IR (JASCO- 5300, Japan), HPLC (Waters, Japan)을 사용하였다.

### 2.2. mPEG-OA 유도체의 합성

2.2.1. Methoxy polyethylene glycol nitrophenyl carbonate (mPEG-NPC) mPEG2000 (3 g, 1.5 mmol)과 *p*-NPC (0.91 g, 4.5 mmol)을 dichloromethane (DCM) 20 mL에 용해한다. 혼합 용액을 실온에서 16 h 동안 교반하였다. 반응 용매는 감압 증발하고, 잔류물을 DCM 5 mL에 용해하고 diethyl ether로 재결정하였다(white solid, 98%, 3.23 g). IR  $\nu_{\max}$  (KBR)  $\text{cm}^{-1}$ : 2889 ( $-\text{CH}_2-$ ), 1767 (C=O), 1466 (C-O), 1339 (C-H), 1101 (C-O-C).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 8.33 (2H, d, nitrophenyl H-3, H-5), 7.58 (2H, d, nitrophenyl H-2, H-6), 4.36 (2H, m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$ ), 3.71 (2H, m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$ ), 3.56-3.41 (176H, m,  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n$ ), 3.32 (3H, s,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 155.28, 152.07, 145.14, 126.28, 125.40, 122.57, 116.04, 72.35, 71.27, 69.78, 69.58, 68.29, 67.91, 60.20, 58.04.

### 2.2.2. Methoxy polyethylene glycol oleanolate (mPEG-OA)

mPEG-NPC (2.9 g, 134 mmol), OA (1.83 g, 4.0 mmol) 및 DMAP (0.47 g, 3.89 mmol)를 DCM 2 mL와 THF 20 mL에 용해한다. 혼합용액을 실온에서 65 h 동안 교반시켰다. 반응 용매는 감압 증발시키고, 잔류물을 DCM에 용해한 후 잔류 촉매 제거를 하기 위해 증류수로 3회 수세한 후, 반응물을 감압 증류하였다. 감압 증류한 고체의 반응물을 소량의 DCM에 용해한 후, diethyl ether에 투입하여  $-10^\circ\text{C}$ 에서 교반하였다. 결정화된 반응물을 감압 하에 여과, 건조하여 얻었다(white solid, 95%, 3.05 g). IR  $\nu_{\max}$  (KBR)  $\text{cm}^{-1}$ : 2883 ( $-\text{CH}_2-$ ), 1744 (C=O), 1466 (C-O), 1339 (C-H), 1101 (C-O-C).  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 5.15 (1H, s, H-12), 4.56 (1H, s, H-3), 4.17 (2H, m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$ ), 3.68 (2H, m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}=\text{O}-$ ), 3.56-3.41 (176H, m,  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n$ ), 3.32 (3H, m,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ), 2.73 (1H, m, H-18), 1.90 (2H, m, H-22), 1.80 (2H, m, H-11), 1.64-1.55 (8H, m, H-1, H-2, H-15, H-21), 1.45-1.41 (4H, m, H-6, H-7), 1.35-1.19 (4H, m, H-19, H-16), 1.10(3H, s, H-27), 1.024(2H, m, H-5, H-9), 0.95-0.83 (12H, d, H-23, H-24, H-29, H-30), 0.80 (3H, s, H-26), 0.72 (3H, m, H-25);  $^{13}\text{C NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 178.58, 154.60, 84.47, 72.35, 71.28, 69.78, 69.58, 68.14, 66.76, 66.51, 60.20, 58.04, 54.38, 46.79, 45.69, 45.44, 41.34, 40.81, 37.43, 36.45, 33.33, 32.82, 32.19, 30.40, 27.63, 27.21, 25.55, 23.36, 22.87, 17.71, 16.80, 16.53, 14.99.

### 2.3. 효소 가수분해와 용해도

mPEG-OA 유도체가 esterase에 의한 가수분해되어 출발물질인 OA가 생성되는 반감기를 확인하기 위해 esterase 가수분해 실험을 porcine esterase를 사용하였다. Porcine esterase는 0.02 M isotonic buffer 용액 (pH 8)을 이용하여 0.1 mg/mL의 농도로 준비하였다. mPEG-OA 유도

**Table 1. Analytical Condition of HPLC for mPEG-OA**

Instrument	Condition		
Column	Luna C8 (150 × 4.6 mm)		
	Time	Water (0.1% TFA)	Acetonitrile
Mobile phase	0 min	70	30
	2 min	70	30
	12 min	0	100
	18 min	70	30
	20 min	70	30
Detector	ELSD		
Flow rate	1 mL/min		
Injection volume	10 µL		
Column temperature	55 °C		
Detector temperature	70 °C		
Gain	6		

체의 stock 용액은 20 mM 농도로 증류수에 용해하였고, 4 °C에서 보관하였다. mPEG-OA 유도체의 stock 용액 20 mL와 esterase 용액 1 mL를 screw capped 바이알에 투입하고 37 °C water bath에 보관하였다. 용액을 여과한후 HPLC로 분석하였다[16,17]. mPEG-OA 유도체와 OA의 물에 대한 용해도 시험은 20 °C에 포화 수용액을 제조 후 여과하여 HPLC로 분석하였다(Table 1).

**2.4. 세포 생존율 측정**

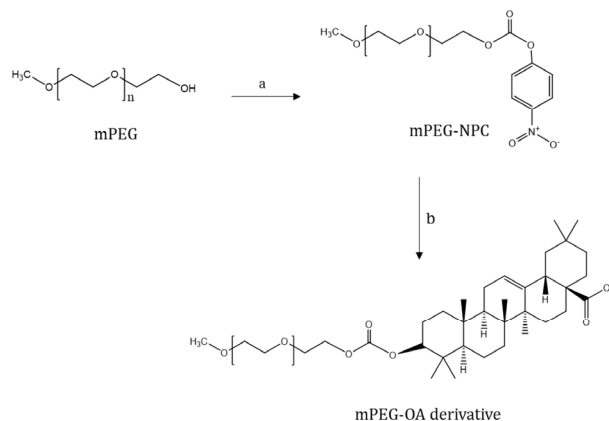
mPEG-OA 유도체와 OA의 세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 평가법을 사용하였다. 먼저, B16F10 melanoma 세포와 human dermal fibroblast (HDF) 세포를 1 × 10<sup>3</sup> cells/well을 96-well plates에 분주하였다. 24 h 배양 후, MTT 용액 (2 mg/mL)을 Dulbecco’s phosphate-buffered saline 50 µL에 용해한 후, 37 °C에서 3 h 동안 반응시켰다. 각 well의 침전물은 제거하고, DMSO에 formazan crystals을 용해하여 투입하였다. 세포 생존율은 Biochrom EZ Read 400 Microplate Reader (Bio-chrome Ltd, England)로 540 nm에서 측정하였다.

**2.5. Melanin assay**

멜라닌 생성 억제 효과를 측정하기 위해서 Bilodeau 등의 방법[19,20]을 변형하여 실시하였다. B16F10 melanoma 세포를 96-well plate에 1 × 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 분주하고 24 h 후에 1 µg/mL 농도의 α-MSH를 각 농도(0.1~50 µg/mL)로 준비된 mPEG-OA 유도체와 OA에 처리하고, 48 h 경과 후 멜라닌 생성을 확인하고 세포를 PBS로 세척한다. 세포를 수확하고 12000 rpm에서 5 min 동안 원심분리하고 생성된 pellet에 1N NaOH를 넣고 80 °C에서 1 h 동안 방치하여 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 멜라닌 함량은 무 처리군의 흡광도와 비교하였으며, 양성대조군은 arbutin을 사용하였다.

**2.6. Western blot analysis**

멜라닌 생성에 관여하는 효소인 MITF의 단백질발현 변화양상을 western blot 방법을 변형하여 실시하였다[12,21]. B16F10 세포를 1 × 10<sup>5</sup> cells/well 농도로 분주한 후 24 h 동안 배양하고, mPEG-OA 유도체, OA, arbutin을 처리 후 24 h 동안 배양한다. 수확한 cells을 12,000



**Figure 2. Preparation of mPEG-OA derivative. a) mPEG 2000, 4-Nitrophenyl chloroformate, DCM, rt, 16 h, b) mPEG 2000-NPC, oleanolic acid, DMAP, THF, DCM, rt, 20 h.**

rpm에서 15 min 간 원심분리하여 상등액을 취한 후, 단백질 농도는 BSA kit (Bio-rad, Korea)를 이용하여 정량한다. 여기서 얻은 상등액을 이용하여 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동 하고, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer한 후 5% skim milk가 함유된 TBST (tris buffered saline containing 0.1% + Tween20)에 넣고 상온에서 1 h 정도 blocking 시킨 후 TBST로 10 min간 3회 세척한다. MITE-1 항체를 처리하여 overnight 반응시킨 후 TBST로 10 min간 3회 세척한 다음 2차 항체로 HRP (horseradish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG를 희석하여 상온에서 1 h 반응시킨다. 그 후 membrane을 TBST로 10 min간 3회 세척한 다음 Clarity Western (Bio-RAD) ECL Kit를 사용하여 Chemidoc XRS (Bio-Rad)을 통해 측정한다.

**2.7. 자료분석 및 통계처리**

본 연구에서 모든 실험 결과는 3회 반복하였으며, 통계자료의 값은 mean ± SD로 나타냈다. 통계적 유의성 검정은 Graph PAD Prism 7.0 (SanDiego, CA)를 이용했으며, one-way ANOVA을 적용하여, p < 0.001 유의수준에서 유의성 검정을 실시했다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. mPEG-OA 유도체의 합성**

mPEG-OA 유도체의 합성은 Figure 2에 따라 진행되었다. 현재 oleanolic acid의 유도체 합성을 위하여 다양한 방법이 사용되고 있으며 [11,15], 이들 중에 p-nitrophenyl chloroformate을 이용하여 mPEG의 Hydroxyl기를 활성화시켜, oleanolic acid의 Hydroxyl기와 esterification하는 방법으로 합성하였다. 합성된 유도체의 구조는 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, FT-IR, HPLC 스펙트럼을 통하여 확인하였다. mPEG-OA 유도체 합성을 위한 중간체인 mPEG-NPC를 합성하였다(Figure 2). 합성된 mPEG-NPC는 특징적인 IR 흡광(C=O, 1767cm<sup>-1</sup>)을 확인하였다. mPEG-NPC 합성물의 <sup>1</sup>H-NMR에서는, mPEG의 특징적인 methylene proton은 3.56~3.41 ppm, p-NPC의 특징적인 phenyl proton은 7.58 ppm (2H, d)와 8.33 ppm (2H, d)에서 확인되었다(Figure 3). <sup>13</sup>C NMR에서는 mPEG의 carbon peak(d)이 60 ppm에서 67 ppm으로 이동하였고(Figure 4), p-NPC의 carbonyl group의 carbon peak(c)을 152 ppm에서 관찰되었다(Figure

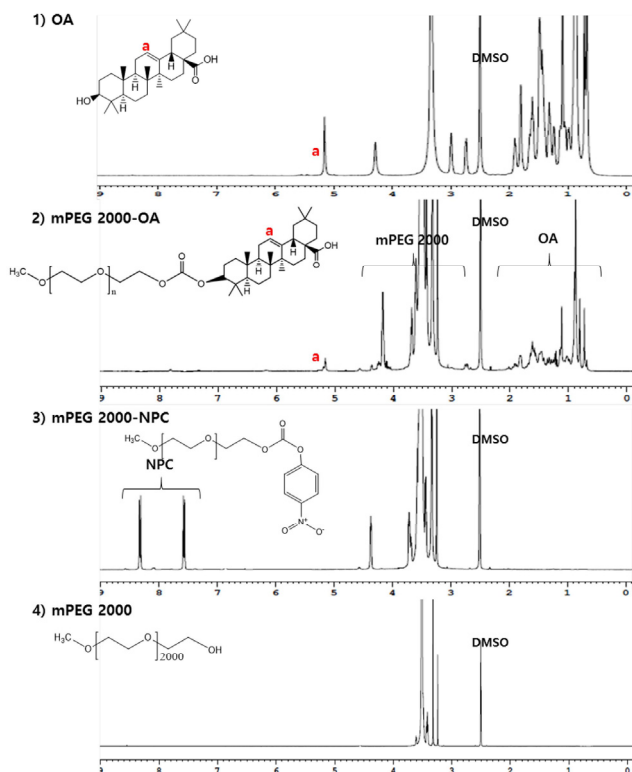


Figure 3.  $^1\text{H}$  NMR spectra of mPEG-OA derivative and OA.

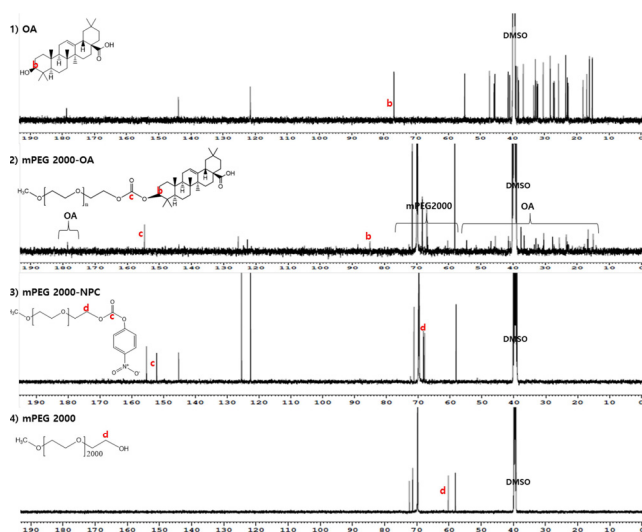


Figure 4.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of mPEG-OA derivative and OA.

4). mPEG-NPC 중간체를 이용하여 mPEG-OA 유도체를 합성하였다. 합성된 PEG-OA의 특징적인 IR 흡광( $\text{C}=\text{O}$ ,  $1744\text{ cm}^{-1}$ )을 나타냈으며,  $^1\text{H}$  NMR에서는 mPEG의 methylene proton은 3.5 ppm, OA의 methylene proton은 0.80~2.73 ppm에서 확인되었으며, OA의 특성 proton (a)이 5.15 ppm에서 관찰되었다(Figure 3).  $^{13}\text{C}$  NMR에서는 OA의 전형적인 peak이 15.1~54.5과 178.6 ppm에서 관찰되었다. OA의 hydroxyl group에 mPEG-NPC가 결합되어 OA의 76.8 ppm의 carbon peak (b)이 84.47 ppm (b)으로 이동되었고, mPEG-NPC의 Carbonyl 기의 carbon peak (c)이 155 ppm으로 이동된 것을 관찰할 수 있었다(Figure 4).

Table 2. Water Solubility at 25 °C and Half-life  $t_{1/2}$  of Enzymatic Hydrolysis of mPEG-OA and OA

Compounds	Water solubility (mg/mL)	Half-life, $t_{1/2}$ (h)	
		buffer solutions (pH 8.0)	Esterase
OA	0.013	-	-
mPEG-OA	13	1,200	3

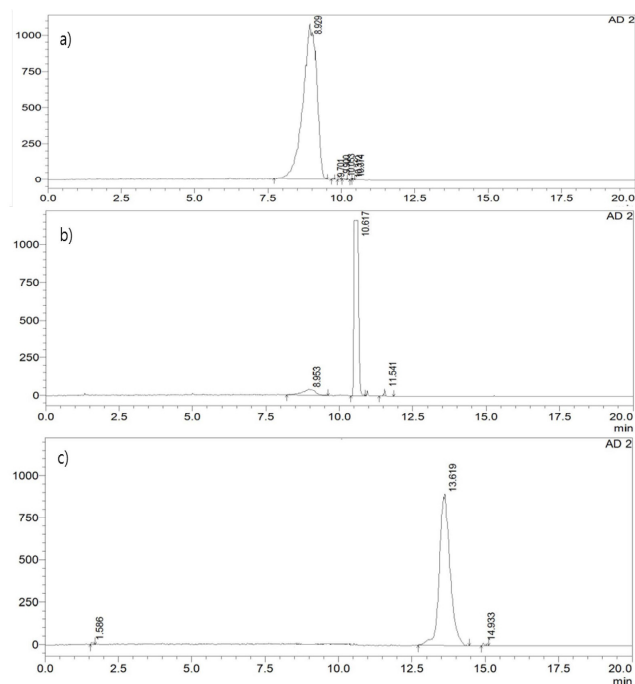


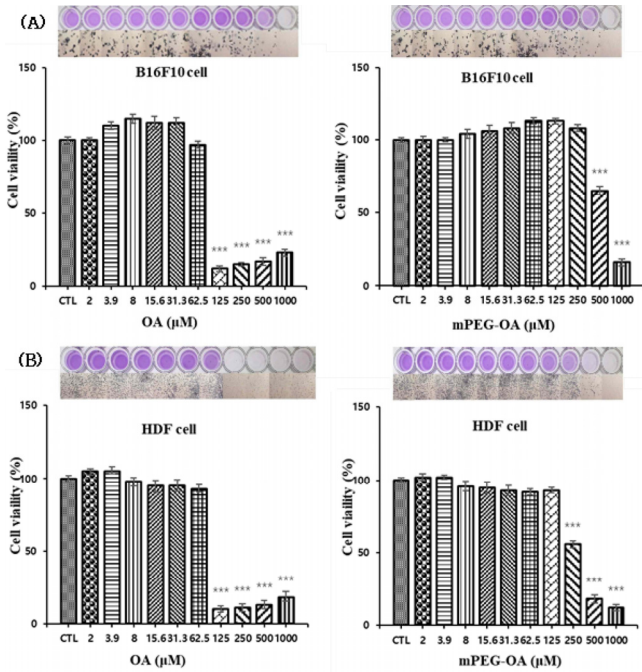
Figure 5. HPLC spectra. (a) mPEG, (b) mPEG-NPC, (C) mPEG-OA.

HPLC (ELSD) 조건(Table 1)에서, mPEG2000, OA, mPEG-OA의 분리 분석을 하여 Retention time을 확인하였다(Figure 5). 상기의 결과로, mPEG-OA의 합성이 성공적으로 합성된 것을 확인하였다.

### 3.2. 효소 가수분해와 용해도

유효성분이 결합되어 있는 고분자 폴리머의 경우, 일반적으로 피부 장벽을 통과하여 표적세포에 도달하기가 어렵다. 피부에는 esterase와 같은 많은 효소들이 존재한다. 전구약물(prodrug)의 효과는 피부 내에서 고분자와 결합된 유효성분의 방출이 약물의 효능에 큰 영향을 가진다. 피부 내 효소 활성을 예상할 수 있는 porcine esterase를 사용하여 ester 결합이 효소에 의해 가수분해되는 연구가 보고되었다[16,17]. mPEG-OA 유도체의 porcine esterase에 의해 가수분해되어 유효성분인 OA가 생성되는 반감기를 확인하였다. mPEG-OA 유도체의 buffer solution과 porcine esterase의 가수분해 조건에 따라서 반감기( $t_{1/2}$ )는 각각 1200과 3 h으로 esterase 조건에서 쉽게 가수분해 되는 것을 확인하였다(Table 2).

mPEG-OA 유도체와 OA의 물에 대한 용해도 시험은 포화용액 조건에서 HPLC를 이용하여 정량시험을 하였다. mPEG-OA 유도체와 OA의 물에 대한 용해도는 각각 13과 0.013 mg/mL로 측정되었다. PEGylation된 mPEG-OA 유도체의 용해도는 OA와 비교하여 약 1,000 배 증가하였다(Table 2). PEGylation에 대한 약물의 용해도 증가 특성에 대한 연구가 보고되었다[15]. mPEG-OA 유도체는 증가된 수용성

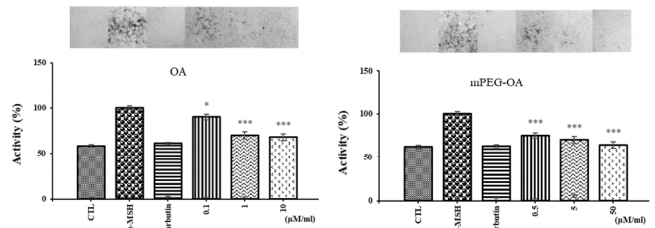


**Figure 6.** Effect of OA and mPEG-OA on viability of (A) B16F10 melanoma cells and (B) HDF cells. Cells were treated with various concentrations of mPEG-OA and OA for 24 h. The results are shown as the mean  $\pm$  SD of triplicate samples (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs CTL).

으로 화장품이나 의약품의 O/W, W/O 등 다양한 제형에 적용 가능하다고 사료된다.

**3.3. 세포생존율**

mPEG-OA 유도체와 OA를 B16F10 melanoma 세포와 human dermal fibroblast (HDF) 세포를 이용하여 세포생존율을 2~1,000  $\mu$ M 농도 범위에서 확인하였다. 먼저,  $1 \times 10^3$ 개 B16F10 melanoma 세포에 처리한 후 24 h 노출시켜 MTT assay를 이용해 세포생존율을 측정할 결과, 62.5  $\mu$ M 농도의 OA에서 97%, mPEG -OA 유도체에서 113%의 세포생존율을 보였으며, OA는 62.5  $\mu$ M 이상의 농도에서는 23% 이하의 세포생존율을 보였다. 250  $\mu$ M 농도의 OA에서 15%, mPEG-OA 유도체에서 108%의 세포생존율을 보였다. 다음은,  $1 \times 10^3$ 개 HDF 세포의 세포생존율을 측정할 결과, 62.5  $\mu$ M 농도의 OA에서 93%, mPEG-OA 유도체에서 92%의 세포생존율을 보였으며, OA는 62.5  $\mu$ M 이상의 농도에서는 18% 이하의 세포생존율을 보였다. 125  $\mu$ M 농도의 OA에서 10%, mPEG-OA 유도체에서 93%의 세포생존율을 보였다. mPEG-OA 유도체의 세포생존율은 pegylation에 따라 B16F10 melanoma 세포와 HDF 세포에서 각각 4배와 2배 이상 증가한 결과를 보였다(Figure 6). 친수성 고분자인 PEG는 물분자와 결합되어 효소 분해 및 세포 표면 단백질과의 상호작용으로 접합된 약물을 보호하는 보호막 역할을 하여 면역학적으로 부작용을 감소시킨다. 또한 약물을 pegylation화 함으로써 pegylation되지 않은 약물에 비해 다양한 pH와 온도에서 안정적이며, 세포독성을 감소하는 효과를 나타낸다고 보고하였다[18]. 또한, mPEG-OA 유도체는 pegylation으로 OA의 산성 전하가 차폐(shielding) 되어 세포독성을 감소시킨다고 판단된다.



**Figure 7.** Effect of OA and mPEG-OA on melanin production in B16F10 melanoma cells. Phase contrast micrographs of B16F10 melanoma cells after treatment OA and mPEG-OA and cells were treated with various concentrations of OA and mPEG-OA for 48 h. arbutin (100  $\mu$ M/mL),  $\alpha$ -MSH (1  $\mu$ g/mL). Results are shown as the mean  $\pm$  SD of triplicate samples (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs  $\alpha$ -MSH).

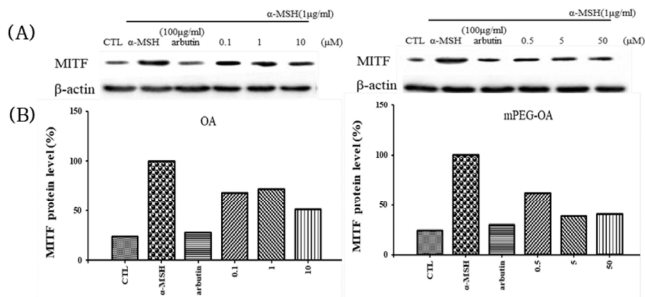
**3.4. Melanin inhibition assay**

mPEG-OA 유도체의 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하기 위해 OA와 대조군으로서 arbutin을 비교하였다. B16F10 melanoma 세포를  $\alpha$ -MSH로 자극한 후 mPEG-OA, OA, arbutin을 농도별로 처리한 후 48 h 동안 배양하였다. 0.5, 5, 50  $\mu$ M 농도에서 mPEG-OA 유도체의 멜라닌 생성 억제 효과는 24, 31, 36% 억제하는 것으로 확인되었다. 0.1, 1, 10  $\mu$ M 농도에서 OA의 멜라닌 생성 억제 효과는 9, 29, 35% 억제하는 것으로 확인되었다(Figure 7). 상대적으로, 100  $\mu$ M 농도에서 대조군인 arbutin의 멜라닌 생성 억제 효과는 40%로 확인되었다. 따라서 mPEG-OA 유도체의 세포생존율 90% 이상인 농도인 50  $\mu$ M 농도에서의 멜라닌 생성 억제 효과는 대조군인 arbutin 보다 낮은 농도에서 농도 의존적이며, 통계적으로 유의하게 억제하였다.

PEG는 친수성, 생분해성, 비독성이며, 수용성 고분자로서 생체재료나 의약품 등에 널리 사용되고 있다. PEG에 OA를 접합할 때, 가장 중요한 PEG 유도체의 형태는 유효성분의 반감기( $t_{1/2}$ )를 크게 증가시키면서 생물학적 약제의 기능을 유지하는 것이다. PEGylation은 OA의 방출 시간을 증가시킨다[22]. 세포 배양 배지에는 많은 esterase를 포함하며, mPEG-OA 유도체는 esterase에 의해 빠르게 가수분해된다(Table 1). Esterase에 의해 가수분해된 OA에 대한 평가는 이루어지지 않았지만, mPEG-OA 유도체에서 가수분해된 OA는 HPLC로 정량할 수 있다. mPEG-OA 유도체는 esterase가 존재하는 세포내에서 가수분해되어, 배양된 세포에 OA가 쉽게 흡수될 것으로 생각된다. 또한, 수용성이 떨어지는 약물에 대해 다양한 수용성 담체로서, PEG는 생리학 적 매질에서 물에 대해 불용성인 물질의 가용화를 촉진한다고 보고 하였다[23]. PEG는 OA와 같은 친유성 물질을 분산시키는데 사용된다. 결론적으로, mPEG-OA 유도체를 피부에 적용할 때, 인간 세포의 esterase에 의해 mPEG와 OA로 가수분해 되어 세포에 흡수되면서, OA 수준의 멜라닌 억제 효과를 나타내어, 다양한 제형의 화장품이나 의약품에 적용 가능함을 시사한다.

**3.5. Western blot analysis**

$\alpha$ -MSH에 의해 세포내 cAMP response element binding protein (CREB)을 활성화시킴으로써 멜라닌 세포에 MITF의 발현을 증가하여 색소 침착을 유도하게 되는 기전에 따라 MITF의 발현량을 western blotting으로 확인하였다.  $\alpha$ -MSH만 처리한 군에서 MITF 발현량을 100% 기준으로 설정하였으며, arbutin을 100  $\mu$ M 농도에서 처리한 군에서는 MITF 발현 발현량이 76% 감소되는 것을 관찰하였다. OA의 MITF 발현량은 0.1, 1, 10  $\mu$ M 농도에서 32, 28, 49% 감소되는 것을



**Figure 8.** Effects of OA and mPEG-OA on level of MITF protein expression levels in melanoma cells. (A) B16F10 melanoma cells were treated with various concentrations of OA and mPEG-OA, (B) Relative intensity of MITF protein.

확인하였다. mPEG-OA의 MITF 발현량은 0.5, 5, 50  $\mu$ M 농도에서 38, 61, 59% 감소되는 것을 확인하였다(Figure 8). OA의 12.5  $\mu$ M 농도에서 B16F10 melanoma 세포에서 MITF 발현량이 arbutin 100  $\mu$ M 농도에서 보다 더 감소되었다고 보고하였다[12]. 본 연구에서는 mPEG-OA의 5  $\mu$ M 농도에서 61%의 MITF 발현량이 감소하는 것을 나타내었으므로 멜라닌 생성 억제 능력에 대하여 비교적 높은 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그러므로 mPEG-OA의 일반적인 미백기능성 화장품 원료로의 적용 가능성이 있다고 사료되었다.

#### 4. 결 론

본 연구는 mPEG와 OA를 이용하여 mPEG-OA 유도체를 합성하여, mPEG-OA 유도체의 구조 분석, 효소 가수분해와 용해도, 세포생존율, 멜라닌 합성 억제 효과 및 western blot 분석을 진행하였다.

(1) mPEG-OA 유도체의 합성방법은 p-nitrophenyl chloroformate를 이용하여 mPEG의 hydroxyl기를 활성화한 중간체와 OA의 hydroxyl기의 esterification으로 제조하여,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, FT-IR로 구조를 확인하였다.

(2) 효소 가수분해시험 결과, mPEG-OA 유도체를 피부에 적용할 때, 피부 효소에 대한 가수분해 활성을 평가하기 위해, porcine esterase를 적용하여 가수분해 실험을 한 결과, mPEG-OA 유도체의 buffer solution과 porcine esterase의 가수분해 조건에 따라서 반감기( $t_{1/2}$ )가 1200, 3 h으로 esterase 조건에서 쉽게 가수분해 되었다. 피부 내에 esterase와 같은 많은 효소의 존재로 효소 가수분해를 통해 mPEG-OA 유도체의 OA와 같은 전구 약물의 방출로 약물의 효능을 높일 수 있는 효소가 가수분해 시험의 결과는 화장품이나 의약품에 적용 가능함을 시사한다. mPEG-OA 유도체와 OA의 물에 대한 용해도 시험은 13, 0.013 mg/mL로 측정되었다. PEGylation된 mPEG-OA 유도체의 용해도는 OA와 비교하여 1,000배 증가하였다. mPEG-OA 유도체는 pegylation에 의해 수용성이 증가되어 O/W, W/O 등 다양한 제형으로 화장품 및 의약품에 적용 가능성을 보였다.

(3) 세포생존율 평가 결과, B16F10 melanoma 세포에서 90% 이상의 세포생존율을 나타낸 농도는 OA의 62.5  $\mu$ M, mPEG-OA 유도체는 250  $\mu$ M 농도로 세포생존율이 4배 증가하였으며, HDF 세포에서, OA의 62.5  $\mu$ M, mPEG-OA 유도체의 125  $\mu$ M로 세포생존율이 2배 증가한 결과를 얻었다.

(4) mPEG-OA의 멜라닌 생성 억제는 세포생존율 90% 이상인 농도인 50  $\mu$ M 농도에서의 멜라닌 생성 억제 효과는 대조군인 arbutin보다

낮은 농도에서 농도 의존적이며, 통계적으로 유의하게 억제하였으며, B16F10 melanoma 세포에 mPEG-OA 유도체를 처리한 후 MITF 발현량은 5  $\mu$ M 농도에서 61%로 억제되어 멜라닌 생성을 저해한 것으로 사료된다.

결론적으로, mPEG와 OA로 결합된 mPEG-OA는 높은 세포 생존율과 멜라닌 합성 억제 활성 및 MITF 발현 억제 활성을 갖는 수용성 멜라닌 생성성 억제제로서 화장품이나 의약품 등에 미백 기능성 소재로써 충분한 가치가 있을 것으로 판단된다.

#### References

- G. E. Costin and V. J. Hearing, Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress, *Faseb. J.*, **21**, 976-994 (2007).
- J. L. Rees, Genetics of hair and skin color, *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 67-90 (2003).
- G. Prota, Progress in the chemistry of melanins and related metabolites, *Med. Res. Rev.*, **8**, 525-525 (1988).
- M. V. Schiaffino, Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**, 1094-1104 (2010).
- G. Cardinali, S. Ceccarelli, D. Kovacs, N. Aspite, L. V. Lotti, M. R. Torrisi, and M. Picardo, Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **125**, 1190-1199 (2005).
- S. Y. Park, M. L. Jin, Y. H. Kim, Y. Kim, and S. J. Lee, Aromatic-turmerone inhibits  $\alpha$ -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways, *Arch. Dermatol. Res.*, **303**, 737-744 (2011).
- T. Tian, X. Liu, E. S. Lee, J. Sun, Z. Feng, L. Zhao and C. Zhao, Synthesis of novel oleanolic acid and ursolic acid in C-28 position derivatives as potential anticancer agent, *Arch. Pharm. Res.*, **40**, 458-468 (2017).
- J. Liu, oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives, *J. Ethnopharmacol.*, **100**, 92-94 (2005).
- L. O. Somova, A. Nadar, P. Rammanan, and F. O. Shode, Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension, *Phytomedicine*, **10**, 115-121 (2003).
- Z. Ovesna, A. Vachalkova, K. Horvathova, and D. Tothova, Pentacyclic triterpenic acids: New chemoprotective compounds, *Neoplasma*, **51**, 327-333 (2004).
- H. Sheng and H. Sun, Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: A multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases, *Nat. Prod. Rep.*, **28**, 543-593 (2011).
- S. K. Han, Y. G. Kim, H. C. Kang, J. R. Huh, J. Y. Kim, N. I. Baek, D. K. Lee, and D. G. Lee, Oleanolic acid from *Fragaria ananassa* calyx leads to inhibition of  $\alpha$ -MSH-induced melanogenesis in B16-F10 melanoma cells, *J. Appl. Biol. Chem.*, **57**(6), 735-742 (2014).
- I. J. Jin, Y. I. KO, Y. M. Kim, and S. K. Han, Solubilization of oleanolic acid and ursolic acid by cosolvency, *Arch. Pharm. Res.*, **20**(3), 267-274 (1997).
- S. Zalipsky, C. Gilon, and A. Zilkha, Attachment of drugs to polyethylene glycols, *Eur. Polym. J.*, **19**, 1177-1183 (1983).
- Y. Wang, Y. Tian, P. Zhu, Y. Ma, J. He and J. Lei, Self-assembled



- nanoparticles based on poly(ethylene glycol)-oleanolic acid conjugates for co-delivery of anticancer drugs, *RSC Adv.*, **7**, 29591-29598 (2017).
16. O. Wong, N. Tsuzuki, B. Nghiem, J. Kuehnhoff, T. Itoh, K. Masaki, J. Huntington, R. Konishi, J. H. Rytting, and T. Higuchi, Unsaturated cyclic ureas as new non-toxic biodegradable transdermal penetration enhancers. II. Evaluation study, *Int. J. Pharm.*, **52**, 191-202 (1989).
  17. M. Johansen, B. Mollgaard, P. K. Wotton, C. Larsen, and A. Hoelgaard, *In vitro* evaluation of dermal prodrug delivery-transport and bioconversion of a series of aliphatic esters of metronidazole, *Int. J. Pharm.*, **32**, 199-206 (1986).
  18. J. M. Harris and R. B. Chess, Effect of pegylation on pharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 214-221 (2003).
  19. M. L. Bilodeau, J. D. Greulich, R. L. Hullinger, C. Bertolotto, R. Ballotti, and O. M. Andrisani, BMP-2 stimulates *tyrosinase* gene expression and melanogenesis in differentiated melanocytes, *Pigm. Cell Res.*, **14**, 328-336 (2001).
  20. M. H. Choi, S. H. Yang, and H. J. Shin, Inhibition of melanogenesis by domestic bamboo leaves (*Sasa coreana* Nakai) extract in B16F10 melanoma cells, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **33**(1), 41-47 (2018).
  21. Y. R. Kim, Y. J. Hong, and K. S. Yang, Anti-inflammatory effect and inhibition of melanin biosynthesis of *Clematic mandshurica*, *Yakhak Hoeji*, **58**(1), 47-52 (2014).
  22. R. B. Greenwald, PEG drugs: An overview, *J. Control Release*, **74**, 159-171 (2001).
  23. H. Yang, J. J. Morris, and S. T. Lopina, Polyethylene glycolpoly-amidoamine dendritic micelle as solubility enhancer and the effect of the length of polyethylene glycol arms on the solubility of pyrene in water, *J. Colloid Interface Sci.*, **273**, 148-154 (2004).

#### Authors

Hyun-Jin An; M.Sc., Graduate Student, Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea; ahj052388@naver.com

Young-kyung Yoon; M.Sc., Team Manager, Yeomyung Biochem Co., Ltd., Cheongju 28171, Korea; 23yyk@naver.com

Jae-Duck Lee; Ph.D., Representative director, Yeomyung Biochem Co., Cheongju 28171, Korea; leej2486@korea.com

Noh-Hee Jeong; Ph.D., Professor, Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea; nhjeong@cbnu.ac.kr