

Tyrosinase Inhibition-mediated Anti-melanogenic Effects by Catechin Derivatives Extracted from *Ulmus parvifolia*

Taehyeok Hwang¹, Hyo Jung Lee¹, Dong-Min Kang¹, Kyoung Mi Moon¹, Jae Cheal Yoo¹, Mi-Jeong Ahn¹, Dong Kyu Moon^{2*} and Dong Kyun Woo^{1*}

¹College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

²Department of Orthopedic Surgery and Institute of Health Sciences, School of Medicine and Hospital, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Korea

Received November 1, 2022 / Revised November 14, 2022 / Accepted November 15, 2022

As a protective defensive mechanism against ultraviolet (UV) light exposure in skin tissue, melanocytes produce the pigment melanin. Tyrosinase plays a key role in melanin production in melanocytes. However, the overproduction of melanin can lead to lesions, such as freckles and dark spots. Thus, it is clinically important to find a modulating molecule to control melanogenesis by regulating tyrosinase expression and/or activity. It is known that catechin, a plant flavonoid, can reduce melanogenesis through the downregulation of tyrosinase expression. Here, we tested whether catechin derivatives isolated from the stem bark of *Ulmus parvifolia* have an effect on melanin production by regulating tyrosinase in mouse melanoma cells and *in vitro* mushroom tyrosinase. The catechin derivatives used in this study included C5A, C7A, C7G, and C7X. Treatments using these catechin derivatives reduced melanin production in mouse melanoma B16F10 cells in which melanogenesis was stimulated by α -MSH. Notably, the anti-melanogenic effects of catechin derivatives were similar to those of kojic acid, a well-known anti-melanogenic molecule. Both C5A and C7A directly inhibited the activity of tyrosinase isolated from mushrooms *in vitro*. Furthermore, our *in silico* computational simulation showed that these two compounds were expected to bind to the active site of tyrosinase, which is similar to kojic acid. In addition, all four catechin derivatives reduced tyrosinase protein expression. In summary, our results showed that catechin derivatives can reduce melanogenesis by regulating tyrosinase activity or expression. Thus, this study suggests that catechin derivatives isolated from *U. parvifolia* can be novel modulators of melanin production.

Key words : Catechin derivatives, melanogenesis, tyrosinase

서 론

자외선(UV)으로 야기되는 피부조직의 손상에 대한 방어기전으로 멜라닌세포(melanocyte)는 멜라닌 색소를 생산한다[8]. 피부의 각질형성세포(keratinocyte)는 자외선이나 산화적 스트레스에 반응하여, melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)을 분비한다. α -MSH는 멜라닌세포를 자극하여 멜라닌을 생성하는데, 이러한 멜라닌 합성에서 tyrosinase 효소가 중추적인 역할을 담당한다. Tyrosinase는 멜라닌 합성과정에서 기질인 tyrosine을 멜라닌의 전구체

인 dopaquinone으로 변환시킨다[4, 7, 14]. 최종적으로 생산된 멜라닌은 멜라닌세포에서 표피세포로 전달되며 피부에 침착된다[5, 13]. 피부조직의 적절한 멜라닌 함량은 자외선에 의한 피부손상을 보호하며 나아가 피부암 발생 위험을 낮추는 것으로 알려져 있다[15]. 그러나 과도한 멜라닌 생성은 주근깨, 검버섯, 기미 등의 과다 색소침착 피부병변을 일으킨다[1, 5, 7, 10]. 한편, 멜라닌의 과도한 생산 및 피부 축적을 제어하기 위한 물질로서 kojic acid를 비롯한 여러 tyrosinase 억제제가 제약 및 화장품 산업에서 연구개발되고 있으나 안전성 문제가 완전히 해결되지 못한 실정이다[1, 10]. 따라서, tyrosinase 억제 효과가 크며, 안전성이 보장되는 새로운 천연 화합물을 발굴하는 것이 요구된다.

참느릅나무(*Ulmus parvifolia* Jacq.)는 중국, 한국, 일본에 분포하며, 그 줄기 또는 뿌리의 껍질은 한의학과 민간에서 염증 및 위장질환 치료에 사용되어왔다[11]. 참느릅나무의 줄기 껍질(stem bark) 추출물에서는 catechin과 당치환기를 갖는 catechin 유도체 화합물(catechin-5-O- β -

*Corresponding authors

Tel : +82-55-772-2428, Fax : +82-55-772-2429

E-mail : dongkyun.woo@gnu.ac.kr (Dong Kyun Woo)
sidero17@hanmail.net (Dong Kyu Moon)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

D-apiofuranoside, catechin-7-O- α -L-rhamnopyranoside, catechin-7-O- β -D-apiofuranoside, catechin-7-O- β -D-glucopyranoside 및 catechin-7-O- β -D-xylopyranoside)이 주요 이차대사산물로 알려져 있다[11]. 또한, 최근 연구에서 참느릅나무 유래 천연 화합물은 항염증 효과 이외에도 항산화 및 피부 상처 치유 효과가 있는 것으로 보고되었다[6, 9]. 홍미롭게도, catechin은 B16F10 마우스 흑색종 세포주에서 tyrosinase 발현을 억제함으로써 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 보고 되었다[12]. 및 본 연구진이 수행한 최근 연구결과에서, catechin 유도체 화합물 중 하나인 catechin-7-O- α -L-rhamnopyranoside가 tyrosinase 효소의 활성을 억제함으로써 멜라닌 생성을 저해함이 밝혀졌다[3]. 따라서 본 연구에서는 천연물 유래의 안전성이 확보되며, 피부의 과다 색소침착 질환 제어를 위한 새로운 조절 물질을 발굴하고자, 참느릅나무 줄기 껍질에서 추출 및 동정된 catechin 유도체 화합물의 멜라닌 생성 억제 효능을 검증하였다.

재료 및 방법

실험시료

본 연구에 사용된 mushroom tyrosinase (cat. # T3824), L-DOPA (cat. #D9628), L-tyrosine (cat. #T3754), kojic acid 및 α -MSH (cat. #M4135)는 Sigma Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였고, cell viability assay kit (EZ-Cytox)는 DOGEN (Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. Anti-tyrosinase antibody (cat. #sc-7833)는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) 및 anti- β -actin antibody (cat. #A5441)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)로부터 각각 구입하였다. Catechin 유도체 화합물은 기존의 보고된 방법[3, 11]에 따라 참느릅나무의 줄기 껍질에서 추출 및 동정되었다.

Catechin 유도체 화합물의 분리 및 구조동정

건조시킨 참느릅나무 줄기 껍질(300 g)을 곱게 분쇄하여 70% 에탄올로 60분씩 3회 초음파추출하였다. 추출액을 여과한 후 감압농축하여 얻은 추출물(117 g)을 물에 현탁시키고, *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, 수포화 *n*-BuOH의 순서로 분획을 실시하여 각각 Hexane fr. (2.0 g), CH₂Cl₂ fr. (0.4 g), EtOAc fr. (8.5 g), BuOH fr. (101.5 g)의 분획물을 얻었다. EtOAc 분획물에 대하여 CH₂Cl₂와 MeOH 혼합용액 (100 : 0 → 0 : 100)을 전개용매로 MPLC (Isolera One, Biotage, Charlotte, USA)를 실시하여 15개의 소분획물(Fr.1 ~ Fr.15)를 얻었다. 소분획물 Fr.9에 대하여 MeOH로 재결정을 실시하여 화합물 1(300 mg)을 얻었다. 소분획물 Fr.13에 대하여 물(A)과 MeOH (B)을 전개용매로 prep-HPLC (Agilent 1260 infinity binary system, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)를 실시하여 8개의 소분획물(fr.13.1 ~ fr.13.8)을 얻었다. Prep-HPLC용 column은 YMC Pack ODS-

A (250×20 mm, 5 μ m)를 사용하였고, 검출과장은 280 nm였으며 유속은 4 ml/min였다. 전개용매의 농도구배조건은 처음 25분간은 B용매를 15%에서 20%로, 다음 10분간은 B용매를 20%에서 90%로 올려주었다. 소분획물 fr.13.2 (*t_R* 16.5 min), fr.13.4 (*t_R* 20.6 min), fr.13.6 (*t_R* 26.3 min)에 대하여 MeOH를 전개용매로 각각 Sephadex LH-20를 실시하여 화합물 2(5 mg), 3(8 mg), 4(6 mg)를 얻었다. 이상으로 분리한 4가지 화합물(1-4)의 FAB-MS 또는 ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 분광학적 데이터를 기준에 보고된 화합물의 분광학적 데이터와 비교하여 그 구조를 각각 C7A (1), C7X (2), C7G (3), C5A (4)로 규명하였으며[11], 이들 화합물 모두 (-)-catechin의 배당체였다.

B16F10 마우스 흑색종 세포주 세포배양

Mouse melanoma 세포주인 B16F10 세포배양은 10% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM 배양액)을 사용하여 통상적인 37°C, 5% CO₂의 배양조건에서 이루어졌다.

Catechin 유도체 화합물의 세포독성 분석

B16F10 세포를 24-well plate에 3×10⁴ cells/ml 의 농도로 seeding한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후, catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X)를 10, 20, 및 50 μ M 농도로 처리한 후 72시간 동안 배양하였다. 다음으로 통상적인 MTT assay 분석을 시행하였으며, 각 반응의 결과물에 대해 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, USA)를 이용한 흡광도(absorbance at 595 nm)를 측정하여 세포독성(cytotoxicity)을 평가하였다.

B16F10 세포주에서 멜라닌 함량 분석

세포내 멜라닌 함량을 조사하기 위해, 다양한 농도(5, 10, 및 20 μ M)의 catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X)을 1시간 동안 전처리한 후 α -MSH (1 μ M)로 3일 동안 멜라닌 생성을 자극하였다. 이후 NaOH (1 N)를 사용하여 cell lysates를 획득하였고, microplate reader (Molecular Devices, San Jose, USA)를 이용한 흡광도(at 490 nm)를 측정하여 멜라닌 함량을 평가하였다[7].

In vitro tyrosinase 활성 분석

Mushroom tyrosinase 활성 측정은 기존의 보고된 방법 [7]에 따라 96-well plate에서 진행되었다. Tyrosinase가 촉매하는 반응에서, 20 μ l의 L-tyrosine (1 mM) 기질과 170 μ l의 sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.8)를 사용하였으며, 버섯에서 추출/정제한 20 μ l의 mushroom tyrosinase (500 unit)를 각 well에 첨가하였고, 10 μ l의 catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X, 각 50 μ M)을 혼합한 후에 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이 반응으로부터 생성된

DOPA chrome의 함량은 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, USA)를 이용한 흡광도(at 475 nm)를 측정하여 평가하였다.

Protein 추출 및 Western blotting 분석

B16F10세포를 6-well plate에 seeding (2×10^5 cells/well)한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포배양액에 catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X, 각 20 μ M)을 12시간 동안 처리하였다. 이후 α -MSH (1 μ M)를 48시간 동안 처리한 후에, NP40 Cell Lysis Buffer (Life Technologies, Carlsbad, USA)를 사용하여 세포용해(cell lysis)를 실시하였다. 여기서 획득된 cell lysates로부터 protein을 추출하고, protein sample은 BCA assay를 통해 정량하였다. 단백질 샘플(20 μ g)을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하여 분리한 후에, PVDF membrane으로 transfer하였다. 5% skim milk를 사용하여 PVDF membrane을 blocking한 후에, 1차 항체(anti-tyrosinase antibody)를 4°C에서 overnight 처리하였다. 다음으로 2차 항체와 반응시키고 ECL kit를 사용하여 chemiluminescence 화학반응으로 tyrosinase 단백질을 검출하였다. 검출된 tyrosinase 단백질의 시각화는 imaging system (Microchemi 4.2, Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하여 이미지를 획득하였으며, 정량은 Image J software (NIH, Bethesda, USA)을 이용하여 분석하였다.

Tyrosinase와 C5A (또는 C7A) 사이의 결합에 대한 *in silico* 분석

Tyrosinase의 active site와 C5A (또는 C7A) 사이의 protein-ligand 결합을 예측하기 위하여, AutoDock 4.2 software를 이용한 docking simulation 분석을 실행하였다. 컴퓨터 분석에 사용된 mushroom tyrosinase의 구조는 Protein Data Bank (PDB ID: 2Y9X)로부터 획득하였다. Protein-ligand 결합을 이루는 아미노산 잔기를 예측하기 위하여, Ligand Scout 3.1 software를 사용한 pharmacophore 분석을 실행하였다. *In silico* 분석에서, 기존의 알려진 tyrosinase 저해제인 kojic acid를 positive control로 사용하였다.

통계분석

모든 실험은 최소한 3회 이상의 독립적인 반복을 실시하였고, 반복실험에서 얻은 결과는 Graphpad Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, USA)를 이용하여 Student's two-tailed t-test를 수행하였고, 데이터 결과값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 실험군의 평균값 차이를 통계분석하여 $p < 0.05$ 인 경우에 통계학적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

Catechin 유도체 화합물의 구조와 세포독성에 대한 영향 분석

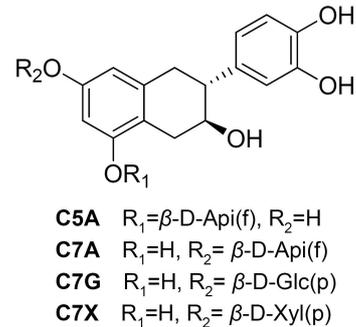


Fig. 1. Chemical structures of catechin derivatives used in this study. The chemical structure of catechin is shown. In the bottom margin, substituents for R₁ and R₂ sites in C5A, C7A, C7G, and C7X are described respectively.

본 연구에 사용된, 참나무로부터 추출/동정된 flavonoids 계열의 catechin 유도체 화합물은 flavan-3-ol backbone의 5 또는 7번째 탄소에 각기 다른 당 치환기를 갖는다(Fig. 1). 본 논문에서는 이들 catechin 유도체 화합물, catechin-5-O- β -D-apiofuranoside는 C5A로, catechin-7-O- β -D-apiofuranoside는 C7A로, catechin-7-O- β -D-glucopyranoside는 C7G로, 및 catechin-7-O- β -D-xylopyranoside는 C7X로 각각 축약하여 명명하였다. 먼저 catechin 유도체 화합물이 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay 기법으로 세포독성 분석을 수행하였다. 멜라닌 생성 기전 연구에 흔히 사용되는 mouse melanoma 세포주인 B16F10 세포에 catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X)을 10, 20, 및 50 μ M 농도로 72시간 동안 처리하고, 약물 처리를 하지 않은 대조군과 비교하여 나타난 세포독성을 분석하였다. Fig. 2에서 보여지듯 각각의 catechin 유도체 화합물은 B16F10 세포주에서 50 μ M 농도 처리까지는 통계적으로 유의한 세포독성을 유발하지 않았다. 따라서, 이하 본 연구의 catechin 유도체 화합물을 이용한 세포 실험에서, 세포독성을 충분히 배제할 수 있도록 20 μ M 이하의 농도를 사용하였다.

B16F10 세포주에서 catechin 유도체 화합물에 의한 멜라닌 생성 억제 효과 분석

피부의 과다 색소침착은 α -MSH 호르몬에 의한 멜라닌 과잉 생성이 주요한 원인이며, 따라서, 이를 억제하거나 감소시키는 물질을 발굴하는 것은 매우 중요하다. B16F10 세포주에서 멜라닌 생성에 대한 catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X)의 영향을 알아보기 위하여, catechin 유도체 화합물을 5, 10, 20 μ M 농도로 각각 전처리한 후에, α -MSH 호르몬을 처리하여 멜라닌 생성을 유도하였다. Fig. 3에서 보여지듯, 대조군에 비해 α -MSH 호르몬 처리는 B16F10 세포의 멜라닌 생성을 약 60% 증가시켰다. 또한 잘 알려진 멜라닌 생성 억제 물질인 kojic acid 처리

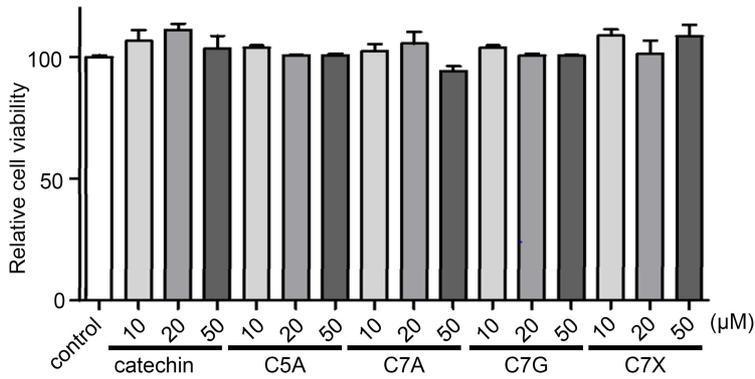


Fig. 2. Effects of catechin derivatives on the viability of B16F10 cells. Cell viabilities of catechin, C5A, C7A, C7G, and C7X-treated B16F10 cell cultures were assessed by MTT assay.

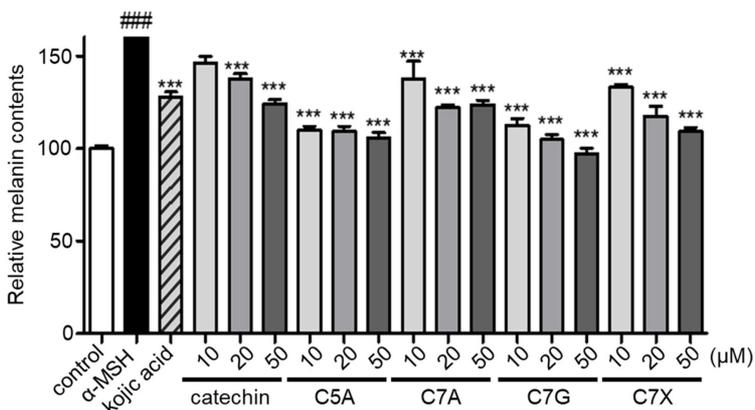


Fig. 3. Melanin contents of B16F10 cells stimulated with α-MSH. B16F10 cells were pretreated with C5A, C7A, C7G, C7X, or kojic acid for 1 hr and then the cells were stimulated with α-MSH for 72 hr. The cellular melanin contents are expressed as the relative percentage of the untreated control. *** $p < 0.001$, and ### $p < 0.0001$.

(20 μM)는 α-MSH 호르몬의 자극으로 유도된 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하였다. 이미 보고된 바와 같이 catechin도 멜라닌 생성 억제 효능을 보였다. 흥미롭게도, 본 연구에 사용된 4 종류의 catechin 유도체 화합물 모두 α-MSH-유도 멜라닌 생성을 억제하였다. 특히, C5A, C7G, 및 C7X는 20 μM 처리 농도에서 멜라닌 생성 억제 효과가 kojic acid 보다 큰 것으로 나타났다. 또한, catechin에 비하여, 4종류의 catechin 유도체 화합물 모두가 멜라닌 생성

억제 효능이 더 높은 경향을 보였다.

Catechin 유도체 화합물의 mushroom tyrosinase 활성 저해 효과 분석

Tyrosinase는 멜라닌 생성 속도를 결정하는 하는 주요 효소이며, tyrosine을 DOPA quinone으로 변환시키는 화학 반응을 촉매한다. Catechin 유도체 화합물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 분석하기 위해, mushroom tyrosinase

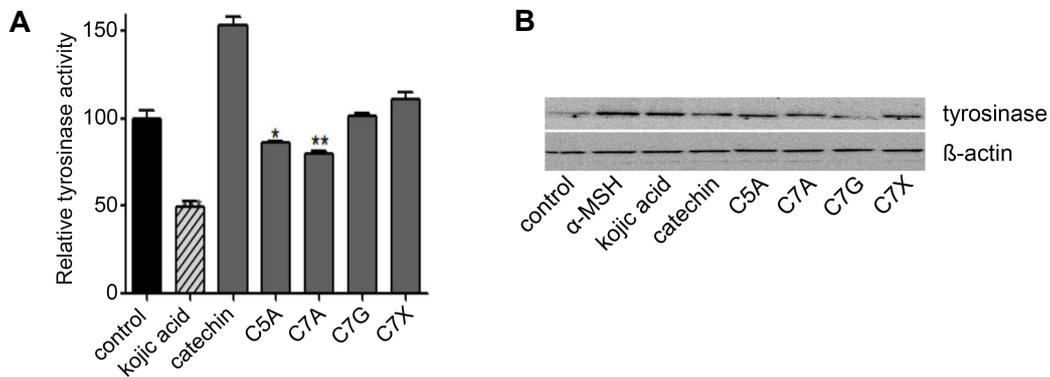


Fig. 4. Effects of catechin derivatives on tyrosinase activity and expression. (A) *In vitro* mushroom tyrosinase activities were measured in a reaction using tyrosine substrate and C5A, C7A, C7G, and C7X. Kojic acid was used as a positive control for tyrosinase inhibition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. (B) A representative image of Western blotting analysis for tyrosinase protein expression in B16F10 cells treated with C5A, C7A, C7G, and C7X.

(500 units)가 촉매하는 *in vitro* 화학반응에 50 μ M 농도로 C5A, C7A, C7G, 및 C7X를 각각 처리하였다. Fig. 4A에서 보여지듯, 잘 알려진 tyrosinase 저해제인 kojic acid는 mushroom tyrosinase 촉매반응을 약 50% 억제하였다. 또한, 이미 보고된 바와 같이 catechin은 직접적인 tyrosinase 활성 억제 효과는 나타내지 않았다. 본 연구에 사용된 catechin 유도체 화합물 중에서 C5A와 C7A는 tyrosinase 활성 억제 효과를 보인 반면에, C7G와 C7X는 억제 효과가 없었다.

B16F10 세포주에서 catechin 유도체 화합물에 의한 tyrosinase 단백질 발현에 대한 영향 분석

Catechin 유도체 화합물이 B16F10 세포주에서 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 세포독성이 없는 20 μ M 농도로 C5A, C7A, C7G, 및 C7X를 각각 전처리(24시간) 하였고, 이후에 α -MSH (1 μ M, 48시간)로 자극하였다. Fig. 4B의 Western blotting 실험결과에서 보여지듯, 대조군에 비해서 α -MSH 처리는 tyrosinase 단백질의 뚜렷한 증가를 유도하였다. 기존의 보고와 일치하게, kojic acid 처리는 tyrosinase 단백질 발현에 영향이 없었으며, 반면 catechin 처리는 tyrosinase 단백질 발현을 감소시켰다. 본 연구에 사용된 catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X) 모두가 α -MSH로 유도된 tyrosinase 단백질 발현 증가를 감소시켰다.

C5A/C7A와 tyrosinase 사이의 protein-ligand 결합에 대한 *in silico* 분석

본 연구결과에서 catechin 유도체 화합물 중 C5A와 C7A는 mushroom tyrosinase의 효소활성을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 이러한 결과에서, 이들 catechin 유도체 화합물이 직접 tyrosinase와 결합하여 그 활성을 억제할 것이 의심된다. 이러한 가설을 증명하기 위해, AutoDock 4.2 software를 사용하여, tyrosinase의 활성자리(active site)와 C5A (또는 C7A)사이의 결합을 예상할 수 있는 *in silico* docking simulation 분석을 실행하였다. Tyrosinase의 active site에 C5A (또는 C7A)를 컴퓨터 분석으로 결합시켰을 때, 잘 알려진 tyrosinase 저해제인 kojic acid와 유사한 수준의 binding energy values를 보이며 결합이 예측되었다(Fig. 5D). 또한, Ligand Scout 3.1 software를 사용한 pharmacophore 분석을 통해, C5A (또는 C7A)와 결합하는 tyrosinase의 아미노산 잔기를 예측하고 Fig. 5에 제시하였다.

고 찰

피부조직은 자외선에 대한 방어기전으로 멜라닌을 생성하고 축적한다. 그러나 과도한 멜라닌 생성은 주근깨, 검버섯, 기미 등의 과다 색소침착 피부병변을 유발한다. 한편, 피부조직의 멜라닌세포에 의한 멜라닌 생성에는 ty-

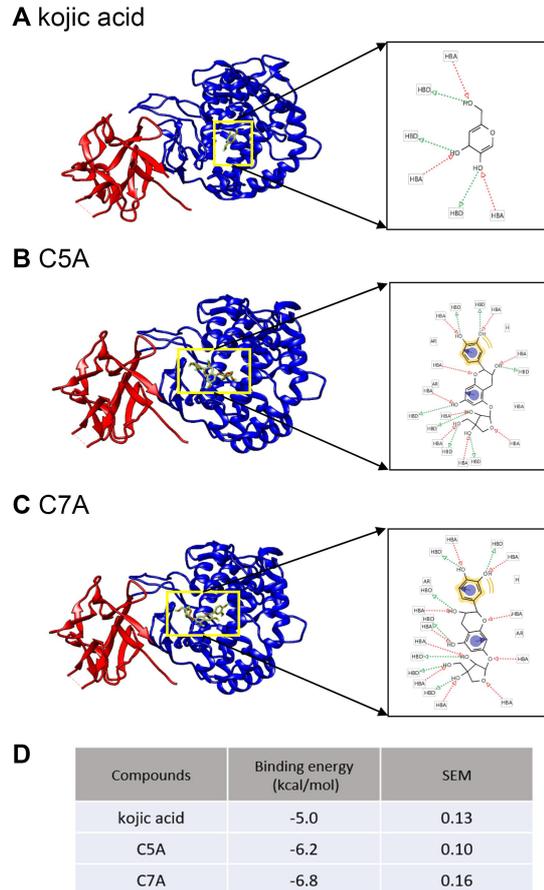


Fig. 5. *In silico* docking simulation and pharmacophore analysis between tyrosinase and C5A/C7A. Protein-ligand docking simulation and pharmacophore analysis were performed using AutoDock 4.2 and Ligand Scout 3.1 software respectively. (A) Docking simulation between the active site of tyrosinase and kojic acid. (B) Docking simulation between the active site of tyrosinase and C5A. (C) Docking simulation between the active site of tyrosinase and C7A. (D) A table shows binding energy values from our computational analysis.

rosinase 효소가 핵심적인 역할을 담당한다. 따라서, 과다 색소침착 피부병변에서 멜라닌세포에 의한 멜라닌 생성을 제어하기 위해, tyrosinase의 발현을 조절하거나 tyrosinase 효소 활성을 조절하는 물질을 발굴하는 연구가 이루어져왔다. 이미 기술된 바와 같이, 참느릅나무에서 추출/동정된 catechin과 그 유도체 화합물인 catechin-7-O- α -L-rhamnopyranoside는 tyrosinase 효소 발현과 활성을 각각 억제함으로써 멜라닌세포의 멜라닌 생성을 저해함이 최근 연구에서 밝혀졌다[3, 12]. 본 연구에서는 참느릅나무에서 추출 및 동정된 새로운 4종류의 catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X)의 멜라닌 생성 억제 효과를 B16F10 세포주와 버섯에서 추출된 tyrosinase를 이용하여 분석하였다. 결론적으로, 이들 화합물 모두가 기존의 잘

알려진 멜라닌 합성 저해제인 kojic acid와 비슷한 수준으로 멜라닌 생성을 억제하였다. 흥미롭게도, furanose 성분 (moiety)을 치환기로 갖는 C5A와 C7A는 tyrosinase 효소 활성을 뚜렷하게 억제하였다. 특히, C5A는 kojic acid보다 높은 저해 효능을 보였다. 이러한 결과는 furanose 성분 구조가 tyrosinase 활성 저해에 영향을 줄 가능성을 제시한다. 또한, 본 연구에 사용된 4종류의 catechin 유도체 화합물 모두가 tyrosinase 발현을 억제하였는데, 이는 기존의 catechin 효능과 일치하며, 아마도 catechin 모체의 효능이 반영된 것으로 추측된다. 본 연구에서 검증된 catechin 유도체 화합물 중에서, tyrosinase 발현과 활성을 모두 억제하는 C5A가 멜라닌 생성 억제 효능이 가장 우수한 것으로 판단된다. 향후 인공피부나 동물모델에서 C5A의 멜라닌 생성 억제 효능과 기작이 검증된다면, 본 연구를 통해 밝혀진 C5A가 피부의 과다 색소침착 질환을 제어하는 새로운 조절 물질로 응용될 수 있음을 기대한다.

감사의 글

본 연구는 교육부와 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원(과제번호: NRF-2020R1C1C1008973 및 NRF-2022R1F1A1074678)을 받아 이루어졌으며 이에 대해 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- An, H. J., Yoon, Y. K., Lee, J. D. and Jeong, N. H. 2020. Synthesis and biological evaluation of water-soluble oleonic acid derivatives for use as melanogenesis inhibitors. *Appl. Chem. Eng.* **31**, 653-659.
- Brach, A. R. and Song, H. 2006. New directions for online floras exemplified by the flora of China project. *Taxon* **55**, 188-192.
- Hwang, T., Lee, H. J., Park, W. S., Kang, D. M., Ahn, M. J., Yoon, H., Yoo, J. C., Moon, D. K. and Woo, D. K. 2022. Catechin-7-O- α -L-rhamnopyranoside can reduce α -MSH-induced melanogenesis in B16F10 melanoma cells through competitive inhibition of tyrosinase. *Int. J. Med. Sci.* **19**, 1131-1137.
- Lee, B., Moon, K. M., Kim, S. J., Kim, S. H., Kim, D. H., An, H. J., Jeong, J. W., Kim, Y. R., Son, S., Kim, M. J., Chung, K. W., Lee, E. K., Chun, P., Ha, Y. M., Kim, M. S., Mo, S. H., Moon, H. R. and Chung, H. Y. 2016. (Z)-5-(2,4-dihydroxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione prevents UVB-induced melanogenesis and wrinkle formation through suppressing oxidative stress in HRM-2 hairless mice. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 2761463.
- Lee, B., Moon, K. M., Lim, J. S., Park, Y., Kim, D. H., Son, S., Jeong, H. O., Lee, E. K., Chung, K. W., An, H. J., Chun, P., Seo, A. Y., Yang, J. H., Lee, B. S., Ma, J. Y., Cho, W. K., Moon, H. R. and Chung, H. Y. 2017. 2-(3, 4-dihydroxybenzylidene)malononitrile as a novel anti-melanogenic compound. *Oncotarget* **8**, 91481-91493.
- Mina, S. A., Melek, F. R., Adeeb, R. M. and Hagag, E. G. 2016. LC/ESI-MS/MS profiling of *Ulmus parvifolia* extracts and evaluation of its anti-inflammatory, cytotoxic, and antioxidant activities. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* **71**, 415-421.
- Moon, K. M., Jeong, J. W., Lee, B., Kim, D. H., Kim, H. R., Woo, Y. W., Lee, E. K., An, H. J., Kim, M. J., Choi, Y. J., Son, S. J., Chun, P., Moon, H. R. and Chung, H. Y. 2016. Antimelanogenic activity of MHY384 via inhibition of NO-induced cGMP signalling. *Exp. Dermatol.* **25**, 652-654.
- Moon, K. M., Lee, B., Kim, D. H. and Chung, H. Y. 2020. FoxO6 inhibits melanogenesis partly by elevating intracellular antioxidant capacity. *Redox Biol.* **36**, 101624.
- Na, M. K., An, R. B., Lee, S. M., Min, B. S., Kim, Y. H., Bae, K. H. and Kang, S. S. 2002. Antioxidant compounds from the stem bark of *Sorbus commixta*. *Nat. Prod. Sci.* **8**, 26-29.
- Ni-Komatsu, L., Tong, C., Chen, G., Brindzei, N. and Orlow, S. J. 2008. Identification of quinolines that inhibit melanogenesis by altering tyrosinase family trafficking. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1576-1586.
- Park, W. S., Kim, H. J., Khalil, A. A. K., Kang, D. M., Akter, K. M., Kwon, J. M., Kim, Y. U., Piao, X. L., Koo, K. A. and Ahn, M. J. 2021. Anatomical and chemical characterization of *Ulmus* species from South Korea. *Plants* **10**, 2617.
- Sato, K. and Toriyama, M. 2009. Depigmenting effect of catechins. *Molecules* **14**, 4425-4432.
- Schallreuter, K., Slominski, A., Pawelek, J. M., Jimbow, K. and Gilchrist, B. A. 1998. What controls melanogenesis? *Exp. Dermatol.* **7**, 143-150.
- Sturm, R. A., Box, N. F. and Ramsay, M. 1998. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* **20**, 712-721.
- Videira, I. F., Moura, D. F. and Magina, S. 2013. Mechanisms regulating melanogenesis. *An. Bras. Dermatol.* **88**, 76-83.

초록 : 참느릅나무에서 추출된 catechin 유도체 화합물의 멜라닌 생성 억제 효과

황태혁¹ · 이효정¹ · 강동민¹ · 문경미¹ · 유재철¹ · 안미정¹ · 문동규^{2*} · 우동균^{1*}
(¹경상대학교 약학과, ²경상대학교병원 정형외과)

자외선으로 야기되는 피부조직의 손상에 대한 방어기전으로 멜라닌세포는 멜라닌 색소를 생산한다. 이러한 멜라닌 생성에는 tyrosinase 효소가 중추적인 역할을 수행한다. 그러나 과도한 멜라닌 생성은 피부조직에 주근깨와 검버섯 등의 과다 색소침착 병변을 일으킨다. 따라서 tyrosinase 발현이나 활성을 조절함으로써, 과도한 멜라닌 생성을 억제하는 물질을 발굴하는 것은 임상적인 의미가 있다. Catechin은 tyrosinase 발현을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제하는 화합물로 알려져 있다. 본 연구에서는 B16F10 마우스 흑색종 세포주와 버섯에서 추출된 tyrosinase를 사용하여, 참느릅나무의 줄기 껍질에서 추출 및 동정된 catechin 유도체 화합물(C5A, C7A, C7G, 및 C7X)의 멜라닌 생성 억제 효능을 검증하였다. 먼저, B16F10 세포주에서, 세포독성을 나타내지 않는 농도의 catechin 유도체 화합물 처리는, 모두 α -MSH로 촉진된 멜라닌 생합성을 억제하는 효능을 보였다. Catechin 유도체 화합물의 이러한 효능은 멜라닌 생합성 저해제로 잘 알려진 kojic acid와 비슷한 수준이었다. 또한, C5A와 C7A는 버섯에서 추출된 tyrosinase의 효소 활성을 통계적으로 유의하게 억제하였다. 또한, 컴퓨터 분석을 통해 C5A와 C7A는 kojic acid와 유사한 수준으로 tyrosinase의 active site에 결합할 것으로 예측되었다. 이에 더하여, 4종류의 catechin 유도체 화합물 모두가 α -MSH 처리된 B16F10 세포주에서 tyrosinase 단백질 발현을 감소시켰다. 본 연구결과를 종합하면, 참느릅나무에서 추출/동정된 catechin 유도체 화합물은 멜라닌세포의 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하였다. 따라서, 본 연구결과는 이러한 catechin 유도체 화합물이 피부의 과다 색소침착 질환 제어를 위한 새로운 조절 물질로 응용될 수 있음을 제시한다.