

2',4'-Dimethoxyflavone의 합성과 멜라닌 생성 저해 효과

이 범 천[†] · 심 관 섭 · 김 진 화 · 김 기 호* · 이 화 정** · 표 형 배

한불화장품(주) 기술연구소, *(주)바이올랜드 생명공학연구소, **충북대학교 약학대학
(2006년 6월 16일 접수, 2006년 7월 18일 채택)

Synthesis of 2',4'-Dimethoxyflavone and Its Anti-pigmentation Effect

Bum Chun Lee[†], Gwan Sub Sim, Jin Hwa Kim, Ki Ho Kim*, Hwa Jeong Lee**, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-830, Korea

*R&D Center, Bioland Ltd.

**College of Pharmacy, Chungbuk National University

(Received June 16, 2006; Accepted July 18, 2006)

요약 본 연구에서는 새로운 미백제를 개발하기 위하여 2',4'-dimethoxyflavone을 합성하였으며 멜라닌 형성 세포에서의 미백효과를 연구하였다. 2',4'-Dimethoxyflavone은 프리 라디칼 소거활성(DPPH)이나 mushroom tyrosinase에 대한 직접적인 저해 효과는 없었다. 2',4'-Dimethoxyflavone을 48 h 처리한 B16 멜라노마 세포에서의 멜라닌 생합성 저해효과는 5 µg/mL에서는 멜라닌생성이 27% 정도 감소되었다. 2',4'-Dimethoxyflavone은 농도에 비례해서 B16 멜라노마 세포내의 tyrosinase 활성을 저해하였으며, western blot을 이용하여 tyrosinase 단백질 발현도 감소시키는 것으로 확인되었다. 또한, RT-PCR을 이용하여 2',4'-dimethoxyflavone이 멜라닌 생성 과정에 관련하는 유전자 발현을 조사한 결과 tyrosinase와 tyrosinase 관련 단백질(TRP-1)의 mRNA 발현을 억제 하였으며 TRP-2의 발현량에는 영향이 없었다. 이 결과로 2',4'-dimethoxyflavone은 멜라닌 형성 세포에서 멜라닌 생성에 관여하는 타이로시나제와 TRP-1 유전자 발현 조절을 통하여 미백 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

Abstract: We synthesized 2',4'-dimethoxyflavone and investigated the effects on melanogenesis. To determine the effects as a whitening agent, various *in vitro* tests were performed such as free radical scavenging activity, melanin assay, tyrosinase activity and expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 (western blot and RT-PCR) in B16 melanoma cells. 2',4'-Dimethoxyflavone showed neither free radical scavenging activities against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and inhibition of mushroom tyrosinase activity, 2',4'-dimethoxyflavone significantly inhibited melanin production in B16 melanoma cells. 2',4'-Dimethoxyflavone treatment (48 h) suppressed the biosynthesis of melanin up to 27% at 5 µg/mL and reduced tyrosinase activity up to 20% at 5 µg/mL in B16 melanoma cells. 2',4'-Dimethoxyflavone was also able to significantly inhibit tyrosinase and TRP-1 expression in protein and mRNA level. These results suggest that 2',4'-dimethoxyflavone inhibits melanin biosynthesis at the level of enzyme activity and protein mRNA expression B16 melanoma cells. Therefore, 2',4'-dimethoxyflavone may be useful as a new whitening agent in cosmetics.

Keywords: 2',4'-dimethoxyflavone, synthesis, melanogenesis, tyrosinase, TRP-1,2

1. 서 론

피부의 색은 피부 속에 존재하는 멜라닌의 함량에 의해 결정된다. 표피에 존재하는 멜라닌은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미,

주근깨 및 다양한 색소 침착을 유발하게 된다[1]. 이러한 멜라닌은 피부의 기저층에 존재하는 melanocyte에서 생합성 된다. 그러나 지나친 멜라닌의 생성은 미적으로나 피부 건강상 문제를 야기할 수 있다. 따라서 최근에는 멜라닌에 의한 피부 착색을 회피하거나 완화시키는 기능성 화장품들이 개발되고 있다.

멜라닌 생합성은 melanocyte에서 cascade 효소 반응에 의해 생성된다. 멜라닌은 melanocyte의 melanosome에서 합성되며, melanosome에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데

† 주 저자 (e-mail: bclee@hanbul.co.kr)

필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 dopachrome tautomerase (DCT) 등이 있다[2,3]. 이들 중 tyrosinase는 melanogenesis의 속도 결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이다. DCT는 초기에는 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)로 불려졌던 효소로서 dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 멜라닌은 흑, 갈색의 eumelanin과 적, 노랑색의 pheomelanin이 있다. 특히 tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 melanin 합성에 필요하며, TRP-1과 DCT는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다[4].

미백 물질들은 작용 기전에 따라 자외선 흡수제나 산란제, vitamin C나 kojic acid, 알부틴[5,6] 등과 같은 tyrosinase 저해제, 활성 산소종을 소거하는 토코페롤 등으로 분류할 수 있다. 또한 상백피, 당귀, 고삼, 지엽, 금은화, 감초, 반하, 백작약, 음양곽 등의 다양한 식물 추출물이 미백 효과가 있는 것으로 나타나고 있다. 최근에는 kojic acid의 유도체 합성물질의 미백효과와 hydroxybenzoate, alkoxybenzoate와 3,4,5-trimethoxycinnamate 등의 새로운 미백 효과가 발표되고 있다[7,8].

새로운 미백 화장품 소재를 개발하기 위하여 플라보노이드의 유도체를 연구하던 중 디메톡시 플라본 유도체가 미백제의 응용 가능성이 높은 것을 발견하였다. 디메톡시 플라본에 대한 기존의 연구로는 플라본 유도체에 대한 기본 구조결정과 함께 사람 유방암에 대한 작용 메커니즘에 대한 연구 결과가 일부 있었으나 미백 효과에 대한 연구는 없었다[9,10].

본 연구는 미백효과가 있는 신소재를 개발하기 위하여 디메톡시 플라본을 합성하였으며 멜라닌 형성 세포에서의 멜라닌 생성 저해 효과를 연구하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 시약

합성 출발 물질 및 시약들은 시판중인 일급시약을 사용하였으며 반응 용매는 무수 용매를 구입하여 별도의 재처리 없이 사용하였다. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz)은 FT-300 MHz spectrometer (Bruker, USA)를 사용하여 얻었으며 용매는 DMSO-*d*₆를 사용하였다. FT-IR spectra는 FT-IR (JASCO-5300, Japan)을 사용하였으며 LC-MS spectrum은 Waters Alliance 2795 (Waters, USA)를 사용하여 얻었다.

2.2. 2',4'-Dimethoxyflavone의 합성

2.2.1. 2-Acetylphenyl 2,4-dimethoxybenzoate

무수 methylene chloride (250 mL)에 thionyl chloride (21.8 g, 0.24 mol)를 녹이고 -20°C 에서 20 min간 교반 후 DMAP (33.6 g, 0.36 mol)를 녹인 methylene chloride (150 mL)와 2,4-dimethoxybenzoate (33.4 g, 0.24 mol)를 녹인 methylene chloride (200 mL)를 차례로 천천히 첨가하여 각각 실온에서 30 min 교반시킨 후 -20°C 에서 냉각교반하였다. 위의 반응액에 2-hydroxyacetophenone (22.3 g, 0.22 mol)과 DMAP (33.6 g, 0.36 mol)를 녹인 methylene chloride (250 mL)를 천천히 첨가하여 실온에서 30 min간 교반하였다. 반응 종결 후 증류수와 ethylacetate를 첨가하여 추출하고 유기용매층을 증류수로 세척한 후 MgSO_4 로 탈수한 다음 진공농축시켜 순수한 백색 결정의 반응생성물을 얻었다(수율: > 90%).

2.2.2. 1-(2,4-Dimethoxyphenyl)-3-(2-hydroxyphenyl) propane-1,3-dione

Pyridine 400 mL에 2-acetylphenyl 2,4-dimethoxybenzoate (84 g, 0.70 mol)를 녹이고 50°C 로 가온하고 KOH (24 g, 1.07 mol)를 첨가한 후 50°C 에서 1 h 동안 교반시켰다. 반응 종결 후 증류수와 ethylacetate를 첨가하여 추출하고 유기용매층을 증류수로 세척한 후 MgSO_4 로 탈수한 다음 진공농축 시켜 순수한 노란 결정의 반응생성물을 얻었다(수율: 80%).

2.2.3. 2',4'-Dimethoxyflavone

위의 반응생성물인 1-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-(2-hydroxyphenyl)propane-1,3-dione (62.2 g, 0.77 mol)을 270 mL acetic acid에 넣고 교반을 하며 7 mL H_2SO_4 를 첨가한 후 50°C 에서 2 h 동안 교반시켰다. 반응액을 0°C 로 냉각하고 이때 생성된 침전물을 여과하여 증류수로 세척한 후 감압증발 시키고 hexane/ethanol (2 : 1, v/v)으로 재결정하였다(수율: > 95%, $^1\text{H NMR}$ in DMSO-*d*₆): 7.92~7.76 (m, 4H), 7.43 (s, 2H), 7.33~7.20 (m, 3H), 6.98~6.61 (m, 7H), 3.83 (s, 6H).

2.3. Tyrosinase 저해활성

실험물질인 2',4'-dimethoxyflavone과 양성 대조군에 각각 완충용액, tyrosine 용액, tyrosinase 용액 등을 투여하고 37°C 에서 30 min 동안 반응시켰다. 반응 후 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. DPPH Radical 소거 효과

항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH,

Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 Blois법[11]을 활용하였다. 0.1 mM DPPH 메탄올 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후, 실온에 10 min 동안 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 세포 및 시약

B16은 마우스의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 5% fetal bovine serum (Bio Whittaker, USA), 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, USA), 200 μ M α -MSH (Sigma, USA)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.6. 세포 생존율 측정

MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann [12]의 방법을 변형하여 실시하였다. B16 melanoma 세포를 1×10^5 cells/well 농도로 24 well plate에 분주한 세포에 2',4'-dimethoxyflavone을 투여하고 24 h 동안 배양하였다. MTT 용액(5 μ g/mL)을 첨가하고 3 h 후, 원심 분리하여 상층액을 제거하고 100 μ L acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Yasunobu [13] 방법을 사용하였다. 6 well plate에 3×10^5 cell/well로 세포를 분주하였고, 시료를 처리하고 48 h 동안 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1,200 rpm에서 5 min 간 원심 분리하여 침전한 후, 1 mL homogenization buffer (50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH (+10% DMSO) 200 μ L를 첨가하고 vortex 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품(Sigma, USA)으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌은 단위세포(10^4 cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

2.8. 세포내 Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성 측정법은 Pawelek과 Pomerantz 방법을 사용하였다[14,15]. 6 Well plate에 5×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 하루 동안 배양한 후 시료를 처리하였다. 24 h 후, 세포를 수집하여 용해시킨 후 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2 h 동안 배양하고 490 nm에서 흡광

도를 측정하였다.

2.9. Western Blot Analysis

시료를 48 h 처리한 B16 melanoma 세포를 RIPA buffer (10 mM sodium fluoride, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM DTT, 500 μ M sodium orthovanadate, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, 1 mM PMSF)로 용해하고 원심 분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 12% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 3% skim milk가 함유된 Tris 완충용액에서 tyrosinase (sc-7833), TRP-1 (sc-10443), TRP-2 (sc-10452), actin (sc-1616) 항체와 각각 반응시킨 후, alkaline phosphatase가 결합된 항체를 가한 후, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT)을 가하여 발색시켰다. Western blot 결과는 calibrated densitometer GS-800 (Biorad, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.10. RNA 분리 및 RT-PCR

Total RNA추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, MD, USA)을 이용하였다. cDNA합성은 1 μ g의 total RNA를 oligo (dT)15 primer, dNTP (0.5 μ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)로 37 $^{\circ}$ C에서 60 min, 93 $^{\circ}$ C에서 5 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 cDNA로부터 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, β -actin을 증폭하기 위하여 cDNA, 0.5 μ M의 5'과 3'primer, 10 X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 μ M dNTP, 25 mM MgCl₂, 2.5 unit *Taq* polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR증폭은 94 $^{\circ}$ C 0.5 min, 50 ~ 55 $^{\circ}$ C, 0.5 min, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 20 ~ 29 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 β -actin 유전자의 발현을 image analyzer (BIS303PC, DNR Imaging Systems Ltd, UK)로 확인 하였으며 각 band의 density는 densitometric program (NIH Image software, Maryland, USA)을 이용하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 oligonucleotide서열은 tyrosinase : sense ; 5'-GAG AAG CGA GTC TTG ATT AG-3', antisense ; 5'-TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC-3', TRP-1 : sense ; 5'-GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC-3', antisense ; 5'-AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT-3', TRP-2 : sense ; 5'-CCT GTC TCT CCA GAA GTT TG-3', antisense ; 5'-CGT CTG TAA AAG AGT GGA GG -3'이며, β -actin의 oligonucleotide서열은 sense ; 5'-ATG

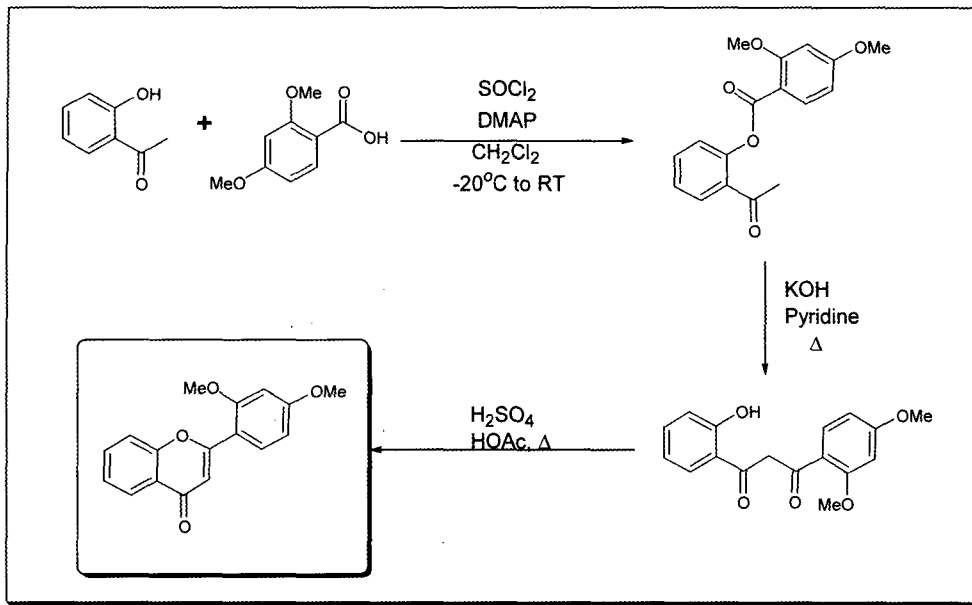


Figure 1. Synthetic procedure of 2',4'-dimethoxyflavone.

CAG AAG GAG ATC ACT GC-3', antisense ; 5'-CTG CGC AAG TTA GGT TTT GT-3'이다.

2.11. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 2',4'-Dimethoxyflavone의 합성

2',4'-Dimethoxyflavone의 합성은 Figure 1에 따라 진행되었다. 현재 flavone의 합성을 위하여 다양한 방법이 사용되고 있으며, 이들 중에서 Baker-Venkataraman 접근방법을 이용하였다[16]. 2,4-Dimethoxybenzoic acid를 halogenating agent인 SOCl₂를 이용하여 acyl halide 화합물을 형성한 후 2-hydroxyacetophenone과 반응하여 benzoyl ester를 형성하였다. 생성된 benzoyl ester에 염기를 처리하여 분자내의 Claisen 축합반응을 통하여 1,3-diketone을 얻은 후 산처리를 통하여 dehydrative cyclization을 유도하여 2',4'-dimethoxyflavone을 얻었다.

합성된 2',4'-dimethoxyflavone의 구조는 NMR, LC-MS, FT-IR 스펙트럼을 통하여 확인하였다. 모든 분광학적 결과는 예상된 구조와 일치하였다. 합성된 flavone은 γ-pyrone의 특징적인 IR 흡광을 나타냈으며(1628~1631 cm⁻¹), ¹H-NMR에서는 flavone의 특징적인 스펙트럼을 관찰할 수 있었다(6.61~7.92 δ ppm). 또한 LC/MS 스펙트

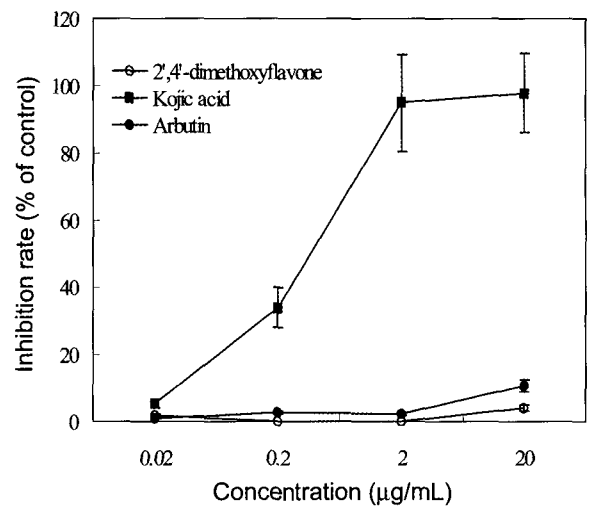


Figure 2. Anti-oxidant effect of 2',4'-dimethoxyflavone in the DPPH assay. A solution of 150 µL of 100 µM DPPH solution in methanol was gently mixed with 100 µL of 2',4'-dimethoxyflavone for 10 min and the absorbance was measured at 565 nm. Results are means ± S.D. from 3 separate experiments.

럼에서는 M+1 피크를 관찰할 수 있었다(LC/MS [m/z (rel. int.)%]: 620 (98) [M+1]).

3.2. Tyrosinase 저해활성

Tyrosine에서 멜라닌을 형성하는 일련된 산화 반응에서 tyrosinase는 처음 tyrosine이 dopa로 산화되는 과정과

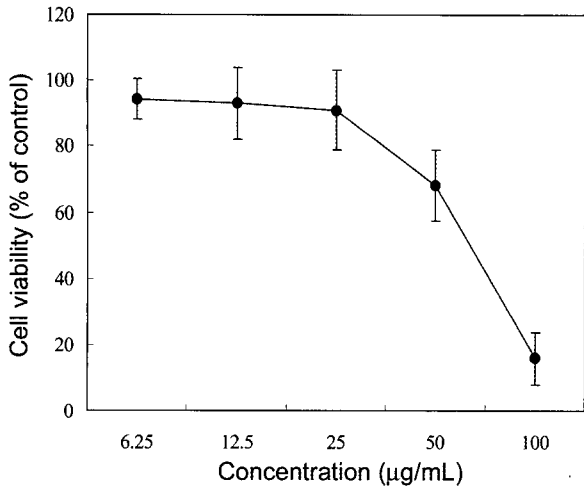


Figure 3. Relative cell viability of 2',4'-dimethoxyflavone on B16 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentration of 2',4'-dimethoxyflavone for 24 h. The cell viability was measured by the MTT method. Data are normalized by taking 100% as a viability of non-treated cells. Results are means ± S.D. from 3 separate experiments.

다음 단계인 dopa가 dopaquinone으로 산화되는 두 단계의 반응을 촉진하는 효소이다. 2',4'-Dimethoxyflavone이 tyrosinase 활성을 억제하는 정도를 실험한 결과 양성 대조군인 알부틴과 kojic acid의 경우에는 mushroom tyrosinase에 직접적인 저해 효과를 나타냈으나 2',4'-dimethoxyflavone은 tyrosinase 저해 활성이 나타나지 않았다 (Figure 2). 이 결과로 2',4'-dimethoxyflavone은 기존 미백제와 같은 mushroom tyrosinase에 직접적인 저해 활성이 없는 것으로 판단된다.

3.3. DPPH Radical 소거 효과

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다. 유해 산소라 불리는 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 색소 침착, 노화 및 성인병 질환을 유발[17]하는 것으로 알려져 있다. 2',4'-Dimethoxyflavone의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 butylated hydroxytoluene (BHT)를 이용하여 2',4'-dimethoxyflavone의 항산화 효과와 비교하였으며 BHT는 647 µg/mL 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였지만 2',4'-dimethoxyflavone은 DPPH radical에 대한 소거효

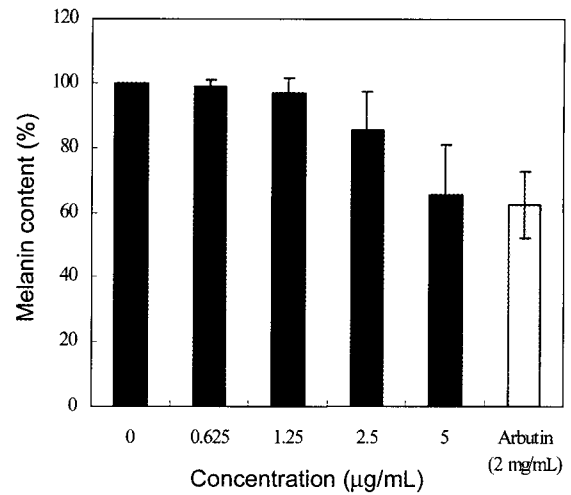


Figure 4. Effect of 2',4'-dimethoxyflavone on melanin production in B16 melanoma cells. The cells were incubated with 2',4'-dimethoxyflavone for 48 h. Melanin content is quantified by absorption at 405 nm calibrated with synthetic melanin as standard. 2',4'-dimethoxyflavone decreased the intracellular melanin contents at treated concentration. Results are means ± S.D. from 3 separate experiments.

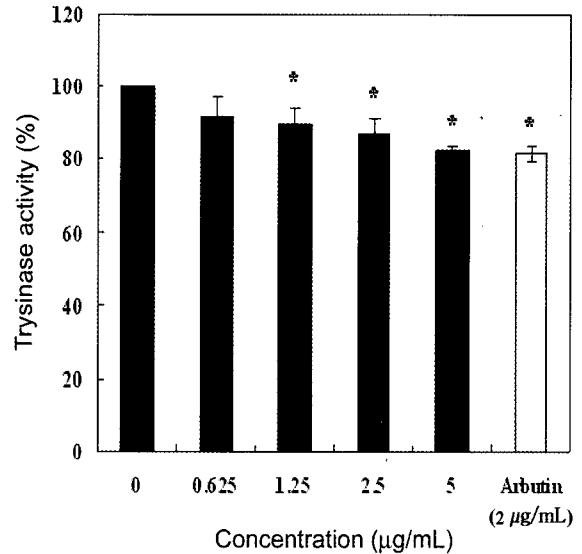


Figure 5. Effect of 2',4'-dimethoxyflavone on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. The cells were incubated with 2',4'-dimethoxyflavone for 24 h. Results are means ± S.D. from 3 separate experiments. **p* < 0.05 compared with control.

과가 나타나지 않았다(data not shown).

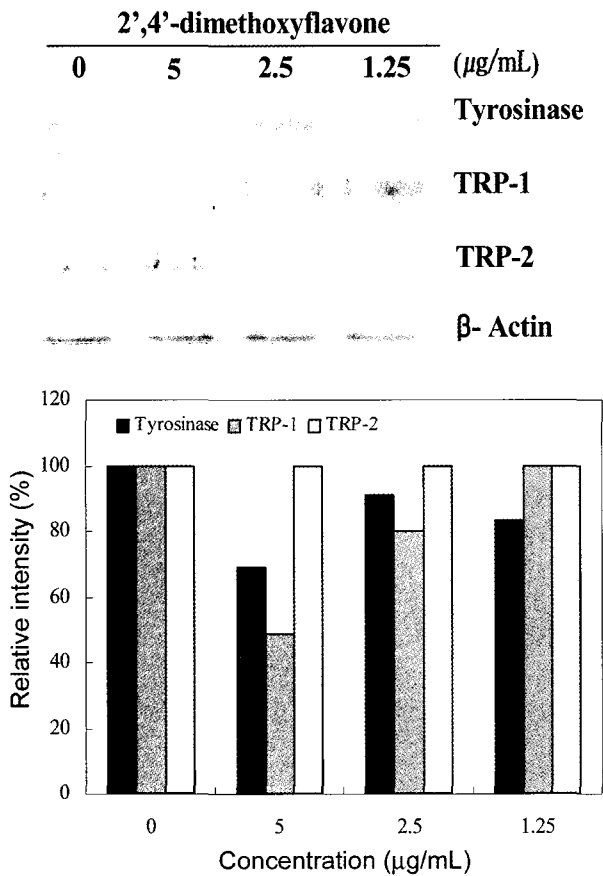


Figure 6. Effect of 2',4'-dimethoxyflavone on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 48 h with 2',4'-dimethoxyflavone. Solubilized total protein (30 µg) was electrophoresed in 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of proteins was performed with the polyclonal antibody against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2. Similar results were observed in three independent experiments.

3.4. 세포독성

2',4'-Dimethoxyflavone의 세포독성에 미치는 농도를 조사하며 미백실험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. B16 melanoma 세포에 대한 2',4'-dimethoxyflavone의 세포 독성을 측정된 결과, 2',4'-dimethoxyflavone은 10 µg/mL 이하의 농도로 처리시 세포생존율이 90% 이상으로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 급격히 생존율이 저하되었다(Figure 3). IC₅₀값은 75 µg/mL으로 나타났다.

3.5. 멜라닌 생합성 저해 효과

2',4'-Dimethoxyflavone이 멜라닌 합성에 미치는 영향을

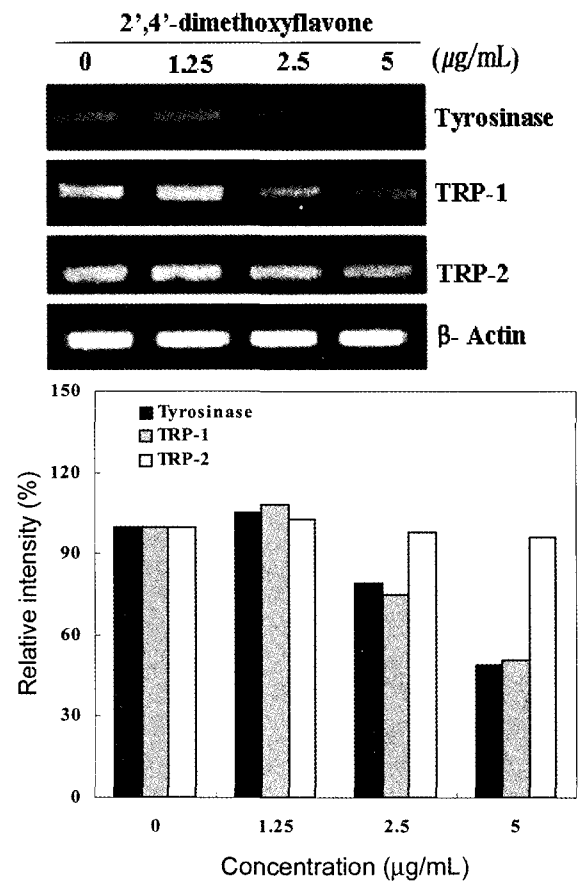


Figure 7. Effect of 2',4'-dimethoxyflavone on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 mRNA expression in B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 48 h with 2',4'-dimethoxyflavone. Total RNA extracted from B16 melanoma cells was analyzed by RT-PCR.

확인하기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다. 준비된 세포에 2',4'-dimethoxyflavone을 농도별로 처리하고 48 h 동안 배양하였다. 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정된 결과, 2',4'-dimethoxyflavone 처리군 모두가 농도에 비례하여 멜라닌 합성이 저해되었으며 5 µg/mL 농도에서 약 27% 멜라닌 생성 저해 효과가 있었다(Figure 4). 양성 대조군으로 사용한 알부틴은 2 mg/mL에서 약 35% 멜라닌 감소 효과를 나타냈으며, 2',4'-dimethoxyflavone은 낮은 농도에서 비교적 우수한 멜라닌 생성 저해 효과가 나타났다.

3.6. 세포내 Tyrosinase 저해 효과

멜라닌 합성은 tyrosinase에 의해 조절되는 일련의 효소적 반응에 의해 조절되며, tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이

루어진다고 알려져 있다. 멜라닌 생성에 관련하는 세포내 tyrosinase의 활성 저해 효과를 측정하였다. 2',4'-Dimethoxyflavone을 처리한 세포를 수집하여 용해시킨 후, 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 넣고 37°C에서 배양한 후 흡광도를 측정하였다. Figure 5의 결과와 같이 2',4'-dimethoxyflavone을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성이 저해되었으며, 5 µg/mL에서 tyrosinase 활성을 약 20% 가량 저해 효과가 있는 것으로 나타났다.

3.7. Tyrosinase/TRP-1/TRP-2 단백질 발현 저해 효과

세포내 tyrosinase 저해 실험의 결과로 2',4'-dimethoxyflavone은 세포내 tyrosinase 활성을 저해하여 멜라닌 생성을 감소시켰다. 이러한 결과가 멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현과도 연관성이 있는지를 확인하기 위해 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 항체를 이용한 western blot으로 관련 단백질의 발현량 변화에 대하여 조사하였다(Figure 6). 실험 결과, 2',4'-dimethoxyflavone은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났으며 TRP-2의 발현량에는 영향을 미치지 않았다. 또한 이에 대한 density를 측정한 결과, 5 µg/mL에서 tyrosinase 발현을 30%, TRP-1의 발현을 57% 감소시키는 것으로 나타났고, TRP-2 발현량은 변화가 없었다.

3.8. Tyrosinase/TRP-1/TRP-2 mRNA 발현 저해 효과

2',4'-Dimethoxyflavone이 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 실험 결과 2',4'-dimethoxyflavone은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났지만 TRP-2의 발현량에는 영향을 미치지 않았다(Figure 7). 2',4'-Dimethoxyflavone은 멜라닌 생성에 관련하는 tyrosinase, TRP-1 등의 유전자 발현을 조절하는 신호전달 과정에 관여하여 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 추측되며 향후에 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

4. 결 론

새로운 미백제를 개발하기 위하여 2',4'-dimethoxyflavone을 합성하였으며 멜라닌 생성 저해 효과를 연구하였다. 2',4'-Dimethoxyflavone의 DPPH소거효과나 mushroom tyrosinase에 대한 직접적인 저해 효과가 나타나지 않았다. B16 melanoma 세포에서는 5 µg/mL 농도를 처리한 실험군에서 멜라닌 생합성이 27% 감소되었다. 또한 세포내에 존재하는 tyrosinase 활성을 20% 저해하였으며, tyrosinase 단백질 발현량은 30% 감소, TRP-1도 57% 감소시켰으나

TRP-2에 대한 저해 효과는 나타나지 않았다. 또한, RT-PCR을 이용하여 유전자 발현을 평가한 결과 tyrosinase, TRP-1의 mRNA 발현도 감소하였으나 TRP-2에 대한 유전자 발현은 영향이 없었다. 2',4'-Dimethoxyflavone은 멜라닌 생합성에 관여하는 단백질과 유전자의 발현 조절 경로를 통하여 멜라닌 생합성 감소 효과를 나타내는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Michell, Melanin : a two edged sword?, *Pigment Cell Res.*, **10**(3), 158 (1997).
2. 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**(12), 982 (1994).
3. V. Marmol and F. Beermann, Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation, *FEBS Letters*, **381**, 165 (1996).
4. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *J. Invest. Dermatol.*, **4**, 24 (1999).
5. M. Higuchi, Y. Miura, J. Boohena, Y. Kinoshita, Y. Yamamoto, I. Yushimura, and Y. Yamaha, Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts, *Planta Med.*, **59**, 253 (1993).
6. K. Y. Ryu, W. S. Kang, Y. H. Kim, H. D. Jang, J. T. Hong, H. S. Yoo, and Y. P. Yun, Antioxidative effects of the rhizoma of *Rhodiola sa halinensis*, *Yakhak Hoeji*, **42**(3), 312 (1998).
7. H. H. Kang, H. S. Rho, J. S. Hwang, and S. G. OH, Depigmentation activity and low cytotoxicity of alkoxy benzoates or alkoxy cinnamate in cultured melanocytes, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(9), 1085 (2003).
8. D. H. Kim, J. S. Hwang, H. S. Baek, K. J. Kim, B. G. Lee, I. S. Chang, H. H. Kang, and O. S. Lee, Development of 5-[(3-aminopropyl)-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one as a novel whitening agent, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(2), 113 (2003).
9. J. E. Lee and S. Safe, 3',4'-Dimethoxyflavone as an acryl hydrocarbon receptor antagonist in human breast cancer cells, *Toxicology Science*, **58**, 235 (2000).
10. J. C. Wallet, E. M. Gaydou, O. Espinosa, O. Osorno, E. Molins, and C. Miravittles, Crystal and molecular structure of 2',4'-dimethoxyflavone, *J. Crystal. Spect.*

- Res.*, **23**, 297 (1993).
11. M. S. Blois, Antioxidation determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
 12. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methos.*, **65**, 55 (1983).
 13. O. Yasunobu, K. Tomoko, O. Yuri, M. Hitoshi, K. Yoshiko, F. Yoko, I. Masamitsu, Y. Ytaka, K. Yoshitane, and S. Hiromu, Development of a novel zinc complex as whitening agent in a new concept, *ASCS*, **6**, 69 (2003).
 14. J. Pawelk, Melanoma cells in culture, *Methods Enzymol.*, **58**, 564 (1978).
 15. S. H. Pomerantz, Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2351 (1963).
 16. G. Y. Song and B. Z. Ahn, Synthesis of dibenzoyl-methanes as intermediates for flavone synthesis by a modified Baker-Venkataraman rearrangement, *Arch. Pharm. Res.*, **17**, 434 (1994).
 17. T. Hatano, Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-tannins and related polyphenols, *Natural Medicines*, **49**, 357 (1995).
 18. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Active oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
 19. P. Kuppusamy and J. L. Zweier, Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 9880 (1989).