

참당귀로부터 분리한 Demethylsuberosin의 멜라닌 생성 억제 효과

김유아 · 박성하 · 김보운 · 김아현 · 박병준 · 김진준*

(주)한국콜마 소재연구소

Inhibitory Effects on Melanin Production of Demethylsuberosin Isolated from *Angelica gigas* Nakai

You Ah Kim, Sung Ha Park, Bo Yun Kim, A Hyun Kim, Byoung Jun Park, and Jin Jun Kim*

Bio Materials R&D Center, Kolmar Korea Co., Ltd., 40, Yeongudanji, Ochang-eup,
Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungbuk 363-883, Korea

Abstract – The anti-melanogenic substance was isolated from the root of *Angelica gigas* Nakai by silica gel column chromatography, preparative HPLC and TLC. As a result of the structure analysis by mass, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR spectrometry, the compound was identified as demethylsuberosin. Demethylsuberosin reduced melanin contents of B16F1 melanoma cells in a dose-dependent manner and decreased to about 74% at a concentration 5 µg/ml. Demethylsuberosin inhibited the expression in microphthalmia associated transcription factor (MITF), tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), and tyrosinase related protein-2 (TRP-2) in melanocytes. These results suggest that the whitening activity of demethylsuberosin may be due to the inhibition of the melanin synthesis by down-regulation of MITF, tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression. Thus, our results provide evidence that demethylsuberosin might be useful as a potential skin-whitening agent.

Key words – Demethylsuberosin, *Angelica gigas* Nakai, Tyrosinase, TRP-1 (tyrosinase related protein-1), TRP-2 (tyrosinase related protein-2), MITF (microphthalmia associated transcription factor)

참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 미나리과에 속하는 다년생 풀로, 한방에서는 그 뿌리를 말린 것이 주로 약재로 이용된다. 맛은 달고 매우며 성질은 따뜻하다. 참당귀는 심경, 간경, 비경에 작용하며, 혈액 생성을 촉진시켜 빈혈의 예방 및 치료에 효과적이고, 스트레스로 인한 생리불순에 효과적이며, 보혈, 부인병에 좋은 것으로 알려져 있다.¹⁾ 참당귀의 주요 기능성 성분으로는 decursin, decursinol angelate, decursinol, nodakenin 등의 coumarin계 화합물이 알려져 있으며,^{2,3)} 이들 성분에 대한 항산화, 항암, 항균, 항염, 면역 증진 효과 등 다양한 효능들이 보고 되었다.^{4,7)}

멜라닌은 피부와 머리카락의 색상을 결정하는 주요한 인자이며 자외선으로부터 피부세포를 보호하기 위한 역할을 가지고 있다.⁸⁾ 그러나 과도한 멜라닌의 축적은 주근깨, 기미, 피부반점 등과 같은 과색소 현상을 유발한다.^{9,10)} Tyrosine으로부터 형성되는 멜라닌 생합성은 tyrosinase의 촉매작용을 통해 일어나는 초기 반응으로 시작되며, tyrosine을 3,4-

dihydroxyphenylalanine(DOPA)로 전환시키는 작용을 하며, tyrosinase related protein-1(TRP-1)은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 전환시키는 DHICA oxidase 작용을 tyrosinase related protein-2(TRP-2)는 DOPACHOME을 DHICA로 전환시키는 역할을 한다. 최근에는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 뿐만 아니라 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 등과 같은 단백질을 이용하여 melanin 합성 억제에 대한 연구가 이루어지고 있다.¹¹⁾

이에 본 연구에서는 천연물로부터 안전하고 미백 효과가 뛰어난 소재를 개발하기 위하여 참당귀로부터 coumarin계 화합물을 분리하고 멜라닌 생성 저해 효과를 검증하였으며, B16F1 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생성 저해 효과를 평가하여 새로운 미백 기능성 소재로서 참당귀의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 – 본 실험에서 사용한 참당귀(*Angelica gigas*

*교신저자(E-mail): jjkim21c@kolmar.co.kr
(Tel): +82-43-218-1057

NaKai)는 한국 경북에서 재배한 생약을 옴니허브에서 구입하여, 형태학적 평가를 통하여 동정하였다. 참당귀 표본(KOR070)은 한국콜마 소재연구소 BIO소재개발팀 표본실에 보관하였다.

시약 및 기기 - 참당귀로부터 유효성분의 분리와 정제를 위해 silica gel column chromatography(silica gel 60, Merck, 230~400 mesh)를 실시하였다. TLC 분석에는 Silica gel 60 F254(precoated, Merck)를 사용하고 이때 detection reagent로는 10% H₂SO₄ 용액을 사용하였다. 참당귀로부터 분리한 화합물들의 구조 동정을 위한 NMR 측정에는 JEOL ECA-500을 사용하였으며, CDCl₃를 용매로 사용하였고, 내부 표준물질로 사용한 tetramethylsilane(TMS)를 기준으로 δ (ppm)으로 나타내었다. Neutral red는 Sigma(USA), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 Thermo scientific(USA), fetal bovine serum(FBS)과 Antibiotic-Antimycotic(100X)은 Gibco(USA) 제품을 사용하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, β -actin 항체는 Santacruz Biotechnology(USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 microplate reader(Bio-rad, USA)와 Chemi-Doc(ATTO, Japan)을 사용하였다.

추출 및 분리 - 참당귀 뿌리 500 g을 잘게 분쇄한 후에 2 L의 MeOH을 가하여 항온조에서 3시간 동안 2회에 걸쳐 환류 냉각하여 추출하고, 여과 및 감압 농축하여 참당귀추출물 150 g을 수득하였다. 참당귀추출물은 증류수에 용해시키고 동량의 Et₂O를 가하여 3회에 걸쳐 용매 분배한 후 Et₂O 층 45 g을 얻었다. Et₂O 분획물 30 g을 silica gel column chromatography(이동상; *n*-hexane:EtOAc=20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 2.5:1, 0:1, v/v)를 실시하여 10개의 subfraction(Fr. 1-10)으로 나누었다. Fr. 7을 medium pressure liquid chromatography(이동상; *n*-hexane:EtOAc=8:1, 7:1, 6:1, v/v) 및 prep. TLC(CHCl₃:*n*-hexane:EtOAc=5:5:2)를 반복 실시하여 화합물 **1**(170 mg)을 순수하게 분리하였다.

화합물 1 - Light yellow gum, ¹H-NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ : 1.74 (3H, s, Me-4'), 1.77 (3H, s, Me-5'), 3.36 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-1'), 5.29 (1H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2'), 6.21 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 6.89 (1H, s, H-8), 7.17 (1H, s, H-5), 7.61 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4); ¹³C-NMR(CDCl₃, 125 MHz) δ : 17.9 (C-5), 25.8 (C-4), 28.7 (C-1), 103.3 (C-8), 112.4 (C-10), 112.6 (C-3), 120.9 (C-2), 125.3 (C-6), 128.4 (C-5), 135.4 (C-3), 143.9 (C-4), 154.2 (C-9), 158.3 (C-2), 162.0 (C-7).

세포주의 배양 - ATCC에서 구매한 mouse melanoma (B16F1) 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)으로 배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

세포독성 측정 - 본 실험에서 mouse melanoma 세포에 대한 시료의 유효농도를 결정하기 위해 세포독성측정(NRU assay)을 진행하였다. B16F1 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)으로 배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양한다. 배양된 mouse melanoma 세포를 96 well plate에 각각 5×10⁴ cell/wells로 접종하고 24 hr 배양한다. 동일 배지로 교체한 후 시료를 농도별로 희석하여 처리한 후 72 hr 동안 CO₂ incubator에서 배양한다. 5 mg/ml neutral red 용액과 10% fetal bovine serum(FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM을 혼합하여 세포에 200 μ l씩 처리한 후 2 hr 배양한다. 1% CaCl₂ & 1% formaldehyde 용액 넣은 후 1 min 교반하고, 1% Acetic acid & 50% EtOH 용액 넣은 후 15 min 교반한 후 microplate reader(Bio-rad, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

멜라닌 정량 - B16F1 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM으로 배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양한 후 6 well plate에 5×10⁴ cell/wells로 접종하고 세포가 바닥에 80% 이상 자랄 때까지 배양한다. 200 nM α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)이 있는 배지조건에 시료를 농도별로 처리한 후 72 hr 배양하였다. 양성대조군으로는 알부틴을 사용하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 trypsination하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 1,000 rpm으로 5 min 원심분리 한 다음 상등액을 제거하여 pellet을 얻었다. 이 pellet은 70°C에서 1 hr 동안 건조한 후 10% DMSO가 함유한 1M NaOH 용액 400 μ l 넣어 멜라닌을 용해시킨 후, microplate reader(Bio-rad, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 MITF의 단백질 발현 저해 효과 - 시료를 72 hr 동안 처리한 B16F1 melanoma 세포를 PRO-PREP protein extraction solution(Intron biotechnology, Korea)으로 용해하고 원심분리하였다. 여기서 얻은 상등액을 8% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 PVDF membrane으로 이전시켰다. 5% skim milk가 함유된 tris 완충용액으로 1 hr blocking한 후, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, β -actin 1차, 2차 항체와 각각 반응시켰다. 반응 후 Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, USA)를 이용하여 1~3 min 반응시킨 후 Chemi-Doc(ATTO, Japan)으로 확인하였다.

통계 처리 - 본 실험의 통계처리는 Minitab 17을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 실험군의 간의 결과는 2-표본 t 검정을 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준(p<0.05)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

분리한 Demethylsuberosin 화합물의 구조결정 - 화합물 1은 옅은 노란색 gum의 형태로 분리되었으며, ELSD를 이용한 HPLC 분석 결과, 순도는 95% 이상으로 확인되었다. ¹H-NMR 스펙트럼의 δ 6.21, 7.61 (each 1H, d, J=9.5Hz, H-3, H-4)에서 전형적인 7-hydroxy-6-substituted coumarin의 존재를 확인할 수 있었으며, δ 6.89 (H-8)와 7.17 (H-5)에서 두 개의 amomatic proton이 있음을 알 수 있었다. 또한, 5.29 (1H, t, J=7.2 Hz), 3.36 (2H, d, J=7.2 Hz) 및 1.77, 1.74 (6H, s, gem-(CH₃)₂)의 피크에서 3-methylbut-2-enyl 기가 존재함을 확인할 수 있었다. 이는 ¹³C-NMR 스펙트럼의 하나의 methylene carbon (δ 28.7), 두 개의 olefinic carbon (δ 120.9, 135.4) 및 두 개의 methyl carbon (δ 17.9, 25.8)에서도 확인할 수 있었다. 위의 결과를 바탕으로 화합물 1은 coumarin 계열의 화합물인 demethylsuberosin로 추정되었으며, 보고된 문헌의 분광학적 data와 비교하여 demethylsuberosin로 최종 확인, 동정하였다(Fig. 1).¹²⁾

세포독성결과 - 화합물 1의 세포 독성측정과 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 NRU assay를 시행하였다. B16F1

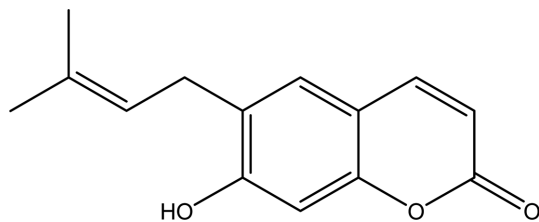


Fig. 1. Structure of compound 1 isolated from *Angelica gigas* Nakai.

melanoma 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과, 5 µg/ml 이하의 농도에서 세포생존율이 80% 이상으로 나타났다(Fig. 2).

멜라닌 생성 억제 효과 - 화합물 1이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 B16F1 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 합성 억제 효과를 측정하였다. 화합물 1을 2.5, 5, 10 µg/ml 농도로 처리한 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정한 결과 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다(Fig. 3). 최고 농도인 5 µg/ml의 농도에서 약 74% 멜라닌 합성이 저해되었고, 양성대조군으로 사용한 arbutin은 500 µg/ml 농도에서 약 33%로 억제되었다.

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 MITF의 단백질 발현 저해 효과 - 화합물 1의 멜라닌 합성 억제 효과가 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 합성효소의 발현억제와 멜라닌 형성에 중요한 transcription factor인 MITF의 발현에 관련된 효과인지 알아보기 위해 western blotting을 수행하였다. 그 결과 화합물 1은 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2의 발현을 억제하는 것으로 나타났으며, transcription factor인 MITF의 발현도 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 4).

Melanin 생합성 신호전달 체계에는 매우 다양한 신호전달물질이 관여하고 있고 melanin은 몇 가지 세포내 신호전달 기전을 통하여 합성되는데, 그 중 cAMP/PKA 경로가 melanin 합성의 주요 경로로서 UV에 피부가 노출되었을 때 melanin세포의 cAMP가 증가되고 하류 신호전달 물질인 PKA를 활성화 시키며, CREB을 거쳐 MITF의 발현을 증가시킨다. MITF는 melanin 합성 과정에서 중요한 전사 조절인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다. 따라서 실험 결과 화합물 1은 MITF 발현 억제를 통하여

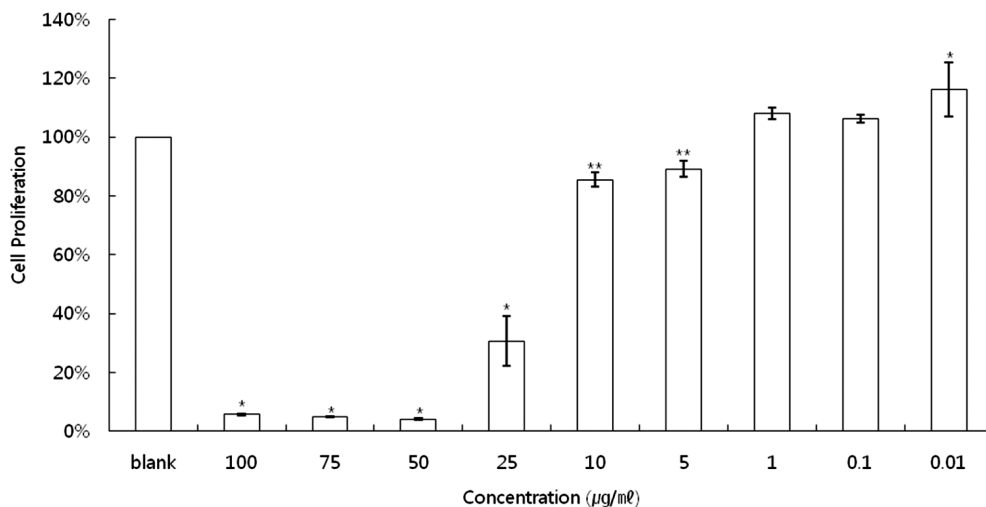


Fig. 2. Cell viability of compound 1 isolated from *Angelica gigas* Nakai on B16F1 melanoma cells by NRU assay. The cells were treated various concentrations of samples. Data represent the mean values of three experiments ±SD. *p<0.01 compared to blank.

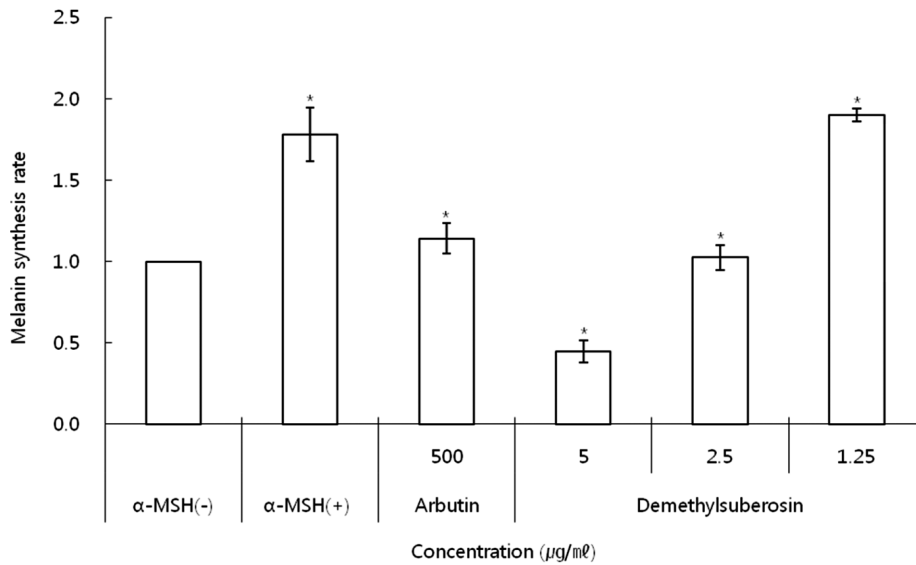


Fig. 3. Inhibition melanin synthesis of compound **1** isolated from *Angelica gigas* Nakai on B16F1 melanoma cells. Treated cells were lysed with 1N NaOH & 10% DMSO and the absorbance was measured at 405 nm. Data represent the mean values of three experiments \pm SD. * p <0.01 compared to the group treated with α -MSH.

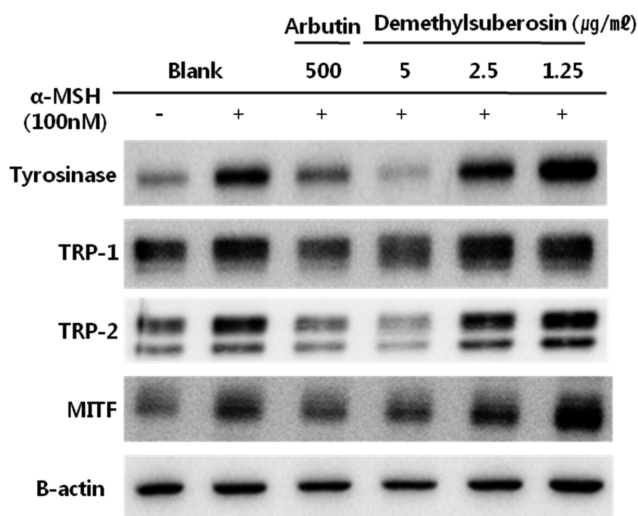


Fig. 4. The effect of compound **1** isolated from *Angelica gigas* Nakai on tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF protein expression in melanoma cells. The cells were treated with various concentration of compound **1** (5, 2.5, 1.25 µg/ml).

tyrosinase, TRP-1, 그리고 TRP-2의 단백질 발현이 감소되고, 더 나아가 멜라닌 생성 억제로 이어지는 것이라 판단된다.

결론

참당귀에서 분리된 coumarin계 화합물은 HPLC, 1D/2D-NMR 등의 분광학적 방법으로 demethylsuberosin(**1**)으로 동정하였으며, 이 화합물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조

사하기 위하여 B16F1 melanoma 세포를 이용하여 세포내 멜라닌생성 저해효과, tyrosinase와 관련단백질 및 유전자에 미치는 영향을 연구하였다. 화합물 **1**의 B16F1 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 생성은 5 µg/ml 농도에서 74% 감소하였고, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF의 발현도 농도 의존적으로 억제하였다. 참당귀 추출물 및 demethylsuberosin은 멜라닌 생합성에 관여하는 단백질과 유전자의 발현조절 경로를 통하여 멜라닌 생합성 저해 효과를 나타내는 것으로 보이며 향후 미백제로 응용 할 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

- Sarker, S. D. and Nahar, L. (2004) Natural medicine: the genus *Angelica*. *Curr. Med. Chem.* **11**: 1479-1500.
- Konoshima, M., Chi, H. J. and Hata, K. (1968) Coumarins from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* **16**: 1139-1140.
- Kang, S. Y. and Kim, Y. C. (2007) Neuroprotective coumarins from the root of *Angelica gigas*: Structure-activity relationships. *Arch. Pharm. Res.* **30**: 1368-1373.
- Kang, S. A., Han, J.A., Jang, K.H. and Choue, R.W. (2004) DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*). *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 1112-1118.
- Son, S. H., Kim, M. J., Chung, W. Y., Son, J. A., Kim, Y. S., Kim, Y. C., Kang, S. S., Lee, S. K. and Park, K. K. (2009) Decursin and decursinol inhibit VEGF-induced angiogenesis by blocking the activation of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Cancer Lett.* **280**: 86-92.

6. Lee, S., Shin, D. S., Kim, J. S., Oh, K. B. and Kang, S. S. (2003) Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 449-452.
7. Han, S. B., Kim, Y. H., Lee, C. W., Park, S. M., Lee, H. Y., Ahn, K. S., Kim, I. H. and Kim, H. M. (1998) Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacology* **40**: 39-48.
8. Mu, H. J. (2011) The effects of polydatin isolated from *Polygonum cuspidatum* on melanogenesis and wrinkle Formation. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **37**: 327-335.
9. Chen, J. S., Wei, C. and Marxhall, M. R. (1991) Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agr. Food Chem.* **39**: 1897-1901.
10. Urabe, K., Aroca, P., Tsukamoto, K., Mascagna, D., Paulumbo, A., Prota, G. and Hering, V. J. (1994) The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim. Biophys. Acta* **1221**: 272-278.
11. Busca, R. and Ballotti, R. (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigm. Cell Res.* **13**: 60-69.
12. Masuda, T., Takasugi, M. and Anetai, M. (1998) Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*. *Phytochemistry* **47**: 13-46.

(2014. 7. 29 접수; 2014. 9. 11 심사; 2014. 9. 19 게재확정)