

The inhibitory effects of 3,4,5 - Trimethoxy cinnamate thymol ester(TCTE, Melasolv[®]) on Melanogenesis

Jae-Sung Hwang, Hyunjung Shin, Ho-Sick Noh, Hyunjung Choi, Soo-mi Ahn, Dong Soon Park, Duck Hee Kim, Byeong Gon Lee, Ihseop Chang and Hak Hee Kang

R&D Center, Amore Pacific Corporation, Kyounggi-do, Korea.

ABSTRACT

To date, research on the regulation of melanogenesis has focused on factors which affect tyrosinase, the rate-limiting enzyme in the melanogenic pathway, by searching for chemicals which competitively inhibit tyrosinase function. Many types of tyrosinase inhibitors have been developed, but no satisfactory results have been made clinically until now. To find a new whitening agent, which effectively inhibits melanogenesis, we synthesized several compounds and selected compounds by cell-based assay system. Finally, 3,4,5-trimethoxy cinnamate thymol ester(TCTE, Melasolv[®]) was selected and the effects of TCTE on melanogenesis were investigated. Treatment of mouse-derived melanocyte melan-a cells with TCTE results in a marked down-regulation of tyrosinase activity. 80% decrease of tyrosinase activity occurs with 30 μ M TCTE treatment for 72 hours without affecting cell growth. The inhibition of tyrosinase activity is dose-dependent and melanin content was also decreased to 40%. From the *in vitro* tyrosinase assay using cell

extract, TCTE does not act as a direct inhibitor of the enzyme. Treatment of melan-a cultures with TCTE blocks the increase in tyrosinase activity by either forskolin, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine.

TCTE decreased the expression of tyrosinase, TRP-1 without effects on TRP-2 protein expression through the down regulation of tyrosinase and TRP-1 mRNA. From the results of cAMP immunoassays, intracellular levels of the cyclin nucleotide are unaffected in cells treated with TCTE. The inhibitory effects of melanin synthesis were also shown in reconstitute human epidermis model by topical application. These findings suggest that TCTE can be used for studying the regulation of melanogenesis and depigmenting agent.

1. 서론

Melanin을 합성은 산화 과정으로 일반적으로 vitamin C, vitamin E등과 같은 항산화제는 이러한 melanin형성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 멜라닌의 형성을 저해하는 물질로써, 페놀, 카테콜 및 레소시놀 등의 폴리히드록시페놀 화합물, 코지산, 토코페롤, 아스코르빅산 및 히드로퀴논 등이 알려져 있으나, 이들 물질은 대부분 항산화 활성에 의해 효소의 작용을 저해하는 것으로, 효소활성 억제라는 긍정적인 면과 동시에, 피부에 적용하였을 때 자극이나 피부세포에 독성을 나타내는 등의 단점을 동시에 가지고 있다.

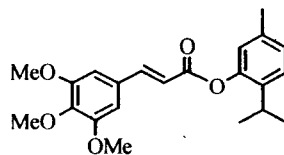
특히, 폴리히드록시 페놀 화합물의 경우는 티로시나제에 의해 쉽게 산화되어 퀴논을 생성시킴으로써, 여러 피부세포에 치명적인 독성을 나타내는 등의 문제점이 있다. 또한, 항산화 활성을 갖는 화합물들의 경우, 실제 화장품 제형에 적용하였을 때 불안전성을 보이거나 변색, 변취 등의 문제점이 발견되기도 하였다.

본 연구자들은 트리히드록시 페놀 화합물인 몰식자산을 출발 물질로 하여 히드록시의

위치와 개수가 미백효과와 세포독성에 미치는 영향을 알아내고자 몰식자산 에스테르 화합물을 연구하였고, 3,4,5-trimethoxy cinnamate thymol ester(TCTE, Melasolv®)는 항산화 활성이 없으며, 멜라노사이트에서 농도 의존적으로 tyrosinase의 효소 활성과 멜라닌생성을 저해함을 밝혔다. 이러한 TCTE의 멜라닌 생성 저해효과를 살펴본 결과, tyrosinase와 TRP-1의 발현을 mRNA수준에서 저해 함으로서 나타나는것임을 밝혔다. TCTE는 IBMX(3-isobutyl-1-methyl xanthine)나 forskolin등에 의한 tyrosinase의 활성증가를 억제하였으나, c-AMP의 양에 대한 직접적인 조절 작용은 없었다. Reconstitute human epidermis에서 TCTE는 멜라닌형성을 억제하였다. 이런 결과에서 TCTE는 새로운 미백제로서 유용할 것으로 사료된다.

2. 재료 및 시험방법

TCTE(Melasolv)



M.W=374.44

1) Melanin synthesis assay in melan-a cells

melan-a(1)세포는 non-tumorigenic mouse melanocyte cell line 으로서 C57BL 의 embryo 로부터 유래한 세포이다. 정상 mouse melanocyte 의 성질을 대부분 가지고 있으면서도 immortalization 되어 있어 실험에 이용하기 적당하다. Melan-a cell 을 24 well plate 에 5×10^5 cell/well 로 plating 한 후 , 다음날부터 시료를 3 일간 매일 처리한다. 5 일째에 배지를 제거한 후, PBS 로 2 회 washing 해준다. 이후 1ml 의 1 N NaOH 를 첨가하여 세포를 완전히 녹인 후 400nm 에서 흡광도를 측정한다. Plate 를 duplicate 로 하여 나머지 plate 는 comassie blue 로 염색하여 세포의

viability를 측정한다.

2) In situ tyrosinase activity 저해 효과 측정

L-[ring-3,5-³H]tyrosine이 tyrosinase에 의해 dihydroxyphenylalanine으로 바뀌면서 나오는 ³H₂O의 양을 정량하여 tyrosinase의 활성을 측정하는 방법이다(2).

Cell을 12 well plate에 2 X 10⁵ cells가 되도록 깔고 하루 동안 cell이 잘 붙게 놔둔다. 실험 시료가 들어 있는 새 배지로 갈아주고 실험을 끝내기 24시간 전에 ml당 2 μCi의 [³H]tyrosine을 넣어준다. 500μl 의 배지를 취한 후 10% TCA와 0.2% BSA를 첨가하여 단백질을 침전시키고 원심분리하여 제거한다. 1ml의 상등액에 500μl 의 activated charcoal을 3시간 이상 혼합하여 그 상등액을 취한 뒤 Liquid scintillation counter로 측정한다

3) Tyrosinase 효소활성 측정

Tyrosinase activity using cell homogenates was assayed according to the method of Pomerantz(3)의 방법을 약간 변형하였다. Melan-a 세포를 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.8, 0.1mM PMSF and 1% Triton X-100) 에 넣어 sonication한다. 얼음에 1시간 방치하여 tyrosinase가 방출되도록 한다. 25μg 의 단백질을 효소활성측정에 사용한다. 각 물질을 0.5ml 의 반응액에(0.25μM tyrosine, 5μCi[³H]tyrosine, 0.25mM L-DOPA and 0.1mM PMSF in 0.1M sodium phosphate buffer(pH6.8)) 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다. Charcoal로 반응하지 않은 [³H] tyrosine 을 제거한 후 상등액에서 방출된 ³H₂O의 양을 측정한다.

4) DOPA assay on Gel

시험 시료를 약 일주일 동안 처리한 HM3KO cell의 단백질 50 ~ 100 μg을 전기영동으로 분리한 후, gel을 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 넣고 15분 동안 흔들여 준다. Buffer를 버리고 0.2 % DOPA를 포함한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 넣고 37 °C에서 15분간 incubation 한다. DOPA가 없는 새 buffer로 gel을 씻고 말려서 보관한다.

5) Western blot

Melan-a cell을 60mm plate에 plating한 후 시료를 3일간 처리하고, protein을 얻어 tyrosinase(M-19, santacruz), TRP-1(G-17, santacruz), TRP-2(alpha-PEP8) 및 actin(SC-1616, santacruz) antibody를 이용하여, western blot을 실시한다.

Chemiluminiscent detection한 후 x-ray film을 Image analysis하여, 정량 하였다.

6) RT-PCR

Melan-a 세포를 2×10^6 개가 되도록 60mm 배양 접시에 깔고, 하루 동안 바닥에 붙도록 배양시킨다. 다음날 시험시료가 들어있는 새 배지로 교환한 뒤, 48시간 동안 배양하였다. 세포로부터 total RNA 를 추출하는 것은 StrataPrep[®] Total RNA miniprep kit(Stratagene, USA) 를 사용하였다. RNA level에서의 유전자 발현 양에 대한 분석은 One Step RNA PCR kit (Takara, Osaka, Japan)를 사용하여 수행하였다. 100ng RNA, 5mm MgCl₂, 1mM dNTP, 0.8 units/ μ l Rnase inhibitor, 0.1 units/ μ l AMV Rtase, 0.1 units/ μ l AMV-optimized Taq과 specific primer를 각각 20pmol씩 포함하는 RT-PCR 반응액 50 μ l을 만들었다. 위의 반응액을 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 역전사 반응을 시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 2분을 방치하여 반응을 종료시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 58 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분30초간 extension 을 15 cycles 수행하여 amplification 하였다. PCR product는 1.2% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다. 반응에 사용된 primer는 다음과 같다. Tyrosinase; Backword: 5'-GCAAAAGAATGCTGCCACC-3', Forward :5'-ATGTCCCTCCATATTTTCAGAGCC-3' TRP-1 ; B:5'-TATTGAGGCTCTGAGACGTGGGG-', F:5'-CTCCTTGTGGCAATGACAAATTG-3', TRP2; F:5'-GAGAAGCTCCCCTCATTAACCTG-3', B:5'-TTCAGCACGCCATCCAAGGTCATG-3', β -actin; F: 5'-GTGGGGCTGCCCCAGGCACCA-3', B:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'

7) c-AMP level 측정

Melan-a 세포를 6-well plate에 well당 2×10^6 개가 되도록 깔고, 하루 동안 세포가

바닥에 붙도록 배양시킨다. 다음 날 배지를 각 well로부터 제거한 뒤, 각 시료가 들어있는 배지(FBS-free)로 갈아주고 40분간 배양시킨다. 10% TCA를 포함하는 phosphate buffer를 첨가하여 반응을 중단시키고 세포를 회수한 뒤, 5배의 diethyl ether를 가하여 3회이상 extraction을 반복한다. 시험 시료의 cAMP level을 정량하기 위해서, 각 농도별로 준비된 cAMP standard 물질과 시험 시료에 대하여 cAMP enzyme immunoassay kit(Cayman, Ann Arbor, USA)를 이용하여 assay를 실시한다.

8) Melanin assay in RPE(melanoderm®) model

Melanoderm®은 Mattek(USA)사에서 구입하였다. Melanoderm tissue를 6 well plate에 넣는다. 이후 물질을 3일에 한번씩 2주간 topical처리한 후, tissue에서 멜라닌을 분석하고 조직학적 염색을 수행한다. 간단히 실험방법을 서술하면 다음과 같다. 처리된 조직을 homogenizer로 갈고, proteinase K 24시간 처리한다. 24시간 뒤 0.5M NaHCO₃ 을 첨가한 후 80C에서 prewarm 하고, 30% H₂O₂ solution 첨가한다. 30분경과 후 chloroform: MeOH(2:1)을 첨가한 후 vortex하고, centrifuge하고 supernatant를 405nm에서 측정한다. 조직염색은 10% formalin에서 고정시킨후 Fontana-masson 염색을 실시한다.

9) 통계처리

모든 통계처리는 paired 나 unpaired Student's t test를 실시하였다.

4. 시험결과

4.1 TCTE의 Melanin synthesis 저해효과

TCTE을 처리한 군에서는 control군에 비해 pigment가 dendrite나 세포질내에 축적되지 않음을 뚜렷하게 관찰할 수 있으며(48 hour, 그림 1a), 시험물질의 멜라닌 생성저해 효과를 정량 하기위해 melan-a 세포에 시료를 4일간 처리한 후

멜라닌을 정량한 결과 15 μ M, 30 μ M 처리시에, 60%, 75%의 멜라닌생성 저해효과를 보였다(그림 1a). 50 μ M 처리한 경우에는 10% 내외의 cytotoxicity를 보였다.

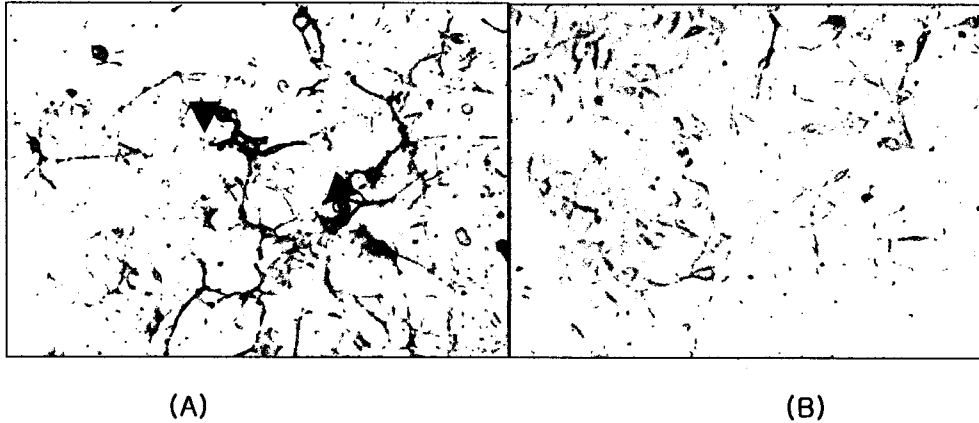


그림 1a. Melan-a 세포의 pigmentation. A; 대조군 B; TCTE_15 μ M, 48시간 처리군

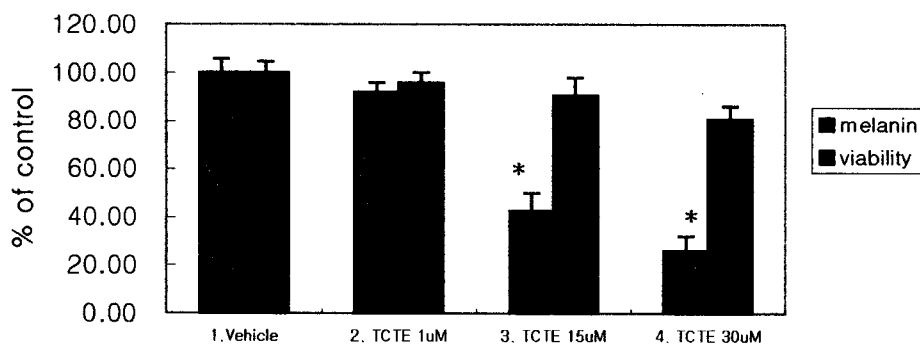


그림 1b. Melanin합성저해효과. * P<0.01

4-2. *In situ* tyrosinase activity 저해 효과

Melan-a 세포를 이용하여 실험 시료를 1, 15, 30 μ M의 농도로 72시간 처리하고 tyrosinase의 효소 작용으로 얻어진 $^3\text{H}_2\text{O}$ 의 양을 정량하여 실험 시료의 tyrosinase activity에 대한 저해 효과를 관찰하였다. 그 결과, Thymol 및 2,3,4-Trimethoxy benzoic acid 각각에 대해서는 tyrosinase 활성 저해 효능을 보이지 않았으나,

TCTE 30에서는 80%의 저해율을, 15에서는 60%의 저해율을 나타내었다.

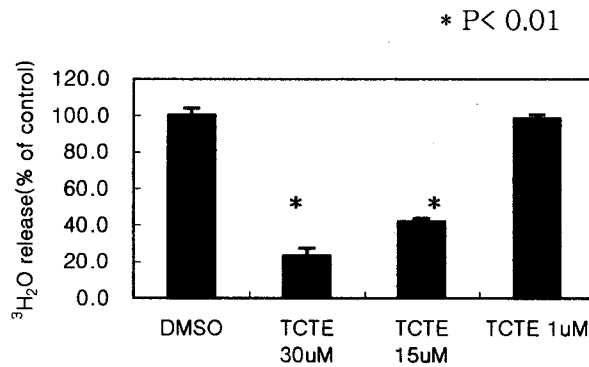


그림 2. *In Situ* tyrosine hydroxylase 활성저해효과

4-3. In vitro tyrosinase 활성 측정

melan-a 세포에서 추출된 tyrosinase를 이용하여 *In vitro* tyrosinase assay를 수행한 결과 tyrosinase저해 효과는 없었다. *In Situ*에서 저해효과가 있는 결과와 비교해 볼 때, TCTE은 direct한 tyrosinase의 효소 저해제가 아니며, 다른 기작에 의해 효소의 활성을 낮추는 것으로 판단할 수 있다.

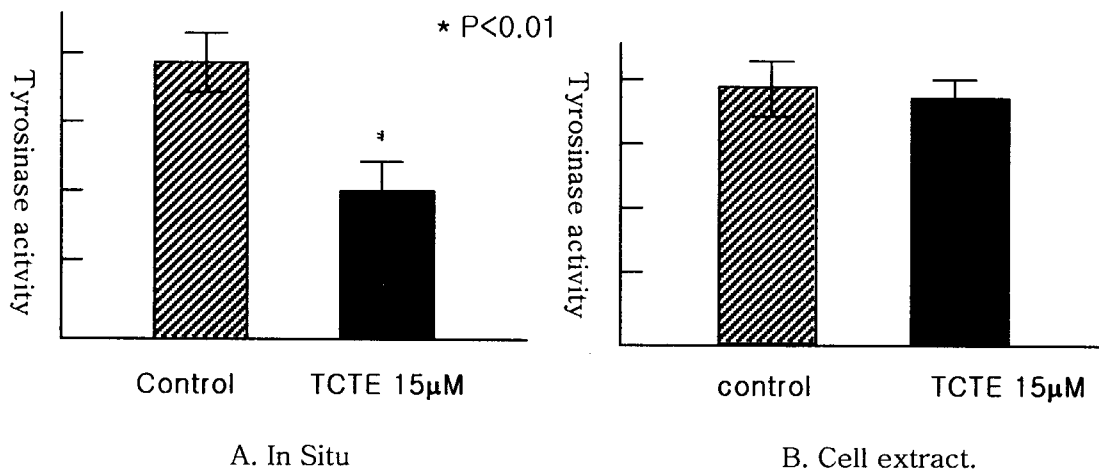


그림 3. Tyrosinase assay using cell extract and *In situ*.

4-4. Tyrosinase 발현 저해 효과

TCTE tyrosinase의 protein 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 melan-a cell에 다음의 농도로 3일간 처리한 후 western blot을 실시하였다.

그림에서 보듯이 TCTE 처리한 경우에 tyrosinase의 발현이 저해되었고, 이를 actin과 비교하여, densitometry로 정량한 결과 30 μ M처리 결과 약 50%의 tyrosinase 저해효과를, 15 μ M에는 20%의 발현 저해 효과를 나타내었다(그림 4). 또한 DOPA gel염색을 통해 효소의 활성도를 측정한 결과 그림 5에서와 같이 TCTE처리군에서 효소의 활성이 매우 저하되어 있음을 볼 수 있다.

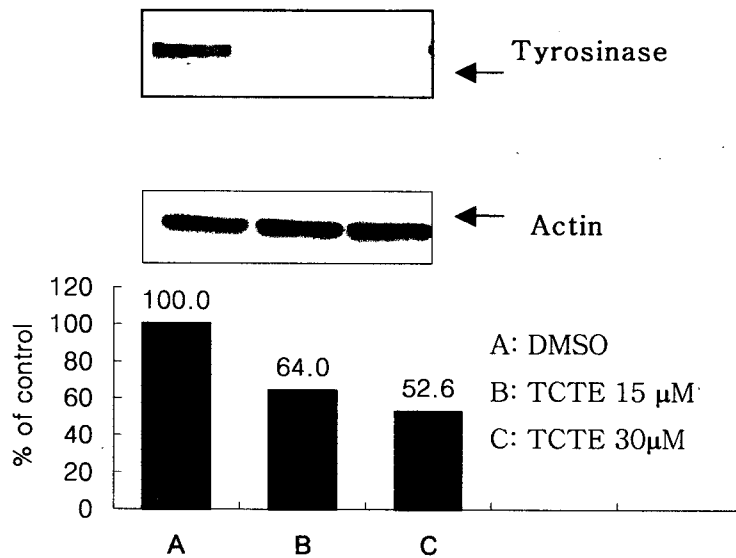


그림 4. Tyrosinase western blot 과 densitometry 결과



A: DMSO
B: TCTE 15 μ M
C: TCTE 30 μ M

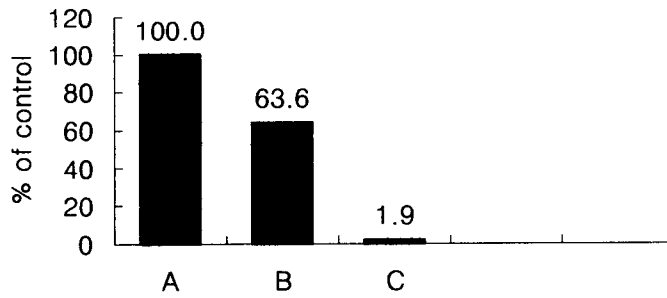


그림 5. DOPA staining of SDS-PAGE gel and densitometry

4-5. TRP-1 발현 저해 효과

동일한 시료를 이용하여, TRP-1을 western한 결과, 그림에서 보듯이 TCTE 처리한 경우 농도 의존적으로 TRP-1의 발현이 저해되었다.

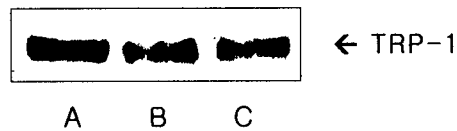


그림 6. TRP-1 western blot.

A: control, B; TCTE 15µM C: TCTE 30µM

4-6. TRP-2의 발현

반면, TRP-2의 발현에는 특별한 변화가 없었다.

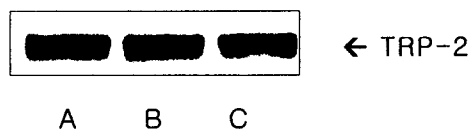


그림 7. TRP-2 western blot

A: control, B; TCTE 15µM C: TCTE 30µM

4-7. mRNA 발현에 미치는 영향

시료를 48시간 처리 후 RT-PCR한 결과, tyrosinase, TRP-1의 mRNA발현이 줄었음을 알수 있다(그림 8).

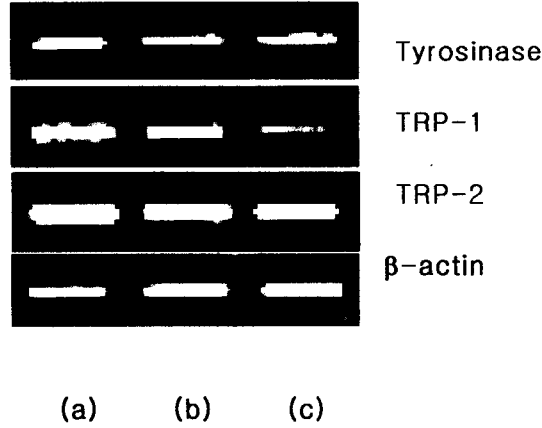


그림 8. RT-PCR results. (a)control (b)TCTE 15uM (c) TCTE 30uM

4-8. c-AMP inducer에 의한 tyrosinase활성증가 억제효과

c-AMP의 inducer와 c-AMP에 의해 tyrosinase activity가 증가했으며, TCTE처리에 의해 증가된 tyrosinase의 활성이 정상수준 이하로 감소되었다.

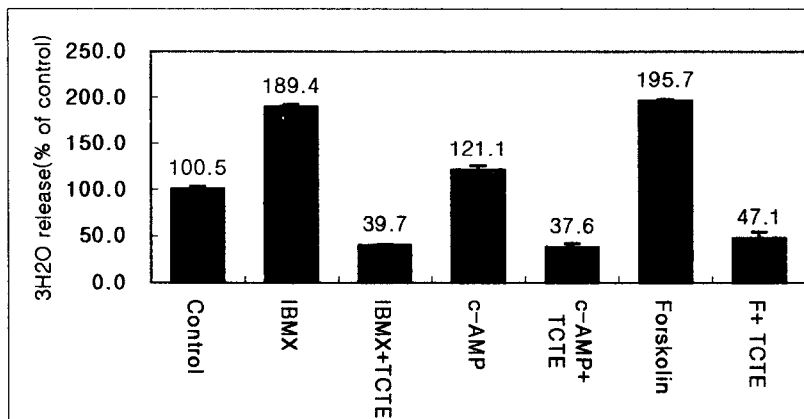


그림 9. *In Situ* tyrosinase activity. IBMX 100uM, c-AMP 100uM, Forskolin 10uM and TCTE 30uM were treated for 48hours in melan-a cell.

4-9. c-AMP level의 변화

Alpha MSH, forskolin 처리에 의해, c-AMP의 수준이 많이 증가 하였으나, TCTE에 의해 변화되지는 않았다.

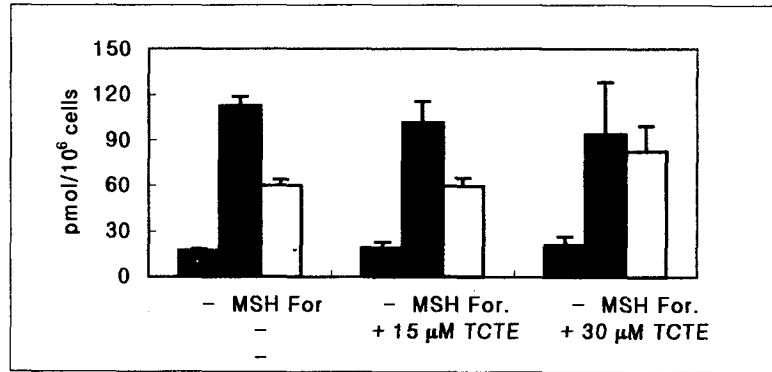


그림 10. c-AMP level. C-AMP level was elevated by MSH and forskolin treatment.

4-9. Melanoderm 에서 멜라닌 생성 억제 효과

시험시료를 14 일간 처리 후 melanin content 를 측정 한 결과, TCTE 처리시에 18.2μg/tissue 로 control 과(25.8μg/tissue) 비교하여 약 30% 정도의 생성저해 효과를 나타내었다. kojic acid 1% 처리시에는 약 20.5 μg/tissue 로 control 에 비해 20%의 저해 효과를 보였다.

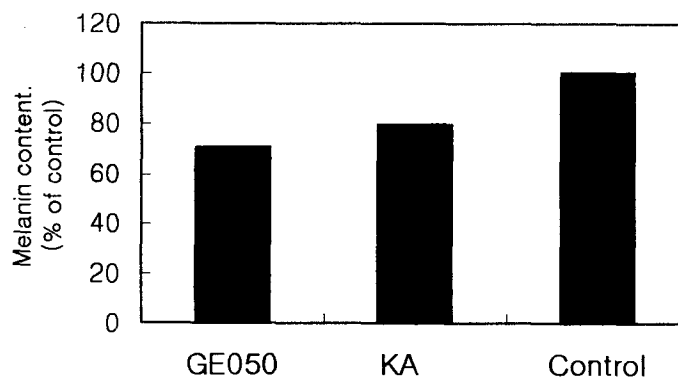


그림 11. Melanoderm model에서 멜라닌 생성저해효과(day 14).

5. 결론 및 고찰

Melasolv(TCTE)은 melan-a cell 에서 세포에 독성을 미치지 않으면서, 농도 의존적으로 melanin 합성 저해효과를 보였다(그림 1). 본 물질의 building block과 단순 mixture는 멜라닌 저해효과가 없었다.

TCTE은 cell extract를 이용한 *in vitro* tyrosinase assay에서 억제효과는 없는 것으로 나타나 직접적인 tyrosinase 저해제는 아님을 알 수 있었다(그림 3). TCTE의 멜라닌 생성 저해효과는 key enzyme인 tyrosinase의 발현 저해에 의해 나타난 것임을 *in situ* tyrosine hydroxylase 효소 활성(그림 2, 5)과 enzyme expression(그림 4)을 측정함으로써 확인하였다. 또한 본 물질 처리에 의해TRP-1의 발현이 저해되었으며(그림 6), TRP-2의 발현은 약간 감소하였으나 큰 변화는 없었다.(그림 7).

Tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2의 공통된 전사인자로 밝혀진 것은 upstream region의 M-box(5)이며, 이는 쥐와 사람에게서도 보존되어있다. M-box에 binding되는 factor중 microphthalmia-associated transcription factor(MITF)는 positive regulator이며, TCTE이 이를 조절할 가능성도 있을 것으로 보인다.

Protein expression level측정결과 Tyrosinase, TRP-1은 TCTE에 의해 발현이 줄었으나, TRP-2는 큰 변화가 없었다. B16-F1 melanoma cell에서 cAMP-dependent protein kinase나 protein kinase C등을 경유하는 melanotrophic agent등에 의해 tyrosinase와 TRP-1이 같이 조절된다는 보고(6)을 볼 때 TCTE에 의한 이런 조절이 가능하다고 생각되며, 위 pathway에 관여될 가능성이 있다고 사료된다. 즉, Cholera toxin이나, alpha-MSH, dibutyryl cAMP등 tyrosinase의 transcription을 증가시키는 melanotropic reagent가 TRP-1의 전사도 활성화시킨다는 보고들을 참고할때, tyrosinase와 TRP-1이 같이 조절된다는 것은 의미 있는 현상이라고 보여진다. 반면, TRP-2는 이들과는 오히려 반대로 조절된다는 보고가 있으며(7, 8), Bouchare 등은(9) 10종류의 human melanoma

cell line에서 TRP-2의 발현과 melanin의 생성과는 연관성이 없는 것을 보고하였다.

TRP-1의 역할이 tyrosinase의 안정화에 관여한다는 보고들을 볼 때(10), 이 두 단백질의 발현감소는 tyrosinase의 단백질 감소를 더욱 가속화시켜 효소의 활성 저하에 상승작용을 함을 알 수 있다.

TCTE처리에 의해 tyrosinase, TRP-1 의 mRNA의 발현이 감소되었다. TRP-2 mRNA도 감소되는 경향을 보였으나 단백질의 경우와 같이 tyrosinase나 TRP-1처럼 뚜렷하지는 않았다.(그림 8). TCTE처리는 Melan-a 세포에서 IBMX와 c-AMP, forskolin등의 처리에 의한 tyrosinase의 활성증가를 억제하였으나(그림 9), c-AMP의 양은 변화시키지 않았다(그림 10). 따라서 직접적인 c-AMP를 조절하는 것은 아닌 것으로 보이며, 이후 단계의 신호전달을 조절할 가능성이 있으리라 보여진다.

TCTE은 human skin의 대체 모델인 melanoderm에서 melanin생성 저해 효과를 보였으며 Kojic acid와 비교하여 4배 이상의 생성 저해 효과를 나타내었다(그림 11).

본 실험을 통해볼 때 melasolv(TCTE)은 멜라닌 생성저해효과가 우수한 미백원료로서 가능성이 있는 것으로 판단된다.

6. 참고문헌

1. Dorothy C Benette et al., *Int. J. Cancer*: 39, 414-418, 1987
2. Fuller et al, *J. Biol. Chem.* 262:4024-4033, 1987
3. Pomerantz SH(1966) *J Biol Chem.* 241: 161-168, 1966
4. <http://www.mattek.com>
5. Jackson et al., *Annu. Rev. Genet.* 28:189-217, 1994
6. Kuzumaki et al., *Exp. Cell. Res.* 207:33-40, 1993
7. Martinez-Liarte et al., *J. Invest. Dermatol.* 99:435-439, 1992
8. Sturm et al., *Pigment. Cell. Res.* 7:235-240, 1994
9. Bouchard et al., *Eur. J. Biochem.* 219:127-134, 1994
10. Kobayashi T ea al, *J. Biol Chem.* 273:31801-31805, 1998