



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

마우스 세포에서
6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin
화합물의 항염증 및 멜라닌 생성
효과 규명

제주대학교 대학원

화학과

강 윤 실

2022년 2월

마우스 세포에서 6,7-Dihydroxy- 4-methylcoumarin 화합물의 항염증 및 멜라닌 생성 효과 규명

지도교수 현 창 구

강 윤 실

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2022년 2월

강윤실의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 _____ ①

위 원 _____ ①

위 원 _____ ①

제주대학교 대학원

2022년 2월

Anti-inflammatory and Melanogenic Effect
of 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin in
Mouse Cells

Yun Sil Kang

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Master of Science

2021.12

This thesis has been examined and approved by

.....
.....
.....

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Coumarin derivatives such as umbelliferone, esculetin, herniarin, psoralen, and imperatorin have various physiological functions such as anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-viral, and anti-cancer. In this study, we investigated the effect of 4-methylcoumarin related compounds on anti-inflammation and melanin in RAW 264.7 and B16F10 melanoma cells. The results showed that the dihydroxy group had antioxidant and anti-inflammatory effects, and the ortho dihydroxy group had anti-melanogenic effect, while the meta dihydroxy group had melanogenic effect. Also, the methoxy group had a melanogenic effect, and the 6-methoxy group showed the anti-inflammatory effect. Among 4-methylcoumarin related compounds, 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin (6,7-DH-4-MC) showed remarkable anti-inflammatory effect, so we conducted the mechanistic study. The results showed that 6,7-DH-4-MC significantly reduced NO levels and PGE₂ expression via iNOS and COX-2 down-regulation at non-cytotoxic concentrations. Moreover, 6,7-DH-4-MC dose-dependently decreased the levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-6. A mechanistic studies showed that 6,7-DH-4-MC treatment reduced phosphorylation of ERK and p38-MAPK. Furthermore, the degradation of I κ B- α and phosphorylation of NF- κ B in LPS-treated cells were inhibited by treatment with 6,7-DH-4-MC. In α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells, 6,7-DH-4-MC reduced melanin contents and tyrosinase activity without any cytotoxicity. These results suggest that 6,7-DH-4-MC is a potential therapeutic agent for inflammatory diseases and hyperpigmentation.

Key words: 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin, RAW 264.7, Anti-inflammation, NF- κ B, MAPKs, B16F10, Anti-melanogenesis

목 차

ABSTRACT	1
목 차	2
LIST OF FIGURES	4
I. 서 론	6
II. 재료 및 방법	13
1. 시료 및 시약	13
2. 항산화 활성 평가	14
2.1. DPPH radical scavenging assay	14
2.2. ABTS ⁺ radical scavenging assay	16
3. 세포 배양 및 세포 독성 평가	18
3.1. 세포 배양	18
3.2. 세포 독성 평가	18
4. 항염증 활성 평가	20
4.1. Nitric oxide (NO) 생성량 측정	20
4.2. Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 및 전염증성 cytokine 생성량 측정	22
4.3. Western blot	22
5. 미백 활성 평가	23
5.1. Melanin 생성량 측정	23
5.2. 세포 내 tyrosinase 효소 활성 측정	23
6. 통계처리	24

III. 결 과	25
1. 4-Methylcoumarin들의 항산화 활성	25
1.1. DPPH radical scavenging activity	25
1.2. ABTS ⁺ radical scavenging activity	27
2. 4-Methylcoumarin들의 항염증 활성	29
2.1. 세포 독성 평가	29
2.2. Nitric oxide (NO) 생성량 측정	29
3. 4-Methylcoumarin들의 미백 활성	31
3.1. 세포 독성 평가	31
3.2. Melanin 생성량 측정	33
3.3. 세포 내 tyrosinase 효소 활성 측정	35
4. 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin (6,7-DH-4-MC)의 항염증 활성	37
4.1. Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 생성량 측정	37
4.2. 전염증성 cytokine 생성량 측정	39
4.3. iNOS, COX-2 발현량 측정	41
4.4. MAPKs 발현량 측정	43
4.5. IκB-α 및 NF-κB 발현량 측정	45
IV. 고 찰	47
V. 참고문헌	50

LIST OF FIGURES

Figure 1. The mechanism of LPS-induced inflammation	8
Figure 2. The melanin synthesis in melanocytes during melanogenesis	10
Figure 3. Structure of 4-methylcoumarins	12
Figure 4. The principle of DPPH radical scavenging assay	15
Figure 5. The principle of ABTS ⁺ radical scavenging assay	17
Figure 6. The principle of MTT assay	19
Figure 7. The reaction of nitrite with Griess reagents	21
Figure 8. DPPH radical scavenging activity of 4-methylcoumarins	26
Figure 9. ABTS ⁺ radical scavenging activity of 4-methylcoumarins	28
Figure 10. The effect of 4-methylcoumarins on the viability and NO production in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells	30
Figure 11. The effect of 4-methylcoumarins on the viability of B16F10 melanoma cells	32
Figure 12. The effect of 4-methylcoumarins on production of melanin in B16F10 melanoma cells	34

Figure 13. The effect of 4-methylcoumarins on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells	36
Figure 14. The effect of 6,7-DH-4-MC on PGE ₂ production in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells	38
Figure 15. The effect of 6,7-DH-4-MC on pro-inflammatory cytokines production in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells	40
Figure 16. The effect of 6,7-DH-4-MC on the protein expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	42
Figure 17. The effect of 6,7-DH-4-MC on the phosphorylation of MAPKs in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	44
Figure 18. The effect of 6,7-DH-4-MC on the protein expression of IκB-α and p-NF-κB p65 in LPS stimulated RAW 264.7 cells	46

I. 서 론

염증은 침입한 병원균과 같은 외부 자극이나 생체 내 대사산물과 같은 내부 자극에 대한 반응으로, 정상적인 기능을 회복하기 위해 조직을 치료한다[1, 2]. 그러나 이러한 염증 반응은 체온 상승, 홍조, 부기 및 통증을 유발하며, 지속적인 염증반응은 만성 염증성 질환 및 종양을 유발하는 것으로 알려져 있다[3-5]. 생체 내 주요 면역세포인 대식세포는 병원균을 인식하여 식균 작용을 통해 제거하고 다양한 염증 매개체를 생성하여 염증 반응을 일으킨다[6, 7].

내독소로 알려진 Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성 박테리아 세포벽의 성분으로, 대식세포를 활성화하는 대표적인 염증 유발인자이다[8]. 대식세포의 Toll-like receptor 4 (TLR4)가 LPS를 인식하면 mitogen activated protein kinase (MAPKs) 및 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 신호전달 경로를 통해 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 전염증성 사이토카인과 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 염증 매개체를 생성한다[9-11].

NO는 중요한 세포 신호 분자로, 신경 신호의 생리학적 전달, 염증 반응, 세포 분화 및 세포 내 신호 전달에 중요한 역할을 한다. 또한, 혈관 이완, 혈소판 응집 억제, 면역 등 다양한 생리적 기능에 관여한다[12-14]. 그러나 NO는 자유 라디칼이며 생체 내에서 독성이 있다. 특히 지속적인 염증으로 인한 NO의 과잉 생산은 류마티스 관절염 및 암과 관련이 있다[15, 16]. NO는 nNOS, iNOS, eNOS 등 여러 유형의 산화질소 합성효소 (Nitric oxide synthase, NOS)에 의해 L-arginine 으로부터 생성되는데, 이 중 NO 생성량의 가장 큰 비중을 차지하는 iNOS는 LPS 자극 후 발현되어 NO의 과잉 생산을 유도한다[17, 18].

또 다른 대표적인 염증 반응 인자인 PGE₂는 COX (cyclooxygenase)의 촉매 작용 결과 아라키돈산 대사의 산물이다. COX는 COX-1과 COX-2로 분류되며

COX-1은 정상적인 상태에서 PG를 생성하지만, COX-2는 PGE₂의 과잉 생산을 유발한다. PGE₂는 종양 세포 사멸을 억제하고 혈관 신생을 유도하여 종양 형성에 관여한다. LPS에 의해 자극된 대식세포는 COX-2를 과발현하고 결과적으로 PGE₂ 생성을 상향 조절하여 염증을 유발한다[19-21].

Mitogen activated protein kinase (MAPKs)는 기본적인 생물학적 과정과 외부 스트레스 신호에 대한 세포 반응을 매개하는 세린/트레오닌 kinase이며, RAW 264.7 대식세포에서 LPS 자극 후 염증인자의 발현을 조절한다. Extracellular signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38과 같은 MAPK 계열 구성원은 사이토카인, 성장 인자 및 환경적 스트레스에 의해 유도되는 신호의 조절자 역할을 하며 다양한 세포 기능에 관여한다. 또한, 대식세포에서 MAPK의 인산화 증가는 전사 및 번역 수준에서 염증매개체의 합성을 조절하여 염증 반응을 증가시키는 것으로 보고되었다[22-26].

Nuclear factor-kappa B (NF-κB)는 p50과 p60의 이종이량체이다. 일반적으로 inhibitory factor kappa B alpha (IκB-α)와 결합하여 비활성 상태로 세포질에 존재한다. LPS 자극 후 IκB-α는 인산화되어 분해되고 NF-κB 복합체가 세포질로 방출된다. 방출된 NF-κB는 인산화되어 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 합성을 촉진하는 전사인자로 작용한다. 따라서 NF-κB 및 MAPKs 신호전달경로의 억제는 NO 및 PGE₂의 발현을 유도하는 iNOS 및 COX-2의 억제하여 항염증 효과를 유발할 수 있다[27-32].

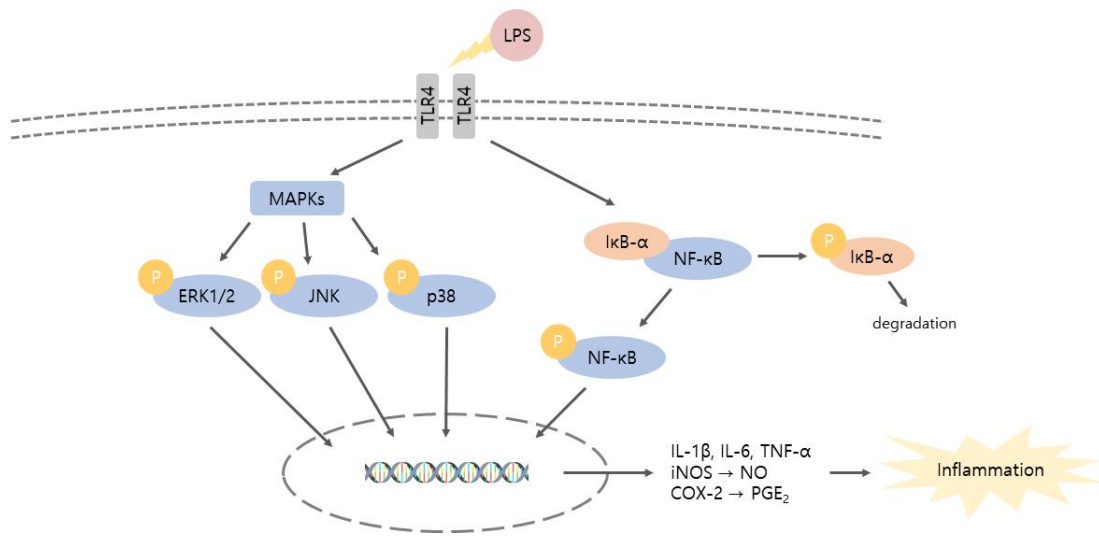


Figure 1. The mechanism of LPS-induced inflammation

자외선은 DNA를 손상시키거나 비흑색종 및 흑색종 피부암, 광노화 및 광피부병을 유발할 수 있다. 피부가 자외선에 노출되면 각질 세포에서 분비된 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)이 멜라닌 세포를 자극하여 멜라닌을 생성한다. 멜라닌은 자외선을 흡수하여 피부 깊숙이 침투하는 것을 막아 자외선으로부터 피부를 보호하지만, 지속적인 자외선 조사는 비정상적인 멜라닌의 축적으로 이어질 수 있으며, 이는 기미나 주근깨 등 색소 침착 장애를 유발할 수 있다[33-35].

멜라닌은 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) 등 멜라닌 생성 관련 단백질에 의해 촉매되는 일련의 산화과정을 통해 생합성된다[36, 37]. 멜라닌을 생성하는데 중요한 속도제한효소인 tyrosinase는 L-tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)로 수산화시키고, DOPA를 DOPA quinone으로 산화시킨다. 이후 두 가지 합성 경로로 나뉘어 멜라닌을 생성시킨다. DOPA quinone이 자발적 산화과정을 거쳐 DOPA chrome으로 전환되면 TRP-1과 TRP-2 효소에 의해 검은색에서 갈색을 띠는 eumelanin이 생성되고, DOPA quinone이 cysteine이나 glutathione과 결합하면 붉은색에서 노란색을 띠는 pheomelanin이 생성된다[38-40].

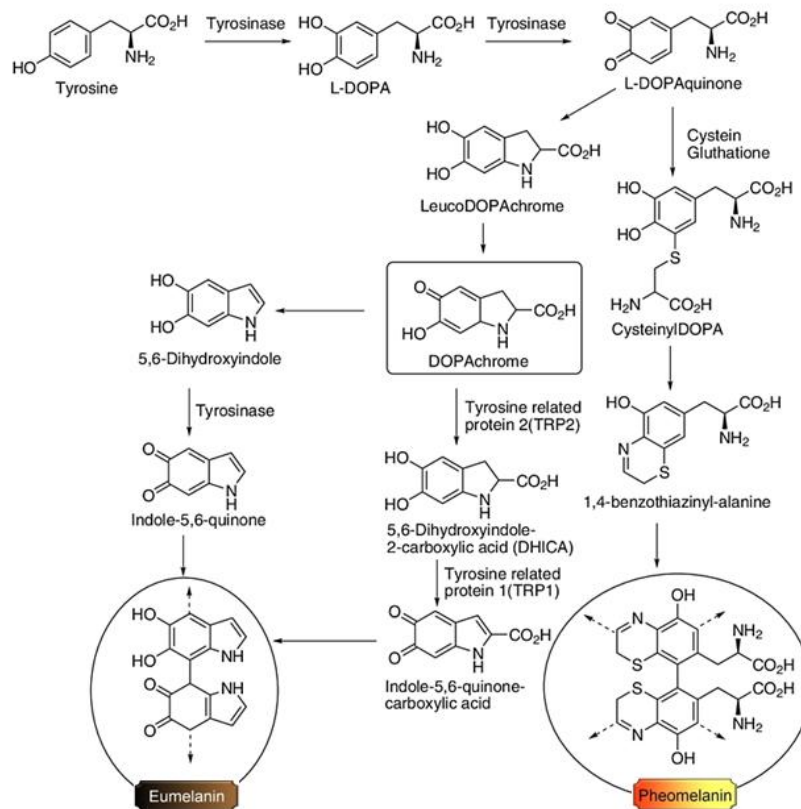


Figure 2. The melanin synthesis in melanocytes during melanogenesis.

쿠마린은 박테리아, 곰팡이 및 식물의 시킵산 경로에서 합성되는 벤조피렌 유도체인 산소 헤테로고리 화합물이다. 쿠마린의 화학 구조는 신남산의 수산화, 당화 및 고리화를 통해 파생된다. Umbelliferone, esculetin, herniarin, psoralen, imperatorin을 포함하여 쿠마린 유도체들이 보고되었고, 여러 연구에서 이러한 쿠마린 유도체들의 항산화, 항염, 항박테리아, 항바이러스 및 항암 효과를 포함한 다양한 생리적 기능을 보고했다[41-49].

본 연구에서는 작용기가 다른 4-methylcoumarin들의 항산화, 항염증 및 미백 효능을 측정하여 구조에 따른 활성의 차이를 연구하였다. 그 중, 항염증 활성이 가장 좋았던 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin (6,7-DH-4-MC)는 장에서 항산화 및 항염증 효과가 입증된 esculetin의 유도체이다[50]. 그러나 RAW 264.7 대식세포를 사용한 6,7-DH-4-MC의 항염 효과 및 기전에 대한 연구는 거의 없었다. 따라서 추가로 6,7-DH-4-MC의 항염 효과 및 기전을 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포를 이용하여 연구하였다.

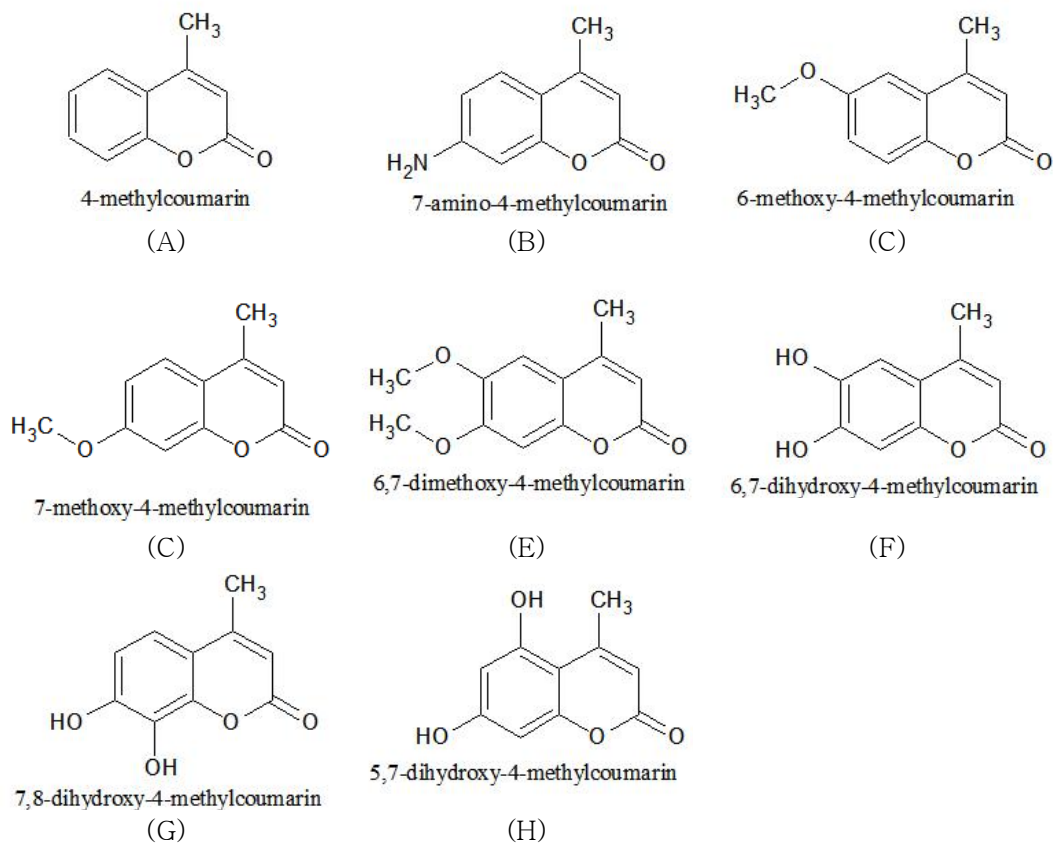


Figure 3. Structure of 4-methylcoumarins

(A) 4-methylcoumarin (4-MC), (B) 7-amino-4-methylcoumarin (7-A-4-MC), (C) 6-methoxy-4-methylcoumarin (6-M-4-MC), (D) 7-methoxy-4-methylcoumarin (7-M-4-MC), (E) 6,7-dimethoxy-4-methylcoumarin (6,7-DM-4-MC), (F) 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin (6,7-DH-4-MC), (G) 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin (7,8-DH-4-MC), (H) 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin (5,7-DH-4-MC)

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용한 4-methylcoumarin들은 Tokyo Chemical Industry (Chuo-ku, Tokyo, Japan)과 Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA)에서 구매하였다.

L-ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), lipopolysaccharides (LPS), fetal bovine serum (FBS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), Griess reagent, sodium nitrite, protease inhibitor cocktail, α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin/streptomycin (P/S), Nonidet P-40 (NP-40) Cell Lysis Buffer, Bicinchoninic acid (BCA) Protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구매하였다.

Enhanced chemiluminescence (ECL) kit, radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, phosphate buffered saline (PBS), tris-buffered saline (TBS)은 Biosesang (Seongnam, Korea)에서 구매하였으며, Tween 20은 Bio-rad (Hercules, CA, USA)에서 구매하였다.

N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methanesulfonamide (NS-398)는 Cayman chemical company (Ann Arbor, MI, USA)에서 구매하였다.

PGE₂, IL-1 β ELISA kits는 R&D systems Inc. (St. Louis, MO, USA)에서, IL-6, TNF- α ELISA kit는 BD Sciences (San Diego, CA, USA)에서 구매하였다.

단백질 발현량 측정을 위한 특이적 1차 항체와 anti-rabbit 및 anti-mouse 2차 항체는 Cell signaling technology (Beverly, MA, USA)에서 구매하였다.

2. 항산화 활성 평가

2.1. DPPH radical scavenging assay

4-methylcoumarin들의 DPPH 라디칼 소거능을 측정하기 위해 Blois 등의 방법을 응용하였다[51]. 보라색의 안전한 DPPH 자유 라디칼이 항산화제의 수소를 받으면 환원되어 노란색의 DPPH가 되는 원리를 이용하여 측정할 수 있다.

DPPH 시약을 DMSO에 녹여 20 mM의 DPPH 용액을 만든다. 95% 에탄올에 희석시켜 0.2 mM로 제조하고 515nm에서 0.940.97 사이의 흡광도 값을 갖도록 한다. 96 well plate에 시료 20 μ L과 DPPH 용액 180 μ L를 혼합한다. 10분간 실온에서 암반응 시킨 후 515nm에서 흡광도를 측정한다. 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였고 소거율은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left[1 - \frac{B-D}{A-C}\right] \times 100$$

A : 시료 무처리군의 흡광도

B : 시료 처리군의 흡광도

C : 시료 무처리군에서 DPPH 용액을 처리하지 않은 군의 흡광도

D : 시료 처리군에서 DPPH 용액을 처리하지 않은 군의 흡광도

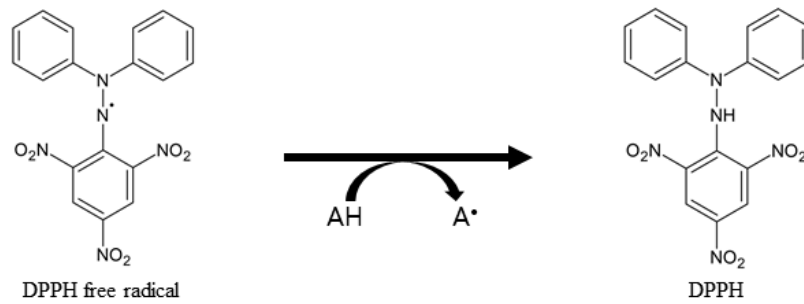


Figure 4. The principle of DPPH radical scavenging assay.

2.2. ABTS⁺ radical scavenging assay

4-methylcoumarin들의 ABTS 양이온 라디칼 소거능을 측정하기 위해 Re 등의 방법을 응용하였다[52]. 무색의 ABTS는 potassium persulfate에게 전자를 제공하여 산화되어 청록색의 ABTS 양이온 라디칼을 형성한다. 이 청록색의 ABTS 양이온 라디칼이 항산화제의 전자를 받으면 환원되어 다시 무색의 ABTS가 되는 원리를 이용하여 측정할 수 있다.

ABTS 시약을 증류수에 녹여 14 mM의 ABTS 용액을 만들고, potassium persulfate를 증류수에 녹여 4.9 mM의 용액을 만든다. 두 용액을 같은 부피로 섞어 하루 동안 실온에서 암반응을 시키면 ABTS 양이온 라디칼이 생성된다. 실험하기 전 95% 에탄올에 30배 정도 희석시키고 700nm에서 0.68~0.72 사이의 흡광도 값을 갖도록 한다. 96 well plate에 시약을 농도별로 20 μ L씩 넣고, ABTS 용액을 180 μ L 넣는다. 15분간 실온에서 암반응 시킨 후 700nm에서 흡광도를 측정한다. 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ radical scavenging activity (\%)} = \left[1 - \frac{B-D}{A-C}\right] \times 100$$

A : 시료 무처리군의 흡광도

B : 시료 처리군의 흡광도

C : 시료 무처리군에서 ABTS 용액을 처리하지 않은 군의 흡광도

D : 시료 처리군에서 ABTS 용액을 처리하지 않은 군의 흡광도

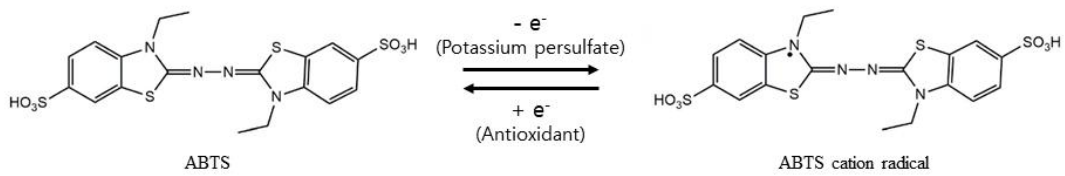


Figure 5. The principle of ABTS⁺ radical scavenging assay.

3. 세포 배양 및 세포 독성 평가

3.1. 세포 배양

RAW 264.7 세포와 B16F10 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구매하였다. 세포 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS와 1% P/S를 포함한 DMEM 배지를 사용하여 각각 2일, 3일 간격으로 계대배양 하였다.

3.2. 세포 독성 평가

6,7-DH-4-MC의 세포 독성을 평가하기 위해서 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였습니다. 살아있는 세포 내 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 수용성의 노란색인 MTT는 환원되어 보라색의 불용성인 formazan을 형성한다.

RAW 264.7 세포를 1.5×10^5 cells/well, B16F10 세포를 2×10^4 cells/well로 24 well plate에 분주한 후, 24시간 후 다양한 농도의 시료를 처리하여 24시간 배양하였다. MTT 시약을 0.2 mg/mL 농도로 처리하여 4시간 동안 생성된 formazan 결정을 DMSO로 용해하고 microplate reader를 통해 570nm에서 흡광도 측정하였다. 세포 독성은 시료군의 흡광도 값을 무침가군 (control)의 흡광도 값과 비교계산하여 백분율로 나타내어 평가하였다.

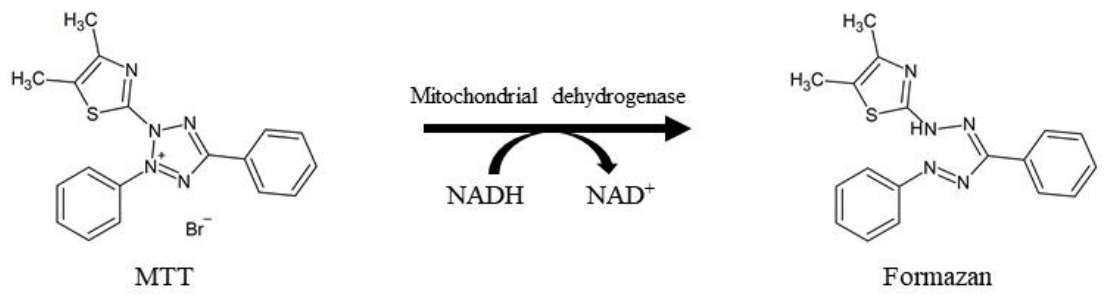


Figure 6. The principle of MTT assay.

4. 항염증 활성 평가

4.1. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

세포 배양액 속에 존재하는 NO를 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% N-1-(naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)을 사용하여 nitrite (NO_2^-) 형태로 측정하였다. RAW 264.7 cell을 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주한 후, 24시간 후 세포 독성이 없는 농도의 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 96 well plate에 세포 배양액 100 μL 와 Griess 시약 100 μL 를 혼합하여 10분간 반응시킨 후 540nm에서 흡광도 측정하였다. NO 생성량은 sodium nitrite (NaNO_2)의 표준검정곡선을 통해 정량계산하였다.

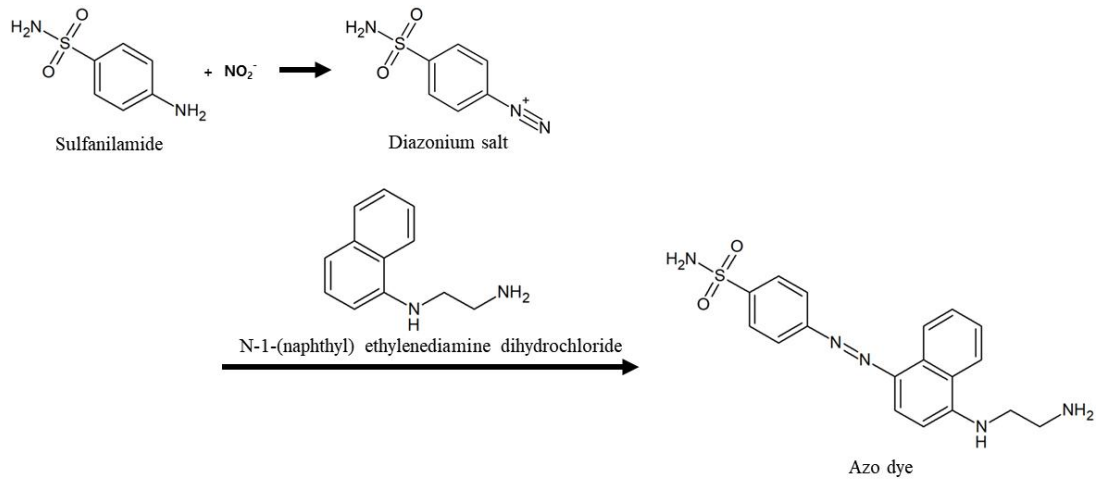


Figure 7. The reaction of nitrite with Griess reagents

4.2. Prostaglandin E2 (PGE₂) 및 전 염증성 cytokine 생성량 측정

RAW 264.7 cell을 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주한 후, 24시간 후 세포 독성이 없는 농도의 시료와 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액을 5,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후, 상층액을 취해 ELISA kit 제조사의 방법에 따라 PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 함량을 측정하였다.

4.3. Western blot

RAW 264.7 cell을 60 mm cell culture dish에 6×10^5 cells/dish로 분주한 후, 각각 lysis 전 적절한 시점에서 시료를 1시간 동안 전처리하고 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하였다. 그 후 차가운 1X PBS를 사용하여 세척하고 lysis buffer (1X RIPA, 1% Nonidet P-40, and 1% protease inhibitor cocktail)를 사용하여 20분간 세포를 용해한 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액의 단백질 함량은 BCA Protein assay kit를 사용하여 bovine serum albumin (BSA)의 표준검정곡선을 통해 정량계산하였다. 정량한 단백질과 2x Laemmli sample buffer를 1:1 비율로 혼합하여 100°C에서 5분간 가열하였다. Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)을 사용하여 전기영동을 통해 단백질을 크기별로 분리하였다. 그 후 PVDF membrane으로 transfer하여 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. TBS(Tris-buffered saline buffer)와 0.1% Tween 20의 혼합물인 TBST를 사용하여 membrane을 10분 간격으로 6회 세척하고 적절한 1차 항체를 사용하여 4°C에서 overnight incubation 하였다. 이 후, TBST로 6회 세척하고 실온에서 2시간 동안 2차 항체를 배양하였다. 다시 TBST로 6회 세척하고 ECL kit를 사용하여 Chemidoc (Fusion solo 6S.WL, VILBER LOURMAT, France)으로 현상하고, ImageJ software를 사용하여 분석하였다.

5. 미백 활성 평가

5.1. Melanin 생성량 측정

B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 8×10^4 cells/dish로 분주한 후, 24시간 후 세포 독성이 없는 농도의 시료와 α -MSH (100 nM)를 처리하였다. 72시간 배양 후, 배지를 제거하고 차가운 1X PBS를 사용하여 세척하였다. Lysis buffer를 사용하여 20분간 세포를 용해한 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액과 pellet를 분리하고, 분리된 pellet에 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH를 700 μ L씩 넣어 100°C에서 20분간 처리하였다. 그 후 96 well plate에 200 μ L씩 옮겨 담아 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 멜라닌 생성량은 α -MSH 단독 처리군과 비교계산하여 백분율로 나타내었다. 상층액은 BCA Protein assay kit를 사용하여 단백질을 정량하여 멜라닌 생성량을 보정하였다.

5.2. 세포 내 tyrosinase 효소 활성 측정

B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 8×10^4 cells/dish로 분주한 후, 24시간 후 세포 독성이 없는 농도의 시료와 α -MSH (100 nM)를 처리하였다. 72시간 배양 후, 배지를 제거하고 차가운 1X PBS를 사용하여 세척하였다. Lysis buffer를 사용하여 20분간 세포를 용해한 후, 15,000 rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 상층액의 단백질 함량은 BCA Protein assay kit를 사용하여 측정하고, 0.1 M sodium phosphate buffer를 사용하여 단백질 농도가 20 μ g/mL이 되도록 희석하였다. 96 well plate에 희석한 단백질 20 μ L와 2 mg/mL L-DOPA 80 μ L를 넣고 37°C에서 2시간 배양한 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 세포 내 tyrosinase 효소 활성은 α -MSH 단독 처리군과 비교계산하여 백분율로 나타내었다.

6. 통계처리

모든 데이터는 3번의 독립적인 실험으로부터의 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, student's t-test를 사용하여 통계분석을 수행하였다. $p < 0.005$ 의 p-value 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 4-Methylcoumarin들의 항산화 활성

1.1. DPPH radical scavenging activity

4-MC, 7-A-4-MC, 6,7-DM-4-MC는 0.78-50 mM, 6-M-4-MC, 7-M-4-MC는 0.03-2 mM, 6,7-DH-4-MC, 7,8-DH-4-MC는 3.91-250 μ M, 5,7-DH-4-MC는 0.31-20 mM의 농도로 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH 라디칼을 50% 소거하였을 때의 농도 (IC_{50})를 계산한 결과, L-ascorbic acid는 40.869 μ M (7.2 μ g/mL), 6,7-DH-4-MC는 25.491 μ M (4.9 μ g/mL), 7,8-DH-4-MC는 39.393 μ M (7.6 μ g/mL), 5,7-DH-4-MC는 7.422 mM (1.4 mg/mL)의 IC_{50} 값을 나타내었고, 6,7-DH-4-MC는 양성대조군인 L-ascorbic acid와 비교했을 때 더 좋은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다(Figure 8).

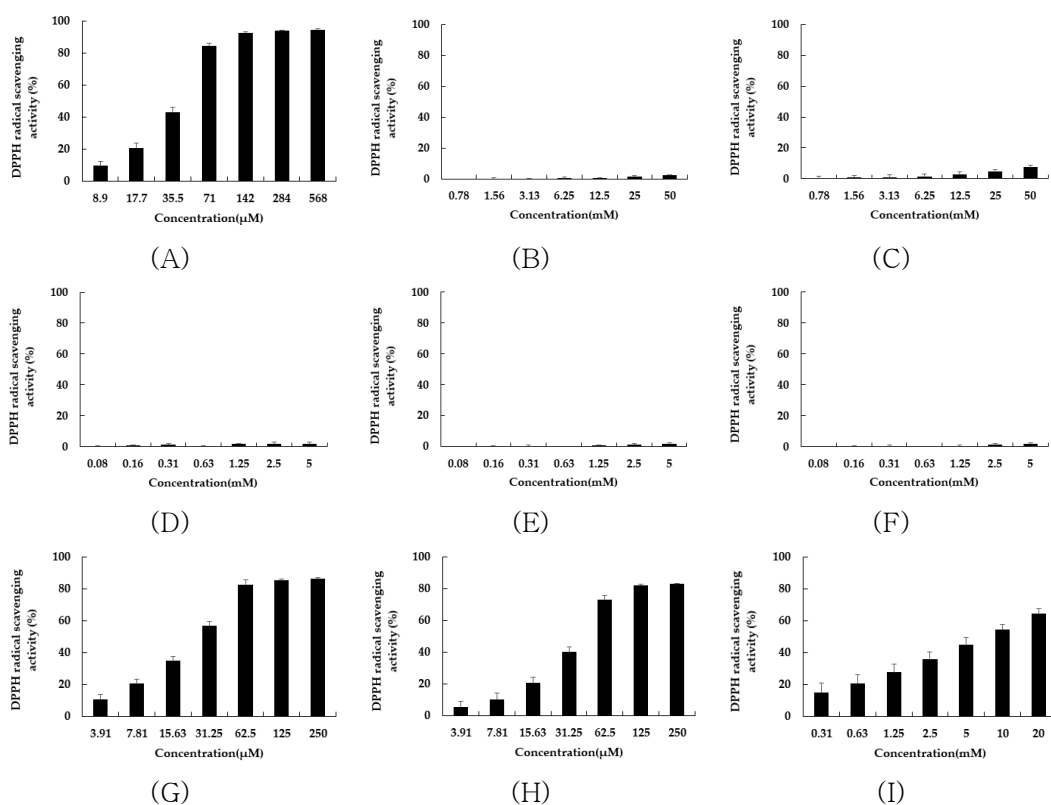


Figure 8. DPPH radical scavenging activity of (A) L-ascorbic acid, (B) 4-MC, (C) 7-A-4-MC, (D) 6-M-4-MC, (E) 7-M-4-MC, (F) 6,7-DM-4-MC, (G) 6,7-DH-4-MC, (H) 7,8-DH-4-MC and (I) 5,7-DH-4-MC. The IC_{50} value was (A) $40.869 \pm 2.441 \mu\text{M}$, (G) $25.491 \pm 1.853 \mu\text{M}$, (H) $39.393 \pm 2.717 \mu\text{M}$ and (I) $7.422 \pm 1.996 \text{ mM}$. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments.

1.2. ABTS⁺ radical scavenging activity

4-MC, 7-A-4-MC는 0.78-50 mM, 6-M-4-MC, 7-M-4-MC는 0.03-2 mM, 6,7-DH-4-MC는 0.39-25 mM, 6,7-DH-4-MC, 7,8-DH-4-MC는 3.91-250 μ M, 5,7-DH-4-MC는 7.81-500 μ M의 농도로 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정하였다. ABTS⁺ 라디칼을 50% 소거하였을 때의 농도 (IC₅₀)를 계산한 결과, L-ascorbic acid는 26.244 μ M (4.6 μ g/mL), 4-MC는 20.693 mM (3.3 mg/mL), 7-A-4-MC는 13.240 mM (2.3 mg/mL), 6,7-DH-4-MC는 8.885 μ M (1.7 μ g/mL), 7,8-DH-4-MC는 11.867 μ M (2.3 μ g/mL), 5,7-DH-4-MC는 10.779 μ M (2.1 μ g/mL)의 IC₅₀ 값을 나타내었으며, 6,7-DH-4-MC, 7,8-DH-4-MC, 5,7-DH-4-MC는 양성대조군인 L-ascorbic acid와 비교했을 때 더 좋은 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 나타내었다(Figure 9).

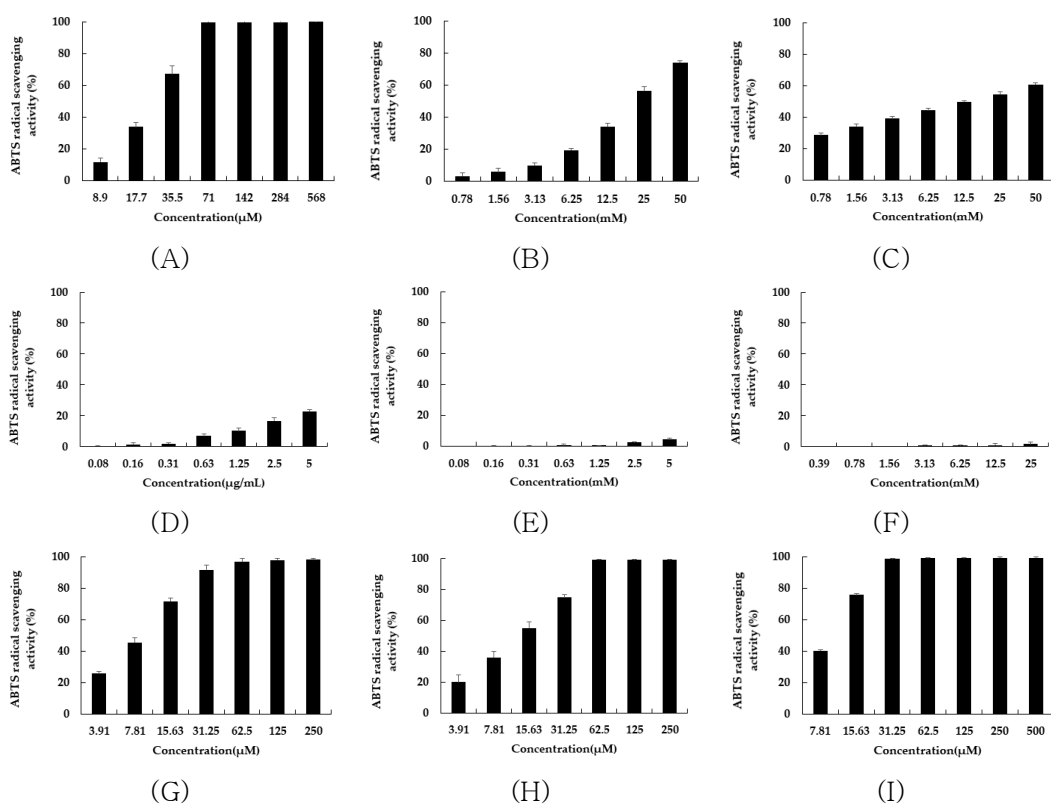


Figure 9. ABTS⁺ radical scavenging activity of (A) L-ascorbic acid, (B) 4-MC, (C) 7-A-4-MC, (D) 6-M-4-MC, (E) 7-M-4-MC, (F) 6,7-DM-4-MC, (G) 6,7-DH-4-MC, (H) 7,8-DH-4-MC and (I) 5,7-DH-4-MC. The IC₅₀ value was (A) 26.244±1.635 μM, (B) 20.693±1.526 mM, (C) 13.240±1.743 mM, (G) 8.885± 0.645 μM, (H) 11.867±3.487 μM and (I) 10.779±0.688 μM. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments.

2. 4-Methylcoumarin들의 항염증 활성

2.1. 세포 독성 평가

RAW 264.7 대식세포에서 6,7-DH-4-MC와 유사한 구조를 가진 4-methyl coumarin 유도체들의 세포 독성 평가를 진행하였다. 그 결과 4-MC, 7-A-4-MC, 6-M-4-MC, 7-M-4-MC, 6,7-DM-4-MC, 6,7-DH-4-MC, 7,8-DH-4-MC, 5,7-DH-4-MC는 각각 40, 60, 300, 10, 160, 40, 20, 200 μ M까지 세포 독성이 없었다(Figure 10).

2.2. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

세포 독성이 없는 농도의 4-methylcoumarin 유도체들의 NO 생성량을 측정하였다. 4-MC, 7-A-4-MC, 7-M-4-MC는 LPS로 유도된 NO 생성량을 억제하지 못하였으며, 6-M-4-MC, 6,7-DM-4-MC, 6,7-DH-4-MC, 7,8-DH-4-MC, 5,7-DH-4-MC는 농도의존적으로 억제하였다(Figure 10).

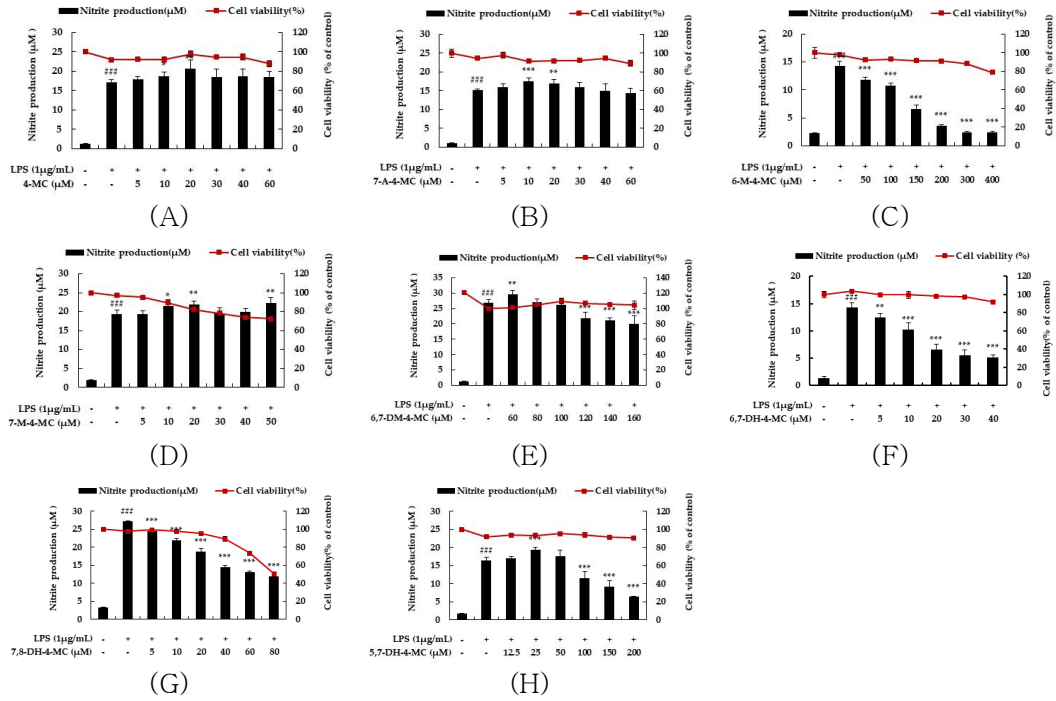


Figure 10. The effect of 4-methylcoumarins on the viability and NO production in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) 4-MC, (B) 7-A-4-MC, (C) 6-M-4-MC, (D) 7-M-4-MC, (E) 6,7-DM-4-MC, (F) 6,7-DH-4-MC (G) 7,8-DH-4-MC and (I) 5,7-DH-4-MC. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. ### $p < 0.001$ vs untreated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS treated group.

3. 4-Methylcoumarin들의 미백 활성

3.1. 세포 독성 평가

B16F10 세포에서 6,7-DH-4-MC와 유사한 구조를 가진 4-methylcoumarin들의 세포 독성 평가를 진행하였다. 그 결과 4-MC, 7-A-4-MC, 6-M-4-MC, 7-M-4-MC는 100 μ M, 6,7-DM-4-MC는 120 μ M, 6,7-DH-4-MC, 7,8-DH-4-MC는 4 μ M, 5,7-DH-4-MC는 60 μ M까지 세포 독성이 없었다 (Figure 11).

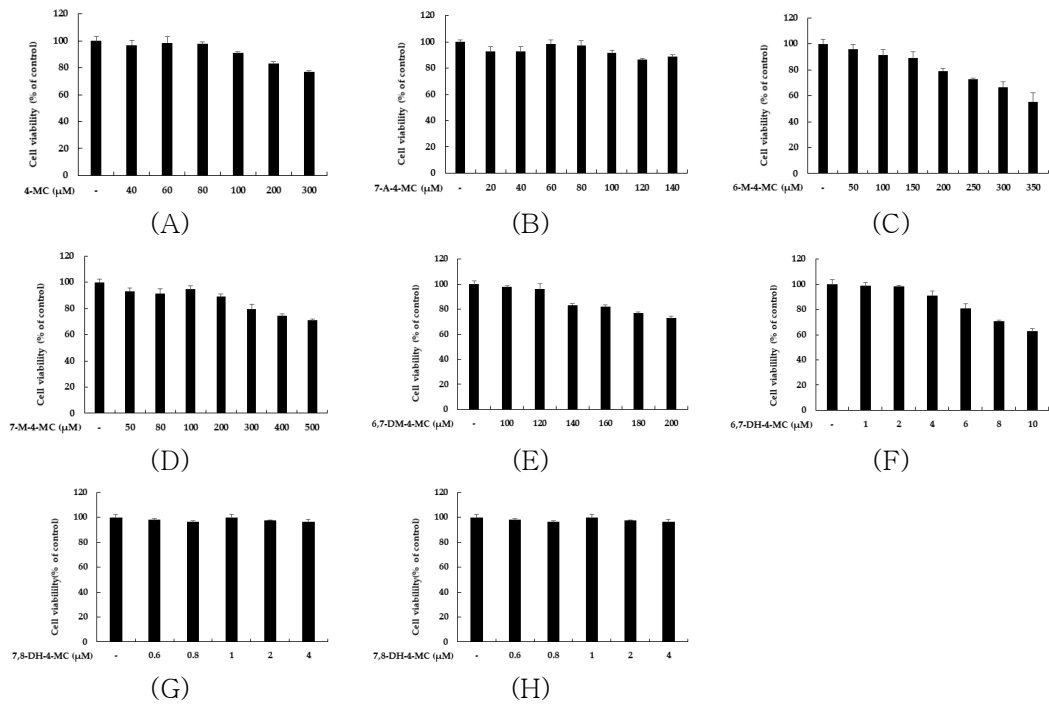


Figure 11. The effect of 4-methylcoumarins on the viability in B16F10 melanoma cells. (A) 4-MC, (B) 7-A-4-MC, (C) 6-M-4-MC, (D) 7-M-4-MC, (E) 6,7-DM-4-MC, (F) 6,7-DH-4-MC, (G) 7,8-DH-4-MC and (H) 5,7-DH-4-MC. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments.

3.2. Melanin 생성량 측정

α -MSH 자극 유무에 따라 세포 독성이 없는 농도에서 4-methylcoumarin들의 멜라닌 생성량을 측정하였다. 그 결과 4-MC, 6-M-4-MC, 7-M-4-MC, 6,7-DM-4-MC, 5,7-DH-4-MC는 α -MSH로 자극되지 않은 B16F10 세포에서 멜라닌을 증가시켰지만 6,7-DH-4-MC와 7,8-DH-4-MC는 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 멜라닌을 감소시켰다. 7-A-4-MC는 멜라닌 생성에 영향을 미치지 않았다 (Figure 12).

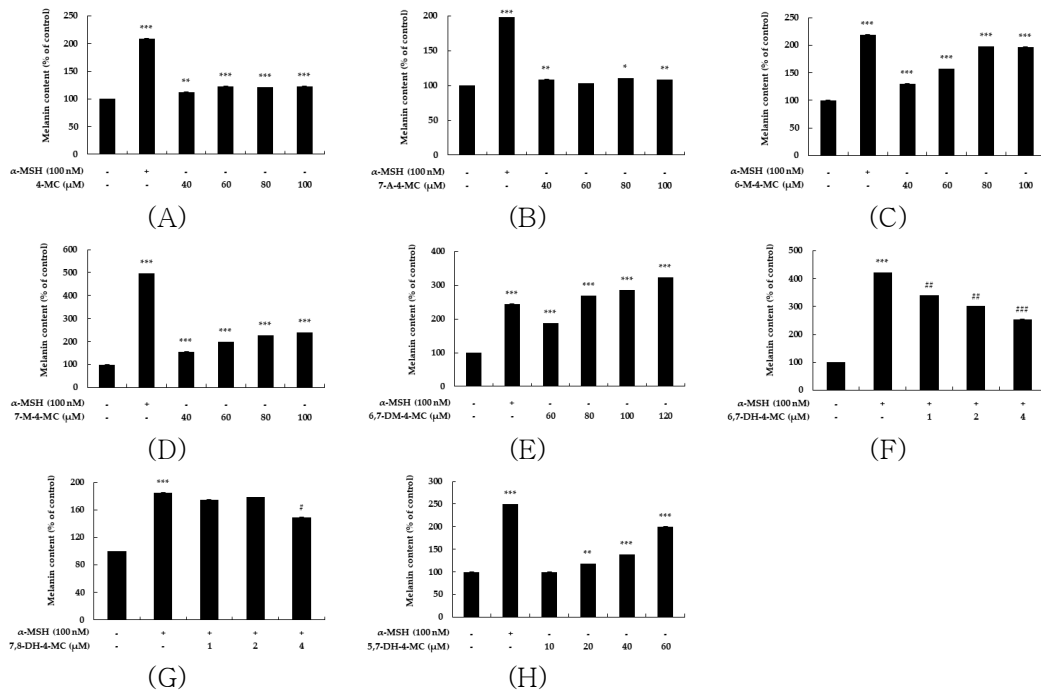


Figure 12. The effect of 4-methylcoumarins on production of melanin in B16F10 melanoma cells. (A) 4-MC, (B) 7-A-4-MC, (C) 6-M-4-MC, (D) 7-M-4-MC, (E) 6,7-DM-4-MC, (F) 6,7-DH-4-MC, (G) 7,8-DH-4-MC and (H) 5,7-DH-4-MC. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated control group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs α -MSH treated group.

3.3. 세포 내 tyrosinase 효소 활성 측정

α -MSH 자극 유무에 따라 세포 독성이 없는 농도에서 4-methylcoumarin들의 세포 내 tyrosinase 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 멜라닌 생성량 결과와 비슷하게 4-MC, 6-M-4-MC, 7-M-4-MC, 6,7-DM-4-MC, 5,7-DH-4-MC는 α -MSH로 자극되지 않은 B16F10 세포에서 tyrosinase 효소 활성을 증가시켰지만 6,7-DH-4-MC와 7,8-DH-4-MC는 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 tyrosinase 효소 활성을 감소시켰다. 7-A-4-MC는 tyrosinase 효소 활성에 영향을 미치지 않았다 (Figure 13).

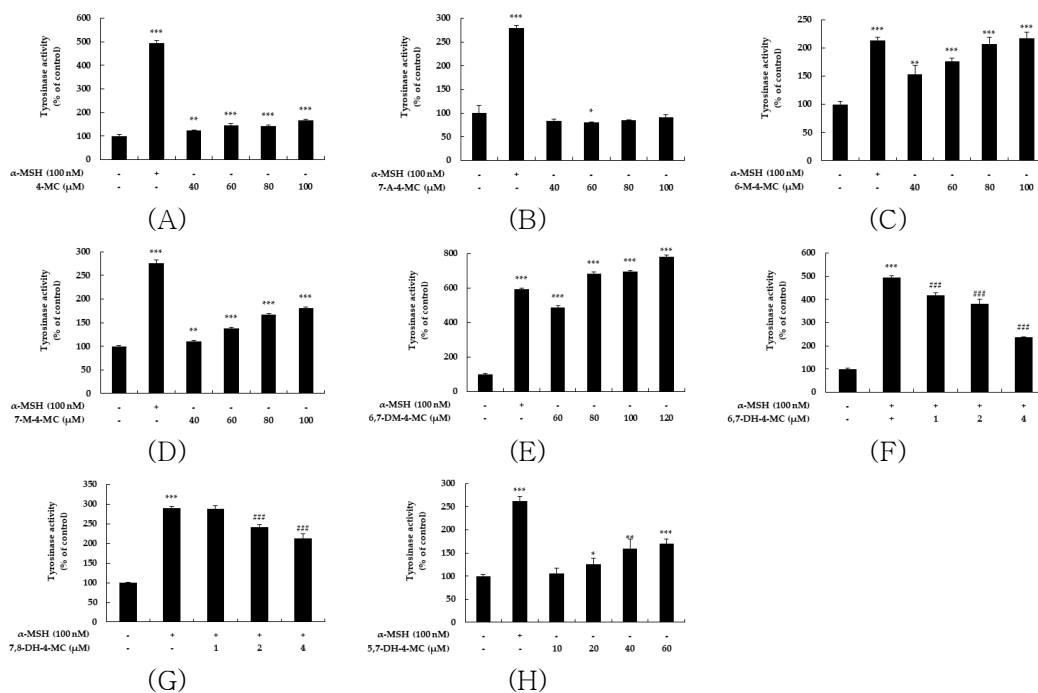


Figure 13. The effect of 4-methylcoumarins on tyrosinase activity in B16F10 cells. (A) 4-MC, (B) 7-A-4 -MC, (C) 6-M-4-MC, (D) 7-M-4-MC, (E) 6,7-DM-4-MC, (F) 6,7-DH-4-MC, (G) 7,8-DH-4-MC and (I) 5,7-DH-4-MC. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated control group. ### $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs α -MSH treated group.

4. 6,7-Dihydroxy-4-methylcoumarin (6,7-DH-4-MC)의 항염증 활성

4.1. Prostaglandin E2 (PGE₂) 생성량 측정

6,7-DH-4-MC의 PGE₂ 생성량 억제를 측정하기 위해, 배양 배지 내 PGE₂ 생성량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. COX-2의 특이적 억제제인 NS-398을 양성대조군으로 사용하였다. 6,7-DH-4-MC는 LPS로 유도된 PGE₂ 생성량을 LPS 처리군에 비해 농도별로 5.8%, 15.7%, 40.0%, 46.1%, 50.3% 억제하였다 (Figure 14).

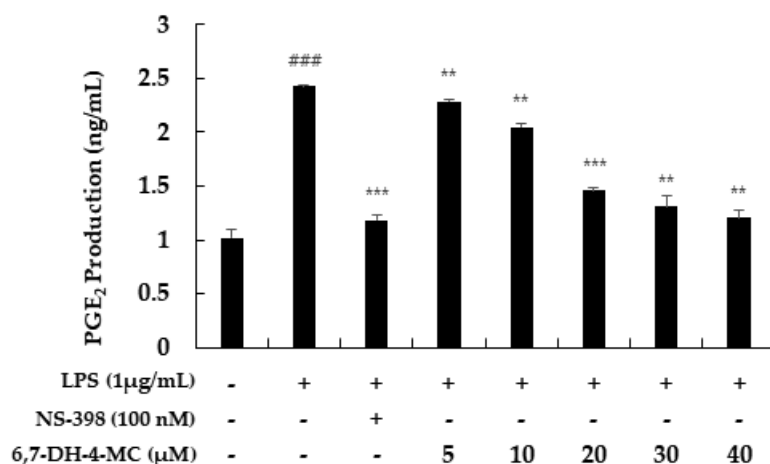


Figure 14. The effect of 6,7-DH-4-MC on PGE₂ production in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were seeded in 24-well plates (1.5×10^5 cells/well) and incubated for 24 hours, and then pretreated with various concentrations of 6,7-DH-4-MC (5, 10, 20, 30, 40 µM) for 1 hour before LPS stimulation for 24 hours. N-[2-Cyclohexyloxy-4-nitrophenyl] methane sulfonamide (NS-398) was used as a positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. ###p < 0.001 vs untreated control group. **p < 0.01, ***p < 0.001 vs LPS treated group.

4.2. 전염증성 cytokine 생성량 측정

6,7-DH-4-MC의 전염증성 cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량 억제를 측정하기 위해, 배양 배지 내 cytokine을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 각각의 cytokine 생성량은 LPS 처리 후 크게 증가하였고, 6,7-DH-4-MC는 LPS로 유도된 IL-1 β 와 IL-6 생성량을 농도 의존적으로 억제하여 고농도에서 각각 51.5%, 65.6% 감소시켰다. 하지만 TNF- α 생성량에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 15).

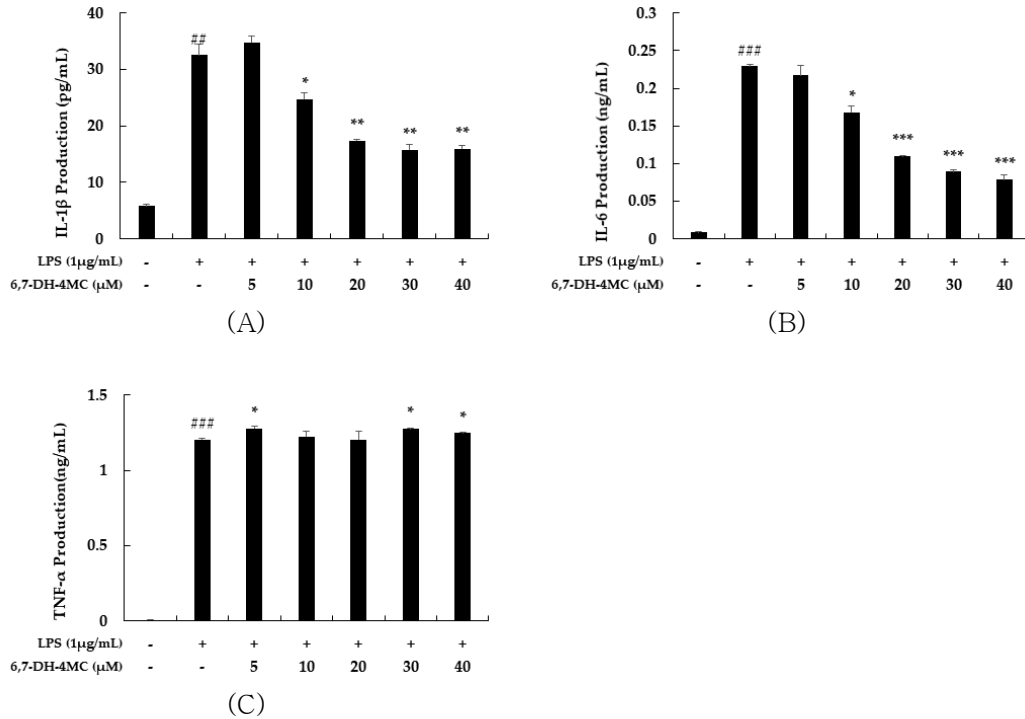


Figure 15. The effect of 6,7-DH-4-MC on (A) IL-1 β , (B) IL-6 and (C) TNF- α production in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with various concentrations of 6,7-DH-4-MC (5, 10, 20, 30, 40 μ M) for 1 hour before LPS stimulation for 24 hours. The pro-inflammatory cytokine production was measured using ELISA kit. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. ##p < 0.01, ###p < 0.001 vs untreated control group. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs LPS treated group.

4.3. iNOS, COX-2 발현량 측정

6,7-DH-4-MC는 LPS로 유도된 RAW 264,7에서 NO와 PGE₂을 억제하였다. 따라서 6,7-DH-4-MC가 이와 관련이 있는 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 억제하는지 확인하기 위해 western blot을 진행하였다.

6,7-DH-4-MC는 LPS로 유도된 iNOS를 농도별로 6.9%, 36.6%, 49.9% 억제하였고, COX-2는 농도별로 30.9%, 44.2%, 67.2% 억제하였다(Figure 16). 이러한 결과는 6,7-DH-4-MC가 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 억제함으로써 NO와 PGE₂를 억제한다는 것을 나타낸다.

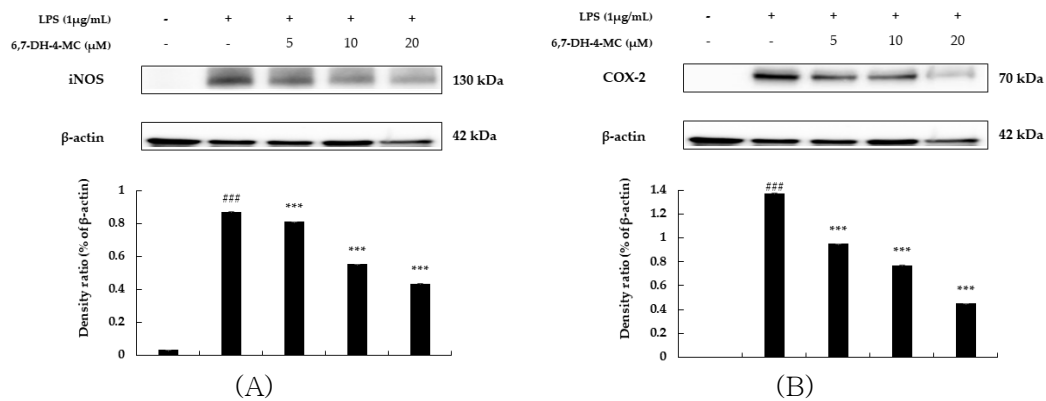


Figure 16. The effect of 6,7-DH-4-MC on the protein expression of (A) iNOS and (B) COX-2 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with various concentration of 6,7-DH-4-MC (5, 10, 20 μ M) for 1 hour before LPS stimulation for 18 hours. β -actin was used as a loading control. The cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against iNOS, COX-2 and β -actin. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. ^{###} $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs LPS treated group.

4.4. MAPKs 발현량 측정

ERK, JNK, p38 MAPKs의 인산화는 전염증성 cytokine의 발현과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 6,7-DH-4-MC의 전염증성 cytokine 생성량 억제에 MAPKs 인산화 억제에 의한 것인지 확인하기 위해 western blot을 진행하였다.

6,7-DH-4-MC는 LPS로 유도된 ERK의 인산화를 농도별로 2.3%, 4.5%, 54.3% 억제하였고, p-38의 인산화를 농도별로 4.7%, 13.5%, 31.8% 억제하였다. 하지만 6,7-DH-4-MC는 LPS로 유도된 JNK의 인산화에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 17). 이러한 결과는 6,7-DH-4-MC가 ERK와 p38 MAPKs의 인산화 억제를 통해 염증 인자와 전염증성 cytokine의 발현을 억제한다는 것을 나타낸다.

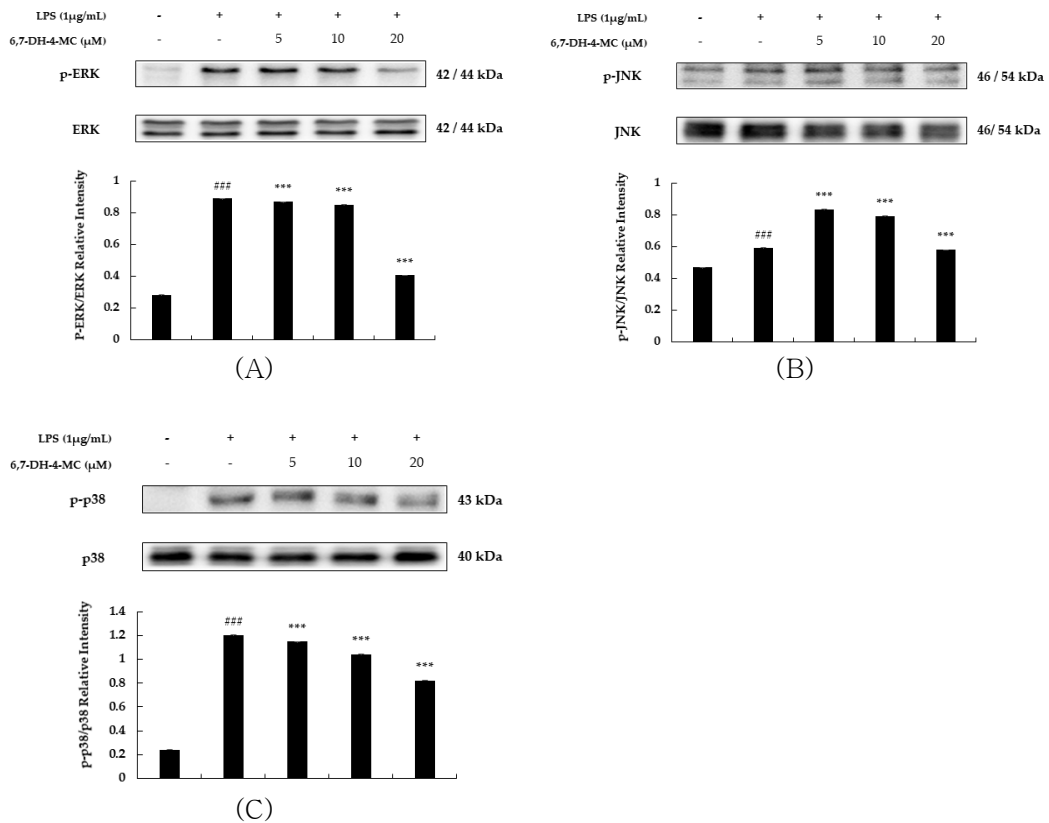


Figure 17. The effect of 6,7-DH-4-MC on the phosphorylation of (A) ERK, (B) JNK and (C) p38 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with various concentration of 6,7-DH-4-MC (5, 10, 20 μM) for 1 hour before LPS stimulation for 30 minutes. The cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. ^{###}p < 0.001 vs untreated control group. ^{***}p < 0.001 vs LPS treated group.

4.5. I κ B- α 및 NF- κ B 발현량 측정

6,7-DH-4-MC의 전염증성 사이토카인 및 iNOS, COX-2 단백질 발현량 억제가 또 다른 경로인 NF- κ B 신호전달경로에 의한 것인지 확인하기 위해 western blot을 진행하였다.

I κ B- α 는 LPS 처리 후 분해되었고, 6,7-DH-4-MC은 LPS에 의한 I κ B- α 의 분해를 농도별로 2.6%, 5.0%, 7.1% 억제하였다. 또한 6,7-DH-4-MC는 LPS로 유도된 p65의 인산화를 농도별로 18.5%, 39.1%, 51.0% 억제하였다(Figure 18). 이러한 결과는 6,7-DH-4-MC가 I κ B- α 의 분해 및 NF- κ B의 인산화를 억제하여 NF- κ B의 핵으로의 전위를 억제하고 염증을 억제한다는 것을 나타낸다.

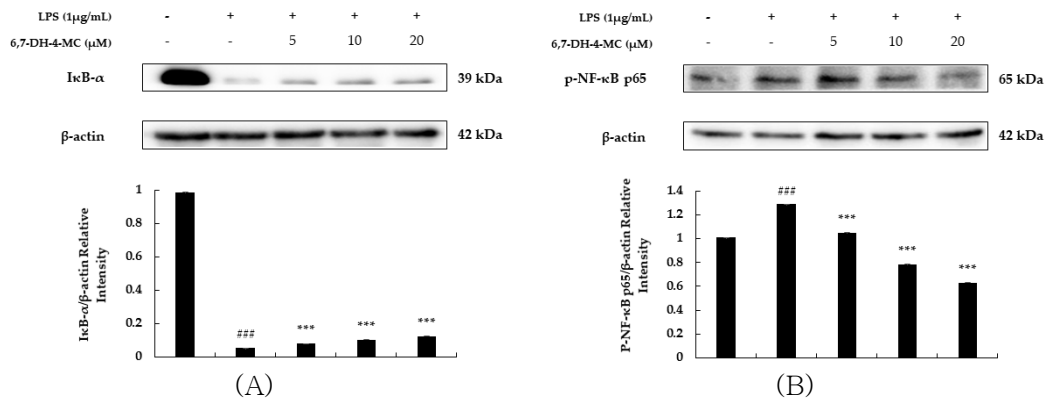


Figure 18. The effect of 6,7-DH-4-MC on the protein expression of (A) IκB-α and (B) p-NF-κB p65 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with various concentration of 6,7-DH-4-MC (5, 10, 20 μM) for 1 hour before LPS stimulation for 15 minutes. β-actin was used as a loading control. The cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against IκB-α, p-NF-κB p65 and β-actin. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. ###p < 0.001 vs untreated control group. ***p < 0.001 vs LPS treated group.

IV. 고찰

본 연구에서는 작용기가 다른 4-Methylcoumarin 골격 쿠마린들의 구조에 따른 활성 차이를 연구하고자 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH radical scavenging assay와 ABTS⁺ radical scavenging assay를 진행하였고, 항염증 효능을 확인하기 위해 RAW 264.7 대식세포에서 NO 생성 억제 실험을, 미백 효능을 확인하기 위해 B16F10 melanoma 세포에서 melanin 생성량 측정 실험과 세포 내 tyrosinase 효소 활성 측정 실험을 진행하였다.

그 결과 2개의 하이드록시기가 있는 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin (6,7-DH-4-MC), 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin (7,8-DH-4-MC) 그리고 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin (5,7-DH-4-MC)이 항산화 효능이 있었다. 4-methylcoumarin 골격 쿠마린들의 항염증 및 미백 효능을 확인한 결과, 세포 독성이 없는 농도에서 4-MC, 7-A-4-MC, 7-M-4-MC는 항염증 효능이 없었고, 6-M-4-MC, 6,7-DM-4-MC, 7,8-DH-4-MC, 5,7-DH-4-MC는 항염증 효능이 있는 것으로 나타났다. 4-MC, 6-M-4-MC, 7-M-4-MC, 6,7-DM-4-MC, 5,7-DH-4-MC는 멜라닌을 증가시켰고, 7,8-DH-4-MC는 멜라닌을 감소시켰으며, 7-A-4-MC는 멜라닌 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

4-Methylcoumarin에 2개의 하이드록시기가 있으면 항산화와 항염증 효능이 나타났으며, ortho 위치의 하이드록시기는 멜라닌을 감소시켰고 meta 위치의 하이드록시기는 멜라닌을 증가시켰다. 또한, 메톡시기는 멜라닌을 증가시켰으며 6번 탄소의 메톡시기는 항염증 효능을 나타내었다. 7-M-4-MC는 항염증 효능이 나타나지 않았고 6,7-DM-4-MC는 6-M-4-MC보다 NO를 덜 억제하는 것으로 보아 7번 위치의 메톡시기는 항염증 효능을 억제하는 것으로 보였다. 마찬가지로 7번 위치의 메톡시기는 항산화 효능을 억제하는 것으로 보였는데, ABTS⁺ 라디칼 소거능의 경우 6-M-4-MC는 4-MC와 비슷한 소거능을 보였으나 7-M-4-MC와 6,7-D-4-MC는 소거능이 나타나지 않았기 때문이다. 아미노기는 4-MC와 비

슷한 결과가 나온 것으로 보아 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

4-Methylcoumarin 골격 쿠마린 중에서 항산화 효능과 항염증 효능이 가장 우수한 6,7-DH-4-MC의 항염증 기전을 규명하기 위하여 LPS로 자극한 RAW 264.7 대식세포에서 NO, PGE₂ 및 전염증성 사이토카인의 생성 억제 실험을 진행하였고, MAPKs 및 NF- κ B 신호전달경로에 대한 메커니즘을 규명하였다.

염증은 산소 라디칼과 반응하여 퍼옥시아질산염을 생성하는 NO 자유라디칼을 생성하는 NO 합성효소인 iNOS의 발현을 유도함으로써 NO 생성을 증가시킨다 [53-55]. 또 다른 대표적인 염증 반응 인자인 PGE₂는 COX-2의 촉매 작용 결과 아라키돈산 대사의 산물로, 종양 세포사멸을 억제하고 혈관 신생을 유도하여 종양형성에 관여한다[56-58]. 6,7-DH-4-MC는 세포 독성이 나타나지 않는 농도 범위에서 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 하향조절하였으며 이를 통해 NO와 PGE₂ 생성을 억제하였다.

LPS로 자극된 대식세포는 NO 및 PGE₂와 더불어 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인을 생성하여 염증을 매개한다[59, 60]. 6,7-DH-4-MC는 LPS로 유도된 IL-1 β 와 IL-6 생성을 농도 의존적으로 억제하였으나 TNF- α 생성은 억제하지 못하였다.

염증 반응은 주로 MAPKs와 NF- κ B 신호전달경로에 의해 조절된다. MAPKs 신호전달경로는 ERK, JNK, p38로 구성되어 있으며, LPS 자극 후 MAPKs의 인산화가 증가하여 iNOS, COX-2 및 전염증성 사이토카인의 발현을 촉진하고, 염증 반응을 일으킨다[61-63]. 6,7-DH-4-MC는 MAPKs 신호전달경로 중 JNK 인산화는 억제하지 못하였지만 ERK 및 p38 인산화의 억제를 통해 염증 매개체 및 전염증성 사이토카인의 생성을 억제하였다.

NF- κ B는 평상시에는 I κ B- α 와 복합체를 이루어 비활성화 상태로 세포질 내에 존재한다. LPS 자극 후 I κ B- α 는 인산화되어 분해되고, 방출된 NF- κ B는 인산화

되어 핵으로 이동하여 iNOS, COX-2 및 전염증성 사이토카인의 발현을 촉진한다[64-66]. 6,7-DH-4-MC는 I κ B- α 의 분해 및 NF- κ B의 인산화를 억제하여 NF- κ B의 핵 전위를 억제함으로써 항염증 효과를 나타내었다.

멜라닌은 피부가 자외선에 노출되었을 때 각질 세포에서 분비된 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)에 의해 생성되며, 자외선으로부터 피부를 보호한다. 멜라닌 생합성에는 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)와 같은 효소들이 관여한다. 특히 tyrosinase는 멜라닌을 생성하는데 중요한 속도제한효소로, 멜라닌 생합성 초기 반응에 관여하여 속도를 결정한다[36-40]. 6,7-DH-4-MC은 α -MSH으로 자극된 B16F10 세포에서 농도 의존적으로 멜라닌을 감소시켰고, tyrosinase 효소 활성 또한 억제하였다.

결론적으로 6,7-DH-4-MC은 LPS로 자극된 RAW 264.7에서 MAPKs 신호전달 경로에서 ERK 및 p38의 인산화, NF- κ B 경로에서 I κ B- α 의 분해 그리고 NF- κ B의 인산화 억제를 통해 염증 매개체 및 전염증성 사이토카인의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 발휘하는 것으로 나타났다. 또한, α -MSH으로 자극된 B16F10 세포에서 tyrosinase 효소 활성을 감소시킴으로써 멜라닌 생성을 저해하였다. 이러한 결과는 6,7-DH-4-MC가 피부염, 관절염, 심혈관 질환 및 암과 같은 염증성 질환에 대한 잠재적 치료제 및 미백 기능성 원료로의 가능성을 제시한다.

V. 참고 문헌

1. Willoughby D. A., Heberden Oration, 1974, Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Annals of the rheumatic diseases*. 1975; 34(6): 471.
2. A current view on inflammation. *Nat. Immunol.* 2017; 18: 825.
3. Han M. H., Lee M. H., Hong S. H., Choi Y. H., Moon J. S., Song M. K., Kim M. J., Shin S. J., Hwang H. J., Comparison of anti-inflammatory activities among ethanol extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their mixtures in RAW 246.7 murine macrophages. *J Life Sci.* 2014; 24(3): 329-335.
4. Jeong H. R., Sung M. S., Kim Y. H., Ham H. M., Choi Y. M., Lee J. S., Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through heme oxygenase-1 induction in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2012; 41(7): 888-894
5. Hofseth L. J., Ying L., Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1765(1): 74-84.
6. Yi P. F., Bi W. Y., Shen H. Q., Wei Q., Zhang L. Y., Dong H. B., Bai H. L., Zhang C., Song Z., Qin Q. Q., Lv S., Wu, S. C., Fu B. D., Wei X. B., Inhibitory effects of sulfated 20(S)-ginsenoside Rh2 on the release of pro-inflammatory mediators in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol.* 2013; 712(1-3): 60-66.

7. Wang Q. S., Xiang Y., Cui Y. L., Lin K. M., Zhang X. F., Dietary blue pigments derived from genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF-kappaB inactivation. *PLoS One*. 2012; 7(3): e34122.
8. He J., Li J., Liu H., Yang Z., Zhou F., Wei T., Dong Y., Xue H., Tang L., Liu M., Scandoside Exerts anti-inflammatory effect via suppressing NF-kappaB and MAPK signaling pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(2): 457
9. Shin J. S., Kim J. M., An W. G., Anti-inflammatory effect of red ginseng through regulation of MAPK in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2012; 26(3): 293-300.
10. Hankittichai P., Buacheen P., Pitchakarn P., Takuathung M. N., Wikan N., Smith D. R., Potikanond S., Nimlamool W., *Artocarpus lakoocha* extract inhibits LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophage Cells. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(4): 1355.
11. Dou W., Zhang J., Sun A., Zhang E., Ding L., Mukherjee S., Wei X., Chou G., Wang Z. T., Mani S., Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF-kB signalling. *Br J Nutr*. 2013; 110(4): 599-608.
12. Choi K. H., Nam H. H., Choo B. K., Effect of five Korean native *Taraxacum* on antioxidant activity and nitric oxide production inhibitory activity. *J Med Crop Sci*. 2013; 21(3): 191-196.
13. Osanai T., Gujiwara N., Saitoh M., Sasaki S., Tomita H., Nakamura M.,

- Osawa H., Yamabe H., Okumura K., Relationship between salt intake, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine and its relevance to patients with end-stage renal disease. *Blood Purif.* 2002; 20(5): 466-468.
14. Dessy C., Feron O., Pathophysiological roles of nitric oxide: In the heart and the coronary vasculature. *Anti Inflamm. Anti Allergy. Agents Med. Chem.* 2004; 3(3): 207-216.
15. Manzi S., Wasko M. C., Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59(5): 321-325.
16. Abramson S. B., Amin A. R., Clancy R. M., Attur M., The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001; 15(5): 831-845.
17. Moncada S., Higgs E. A., Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J.* 1995; 9(13) :1319-1330.
18. Kim Y. J., Shin Y. S., Lee K. H., Kim T. J., *Anethum graveolens* flower extracts inhibited a lipopolysaccharide-induced inflammatory response by blocking iNOS expression and NF-kappaB activity in macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012; 76(6): 1122-1127.
19. Fitzpatrick F. A., Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des.* 2004; 10(6): 577-588.
20. Sinha P., Clements V. K., Fulton A. M., Ostrand-Rosenberg S., Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007; 67(9): 4507-4513.

21. Bishop-Bailey D., Calatayud S., Warner T. D., Hla T., Mitchell J. A., Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2002; 21(2): 9-101.
22. Feng D., Zhou Y., Xia M., Ma J., Folic acid inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages by suppressing MAPKs and NF- κ B activation. *Inflamm Res.* 2011, 60(9): 817-822.
23. Kaminska B., MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1754(1-2): 253-262.
24. Reibman J., Talbot A. T., Hsu Y., Ou G., Jover J., Nilsen D., Pillinger M. H., Regulation of expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human bronchial epithelial cells: roles of protein kinase C and mitogen activated protein kinases. *J Immunol.* 2000; 165(3): 1618-1625.
25. Nakano H., Shindo M., Sakon S., Nishinaka S., Mihara M., Yagita H., Okumura K., Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(7): 3537-3542.
26. Carter A. B., Knudtson K. L., Monick M. M., Hunninghake G. W., The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem.* 1999; 274(43): 30858-30863
27. Suzuki H, Chiba T, Kobayashi M, Takeuchi M, Furuichi K, Tanaka K. In

- vivo and in vitro recruitment of an I κ B α -ubiquitin ligase to I κ B α phosphorylated by IKK, leading to ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 256(1): 121-126.
28. Ghosh S., Hayden M. S., New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(11): 837-848.
 29. Park S. M., Byun S. H., Kim Y. W., Cho I. J., Kim S. C., Inhibitory effect of *Mori Folium* ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Korean J Herbology.* 2012; 27(3): 31-38.
 30. Chung Y.C., Park S.M., Kim J.H., Lee G. S., Lee J. N. Hyun C. G., Anti-inflammatory effect of pratol in LPS-stimulated RAW 264.7 cells via NF- κ B signaling pathways. *Nat Prod Commun.* 2018; 13(5): 547-550.
 31. Paik Y. H., Schwabe R. F., Bataller R., Russo M. P., Jobin C., Brenner D. A., Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopoly saccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2003; 37(5): 1043-1055.
 32. Kim A. R., Lee M. S., Shin T. S., Hua H., Jang B. C., Choi J. S., Byun D. S., Utsuki T., Ingram D., Kim H. R., Phlorofuofuroeckol A inhibits the LPS-stimulated iNOS and COX-2 expressions in macrophages via inhibition of NF- κ B, Akt, and p38 MAPK. *Toxicol In Vitro.* 2011; 25(8): 1789-1795.
 33. Pillaiyar T., Manickam M., Jung S. H., Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis, *Cell Signal.* 2017; 40: 99-115.
 34. Wu P. Y., You Y. J., Liu Y. J., Hou C. W., Wu C. S., Wen K. C., Lin C. Y., Chiang H. M., Sesamol inhibited melanogenesis by regulating melanin-related

signal transduction in B16F10 cells. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(4): 1108.

35. Liu Y. J., Lyu J. L., Kuo Y. H., Chiu C. Y., Wen K. C., Chiang H. M., The Anti-melanogenesis effect of 3,4-dihydroxybenzalacetone through down regulation of melanosome maturation and transportation in B16F10 and Human Epidermal Melanocytes. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(6): 2823.
36. Chung Y. C., Lee J. N., Kim B. S., Hyun C. G., Anti-melanogenic effect of *Paederia foetida* L. extract via MAPK signaling-mediated MITF down regulation. *Cosmetics.* 2021; 8(1): 22.
37. Ding X., Mei E., Hu M., Zhou C., Li X., Cai L., Li Z., Effect of puerarin on melanogenesis in human melanocytes and vitiligo mouse models and the underlying mechanism, *Phyther Res.* 2019; 33(1): 205 - 213.
38. Ito S., Wakamatsu K., Ozeki H., Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 2000; 13(s8): 103-109.
39. Plonka P. M., Grabacka M., Melanin synthesis in microorganisms-bio technological and medical aspects. *Acta Biochim Pol.* 2006; 53(3): 429-443.
40. Hearing V. H., Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(E1): E8-E11.
41. Kostova I., Raleva S., Genova P., Argirova R., Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorg Chem Appl.* 2006; 2006: 1-9.

42. Kostova I., Bhatia S., Grigorov P., Balkansky S., Parmar V. S., Prasad A. K., Saso L., Coumarins as antioxidants. *Curr Med Chem.* 2011; 18(25): 3929–3951.
43. Stefanachi A., Leonetti F., Pisani L., Catto M., Carotti A., Coumarin: a natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules.* 2018; 23(2): 250.
44. Rehakova Z., Koleckar V., Jahodar L., Opletal L., Macakova K., Cahlikova L., Jun D., Kuca K., Evaluation of the antioxidant activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues by "ferric reducing antioxidant power" assay. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2014; 29(1): 49–54.
45. Kang J. K., Hyun C. G., 4-Hydroxy-7-methoxycoumarin inhibits inflammation in LPS-activated RAW264.7 macrophages by suppressing NF- κ B and MAPK activation. *Molecules.* 2020; 25(19): 4424.
46. Hoult J. R, Payá M., Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol.* 1996; 27(4): 713–722.
47. Zhu J. J., Jiang J. G., Pharmacological and nutritional effects of natural coumarins and their structure-activity relationships. *Mol Nutr Food Res.* 2018; 62(14): e1701073.
48. Pereira T. M., Franco D. P., Vitorio F., Kummerle A. E., Coumarin compounds in medicinal chemistry: some important examples from the last years. *Curr Top Med Chem.* 2018; 18(2): 124–148.
49. Annunziata F., Pinna C., Dallavalle S., Tamborini L., Pinto A., An overview of

coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(13): 4618.

50. Tanimoto A., Witaicenis A., Caruso Í. P., Piva H. M. R., Araujo G. C., Moraes F. R., Fossey M. C., Cornélio M. L., Souza F. P., Di Stasi L. C., 4-Methyl esculetin, a natural coumarin with intestinal anti-inflammatory activity, elicits a glutathione antioxidant response by different mechanisms. *Chem Biol Interact.* 2020; 315: 108876.
51. Blois M. S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 1958; 181: 1199-1200.
52. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay., *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(9-10): 1231-1237.
53. Pryor W. A., Squandrito G. L., The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995; 268: L699-722.
54. Hobbs A. J., Higgs A., Moncada S., Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39: 191-220.
55. Jung H. W., Park Y. K., Effects of subfractions of *Coptidis Rhizoma* extract on the nitric oxide production in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *Korean J Herbol.* 2007; 22(2): 73-78.
56. Chell S., Kaidi A., Williams A. C., Paraskeva C., Mediators of PGE₂ synthesis and signalling downstream of COX-2 represent potential targets for the

- prevention/treatment of colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1766(1): 104-119.
57. Adebayo S. A., Shai L. J., Eloff J. N., First isolation of glutinol and a bioactive fraction with good anti-inflammatory activity from n-hexane fraction of *Peltophorum africanum* leaf. *Asian Pac J Trop Med*. 2017; 10(1): 42-46.
58. Kim E. H., Choi Y. S., Kim Y. M., Antioxidative and anti-inflammatory effect of *Phellinus igniarius* on RAW 264.7 macrophage cells. *J Exerc Rehabil*. 2019; 15(1): 2-7.
59. Yeom M. J., Choi B. H., Han D. O., Lee H. J., Shim I. S., Kim S. H., Hahm D. H., In vitro inhibition of pro-inflammatory mediator mRNA expression by nephrite in lipopolysaccharide-induced mouse macrophage cells. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2007; 18(6): 1622-1627.
60. Jeong J. B., Hong S. C., Jeong H. J., Koo J. S., Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J Plant Res*. 2012; 25(3): 299-307.
61. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1754(1-2): 253-262.
62. Jang B. C., Paik J. H., Kim S. P., Shin D. H., Song D. K., Park J. G., Suh M. H., Park J. W., Suh S. I., Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF- κ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cellular signalling*. 2005; 17(5): 625-633.

63. Kim K. N., Ko Y. J., Kang M. C., Yang H. M., Roh S. W., Oda T., Jeon Y. J., Jung W. K., Heo S. J., Yoon W. J., Kim D. K., Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one mediated by suppression of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2014; 53: 371-375.
64. Cheung D. W., Koon C. M., Wat E., Ko C. H., Chan J. Y., Yew D. T., Leung P. C., Chan W. Y., Lau C. B., Fung K. P., A herbal formula containing roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) and *Pueraria lobata* (Gegen) inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through inhibition of nuclear factor κ B (NF κ B) pathway. *J Ethnopharmacol.* 2013; 145(3): 776-783.
65. Reber L., Vermeulen L., Haegeman G., Frossard N., Ser276 phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS One*, 2009; 4(2): e4393.
66. Zhang Z., Jian S., Tian H., Zeng Y. He K., Lin L., Ethyl acetate fraction from *Nymphaea hybrida* Peck modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and acute inflammation murine models. *J Ethnopharmacol.* 2021; 269: 113698.