



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 세포주에서
7-Hydroxy-4-Methlycoumarin의
항염증과 멜라닌생성 증진 효과

제주대학교 대학원

화학과

김 관 보

2022년 2월



마우스 세포주에서 7-Hydroxy-4-Methlycoumarin의 항염증과 멜라닌생성 증진 효과

지도교수 현 창 구

김 관 보

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2022년 2월

김관보의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장

金原亨



위 원

尹景奘



위 원

玄昌久



제주대학교 대학원

2022년 2월



Effects of 7-Hydroxy-4-Methylocoumarin
on Anti-inflammation and Melanogenesis
in Mouse Cell Lines

Kwan Bo Kim

(Supervised by professor Chang-Gu Hyun)

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

2021. 12.

This thesis has been examined and approved.

Wan Hyung Kim
Kyung-Sup Yoon

CHANG-GU HYUN

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

7-Hydroxy-4-methylcoumarin (7H-4MC) inhibits hyaluronic acid production in multiple cell lines and tissue types both in vitro and in vivo. However, the pharmacological efficacy of 7H-4MC has not yet been reported in anti-inflammation and melanogenesis. In this study, we investigated mechanism of its anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages and mechanisms of melanin production in B16F10 murine melanoma cells. We investigated the inhibitory effects of 7H-4MC on the production of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells. We found that 7H-4MC inhibited NO and pro-inflammatory cytokines production such as prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin-6 (IL-6), interleukin (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). In addition 7H-4MC significantly inhibited experssion of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). 7H-4MC suppressed phosphorylation of c-Jun N-terminal kinases (JNK). 7H-4MC prevented nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation by reducing the phosphorylation and degradation of the inhibitor κ B- α (I κ B- α). In addition, 7H-4MC concentration-dependently increase melanin content and tyrosinase activity without being cytotoxic in B16F10 cells. Furthermore, 7H-4MC increased the expression of proteins associated with regulating melanin synthesis such as tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), 2 (TRP-2), tyrosinase and microphthalmia-associated transcription factor (MITF). These results suggest that possibility of 7H-4MC may be an anti-inflammatory and hypopigmentation drug.

Key words : 7-hydroxy-4-methylcoumarin, inflammation, melanogenesis

목 차

ABSTRACT	1
목 차	2
LIST OF FIGURES	4
I. 서 론	6
II. 재료 및 방법	14
1. 시료 및 시약	14
2. 실험방법	15
2.1. RAW264.7 세포 내에서 7H-4MC의 항염증 효과	15
2.1.1. 세포 배양	15
2.1.2. 세포 생존율	16
2.1.3. NO 생성량 측정	17
2.1.4. PGE ₂ 및 Pro-inflammation cytokines 측정	18
2.1.5. Western Blot 분석	19
2.2. B16F10 세포 내에서 7H-4MC의 멜라닌생성 효과	20
2.2.1. 세포 배양	20
2.2.2. 세포 생존율	21
2.2.3. Melanin Contents 측정	22
2.2.4. Tyrosinase Activity 측정	23
2.2.5. Western Blot 분석	24
3. 통계처리	25

III. 결 과	26
1. RAW264.7 세포 내에서 7H-4MC의 항염증 효과	26
1.1. 세포 생존율	26
1.2. NO 및 PGE ₂ 에 대한 7H-4MC의 영향	28
1.2.1. NO 생성량 측정	28
1.2.2. PGE ₂ 생성량 측정	28
1.3. iNOS 및 COX-2 발현량 측정	30
1.4. Pro-inflammatory cytokines 생성에 미치는 7H-4MC의 영향	32
1.5. MAPK 신호전달경로에 대한 7H-4MC의 영향	34
1.6. NF- κ B 신호전달경로에 대한 7H-4MC의 영향	36
1.6.1. I κ B- α 에 대한 7H-4MC의 영향	36
1.6.2. NF- κ B 핵 전위에 대한 7H-4MC의 영향	38
2. B16F10 세포 내에서 7H-4MC의 멜라닌생성 효과	40
2.1. 세포 생존율	40
2.2. Melanin Contents에 대한 7H-4MC의 영향	42
2.3. Tyrosinase Activity에 대한 7H-4MC의 영향	44
2.4. 멜라닌생성 관련 효소 발현에 미치는 7H-4MC의 영향	46
2.5. MITF 발현에 미치는 7H-4MC의 영향	48
IV. 고 찰	50
V. 참고문헌	54

LIST OF FIGURES

Figure 1. Mechanisms regulating of 7H-4MC against inflammation in LPS-induced RAW264.7 cells	8
Figure 2. Mechanisms regulating of 7H-4MC against melanogenesis in B16F10 melanoma cells	11
Figure 3. Melanin biosynthesis pathway	11
Figure 4. Structure of 7H-4MC	13
Figure 5. Effects of 7H-4MC on the viability in RAW264.7 cells	27
Figure 6. Effects of 7H-4MC on production NO and PGE ₂ in LPS-induced RAW264.7 cells	29
Figure 7. Effects of 7H-4MC on expression of iNOS and COX-2 in LPS-induced RAW264.7 cells	31
Figure 8. Effects of 7H-4MC on production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells	33
Figure 9. Effects of 7H-4MC on expression of P-ERK, P-JNK and P-p38 in LPS-induced RAW264.7 cells	35
Figure 10. Effects of 7H-4MC on expression of I κ B- α in LPS-induced RAW264.7 cells	37

Figure 11. Effects of 7H-4MC on expression of NF- κ B in LPS-induced RAW264.7 cells	39
Figure 12. Effects of 7H-4MC on expression of NF- κ B (p65; cytoplasm and nucleus) in LPS-induced RAW264.7 cells	39
Figure 13. Effects of 7H-4MC on the viability in B16F10 cells	41
Figure 14. Effects of 7H-4MC on production of melanin in B16F10 melanoma cells	43
Figure 15. Effects of 7H-4MC on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells	45
Figure 16. Effects of 7H-4MC on expression of TRP-1, TRP-2 and Tyrosinase in B16F10 melanoma cells	47
Figure 17. Effects of 7H-4MC on expression of MITF in B16F10 melanoma cells	49

I. 서 론

염증 (inflammation)은 외부 자극과 감염 (infection) 및 조직 손상과 같은 유해한 자극에 의해 유발되는 방어 반응이다[1]. 이런 반응은 수많은 질병과 관련된 일반적인 반응이고 기본 병리학적 과정이다[2]. 하지만 과도한 염증 반응이나 만성 염증은 당뇨병, 관절염, 심장병 및 신경 퇴행성 질환과 같은 다양한 질병의 발병기전과 밀접한 관련 있다[3-5]. 따라서 과도한 염증 반응이나 만성 염증을 억제하는 것은 염증성 질병의 효과적인 치료 방법으로 여겨진다.

대식세포 (macrophage)는 병원체 (pathogen) 인식, 및 식균 작용 (phagocytosis)을 통한 감염에 대한 방어 반응에 중요한 역할을 한다[6-8]. 내독소 (endotoxin)인 lipopolysaccharide (LPS) 는 그람 음성 박테리아 (gram-negative bacteria)의 외막의 구성 요소이다. LPS는 대식세포의 세포막에 위치한 toll-like receptor 4 (TLR4)와 결합하여 mitogen activated protein kinase (MAPK) 및 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 등 다양한 신호전달경로(signaling pathway)를 활성화하여 염증을 유발한다[9].

활성화된 MAPK 및 NF- κ B 신호전달경로는 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 염증 매개체와 interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 전염증성 사이토카인 (pro-inflammation cytokine)의 생성을 촉진한다[10].

염증 매개체 중 NO는 광범위한 생리 기능에 관여하는 중요한 신호 분자이다. NO는 산화질소 합성 효소 (nitric oxide synthase, NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. NOS에는 endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) 및 inducible (iNOS)가 있다. eNOS와 nNOS는 낮은 수준의 NO만을 생성하여 신경 신호를 제공하고 신체 항상성을 유지하는 데 도움을 준다. 하지만 iNOS는 LPS

와 같은 자극을 통해 과량의 NO를 생성한다. NO가 염증 및 면역 반응에 중요한 역할을 한다는 것으로 알려져 있으나, iNOS에 의해 생성된 과량의 NO는 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환을 유발한다[11]. 또 다른 염증 매개체인 PGE₂는 cyclooxygenase (COX) 효소에 의해 합성된다. COX 효소는 2가지 형태의 COX-1과 COX-2로 존재한다. COX-1은 정상 상태에서 항상성에 필요한 prostaglandin을 생산하는 반면, COX-2는 염증 반응에 관여하는 유도성 효소이다. 외부 손상을 받으면 세포막 성분인 인지질에서 arachidonic acid이 세포 내로 유리 (isolation)되어 COX-2에 의해 PGE₂가 합성되며 이는 많은 염증성 질환의 발병에 기여한다[12].

MAPK 신호전달경로는 염증성 매개체, 세포사멸 (apoptosis) 유도 인자, 산화적 스트레스 등과 같은 자극에 의해 세포의 증식, 분화 및 세포 자멸사를 조절하고 만성 염증 및 암(cancer)을 포함한 여러 질병에 관여한다[13, 14]. MAPK는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK), p38 MAPK kinase (p38)으로 구성되었다. 이러한 전사인자들이 인산화 (phosphorylation)를 통해 활성화되면 여러 전염증성 사이토카인의 발현이 촉진되고 염증이 유발된다[15,16].

NF- κ B 신호전달경로는 염증성 매개체 및 전염증성 사이토카인 발현을 조절하여 염증 및 면역 반응에서 중추적인 역할을 하는 transcription factor이다[17]. 평상시 NF- κ B (p50/p65 complex)는 세포질 내에서 inhibitor κ B (I κ B)와 결합한 비활성 복합체 (complex)로 존재한다[18]. LPS와 같은 자극을 받으면 I κ B kinase (IKK)는 I κ B- α 의 인산화를 유도한다. 인산화된 I κ B- α 는 NF- κ B 복합체와 분리되고, I κ B- α 는 유비퀴틴화 (ubiquitination) 되어 분해된다. 인산화된 NF- κ B는 활성화되어 세포질에서 핵 내로 이동한다. 핵 내로 이동한 NF- κ B는 전염증성 사이토카인과 COX-2 및 iNOS의 유전자 발현을 증가시켜 염증을 발생시킨다 [19,20].

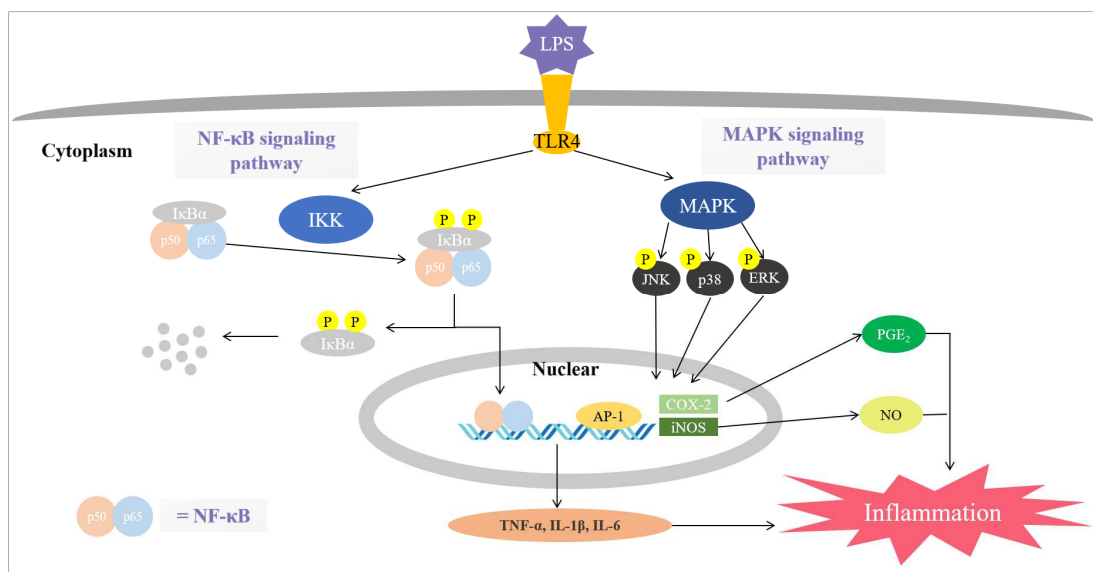


Figure 1. Mechanisms regulating of 7H-4MC against inflammation in LPS-induced RAW264.7 cells.

인간의 피부와 머리카락의 색은 멜라닌 (melanin) 함량에 의해 결정된다[21]. 멜라닌의 유형과 분포에 의해 인간의 피부와 머리카락의 검정 (black), 적색 (red), 갈색 (brown), 노랑 (yellow), 흰색 (white; without melanin) 5가지 기본 색상이 나타난다[22]. 또한, 멜라닌은 열을 흡수하고, 자외선 (ultraviolet, UV)을 차단하여 피부를 보호하는 기능을 한다[22, 23]. 멜라닌이 적은 피부는 멜라닌이 많은 피부보다 피부암(skin cancer)에 걸릴 가능성이 약 70배 더 높으며, 멜라닌생성이 감소하면 백색증 (albinism), 백반증 (Vitiligo)과 같은 저색소침착증 (hypopigmentation)이나 흰머리 (gray hair)등이 나타나게 된다[24-27].

멜라닌은 멜라닌 형성 세포 (melanocyte)에서 생성된다. 멜라닌 형성 세포는 피부의 표피 (epidermis) 기저층 (basal layer)에 존재하며 멜라노솜 (melanosome)을 포함한다[28]. 멜라노솜은 멜라닌 형성 세포 내에 존재하는 세포 소기관으로서 멜라닌을 생성하고, 생성된 멜라닌은 인접한 각질 세포로 전달하는 역할을 한다[29,30].

멜라닌은 멜라닌 합성 과정에 따라 흑갈색을 띠는 유멜라닌 (eumelanin)과 붉은색을 띠는 페오멜라닌 (pheomelanin)이 생성된다[31]. 멜라닌 생합성 과정 초기에 tyrosine이 dihydroxyphenylalanine (DOPA)와 DOPA quinone으로 산화된다[32]. Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA로 하이드록시화 (hydroxylation)하는 반응과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화 (oxidation)하는 반응을 촉매한다[33]. DOPA quinone에서 이뤄지는 반응에 의해 유멜라닌이나 페오멜라닌으로 나뉘게 된다. DOPA quinone이 DOPA chrome으로 산화되고 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)가 생성되는 등 여러 반응을 통해 유멜라닌이 생성된다. 유멜라닌 생성 과정에서 tyrosinase-related protein-1 (TRP-1)은 DHICA의 산화에 관여하며, tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)는 DOPA chrome에서 DHICA로 산화되는 반응에 관여한다. DOPA quinone이 glutathione이나 cysteine과 결합하면 페오멜라닌이 생성된다[31,34,35].

UV에 의해 피부가 자극되면 피부 각질 세포로부터 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)가 분비된다[36]. α -MSH는 멜라닌 형성 세포에 신호를 전달하고, 여러 멜라닌생성 신호전달경로를 활성화한다[37]. 활성화된 신호전달경로들은 MITF의 발현을 증가시키고 이는 멜라닌 형성 세포의 핵 내에서 멜라닌 합성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 멜라닌 합성 효소들을 생성을 증가시켜 최종적으로 멜라닌의 합성을 유도한다[38,39,40].

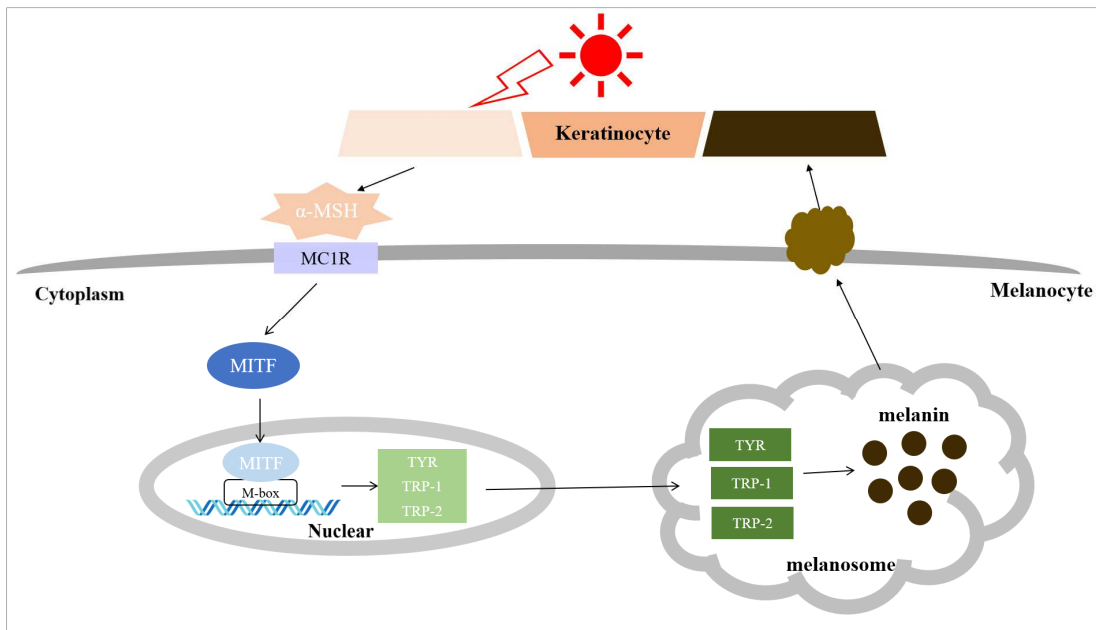


Figure 2. Mechanisms regulating of 7H-4MC against melanogenesis in B16F10 melanoma cells.

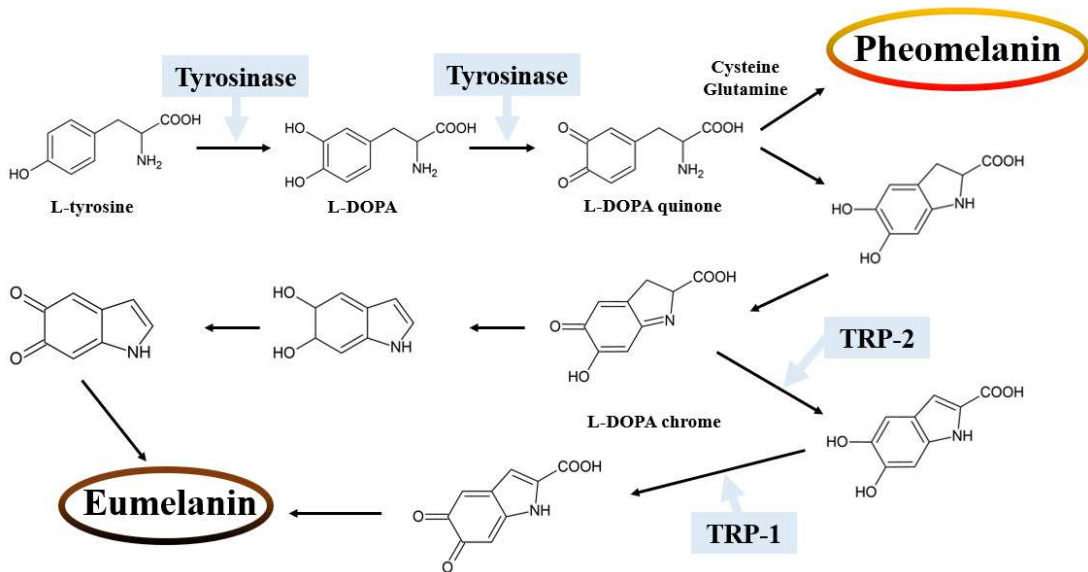


Figure 3. Melanin biosynthesis pathway.

쿠마린 (coumarin)은 자연계에 널리 분포한 벤조피론 (benzopyrone) 계열 화합물이다. 쿠마린은 benzene ring과 α -pyrone ring이 결합한 락톤 (lactone) 화합물이다[41,42]. 쿠마린과 그 유도체는 많은 유기체에서 자연적으로 발생하며, 1300개 이상의 쿠마린이 식물, 박테리아 및 곰팡이의 2차 대사물질로 확인되었다 [43,44]. 특히 운향과 (Rutaceae) 및 미나리과 (Umbelliferae)에서 배당체 등으로 존재한다[45]. 천연 및 합성 쿠마린은 항응고제, 항염증, 항바이러스, 항종양 및 항산화, 항균 등의 약리학적 활성이 있어 많은 관심을 받고 있다[46-50].

다양한 쿠마린 유도체 중 7-hydroxy-4-methylcoumarin (7H-4MC)은 유럽과 아시아에서 “Hymecromone”이라는 진경제 일반의약품으로 판매되고 있다[51]. 7H-4MC은 섬유아세포, 각질 세포, 췌장암 세포를 포함한 여러 세포주에서 hyaluronic acid (HA) 합성을 억제하는 것으로 나타났다[53,54]. HA 합성 억제제로서 7H-4MC은 담도 경련 치료에 사용된다[52]. HA는 TLR4와 같은 세포 표면 수용체에 결합하여 염증, 조직 손상, 복구 및 섬유증을 조절할 수 있다. 7H-4MC은 이것 외에도 항산화, 항암, 항균 등 다양한 약리학적 성질을 가지고 있지만 [55-58], LPS로 유도된 RAW264.7 마우스 대식세포에서 항염증 효능과 B16F10 흑색종 세포에서의 멜라닌생성에 대한 효능은 아직 조사되지 않았다. 따라서 7H-4MC이 LPS로 유도된 RAW264.7 마우스 대식세포에서 염증 억제 및 그 작용 기전과 B16F10 마우스 흑색종 세포에서의 멜라닌생성에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

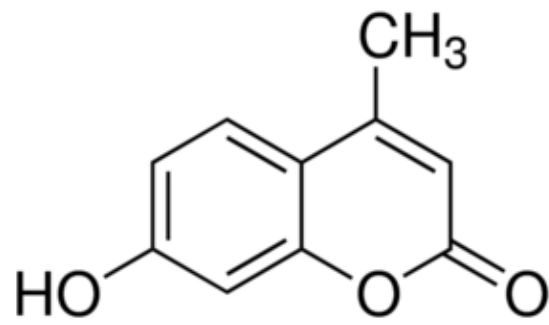


Figure 4. Structure of 7H-4MC.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용한 7-hydroxy-4-methylcoumarin은 ChemFaces Biochemical (co, Ltd, Wuhan, china)에서 구입하였다. Fetal Bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 그리고 penicillin/streptomycin은 Merck Millipore (Burlington, MA, United States)에서 구입하였다. Bicinchoninic acid (BCA) protein kit 및 NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Protease inhibitor cocktail, lipopolysaccharide (LPS), griess reagent 은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PGE₂ ELISA kit는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. Mouse IL-1 β ELISA kit는 R&D System (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Mouse IL-6 ELISA kit와 Mouse TNF- α ELISA kit는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Western blot 1차 항체(Primary Antibody) 중 anti-COX-2 항체와 anti-iNOS 항체는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, protease/phosphatase inhibitor cocktail과 P-JNK, P-ERK, P-p38, I κ B- α , β -actin 그리고 anti-mouse와 anti-rabbit 2차 항체(Secondary Antibody)는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 2X Laemmli sample buffer와 Tween 20은 Bio-rad (Hercules, CA, USA), skim milk는 BD Difco (Sparks, MD, USA), bovine serum albumin (BSA)는 Bovostar (Bovogen, Melbourne, Australia)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), enhanced chemiluminescence (ECL) kit, dimethyl sulfoxide (DMSO), radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer, 20X Tris buffered Saline (TBS) 그리고 phosphate buffered saline (PBS)는 Biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다.

2. 실험방법

2.1. RAW264.7 세포 내에서 7H-4MC의 항염증 효과

2.1.1. 세포 배양

RAW264.7 대식세포는 FBS와 penicillin-streptomycin을 각각 10% (v/v)와 1% (v/v)로 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 2일 간격으로 계대배양 하였고, 37°C, 5% CO₂ 습윤 배양기에서 배양하였다.

2.1.2. 세포 생존율

7H-4MC이 세포 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT 법을 수행하였다. MTT 법은 노란색의 수용성인 MTT tetrazolium을 보라색의 비수용성인 MTT formazan으로 환원되는 원리를 이용한다. MTT formazan은 DMSO와 같은 유기 용매에 녹이고 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하는데, 이 흡광도는 각 well에 존재하는 생존 세포 수와 비례한다. 이러한 원리를 이용하여 측정된 흡광도에 따라 살아있는 세포를 정량적으로 평가한다[59].

RAW264.7 세포를 24-well plate에 well 당 1.5×10^5 cells/well로 분주한 후 24 시간 동안 배양하였다. 7H-4MC (62.5, 125, 250 및 500 μ M)과 LPS (1 μ g/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다. 그런 다음 상층액을 모두 제거하고 MTT 시약 (0.4 mg/mL in DMEM)을 well 당 400 μ L씩 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 반응 시간이 끝난 후 상층액을 모두 제거하고, DMSO를 800 μ L씩 넣어 30분간 형성된 formazan 결정을 용해하였다. Spectrophotometric microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.1.3. NO 생성량 측정

7H-4MC이 LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포에서 NO 생성억제 효과를 측정하기 위해 griess reagent를 이용하여 실험을 수행하였다. 일산화질소 (NO)의 반감기가 4초로 매우 짧아 일산화질소가 생성하는 대사물질인 아질산염 (nitrite, NO_2)와 질산염 (nitrogen trioxide, NO_3)을 통해 간접적으로 측정하는 방법이다. 여기서 생성된 질산염 (nitrate, NO_3)은 griess reagent에 들어있는 질산환원효소 (nitrate reductase, nitratoreductase)에 의해 아질산염으로 환원된다. 이렇게 생성된 아질산염은 griess reagent에 첨가된 sulfanilamide와 반응 후 다시 H_2O 와 나프틸에틸렌디아민 (naphthylenediamine)과 만나 아조 화합물 (azo compound)을 형성한다. 연한 붉은색을 띠는 아조 화합물은 540nm에서 흡광도를 측정한다 [60, 61].

RAW264.7 대식세포를 24-well plate에 well 당 1.5×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 배양하였다. 7H-4MC (62.5, 125, 250 및 500 μM)과 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 24시간 동안 처리하였다. 세포 배양상층액 100 μL 와 griess reagent 100 μL 를 혼합하여 15분간 반응시킨 후, spectrophotometric microplate reader를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.1.4. PGE₂ 및 Pro-inflammatory cytokines 측정

RAW264.7 대식세포를 24-well plate에 well 당 1.5×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 배양하였다. 7H-4MC (62.5, 125, 250 및 500 μ M)과 LPS (1 μ g/mL)를 24시간 동안 처리하였다. 세포 배양상층액을 10,000 rpm으로 5분간 원심 분리한 후, 상층액을 회수하여 PGE₂ 및 전염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 생성량을 ELISA kit 실험방법에 따라 수행하였다.

2.1.5. Western Blot 분석

RAW264.7 대식세포를 60 mm culture dish에 8×10^5 cells/dish로 3 mL씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 7H-4MC (62.5, 125, 250 및 500 μ M)과 LPS (1 μ g/mL)를 24시간 처리하였다. 상층액을 제거하고 차가운 1×PBS로 세척한 후, 세포를 1% protease/phosphatase inhibitor cocktail을 함유한 RIPA buffer를 사용하여 4°C에서 20분간 세포를 용해(lysis)하였다. 세포를 1.5 mL e-tube에 모아준 뒤 -8°C, 15,000 rpm 조건에서 20분간 원심 분리하였다. 핵과 세포질의 단백질을 분리하는 NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit 실험 방법에 따라 진행하였다. 단백질 함량은 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였다. Loading sample은 단백질을 2X laemmli sample buffer와 동일한 비율로 혼합하고 100°C에서 5분간 가열하여 제조하였다. Loading sample은 10% SDS-PAGE 상에서 분리하였고 Polyvinylidene Fluoride(PVDF) membrane으로 옮겨주었다. membrane은 4% skim milk로 2시간 동안 blocking 한 후 TBST로 10분씩 6회 세척하였다. TBST에 희석한 1차 항체와 membrane을 4°C에서 overnight한 후, TBST로 6회 세척하였다. TBST에 희석한 2차 항체와 membrane을 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 TBST로 6회 세척 하였다. 세척한 다음 ECL kit를 사용하여 band를 현상하였다.

2.2. B16F10 세포 내에서 7H-4MC의 멜라닌생성 효과

2.2.1. 세포 배양

B16F10 흑색종 세포는 FBS와 penicillin-streptomycin을 각각 10% (v/v)와 1% (v/v)로 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 3일 간격으로 계대배양 하였고, 37°C, 5% CO₂ 습윤 배양기에서 배양하였다.

2.2.2. 세포 생존율

B16F10 세포를 24-well plate에 well 당 7×10^3 cells/well로 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 7H-4MC (25, 50, 100 및 200 μ M)와 양성대조군으로 α -MSH (100 nM) 72시간 동안 처리하였다. 그런 다음 상층액을 모두 제거하고 MTT 시약 (0.4 mg/mL in DMEM)을 well 당 400 μ L씩 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 상층액을 모두 제거한 다음 DMSO를 800 μ L씩 넣어 30분 동안 형성된 formazan 결정을 용해하였다. Spectrophotometric microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.3. Melanin Contents 측정

B16F10 세포를 60 mm culture dish에 6×10^4 cells/dish로 3mL씩 분주하여 24시간 배양하였다. 7H-4MC (25, 50 및 100 μ M)과 양성대조군인 α -MSH (100 nM)를 72시간 처리하였다. 상층액을 제거하고 차가운 1×PBS로 세척한 후, 세포를 RIPA buffer를 사용하여 4°C에서 20분간 용해 (lysis) 하였다. 세포를 1.5 mL e-tube에 모아준 뒤 -8°C, 15,000 rpm 조건에서 20분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH을 200 μ L씩 넣고 90°C에서 5분간 용해시켰다. Spectrophotometric microplate reader를 통해 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.4. Tyrosinase Activity 측정

B16F10 세포를 60 mm culture dish에 6×10^4 cells/dish로 3mL씩 분주하여 24시간 배양하였다. 7H-4MC (25, 50 및 100 μ M)과 양성대조군으로 α -MSH (100 nM)를 72시간 처리하였다. 상층액을 제거하고 차가운 1 \times PBS로 세척한 후, 세포를 RIPA buffer를 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 용해(lysis)하였다. 세포를 1.5 mL e-tube에 모아준 뒤 -8 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm 조건에서 20분간 원심 분리하였다. 단백질 함량은 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였다. 그런 다음 일정한 단백질량으로 제조한 단백질 20 μ L와 L-DOPA (2 mg/mL) 80 μ L을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 후, spectrophotometric microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.5. Western Blot 분석

B16F10 세포를 60 mm culture dish에 6×10^4 cells/dish로 3mL씩 분주하여 24시간 배양하였다. 7H-4MC (25, 50 및 100 μ M)과 양성대조군으로 α -MSH (100 nM)를 72시간 동안 처리하였다. 상층액을 제거하고 차가운 1×PBS로 세척한 후, 세포를 1% protease inhibitor cocktail을 함유한 RIPA buffer를 사용하여 4°C에서 20분간 용해(lysis) 하였다. 세포를 1.5 mL e-tube에 모아준 뒤 -8°C, 15,000 rpm 조건에서 20분간 원심 분리하였다. 단백질 함량은 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였다. 그런 다음, 단백질을 2X laemmli sample buffer와 동일한 비율로 혼합하고 100°C에서 5분간 가열하여 loading sample을 만들었다. Loading sample을 10% SDS-PAGE로 분리하고 PVDF membrane으로 옮겨주었다. membrane은 4% skim milk로 2시간 동안 blocking 한 후 TBST로 10분씩 6회 세척하였다. TBST에 희석한 1차 항체와 membrane을 4°C에서 overnight한 후, TBST로 6회 세척하였다. TBST에 희석한 2차 항체와 membrane을 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, TBST로 6회 세척 하였다. 세척 후 ECL kit를 사용하여 band를 현상하였다.

3. 통계처리

모든 실험의 결과는 세 번의 독립적인 실험을 평균 \pm 표준편차 (SD; $n = 3$)로 표현된다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group. 통계적 유의성 및 p 값은 Student's t -test을 사용하여 계산하였다.

Ⅲ. 결 과

1. RAW264.7 세포 내에서 7H-4MC의 항염증 효과

1.1. 세포 생존율

RAW264.7 세포에서 7H-4MC의 세포독성이 나타나지 않는 농도 범위를 찾기 위해 MTT법을 수행하였다. 세포 생존율은 미처리군을 기준으로 90% 이상의 생존율을 보였을 때, 독성이 없다고 판단하였다.

62.5, 125, 250 및 500 μ M의 7H-4MC과 1 μ g/mL의 LPS를 처리한 결과, 미처리군을 100%라 하였을 때 음성대조군으로 사용된 LPS는 95%로 세포독성에 영향을 주지 않았다. LPS와 7H-4MC을 동시에 처리하였을 때 모든 농도에서 생존율이 90% 이상을 나타내었다. 이는 다음과 같은 농도 범위에서 7H-4MC은 세포의 생존율에 유의미한 영향을 미치지 않는 것을 의미한다. 따라서 이후 실험은 500 μ M 이하의 농도에서 실험을 진행하였다(Fig. 5).

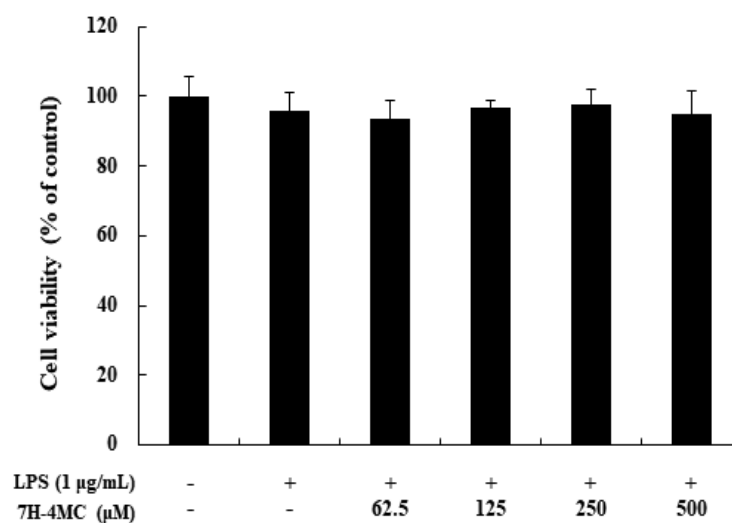


Figure 5. Effects of 7H-4MC on the viability in RAW264.7 cells. Cells were seeded in 24-well plates and incubated for 24h. Cells were treated with 7H-4MC (62.5, 125, 250 and 500 µM) and LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. Cytotoxicity of 7H-4MC was evaluated using a MTT assay. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments.

1.2. NO 및 PGE₂에 대한 7H-4MC의 영향

1.2.1. NO 생성량 측정

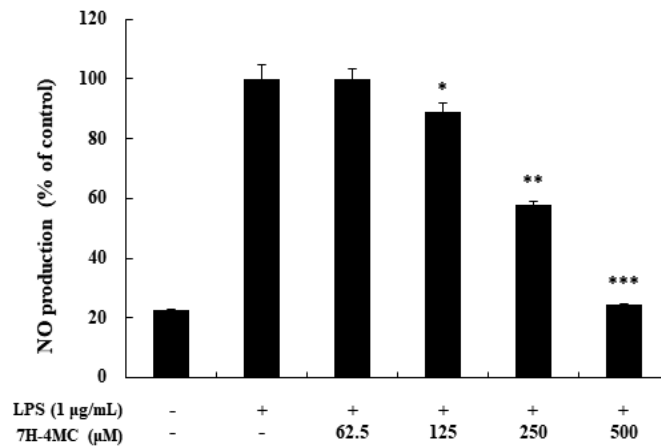
과도한 NO의 생성은 염증성 질환을 유발한다. 따라서 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 7H-4MC이 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지 griess reagent를 사용하여 확인해 보았다.

실험 결과 LPS 단독처리 시 NO 생성량이 현저히 증가하였다. LPS를 처리한 조건에서 7H-4MC을 62.5, 125, 250 및 500 μ M 농도로 처리하였을 때, LPS 단독 처리군을 기준으로 각각의 농도에서 1.02%p, 20%p, 75%p 만큼 NO 생성이 감소하였다(Fig. 6).

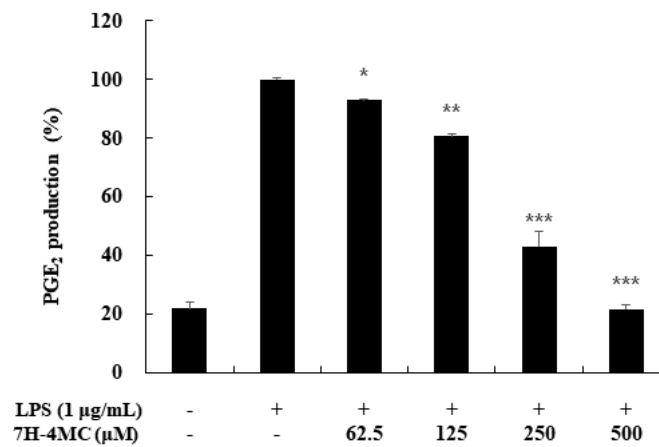
1.2.2. PGE₂ 생성량 측정

PGE₂는 NO와 마찬가지로 염증을 매개하며 PGE₂의 생성량이 증가하면 염증이 유발된다. 따라서 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 7H-4MC이 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 ELISA kit를 사용하여 측정하였다.

실험 결과 LPS 단독처리 시 PGE₂ 생성량이 증가하였고, LPS를 처리한 조건에서 7H-4MC을 62.5, 125, 250 및 500 μ M 농도로 처리하였을 때, LPS 단독 처리군을 기준으로 각각의 농도에서 7%p, 19.3%p, 57%p 및 78.2%p 만큼 PGE₂ 생성을 억제하였다(Fig. 6).



(a)



(b)

Figure 6. Effects of 7H-4MC on production of NO and PGE₂ in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were seeded in 24-well plates and incubated for 24h. Cells were treated with 7H-4MC (62.5, 125, 250 and 500 µM) and LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

1.3. iNOS 및 COX-2 발현량 측정

LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 NO 및 PGE₂의 생성억제가 iNOS 및 COX-2에 의해 조절되는 것인지 조사하기 위해 western blot을 통해 단백질 발현을 확인하였다.

그 결과 LPS 처리 시 iNOS와 COX-2의 발현이 증가하였고, 7H-4MC은 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것을 확인하였다. 최고 농도인 500 μM에서 iNOS의 발현을 60%p, COX-2의 발현을 98%p 저해하였다(Fig. 7).

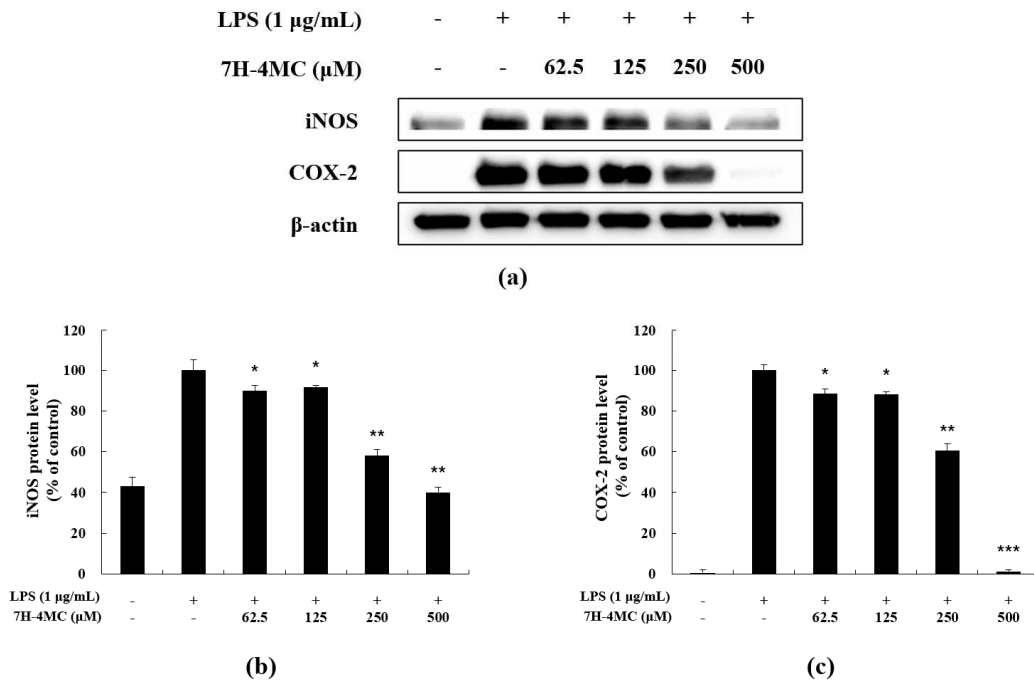


Figure 7. Effects of 7H-4MC on expression of iNOS and COX-2 in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with 7H-4MC (62.5, 125, 250 and 500 µM) and LPS (1 µg/mL) stimulation for 20 h. Western blotting results (a), protein levels of iNOS (b) and COX-2 (c). The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

1.4 Pro-inflammatory cytokines 생성에 미치는 7H-4MC의 영향

LPS로 유도된 RAW264.7 대식세포에서 염증에 관여하는 전염증성 사이토카인에 대한 7H-4MC의 억제 효과를 확인해 보기 위해 ELISA kit를 사용하여 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현을 측정하였다.

실험 결과 LPS는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 유도하였다. LPS를 처리한 조건에서 7H-4MC은 농도의존적으로 전염증성 사이토카인의 생성을 억제하였고, LPS 단독 처리를 기준으로 500 μ M 농도에서 IL-1 β 를 78%p, IL-6를 97%p, TNF- α 를 35%p 저해하였다(Fig. 8).

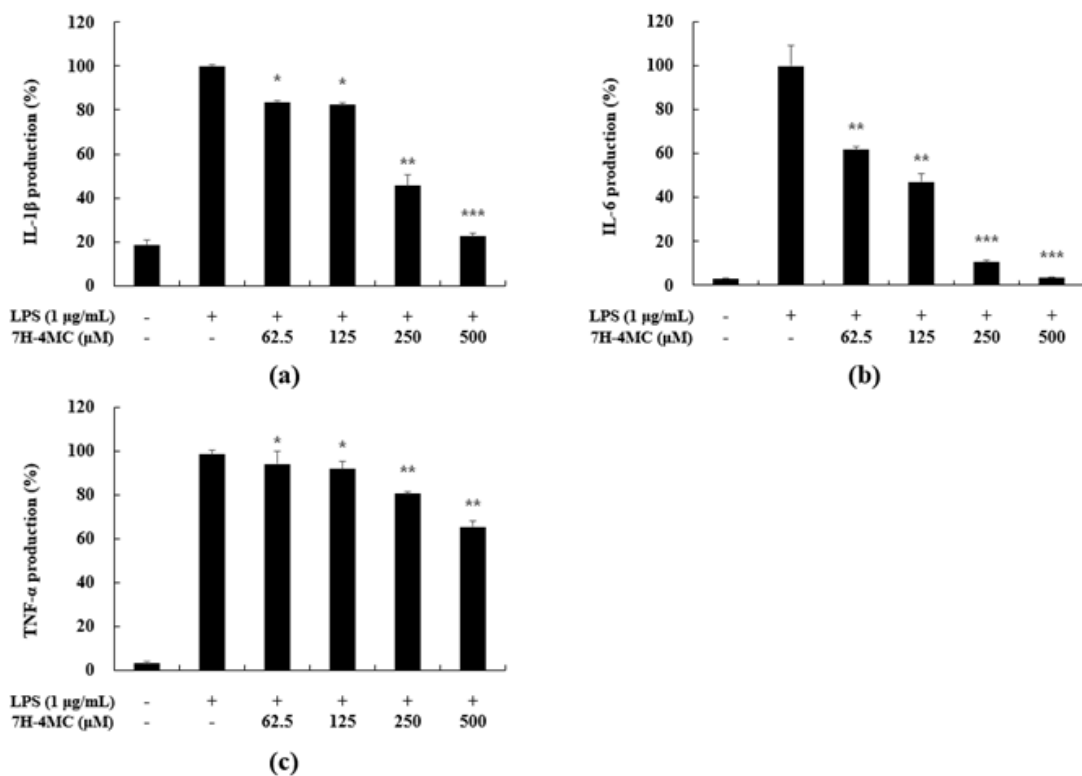


Figure 8. Effects of 7H-4MC on production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with 7H-4MC (62.5, 125, 250 and 500 μ M) and LPS (1 μ g/mL) stimulation for 24 h. IL-1 β (a), IL-6 (b), TNF- α (c), production was determined by ELISA. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

1.5 MAPK 신호전달경로에 대한 7H-4MC의 영향

MAPK 신호전달경로는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 를 포함한 전염증성 사이토카인들과 염증 매개체의 활성화를 조절하는데 중요한 신호전달경로이다. 따라서 western blot을 통해 7H-4MC이 ERK, JNK, p38의 인산화에 미치는 영향을 확인해 보고자 하였다.

실험 결과 ERK, JNK, p38의 인산화는 LPS 처리 시 현저하게 증가하였다. 7H-4MC은 ERK와 p38의 인산화에는 영향이 미치지 않았다. JNK의 인산화는 농도 의존적으로 감소시켰고, LPS 단독 처리군을 기준으로 하였을 때 500 μ M의 농도에서 33%p 저해하였다(Fig. 9).

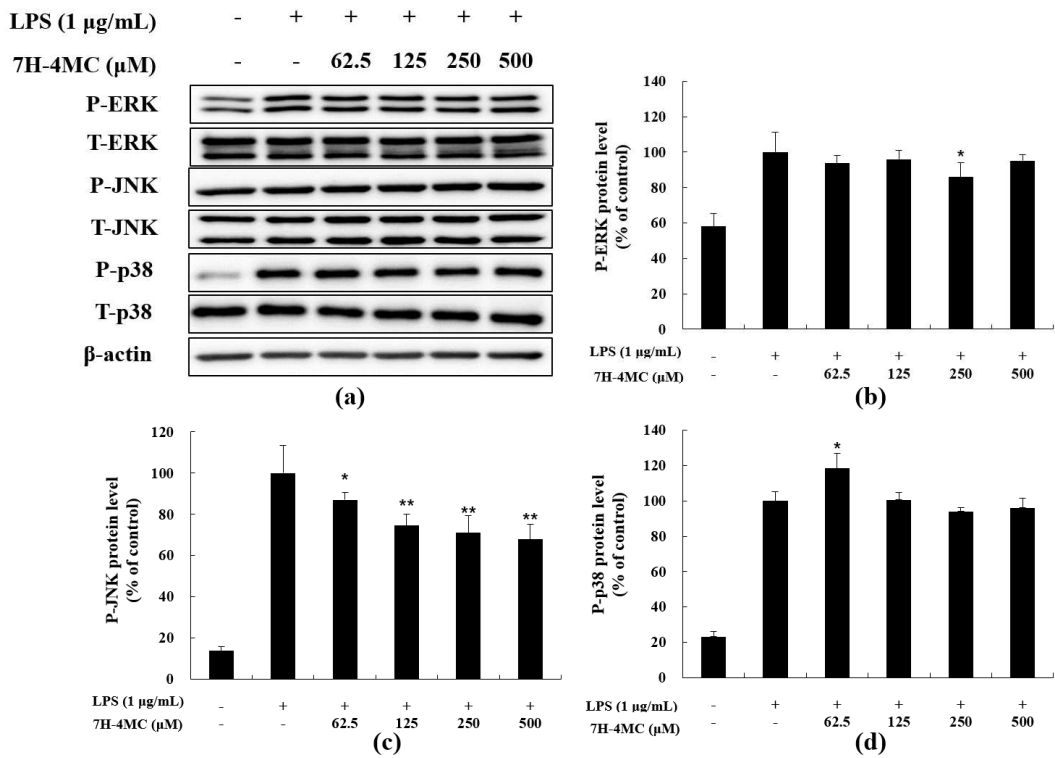


Figure 9. Effects of 7H-4MC on expression of P-ERK, P-JNK and P-p38 in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with 7H-4MC (62.5, 125, 250 and 500 μM) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) stimulation for 20 min. Western blotting results (a) and protein levels of JNK (b), ERK (c) and p38 (d). The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group.

1.6. NF- κ B 신호전달경로에 대한 7H-4MC의 영향

1.6.1. I κ B- α 에 대한 7H-4MC의 영향

LPS와 같은 자극은 I κ B- α 의 인산화와 분해를 일으키고, 활성화된 NF- κ B는 세포질에서 핵으로 이동한다. 7H-4MC가 I κ B- α 의 인산화에 미치는 영향을 확인해 보고자 western blot을 수행하였다.

실험 결과 LPS 단독 처리 시 I κ B α 의 인산화가 유도되었고, 7H-4MC는 250 μ M 이상의 농도에서 I κ B- α 의 인산화를 저해하였다. LPS 단독 처리군을 기준으로 하였을 때 500 μ M 농도에서는 65%p 만큼 I κ B- α 의 인산화를 저해하였다(Fig. 10).

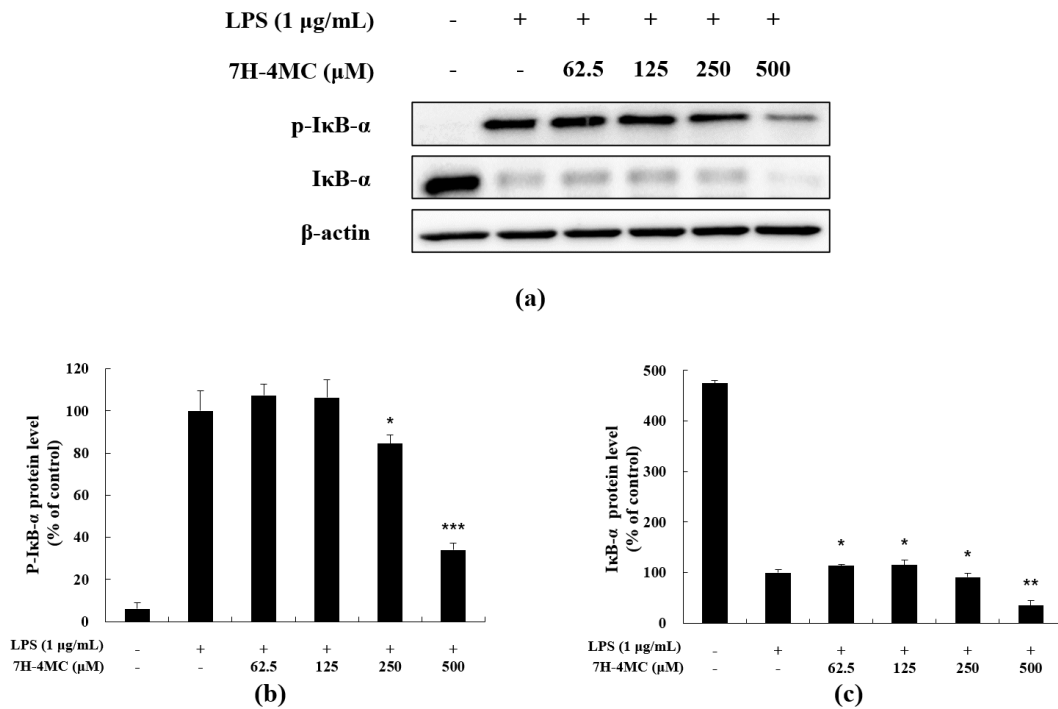


Figure 10. Effects of 7H-4MC on expression of I κ B- α in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with 7H-4MC (62.5, 125, 250 and 500 μM) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) stimulation for 15 min. Western blotting results (a) and protein levels of P-I κ B- α (b) and I κ B- α (c). The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

1.6.2. NF- κ B 핵 전위에 대한 7H-4MC의 영향

NF- κ B 신호전달경로는 염증 반응에서 염증성 유전자의 발현을 조절하는 역할을 한다고 알려져 있다. LPS로 유도된 NF- κ B의 활성화 및 핵 전위에 대한 7H-4MC의 효과를 western blot을 통해 확인해 보고자 하였다.

먼저 NF- κ B의 인산화는 LPS 처리 시 현저하게 증가하였고, 7H-4MC는 NF- κ B의 인산화를 500 μ M 농도에서 65%p 억제하였다(Fig. 11). 다음으로 세포질에서 핵으로의 NF- κ B의 전위를 확인하였다. LPS 처리 시 p65 발현이 세포질에서 감소하고 핵에서 증가하였다. 이는 NF- κ B가 세포질에서 핵으로 전위되었음을 나타낸다. 그러나 7H-4MC 처리 시 세포질에서 핵 내로 p65의 전위를 억제시킴을 확인하였다(Fig. 12).

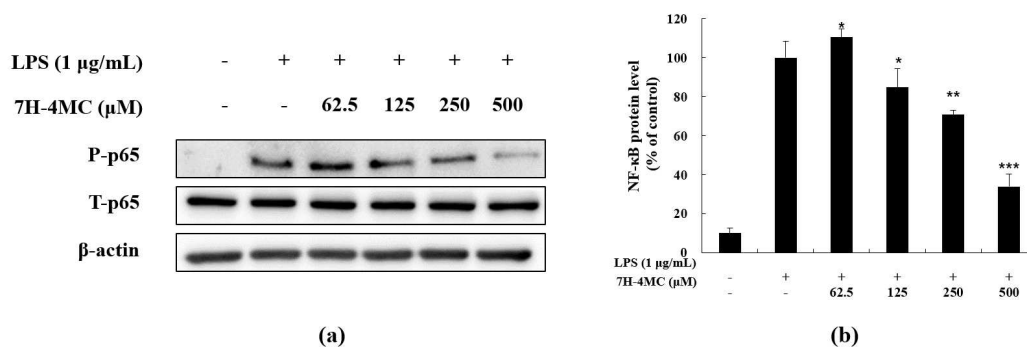


Figure 11. Effects of 7H-4MC on expression of NF- κ B in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with 7H-4MC (62.5, 125, 250 and 500 μM) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) stimulation for 15 min. Western blotting results (a) and protein levels of NF- κ B (p65) (b). The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

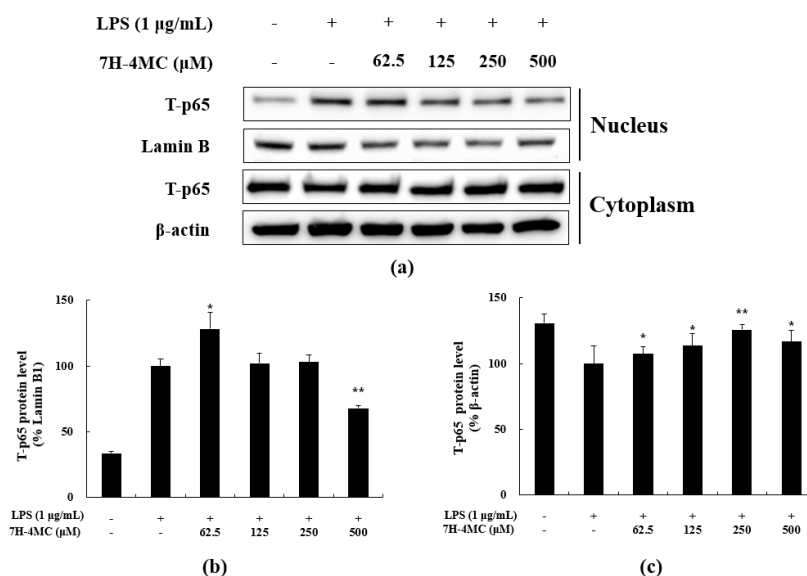


Figure 12. Effects of 7H-4MC on expression of NF- κ B (p65; cytoplasm and nucleus) in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were treated with 7H-4MC (62.5, 125, 250 and 500 μM) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) stimulation for 15 min. Western blotting results (a), protein levels of NF- κ B (p65; cytoplasm) (b) and NF- κ B (p65; nucleus) (c). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

2. B16F10 세포 내에서 7H-4MC의 멜라닌생성 효과

2.1. 세포 생존율

B16F10 세포에 대한 7H-4MC의 세포독성이 나타나지 않는 농도 범위를 찾기 위해 MTT 법을 수행하였다. 7H-4MC (25, 25, 50 및 100 μM)과 양성대조군인 $\alpha\text{-MSH}$ (100 nM)을 72시간 처리하였다.

그 결과, 미처리군을 기준으로 하였을 때 7H-4MC는 100 μM 에서 98%p, 200 μM 에서 85%p의 생존율을 보였다. 따라서 이후 실험은 세포독성이 없는 100 μM 이하 농도에서 실험을 진행하였다(Fig. 13).

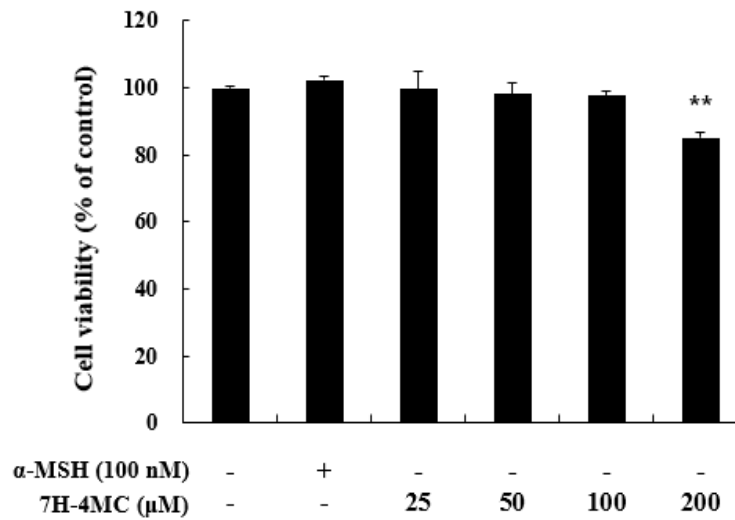


Figure 13. Effects of 7H-4MC on the viability in B16F10 cells. Cells were seeded in 24-well plates and incubated for 24h. Cells were treated with 7H-4MC (25, 50, 100 and 200 μM) and α-MSH (100 nM) for 72h. Cytotoxicity of 7H-4MC was evaluated using a MTT assay. The results are presented as the mean ± standard deviation from three independent experiments. ** $p < 0.01$ vs. control group.

2.2. Melanin Contents에 대한 7H-4MC의 영향

B16F10 세포에서 7H-4MC이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 평가하기 위해 melanin contents 실험을 진행하였다.

B16F10 세포에 7H-4MC (25, 50 and 100 μ M) 및 α -MSH (100 nM)를 72시간 동안 처리한 결과 양성대조군인 α -MSH는 미처리군에 비해 253%p 증가하였다. α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 7H-4MC은 멜라닌생성을 농도 의존적으로 증가시켰고, 최고 농도인 100 μ M의 농도에서 미처리군에 비해 182%p 증가하였다(Fig. 14).

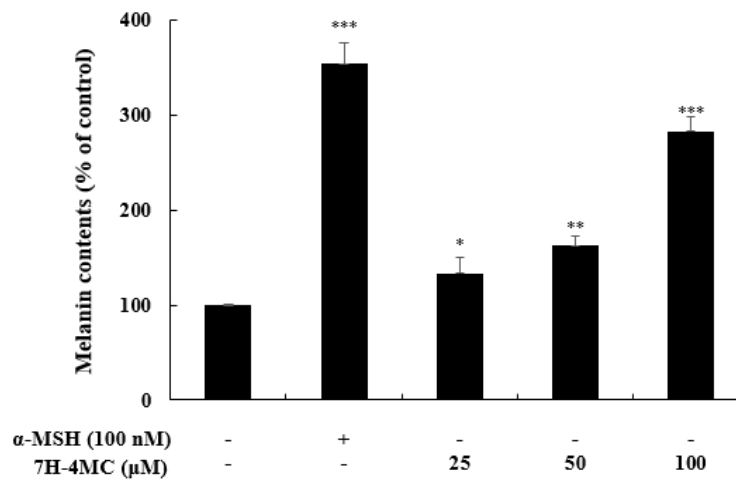


Figure 14. Effects of 7H-4MC on production of melanin in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded in 60 mm culture dish and incubated for 24 h. Cells were treated with 7H-4MC (25, 50 and 100 μM) and α-MSH (100 nM) for 72h. α-MSH was used as the positive control. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

2.3. Tyrosinase activity에 대한 7H-4MC의 영향

Tyrosinase는 멜라닌 합성 초기에 관여하는 속도 제한 효소 (rate-limiting enzyme)이다. B16F10 세포에서 7H-4MC이 tyrosinase 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해 tyrosinase activity를 진행하였다.

B16F10 세포에 7H-4MC (25, 50 and 100 μ M) 및 α -MSH (100 nM)를 72시간 동안 처리한 결과 α -MSH는 미처리군에 비해 131%p 증가하였다. α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 7H-4MC은 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 증가시켰고, 최고 농도인 100 μ M의 농도에서 미처리군에 비해 144%p 증가시켰다(Fig. 15).

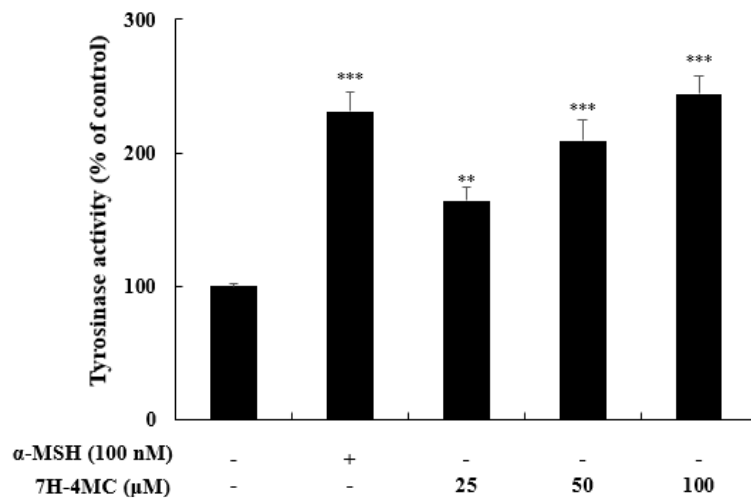


Figure 15. Effects of 7H-4MC on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded in 60 mm culture dish and incubated for 24 h. Cells were treated with 7H-4MC (25, 50 and 100 μM) and α-MSH (100 nM) for 72h. α-MSH was used as the positive control. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

2.4. 멜라닌생성 관련 효소 발현에 미치는 7H-4MC의 영향

TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase는 멜라닌 생합성을 촉매하는 효소이다. 따라서 7H-4MC이 TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 발현에 미치는 영향을 확인해 보고자 하였다.

실험 결과 α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 7H-4MC은 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 농도의존적으로 증가시켰고, 최고 농도인 100 μ M에서는 미처리군 보다 각각 45%p 및 28%p 증가시켰다. TRP-2는 50 μ M 이상의 농도에서 발현이 증가하였고, 최고농도에서 44%p 증가하였다(Fig. 16).

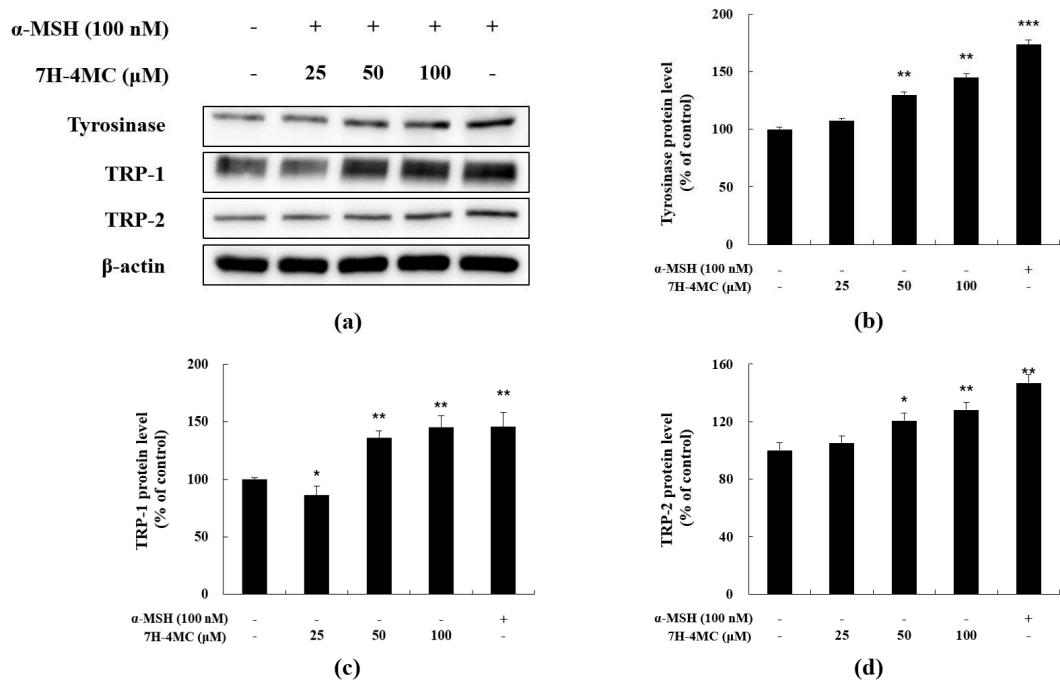


Figure 16. Effects of 7H-4MC on expression of TRP-1, TRP-2 and Tyrosinase in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded in 60 mm culture dish and incubated for 24 h. Cells were treated with 7H-4MC (25, 50 and 100 μ M) and α -MSH (100 nM) for 72h. α -MSH was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

2.5. MITF 발현에 미치는 7H-4MC의 영향

MITF는 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 발현을 조절하여 멜라닌생성에 중요한 역할을 한다. 따라서 7H-4MC이 MITF 발현에 미치는 영향을 western blot을 통해 확인해 보았다.

실험 결과 α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 7H-4MC은 미처리군에 비해 MITF의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰고, 100 μ M 농도에서 75%p 증가시켰다(Fig. 17).

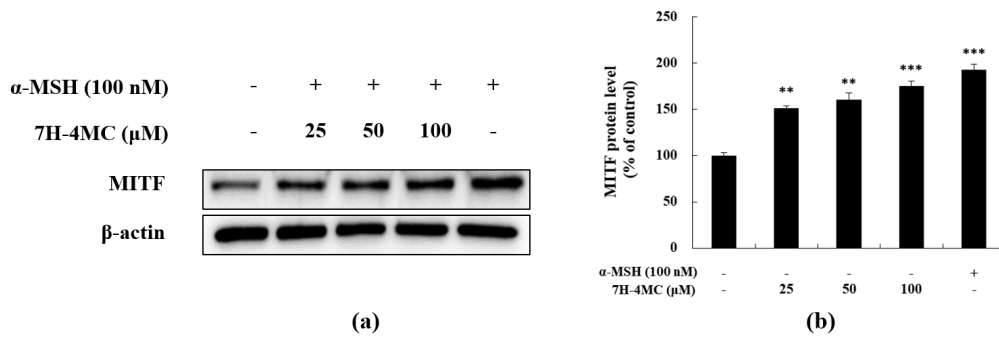


Figure 17. Effects of 7H-4MC on expression of MITF in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded in 60 mm culture dish and incubated for 24 h. Cells were treated with 7H-4MC (25, 50 and 100 μ M) and α -MSH (100 nM) for 72h. α -MSH was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control group.

IV. 고 찰

염증은 관절염, 심혈관 질환 및 기타 치명적인 질병과 같은 많은 질병의 다양한 요인에 의해 유발되는 복잡한 방어 반응이다. 일반적으로 염증은 잠재적으로 유해하며 과도한 염증 반응은 일부 질병을 유발한다. 항염증제로 사용되는 스테로이드 및 비스테로이드성 치료제는 많은 부작용을 가지고 있어 상대적으로 부작용이 적은 천연물을 통한 많은 연구가 이루어지고 있다. 그중에서도 천연 및 합성 쿠마린은 다양한 약리학적 활성이 있어 많은 관심을 받고 있다.

이번 연구에 사용된 7H-4MC은 RAW264.7 세포에서 항염증에 대한 메커니즘과 B16F10 세포에 멜라닌생성에 관한 연구는 아직 조사되지 않았다. 따라서 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 염증성 매개체 생성과 전염증성 사이토카인의 발현에 대한 7H-4MC의 항염증 효과와 염증 작용 기전에 대해 조사했으며, B16F10 세포에서 멜라닌생성과 멜라닌생성 효소 발현에 대한 7H-4MC의 효과를 조사하였다.

본 연구에서는 7H-4MC의 세포독성을 나타나지 않는 농도 범위에서 7H-4MC이 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 NO, PGE₂ 생성 및 전염증성 사이토카인의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 그리고 western blot을 통해 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 iNOS와 COX-2의 발현을 조절하는 NF- κ B와 MAPK 신호전달경로를 7H-4MC이 하향 조절함으로써 염증 반응을 억제하는 것을 확인하였다.

먼저, RAW264.7 세포에서 7H-4MC이 세포독성에 나타나지 않는 농도 범위를 찾기 위해 MTT 법을 사용하였으며, 세포 생존율은 미처리군을 기준으로 하여 90% 이상인 농도를 사용하였다. 따라서 세포독성이 나타나지 않는 농도 범위인 62.5, 125, 250 및 500 μ M 농도에서 이후 실험을 진행하였다.

NO의 발현은 다양한 염증 촉진 효과를 나타낸다. 그러나 생성된 NO는 죽상동맥경화증, 류마티스 관절염, 패혈성 쇼크 등을 포함한 많은 염증성 질환의 원인이 된다. 따라서 7H-4MC이 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 염증을 유발하는 인자인 LPS를 단독 처리하였을 때 미처리군에 비해 NO 생성을 확연히 증가시켰다. LPS 처리한 조건에서 7H-4MC은 LPS 처리군과 비교하여 NO 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다.

PGE₂는 COX-2에 의해 염증 부위에서 생성되는 염증 매개체로서 심혈관 질환, 암과 같은 많은 만성 염증성 질환의 발병에 기여한다. 따라서 7H-4MC이 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 확인하였다. LPS 단독 처리시 미처리군에 비해 PGE₂ 생성을 확연히 증가시켰고, LPS를 처리한 조건에서 7H-4MC은 LPS 처리군과 비교하여 PGE₂ 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다.

iNOS 및 COX-2는 NO와 PGE₂ 생성 관련 효소로서 7H-4MC의 이러한 효과가 iNOS 및 COX-2와 관련이 있는지 분석하기 위해 western blot을 통해 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 확인하였다. LPS 단독 처리시 iNOS 및 COX-2의 발현은 미처리군에 비해 증가되었고, LPS를 처리한 조건에서 7H-4MC은 농도의존적으로 iNOS 및 COX-2이 발현을 억제하였다. 따라서 7H-4MC의 염증 억제 효과는 각각 iNOS 및 COX-2의 발현을 하향 조절함으로써 NO 및 PGE₂의 생성을 억제 통해 나타나는 것을 확인하였다.

다음으로 염증 발현에 관여하는 인자인 전염증성 사이토카인들의 생성에 7H-4MC이 미치는 영향을 확인해 보고자 하였다. LPS 단독 처리시 미처리군에 비해 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 증가시켰고 LPS를 처리한 조건에서 7H-4MC은 농도의존적으로 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 생성을 억제하였다. 따라서 7H-4MC은 RAW264.7 세포에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현을 조절하여 염증 억제 효과를 나타나는 것을 확인하였다.

이러한 염증성 매개체 및 사이토카인의 생성은 MAPK 및 NF- κ B 신호전달경로를 통해 조절된다. MAPK 신호전달경로는 JNK, ERK 및 p38로 구성된다. LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 7H-4MC은 JNK의 인산화를 농도의존적으로 저해하였지만, ERK와 p38의 인산화에는 유의한 영향을 미치지 않았다.

NF- κ B는 염증 유전자 발현을 조절하며 면역 및 염증 반응에 관여하는 주요 염증 신호 경로이다. 7H-4MC이 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 NF- κ B 신호전달경로에 미치는 영향을 확인하였다. I κ B- α 의 인산화는 NF- κ B의 활성화 및 핵 전위를 유도한다. 따라서, I κ B- α 의 인산화를 억제하면 NF- κ B의 활성화 및 핵 전위를 저해하여 염증을 억제할 수 있다. 7H-4MC은 LPS에 의해 유도된 I κ B- α 인산화 수준을 유의하게 감소시킴을 확인하였다.

다음으로 7H-4MC이 NF- κ B의 인산화 및 세포질에서 핵으로의 전위에 미치는 영향을 확인해 보았다. LPS로 유도된 NF- κ B의 인산화를 7H-4MC이 농도 의존적으로 저해하였다. 인산화 된 NF- κ B가 세포질에서 핵으로 전위 되었는지 확인하기 위해 핵과 세포질의 단백질을 분리하여 western blot을 진행하였다. LPS는 NF- κ B를 핵으로의 전위를 유도하였고, LPS를 처리한 조건에서 7H-4MC은 NF- κ B 핵 전위를 저해하였다. 이러한 결과는 7H-4MC이 I κ B- α 의 인산화를 저해함으로써 세포질에서 핵으로의 NF- κ B 핵 전위를 농도 의존적으로 저해하여 NF- κ B 활성화를 억제함을 확인하였다.

추가적으로 B16F10 세포에서 7H-4MC이 멜라닌생성에 미치는 영향을 확인해 보았다. B16F10 세포에서 α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 7H-4MC는 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성을 농도의존적으로 증가시켰다. 그리고 α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 7H-4MC이 멜라닌 합성 효소들의 발현과 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌생성을 유도함을 확인하였다.

먼저, B16F10 세포에서 7H-4MC이 세포독성에 나타나지 않는 농도 범위를 찾기 위해 MTT 법을 사용하였으며, 세포 생존율은 미처리군에 비해 90% 이상 일

때의 농도를 독성이 나타나지 않는 범위로 하여 25, 25 및 100 μ M 농도에서 이 후 실험을 진행하였다.

멜라닌생성은 tyrosinase 활성과 tyrosinase 단백질 수준과 직접적인 관계가 있다. 따라서 B16F10 세포에서 7H-4MC이 멜라닌생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 확인하기 위해 melanin content 및 tyrosinase activity를 진행하였다. 그 결과 α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 7H-4MC은 미처리군과 비교하여 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성이 농도 의존적으로 증가한 것을 확인하였다. 7H-4MC은 tyrosinase 활성을 증가시켜 멜라닌생성을 유도함을 확인하였다.

TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase는 멜라닌 생합성에 관여하는 효소이다. 7H-4MC이 이러한 멜라닌생성 관련 효소에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 7H-4MC은 α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 발현을 모두 농도 의존적으로 증가시킴을 확인하였다.

MITF는 TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase와 같은 멜라닌 합성 효소들의 발현을 조절한다. 따라서 7H-4MC이 MITF에 미치는 영향을 확인해 보고자 하였다. 그 결과 α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 7H-4MC은 농도 의존적으로 MITF의 발현을 증가시켰다. 7H-4MC은 MITF의 발현을 유도하여 멜라닌 합성 효소들의 발현을 증가시키고 tyrosinase 활성을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도한다.

본 연구를 통해 7H-4MC은 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 NO와 PGE₂ 생성 및 pro-inflammatory의 발현을 감소시켰다. 이는 7H-4MC이 MAPK 신호 전달경로와 NF- κ B 신호전달경로를 통해 항염증 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 그리고 B16F10 세포에서 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 합성 효소들의 발현을 촉진하고 최종적으로 멜라닌 합성을 유도함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, 7H-4MC은 항염증 치료제 및 저색소침착증 치료제로서의 가능성을 시사한다.

V. 참고문헌

1. Medzhitov, R., Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008. 454(7203): p. 428-435.
2. Luo, Y., et al., Phosphoproteomics and proteomics reveal metabolism as a key node in LPS-induced acute inflammation in RAW264. 7. *Inflammation*, 2020. 43: p. 1667-1679.
3. Catrysse, L. and G. van Loo, Inflammation and the metabolic syndrome: the tissue-specific functions of NF- κ B. *Trends in cell biology*, 2017. 27(6): p. 417-429.
4. Reinehr, T., Inflammatory markers in children and adolescents with type 2 diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*, 2019. 496: p. 100-107.
5. Donath, M.Y. and S.E. Shoelson, Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature reviews immunology*, 2011. 11(2): p. 98-107.
6. Jung, H.-W., et al., Flower extract of *Panax notoginseng* attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF- κ B signaling pathway in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009. 122(2): p. 313-319.
7. Fang, W., et al., Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264. 7 macrophages. *Scientific reports*, 2017. 7(1): p. 1-13.

8. Koh, T.J. and L.A. DiPietro, Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 2011. 13.
9. Xu, Z., et al., Immunomodulatory mechanism of a purified polysaccharide isolated from *Isaria cicadae* Miquel on RAW264. 7 cells via activating TLR4-MAPK-NF- κ B signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020. 164: p. 4329-4338.
10. Bi, C.-L., et al., Selenium inhibits *Staphylococcus aureus*-induced inflammation by suppressing the activation of the NF- κ B and MAPK signalling pathways in RAW264. 7 macrophages. *European journal of pharmacology*, 2016. 780: p. 159-165.
11. Han, B.H., et al., Hwangryunhaedoktang exerts anti-inflammation on LPS-induced NO production by suppressing MAPK and NF- κ B activation in RAW264. 7 macrophages. *Journal of Integrative Medicine*, 2017. 15(4): p. 326-336.
12. Park, J.Y., M.H. Pillinger, and S.B. Abramson, Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clinical immunology*, 2006. 119(3): p. 229-240.
13. Bi, D., et al., Immune activation of RAW264. 7 macrophages by low molecular weight fucoidan extracted from New Zealand *Undaria pinnatifida*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2018. 66(41): p. 10721-10728.
14. Liu, Y., E.G. Shepherd, and L.D. Nelin, MAPK phosphatases—regulating the immune response. *Nature Reviews Immunology*, 2007. 7(3): p. 202-212.

15. Nadal-Ribelles, M., et al., Shaping the transcriptional landscape through MAPK signaling. *Gene Expression and Control*, 2019: p. 19.
16. Turjanski, A., J. Vaque, and J. Gutkind, MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3240-3253.
17. Tak, P.P. and G.S. Firestein, NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation*, 2001. 107(1): p. 7-11.
18. Zhao, X.-L., et al., Cryptochlorogenic acid attenuates LPS-induced inflammatory response and oxidative stress via upregulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in RAW 264.7 macrophages. *International immunopharmacology*, 2020. 83: p. 106436.
19. Killeen, M.J., et al., NF- κ B signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug discovery today*, 2014. 19(4): p. 373-378.
20. Lee, S.-B., et al., Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 via AP-1, NF- κ B, and JAK-STAT inactivation in RAW 264.7 macrophages. *International immunopharmacology*, 2017. 49: p. 21-29.
21. Wu, Q.-Y., et al., Isoorientin derived from *Gentiana veitchiorum* Hemsl. flowers inhibits melanogenesis by down-regulating MITF-induced tyrosinase expression. *Phytomedicine*, 2019. 57: p. 129-136.
22. Bologna, J.L. and J.M. Pawelek, Biology of hypopigmentation. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1988. 19(2): p. 217-255.

23. Brown, D.A., Skin pigmentation enhancers. *Comprehensive Series in Photosciences*, 2001. 3: p. 637-675.
24. d'Ischia, M., et al., Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. *Pigment cell & melanoma research*, 2015. 28(5): p. 520-544.
25. Niu, C. and H.A. Aisa, Upregulation of melanogenesis and tyrosinase activity: potential agents for vitiligo. *Molecules*, 2017. 22(8): p. 1303.
26. Liu, S., et al., Current and emerging treatments for albinism. *Survey of Ophthalmology*, 2021. 66(2): p. 362-377.
27. Yale, K., M. Juhasz, and N.A. Mesinkovska, Medication-induced repigmentation of gray hair: a systematic review. *Skin appendage disorders*, 2020. 6(1): p. 1-10.
28. Peng, C.-C., et al., The functional property of royal jelly 10-hydroxy-2-decenoic acid as a melanogenesis inhibitor. *BMC complementary and alternative medicine*, 2017. 17(1): p. 1-8.
29. Lee, A., et al., The inhibition of melanogenesis via the PKA and ERK signaling pathways by *Chlamydomonas reinhardtii* extract in B16F10 melanoma cells and artificial human skin equivalents. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2018. 28(12): p. 2121-2132.
30. Su, T.-R., et al., Inhibition of melanogenesis by gallic acid: Possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells. *International journal of molecular sciences*, 2013.

14(10): p. 20443-20458.

31. Riley, P.A., Melanin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 1997. 29(11): p. 1235-1239.

32. Alam, M.B., et al., Inhibition of melanogenesis by jineol from *Scolopendra subspinipes mutilans* via MAP-Kinase mediated MITF downregulation and the proteasomal degradation of tyrosinase. *Scientific reports*, 2017. 7(1): p. 1-12.

33. Kim, D.E., et al., Neobavaisoflavone Inhibits Melanogenesis through the Regulation of Akt/GSK-3 β and MEK/ERK Pathways in B16F10 Cells and a Reconstructed Human 3D Skin Model. *Molecules*, 2020. 25(11): p. 2683.

34. Shim, E., et al., Inhibitory effect of *Gastrodia elata* Blume extract on alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in murine B16F10 melanoma. *Nutrition research and practice*, 2017. 11(3): p. 173-179.

35. Hwang, K.-S., et al., A novel anti-melanogenic agent, KDZ-001, inhibits tyrosinase enzymatic activity. *Journal of dermatological science*, 2018. 89(2): p. 165-171.

36. Oh, T.-I., et al., Inhibition of NAT10 suppresses melanogenesis and melanoma growth by attenuating microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression. *International journal of molecular sciences*, 2017. 18(9): p. 1924.

37. Truong, X.T., et al., Protocatechuic acid from pear inhibits melanogenesis in melanoma cells. *International journal of molecular sciences*,

2017. 18(8): p. 1809.

38. Huang, H.-C., et al., Theophylline enhances melanogenesis in B16F10 murine melanoma cells through the activation of the MEK 1/2, and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 2020. 137: p. 111165.

39. Seo, J.O., et al., Finasteride inhibits melanogenesis through regulation of the adenylate cyclase in melanocytes and melanoma cells. *Archives of pharmacal research*, 2018. 41(3): p. 324-332.

40. Chang, C.-J. and T.-Y. Tsai, Antimelanogenic effects of the novel melanogenic inhibitors daidzein and equol, derived from soymilk fermented with *Lactobacillus plantarum* strain TWK10, in B16F0 mouse melanoma cells. *Journal of Functional Foods*, 2016. 22: p. 211-223.

41. Bor, T., et al., Chapter 26-Antimicrobials from herbs, spices, and plants A2-Watson, Ronald RosS. 2016, *Fruits, Vegetables, and Herbs: Academic Press*.

42. Chiorcea Paquim, A.M., et al., Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020. 19(4): p. 1680-1726.

43. Li, C.Y., et al., Epigenetic Manipulation Induces the Production of Coumarin Type Secondary Metabolite from *Arthrotrrys foliicola*. *Israel Journal of Chemistry*, 2019. 59(5): p. 432-438.

44. Venugopala, K.N., V. Rashmi, and B. Odhav, Review on natural

coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed research international*, 2013. 2013.

45. Bhattarai, N., et al., Anticancer potential of coumarin and its derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2021.

46. Abdelhafez, O.M., et al., Synthesis, anticoagulant and PIVKA-II induced by new 4-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2010. 18(10): p. 3371-3378.

47. Fylaktakidou, K.C., et al., Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current pharmaceutical design*, 2004. 10(30): p. 3813-3833.

48. Hwu, J.R., et al., Synthesis of new benzimidazole - coumarin conjugates as anti-hepatitis C virus agents. *Antiviral research*, 2008. 77(2): p. 157-162.

49. Weber, U., B. Steffen, and C. Siegers, Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*, 1998. 99(2): p. 193-206.

50. Khan, K.M., et al., Synthesis of coumarin derivatives with cytotoxic, antibacterial and antifungal activity. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2004. 19(4): p. 373-379.

51. Nagy, N., et al., 4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer. *Frontiers in immunology*, 2015. 6: p. 123.

52. Yang, Y.M., et al., Inhibition of hyaluronan synthesis by 4-methylumbelliferone ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in choline-deficient l-amino acid-defined diet-induced murine model. *Archives of Pharmacal Research*, 2021. 44(2): p. 230-240.
53. Galgoczi, E., et al., Characteristics of Hyaluronan Synthesis Inhibition by 4-Methylumbelliferone in Orbital Fibroblasts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2020. 61(2): p. 27.
54. Kultti, A., et al., 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Experimental cell research*, 2009. 315(11): p. 1914-1923.
55. Zhi, H., et al., Fluorescent properties of hymecromone and fluorimetric analysis of hymecromone in compound dantong capsule. *Journal of Spectroscopy*, 2013. 2013.
56. Lokeshwar, V.B., et al., Antitumor Activity of Hyaluronic Acid Synthesis Inhibitor 4-Methylumbelliferone in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 2010. 70(7): p. 2613-2623.
57. Al-Majedy, Y.K., et al., Antioxidant activities of 4-methylumbelliferone derivatives. *PLoS One*, 2016. 11(5): p. e0156625.
58. Šarkanj, B., et al., 4-Methyl-7-hydroxycoumarin antifungal and antioxidant activity enhancement by substitution with thiosemicarbazide and thiazolidinone moieties. *Food chemistry*, 2013. 139(1-4): p. 488-495

59. Pozzolini, M., et al., Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Analytical biochemistry*, 2003. 313(2): p. 338-341.
60. Giustarini, D., et al., Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods in enzymology*, 2008. 440: p. 361-380.
61. Sun, J., et al., Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*, 2003. 3(8): p. 276-284.