



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](#)

박사학위논문

Inhibitory Effects and its Mechanism of
Pinostilbene Hydrate on Melanogenesis and
Adipogenesis in Mouse Cells

제주대학교 대학원

화학과

정 유 철

2022년 2월

마우스 세포에서 멜라닌생성과 지방생성에 관한 Pinostilbene Hydrate의 억제 효과 및 메커니즘 연구

지도교수 현 창 구

정 유 철

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함

2022년 2월

정유철의 이학박사 학위논문을 인준함

심사위원장 _____ ㉠

위 원 _____ ㉠

위 원 _____ ㉠

위 원 _____ ㉠

위 원 _____ ㉠

제주대학교 대학원

2022년 2월

Inhibitory Effects and its Mechanism of Pinostilbene Hydrate on Melanogenesis and Adipogenesis in Mouse Cells

You Chul Chung

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

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

February, 2022

This thesis has been examined and approved by

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

.....
Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Resveratrol is a phytoalexin with multiple bioactive properties, including antioxidative, neuroprotective, cardioprotective, and anticancer effects. However, resveratrol exhibits structural instability in response to UV, alkaline pH, and oxygen exposure. Thus, resveratrol derivatives have gained considerable research interest. In this study, we aimed to evaluate the anti-melanogenic and anti-adipogenic effects of pinostilbene hydrate (PH), a methylated resveratrol derivative, in B16F10 and 3T3-L1 cells. We also evaluated the mechanisms underlying the effects of PH on melanogenesis and adipogenesis in B16F10 cells and 3T3-L1 adipocytes. The results in B16F10 cells indicated that PH significantly inhibits melanin content and cellular tyrosinase activity in cells without causing cytotoxicity. In addition, Western blot analysis showed that PH downregulated the protein levels of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase, and other melanogenic enzymes, such as tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). Although PH activated the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), it inhibited p38 mitogen-activated protein kinases (MAPK). Furthermore, the inhibition of tyrosinase activity by PH was attenuated by treatment with PD98059 (a specific ERK inhibitor). Additionally, phosphorylated-protein kinase B (p-AKT) was upregulated by PH treatment. Finally, the inhibitory effects of PH on melanin content and tyrosinase activity were confirmed in normal human melanocytes. These results suggest PH downregulates melanogenesis via the inhibition of MITF expression, followed by the MAPK signaling pathways. The results in 3T3-L1 adipocytes showed that Oil Red O staining, lipid accumulation assay, and triglyceride (TG) content assay revealed that PH significantly inhibited lipid and TG accumulation on day 8 without

cytotoxicity. In addition, we determined that PH decreased the expression of adipogenesis-related transcription factors such as CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α), peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ), sterol response element binding protein-1c (SREBP-1c), and fatty acid binding protein 4 (FABP4). In the mechanistic study, PH decreased the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) and protein kinase B (AKT). Moreover, PH attenuated the expression of cAMP response element binding protein (CREB) and C/EBP β . Furthermore, PH increased the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and acetyl-CoA carboxylase (ACC) and decreased the expression of fatty acid synthase (FAS) and FABP4. Based on these results, we suggest that PH suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells via inhibition of MAPK and AKT-dependent insulin signaling, and AMPK signaling pathways. Thus, PH may be used as potential therapeutic agent to treat or prevent hyperpigmentation disorders, obesity and obesity-related metabolic disorders.

Keywords: B16F10, melanocytes, pinostilbene, whitening, resveratrol, 3T3-L1, adipogenesis, MAPK, AKT, AMPK, CREB

목 차

| | |
|--|----|
| ABSTRACT | 1 |
| 목 차 | 3 |
| LIST OF FIGURES | 5 |
| | |
| I. 서 론 | 8 |
| | |
| II. 재료 및 방법 | 18 |
| | |
| 1. 시료 및 시약 | 18 |
| 2. 세포배양 | 19 |
| 3. PH의 멜라닌생성 억제 평가 | 21 |
| 3.1. 세포독성평가 | 21 |
| 3.2. Melanin contents 측정 | 22 |
| 3.3. 세포내 tyrosinase 활성 측정 | 22 |
| 3.4. Western blot 분석 | 23 |
| 3.5. 통계처리 | 24 |
| 4. PH의 지방생성 억제 평가 | 25 |
| 4.1. 지방세포 분화 | 25 |
| 4.2. 세포독성평가 | 27 |
| 4.3. Oil Red O 염색 및 triglyceride 분석 | 27 |
| 4.4. Western blot 분석 | 28 |
| 4.5. 통계처리 | 29 |
| | |
| III. 결 과 | 30 |
| | |
| 1. B16F10 및 HEMn-MP 세포에서 PH의 멜라닌생성 영향 평가 | 30 |

| | |
|--|----|
| 1.1. B16F10 세포에서 PH의 세포 생존율 | 30 |
| 1.2. Melanin contents 및 Tyrosinase 활성화에 대한 PH의 영향 | 32 |
| 1.3. Western blot 분석 | 34 |
| 1) B16F10 세포에서 멜라닌생성 효소 및 MITF 발현에 대한 PH 효과 .. | 34 |
| 2) B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 PH 효과 | 37 |
| 3) B16F10 세포에서 AKT 신호 전달 경로에 대한 PH 효과 | 37 |
| 1.4. 인간 표피 멜라닌세포(HEMn-MP)에서 PH의 멜라닌생성 억제 효과 .. | 41 |
| 2. 3T3-L1 adipocytes에서 PH가 지방생성에 미치는 영향 | 43 |
| 2.1. 3T3-L1 지방세포에 대한 PH의 독성 | 43 |
| 2.2. 3T3-L1 지방세포에서 지질 축적 (lipid accumulation) 및 triglyceride 함 량에 대한 PH의 영향 | 45 |
| 2.3. Western blot 분석 | 47 |
| 1) 지방 생성 관련 전사 인자(adipogenic-related transcription factors) 발 현에 대한 PH의 영향 | 47 |
| 2) MAPK 인산화에 대한 PH의 영향 | 50 |
| 3) AKT 관련 신호 전달 경로에 대한 PH의 영향 | 52 |
| 4) AMPK 신호 전달 경로에 대한 PH의 영향 | 55 |
| IV. 고 찰 | 58 |
| V. 참고 문헌 | 66 |
| VI. 연구 성과 | 81 |

LIST OF FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Melanogenesis in melanocytes and hyperpigmentation disorders | 9 |
| Figure 2. Positive regulation of melanogenesis in B16F10 cells | 11 |
| Figure 3. Negative regulation of melanogenesis in B16F10 cells | 11 |
| Figure 4. Insulin related AKT and MAPK signaling pathways | 14 |
| Figure 5. AMPK signaling pathways | 14 |
| Figure 6. Resveratrol and its bioactivity and bioavailability | 16 |
| Figure 7. Resveratrol derivatives and its bioactivities | 16 |
| Figure 8. Pinostilbene and its bioactivity and bioavailability | 17 |
| Figure 9. Cell lines and process of cell culture | 20 |
| Figure 10. Cell lines and process of cell culture | 26 |
| Figure 11. Adipocytes differentiation | 26 |
| Figure 12. Effects of pinostilbene on the viability of B16F10 cells | 31 |
| Figure 13. Effects of PH on melanin production and tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells | 33 |

LIST OF FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 14. Effects of PH on the protein expression levels of TRP-1, TRP-2, and tyrosinase in B16F10 cells | 35 |
| Figure 15. Effects of PH on MITF expression in B16F10 cells | 36 |
| Figure 16. Effects of PH on phosphorylation of ERK, p38, and JNK | 38 |
| Figure 17. Effects of PD98059, an ERK inhibitor, on tyrosinase activity in B16F10 cells | 39 |
| Figure 18. Effects of PH on AKT phosphorylation | 40 |
| Figure 19. Effects of PH on melanin production and tyrosinase activity in normal human melanocytes | 42 |
| Figure 20. Effects of PH on cytotoxicity in 3T3-L1 adipocytes | 44 |
| Figure 21. Effect of PH on lipid accumulation and triglyceride content in 3T3-L1 adipocytes | 46 |
| Figure 22. Effect of PH on expression of adipogenesis-related transcription factors | 48 |
| Figure 23. Effect of PH on the phosphorylation of MAPK | 51 |

LIST OF FIGURES

- Figure 24.** Effect of PH on the AKT-related signaling pathways53
- Figure 25.** Effect of PH on the AMPK signaling pathways56
- Figure 26.** Pinostilbene reduces melanogenesis by P-ERK and P-AKT upregulation and P-p38 downregulation in B16F10 melanoma cells64
- Figure 27.** Pinostilbene downregulates adipogenesis and lipogenesis by regulating the expression of adipogenesis-related factors via the MAPK and AKT-dependent insulin signaling, and AMPK signaling pathways65

I. 서 론

멜라닌(Melanin)은 페오멜라닌(pheomelanin)과 유멜라닌(eumelanin)으로 구성되어 있다. 이러한 멜라닌은 자외선(ultraviolet radiation) 및 스트레스와 같은 외부 자극을 받으면 피부에 있는 멜라닌세포(melanocytes) 소기관인 멜라노솜(melanosome)에 의해 합성되어진다. 멜라닌세포는 표피-진피 접합부에 위치하며 멜라노솜에 의해 생성된 멜라닌을 주변 각질세포(keratinocytes)로 전달하는 역할을 한다. 멜라닌 중, 특히 유멜라닌의 주요 역할로는 사람의 피부, 눈, 및 머리카락의 착색을 결정하고 자유라디칼을 소거하거나 자외선을 분산시켜 자외선으로 인한 광 손상으로부터 피부를 보호한다 (1-6). 그러나 비정상적으로 과도하게 생성된 멜라닌은 흑색종(melanoma), 주근깨(Freckles), 검버섯(lentigo), 반점(blotches)과 같은 과색소침착증(hyperpigmentation)의 원인이 될 수 있다 (7,8).

멜라닌 생성은 멜라닌 세포 내에서 발생하는 복잡한 신호 전달 과정과 관련이 있으며 티로시나아제(tyrosinase) 및 티로시나아제 관련 단백질(tyrosinase-related protein)-1 및 -2와 같은 멜라닌생성효소(melanogenic enzymes)들의 발현은 멜라닌 생성에 있어 매우 중요한 역할을 한다. Tyrosinase는 멜라닌 생성 과정의 핵심 효소이며 L-tyrosine 및 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)의 DOPA퀴논 (DOPAquinone)으로 산화하는 과정 중에 중요한 촉매 역할을 한다. DOPAquinone은 분자 내 고리화과정(cyclization)을 거쳐 cycloDOPA를 형성하고 DOPA크롬(DOPAchrome)으로 추가 산화된다. 그런 다음 DOPA크롬은 dopachrome tautomerase (TRP-2) 및 tyrosinase에 의해 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) 및 5,6-dihydroxyindole (DHI)로 변형되고 결국, DHICA는 TRP-1 또는 tyrosinase에 의해 산화되어 유멜라닌을 생성한다 (9-12).

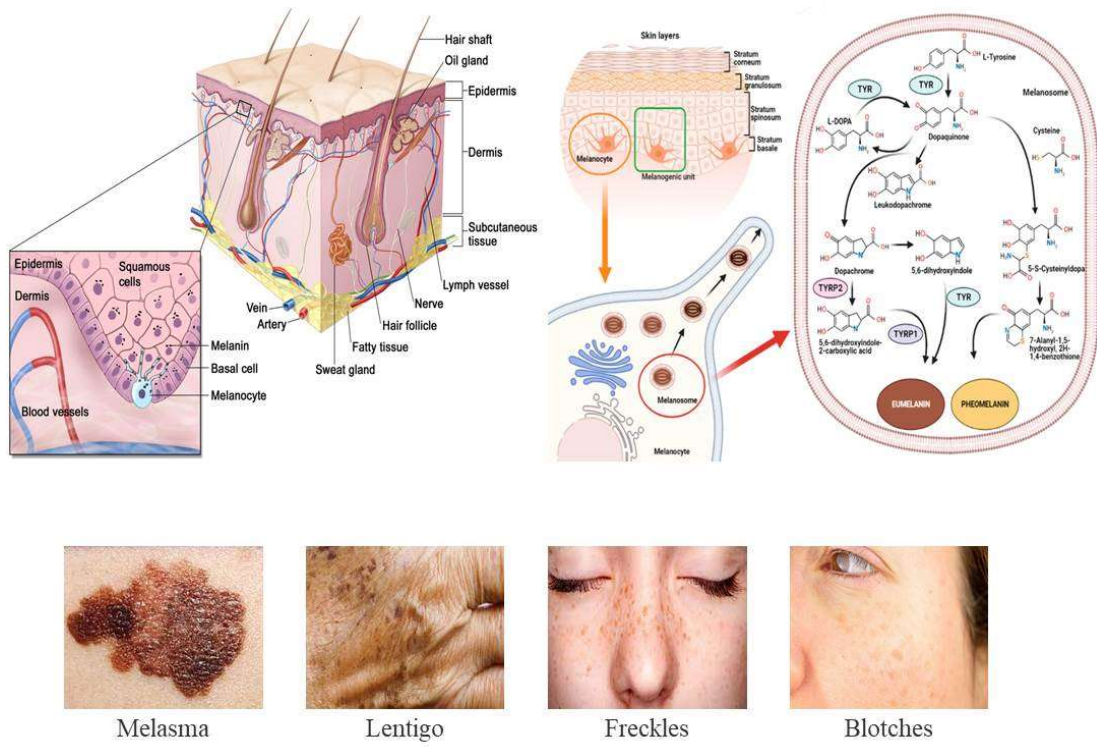


Figure 1. Melanogenesis in melanocytes and hyperpigmentation disorders.

최근 연구에 의하면 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현은 B16F10 세포에서 멜라닌 생성에 관여하는 멜라닌 생성 효소들의 발현과 밀접한 관련이 있다 (13-15). 즉 피부가 자외선과 같은 외부 요인에 의해 자극을 받으면 세포내 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)의 생성이 증가하여 멜라닌 세포 수용체인 melanocortin receptor 1 (MC1R)에 결합하고 세포 내 adenylate cyclase (AC)를 활성화하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 수준을 증가시킨다. 그런 다음, 증가 된 cAMP는 protein kinase A (PKA) 및 cAMP response element-binding protein (CREB)를 인산화 하여 활성을 유도하고 전사인자인 MITF의 발현을 증가시켜 결국 TRP-1, 2, 및 tyrosinase와 같은 멜라닌 생성 효소들의 발현을 상향 조절 한다 (16,17).

Extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), 및 p38로 구성된 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 인산화는 MITF 발현을 조절하여 멜라닌 생성 및 억제에 관여 한다 (18-20). ERK는 인산화 증가를 통해 멜라닌 생성 효소의 전사인자인 MITF를 인산화 하여 degradation을 유도하고 결국 멜라닌 생성을 하향 조절 기전으로 알려져 있다 (21). 이와 반대로 JNK 및 p38의 인산화는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 상향 조절한다 (22,23). 또한 protein kinase B (AKT) 신호 전달 경로의 인산화로 인한 활성화는 MITF를 분해시켜 멜라닌 생성 효소의 발현을 감소하고 결국 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 보고되었다 (24,25). 따라서 최근 연구들에서 MAPK/AKT 신호 전달 경로는 멜라닌 생성 조절을 확인하는 전략적 표적(strategic target)으로 고려되고 있다.

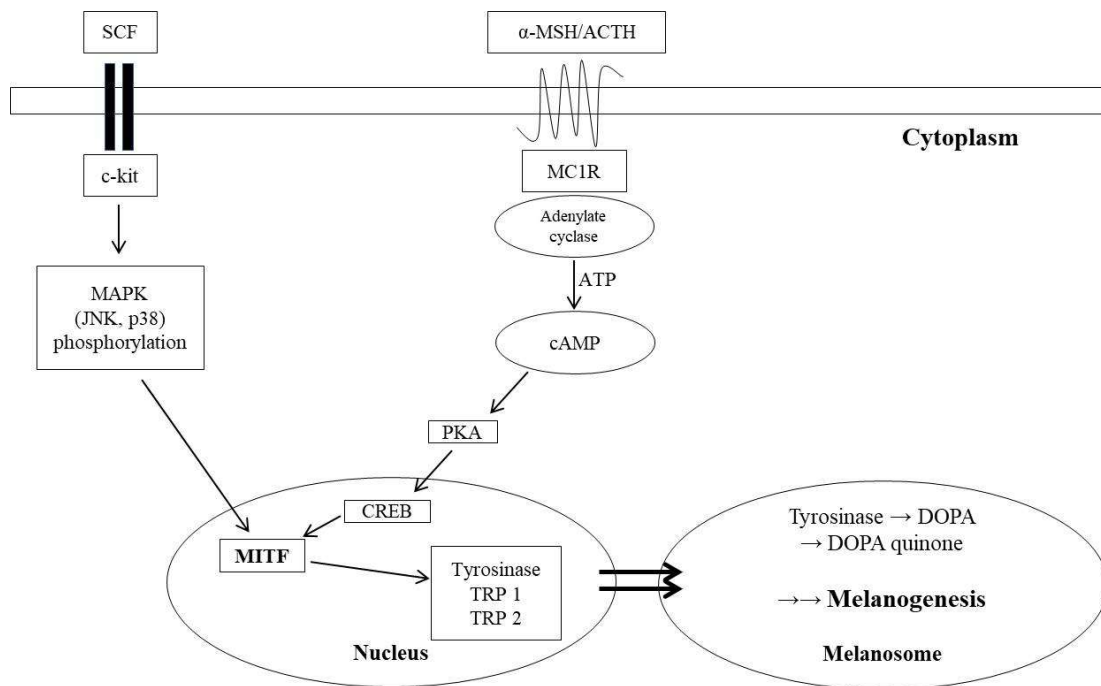


Figure 2. Positive regulation of melanogenesis in B16F10 cells.

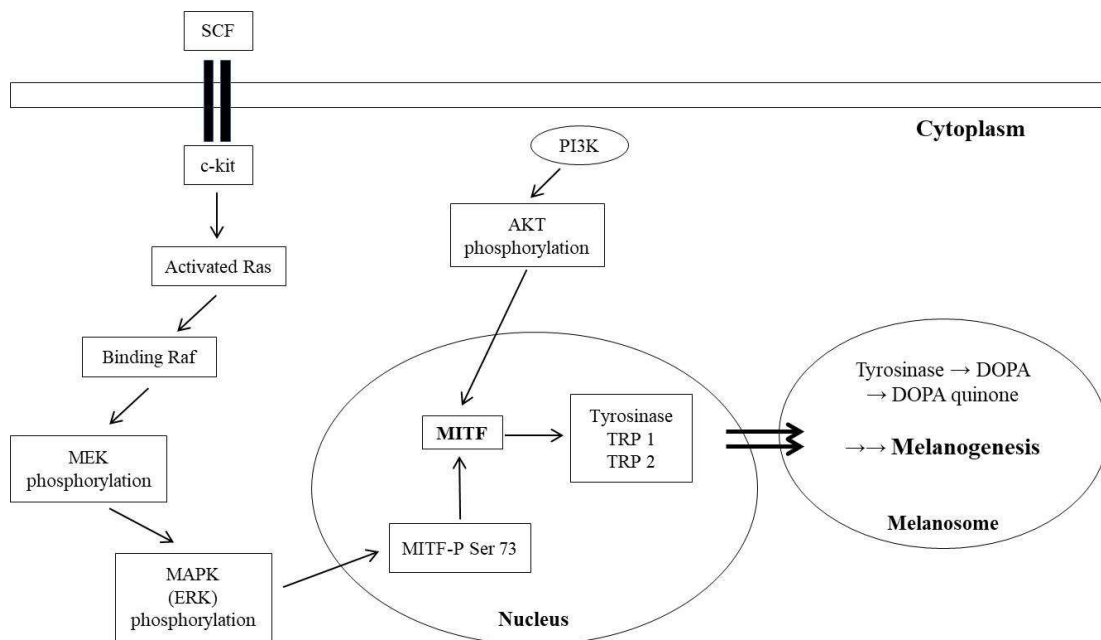


Figure 3. Negative regulation of melanogenesis in B16F10 cells.

비만은 지속적인 고칼로리 음식 섭취로 인해 얻은 에너지가 그 대사율을 초과할 때 체내에 과잉 칼로리가 축적되어 발생한다 (43). 이러한 에너지 불균형이 지속되면 과잉 에너지의 대부분은 지방산을 통해 중성지방(Triglyceride)으로 전환되어 지방세포(Adipocytes)에 축적되고 결국 체중이 증가하게 된다 (44,45). 비만의 초기 단계는 지방세포 크기의 증가(비대; Hypertrophy)가 특징인 반면, 후기 단계는 지방세포 수의 증가(과형성; Hyperplasia)가 특징이다 (46,47). 지방세포의 비대 및 과형성은 지방조직에서 분비되는 호르몬과 사이토카인의 양을 비정상적으로 증가시켜 제2형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증, 심혈관 질환 및 암과 같은 병적 질환을 유발한다 (48-50).

일반적으로 체지방(Body fat)으로 알려진 지방조직(Adipose tissue)은 지방세포로 구성되는데 이러한 지방세포는 지방 생성 과정(Adipogenesis)을 통해 전지방세포(Preadipocytes)의 분화에 의해 형성되고 과잉 에너지를 중성지방 형태로 저장하는 기능을 한다 (51). 또한, 신체에 에너지가 부족하면 지방조직은 지방세포에 저장되어 있던 중성지방을 글리세롤(Glycerol) 및 지방산(Fatty acid) 형태로 분해하고 체내에 방출하여 에너지를 공급한다 (52). 지방조직은 이러한 에너지 저장 기능 외에도 면역반응(Immune response), 포도당 및 지질대사(Glucose and lipid metabolism) 등 다양한 생물학적 과정에 관여하며, 아디포넥틴(Adiponectin), 렙틴(Leptin), 아딕신(Adipsin) 등의 다양한 호르몬을 분비하는 내분비기관(endocrine organ) 역할 또한 수행한다 (53-58). 따라서 지방조직은 생리적 항상성(Physiological homeostasis)을 유지하는 데 매우 중요하다.

지방생성(Adipogenesis)은 지방세포 형성 및 지질 축적에 매우 중요한 과정이며 이 과정을 조절하는 주요 전사인자로는 CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α), peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ), sterol response element binding protein-1c (SREBP-1c), fatty acid synthase (FAS) 및 fatty acid binding protein 4 (FABP4) 등이 있다 (59,60). C/EBP α 및 PPAR γ 는 전지방세포를 성숙한 지방세포로 분화시키는 데 필수적이며, PPAR γ 는 C/EBP 발현이 결여된 세포에서도 지방형성을 촉진할 수 있다. SREBP는 지방생성의 보조 조절자이자 지질대사 및 FAS의 발현을 조절하는 역할을 한다. 이러한 전사인자는 지방생성 중에 지방산과 triglyceride

합성을 조절하며, 또한 FAS 및 FABP4는 지방세포 분화 후기 단계에 영향을 미치고 지방세포 형성을 담당한다 (61-63).

Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 및 protein kinase B(AKT) 관련 인슐린 신호 전달 경로는 지방 세포에서 지방 생성을 활성화시키는 경로로 잘 알려져 있다. AKT 및 MAPK 계열 중 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 및 p38 각각의 인산화는 인슐린에 의해 유도된다 (64). 인산화로 인해 활성화 된 AKT(P-AKT)는 SREBP-1c 활성화를 유도하고 이후 PPAR γ 활성화를 증가시킨다 (65,66). 또한 P-AKT는 cAMP response element binding protein (CREB)의 인산화를 자극하고 인산화 된 CREB(P-CREB)는 C/EBP β 의 활성을 유도하여 C/EBP α 및 PPAR γ 의 전사 활성을 증가시켜 결국 지방세포의 분화를 유도한다 (67-69). 추가적으로, ERK와 p38의 인산화는 C/EBP α 와 PPAR γ 의 활성화를 통해 지방세포 분화 전기 단계에서 지방 분화를 유도한다 (70,71).

최근 연구에 따르면 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 체내의 에너지를 인식하고 탄수화물 및 지방 대사(Carbohydrate and fat metabolism)를 통한 항상성을 조절하는 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. AMPK는 대사 스트레스(Metabolic stress)나 운동으로 인해 세포 내 에너지 수준이 감소할 때 에너지 항상성을 유지하기 위해 활성화되며, 비정상적인 AMPK 발현은 대사 질환(Metabolic diseases), 심혈관 질환(Cardiovascular diseases) 및 암(Cancer)과 밀접한 관련이 있다고 보고되었다 (72). 이러한 AMPK는 지방세포에서 지방산 합성과 분해를 매개하여 지방생성 대사 조절에 중요한 역할을 한다. AMPK는 세린/트레오닌(serine/threonine) kinase의 구성원이며 하나의 catalytic α subunit과 2개의 regulatory β 및 γ subunits으로 이종삼량체(heterotrimeric)의 복합체를 형성하고 있다 (73). AMPK는 α 서브유닛의 촉매 도메인(catalytic domain of the α subunit)에 위치한 트레오닌(threonine) 172의 인산화에 의해 활성화된다. AMPK의 활성화는 acetyl-CoA carboxylase(ACC)를 인산화 하여 비활성상태로 만들고 acetyl-CoA로부터 malonyl-CoA로의 합성을 저해하여, 궁극적으로 SREBP-1c, FABP4, FAS의 발현 감소를 통해 지질생성 억제를 유도한다 (74,75).

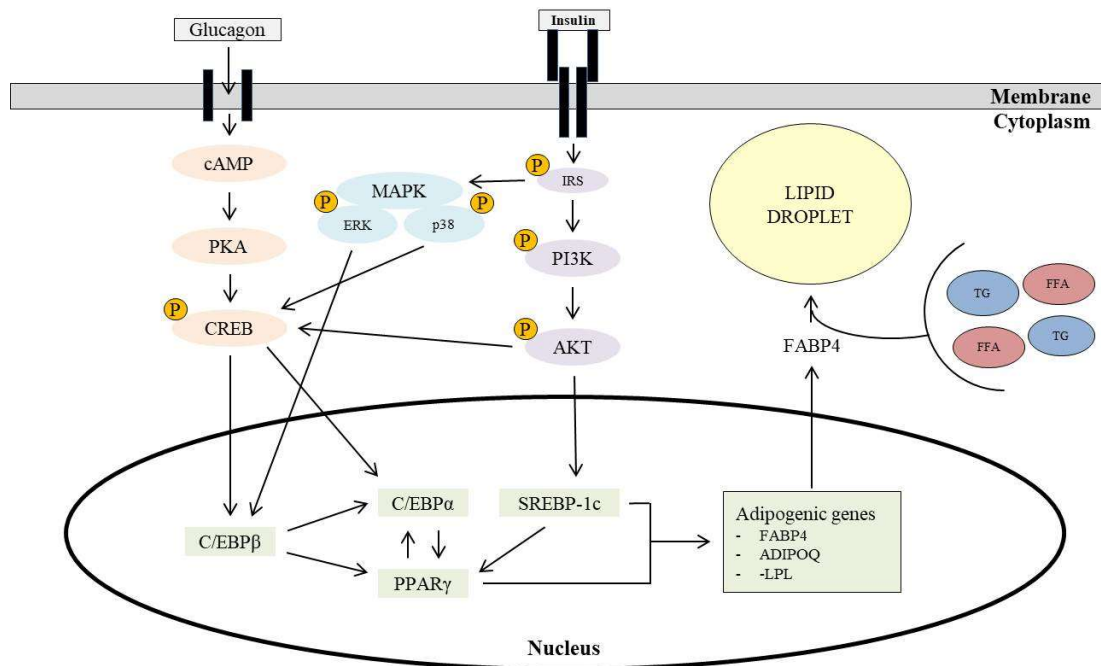


Figure 4. The mechanism of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. Insulin related AKT and MAPK signaling pathways.

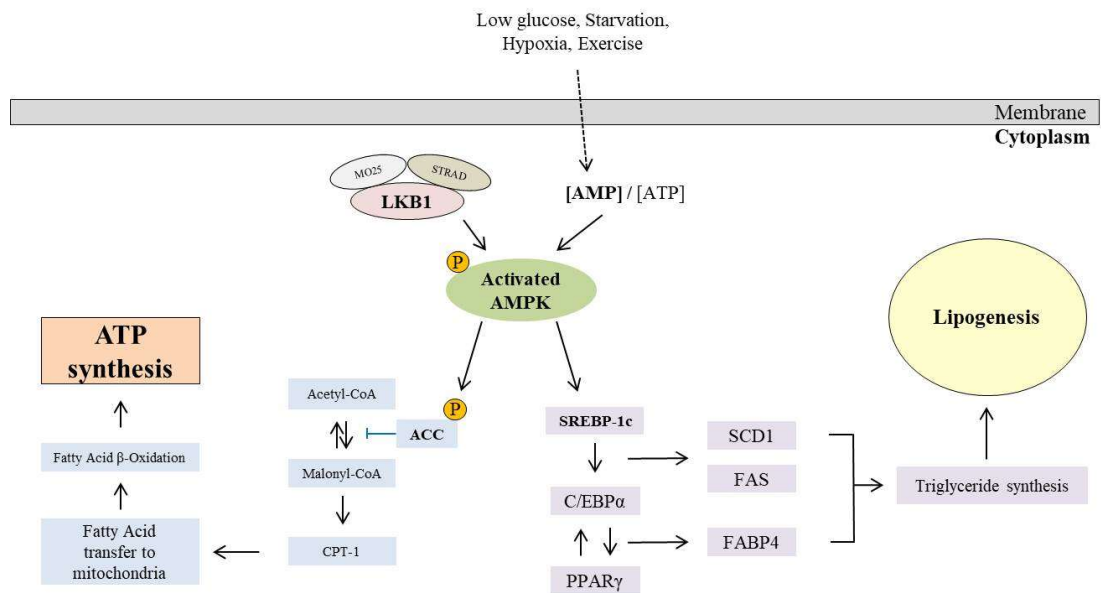
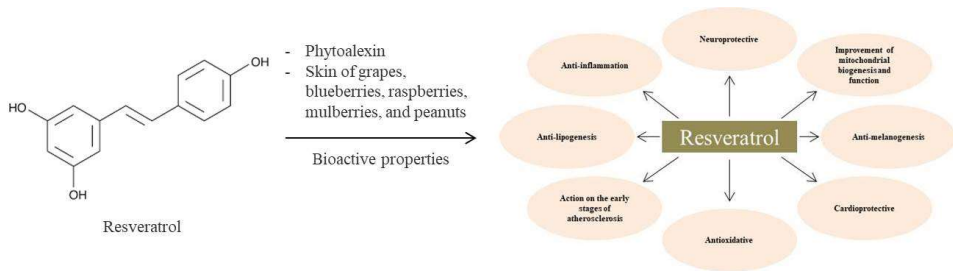


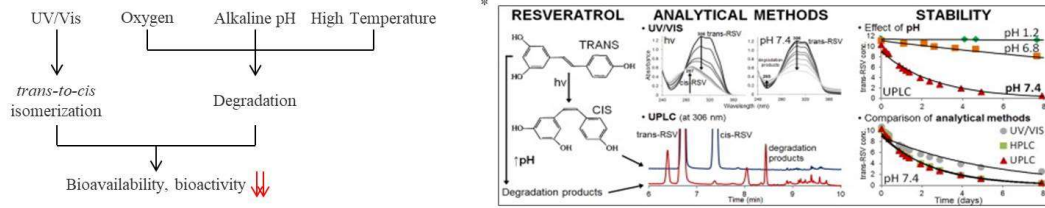
Figure 5. The mechanism of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. AMPK signaling pathways.

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene)은 땅콩이나 적포도 껍질에서 흔히 발견되는 폴리페놀(polyphenolic) 화합물이자 식물이 상처를 입거나 박테리아 및 곰팡이에 의해 공격을 받을 때 생성되는 파이토알렉신(phytoalexin)이며 항염(anti-inflammatory), 항산화(antioxidative), 신경보호(neuroprotective), 심장보호(cardioprotective) 및 항암(anticancer) 효과와 같은 생리활성(bioactive) 특성에 대해 널리 연구되었다 (26-31). 또한, resveratrol은 다양한 세포주에서 지질 축적 및 증식을 감소시켜 지방 생성에 대한 억제 효과를 나타내는 것으로도 보고되었다 (76). 그러나 UV, 극한 pH 조건(extreme pH conditions) 및 산소 노출(oxygen exposure)은 resveratrol의 구조를 불안정하게 만들어 체내 이용률 및 활성을 감소시킨다. 따라서 최근의 많은 연구자들은 수산기(hydroxyl group) 대신 메톡시기(methoxy group)를 함유하는 좀 더 안정한 resveratrol 유도체(resveratrol derivatives)들의 생리활성을 찾는 연구에 초점을 맞추고 있다. 최근 연구 결과에 따르면 메틸화된(methylated) resveratrol 유도체들은 우수한 생체이용률(bioavailability) 및 생체활성(bioactive)을 가지고 있음이 밝혀졌다 (32-34,77).

Pinostilbene hydrate (3,4'-dihydroxy-5-methoxystilbene)은 5번 위치에 methoxy group이 부착된 메틸화 resveratrol 유도체(methylated resveratrol derivative)로, 그 생리활성이 활발하게 연구되고 있다. 최근 연구들에 따르면 pinostilbene hydrate(PH)는 SH-SY5Y 세포에서 강력한 신경 보호 활성을 나타냈으며 (34), 인간 결장 및 LNCaP 암세포에 대한 항암 효과 (35,37), 인간 구강암 세포에 대한 항전이(anti-metastatic) 효과 (36) 그리고 항산화 및 tyrosinase 억제 활성(38) 등의 생리활성이 있다고 보고되었다. 그러나 B16F10 세포와 지방세포에서 멜라닌생성 및 지방생성에 대한 PH의 억제 효과는 아직 조사되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 B16F10 세포와 3T3-L1 지방세포에서 PH의 멜라닌 및 지방생성 억제 효과를 조사함과 동시에 그에 따른 신호전달경로를 확인하였다.



The beneficial effects of resveratrol are limited due to its instability:

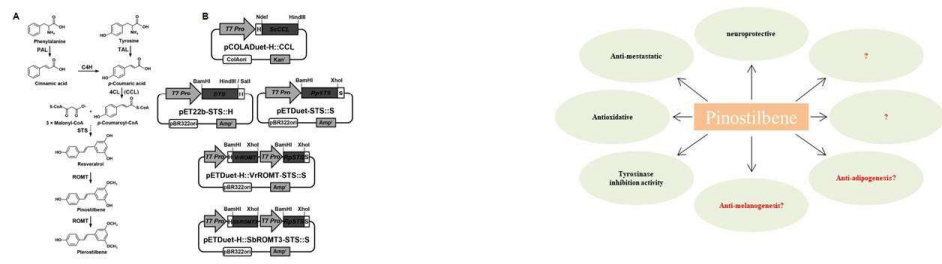


* Š, Zupančič, Z, Lavrič, J, Kristl. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature, *Eur. J. Pharm. Biopharm* 2015, 93, 196-204

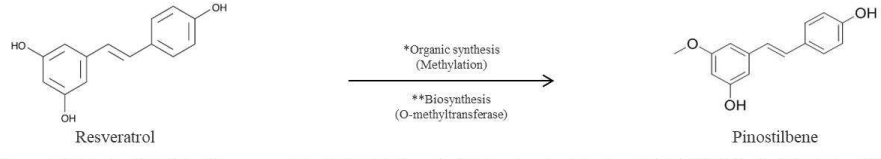
Figure 6. Resveratrol and its bioactivity and bioavailability.

| Resveratrol Derivatives | | | |
|--|--|--|---|
| <chem>Oc1ccc(cc1)/C=C/c2cc(O)cc(O)c2</chem> Resveratrol | <chem>COc1ccc(cc1)/C=C/c2cc(O)cc(OC)c2</chem> Pterostilbene | <chem>COc1ccc(cc1)/C=C/c2cc(O)cc(O)c2</chem> Pinostilbene | <chem>COc1ccc(cc1)/C=C/c2cc(OC)cc(OC)c2</chem> Trimethoxystilbene |
| Bioactivities: - Anti-oxidative (o) - Neuroprotective (o) - Cardioprotective (o) - Anti-cancer (o) - Anti-adipogenesis (o) - Anti-melanogenesis (o) | Bioactivities: - Anti-oxidative (o) - Neuroprotective (o) - Cardioprotective (o) - Anti-cancer (o) - Anti-adipogenesis (o) - Anti-melanogenesis (o) | Bioactivities: - Anti-oxidative (o) - Neuroprotective (o) - Cardioprotective (o) - Anti-cancer (o) - Anti-adipogenesis (No study) - Anti-melanogenesis (No study) | Bioactivities: - Anti-oxidative (o) - Neuroprotective (o) - Cardioprotective (o) - Anti-cancer (o) - Anti-adipogenesis (No study) - Anti-melanogenesis (o) |
| Unstable <i>in vivo</i> | stable <i>in vivo</i> | stable <i>in vivo</i> | stable <i>in vivo</i> |

Figure 7. Resveratrol derivatives and its bioactivities.



(A) Biosynthetic pathway of stilbene compound production from phenylalanine and (B) construction of recombinant plasmids carrying the genes (ScCCL, STS, the synthetic RpSTSsyn, VrROMTsyn, and SbROMT3syn) involved in stilbene biosynthesis.



* J. Chao; Z. H. Li; K. Cheng; et al. Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells, *J Nutr Biochem* 2010, 21, 482-489.
 ** Y. J. Jeong; S. G. Woo; C. H. An; et al. Metabolic engineering for resveratrol derivative biosynthesis in Escherichia coli, *Mol Cells* 2015, 38, 318-326.

Figure 8. Pinostilbene and its bioactivity and bioavailability.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

Pinostilbene hydrate (PH), dimethyl sulfoxide (DMSO), 및 protease inhibitor cocktail 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (P/S), trypsin - ethylenediaminetetraacetic acid (T/E), bicinchoninic acid assay (BCA) kit 그리고 ERK 특정 억제제인 PD98059는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Bovine calf serum (B/S)은 Gibco™ (Grand Island, MD, USA)에서 구입하였다. Tris-buffered saline (TBS), phosphate buffered saline (PBS), enhanced chemiluminescence (ECL) kits, 및 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer는 Biosesang (Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. Lactate dehydrogenase (LDH), a cytotoxicity assay kit, 및 a triglyceride quantification assay kit는 DoGenBio (Guro-gu, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 2X Laemmli sample buffer는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 다음의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 그리고 MITF와 같은 primary 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. FABP4, FAS, C/EBP α , C/EBP β , PPAR γ , phosphor-Ser133-CREB, phospho-Thr172-AMPK, total-AMPK, phosphor-Ser79-ACC, total-ACC, phosphor-Thr180/Tyr182-p38, total-p38, phospho-Thr183/Tyr185-SAPK/JNK, total-JNK, phospho-Thr202/Tyr204-p44/42/ERK, total-ERK, phospho-Ser473-AKT, total-AKT, 그리고 β -actin과 같은 primary 항체들은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하여 Western blot 실험에 사용하였다. 또 다른 primary 항체인 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하여

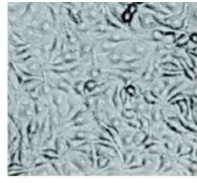
사용하였다. ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 단백질 수준을 정량화하고 그래프로 나타내었다. 실험에 사용된 모든 시약은 analytical grade 시약을 사용하였다.

2. 세포배양

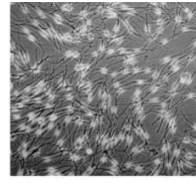
PH의 멜라닌 생성 억제 실험에 사용된 B16F10 murine melanoma 세포는 한국 세포주 은행 (Koeran Cell Line Bank)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10 % fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에 37°C, 5% CO₂ 및 습한 조건의 incubator에서 배양하였다. 세포는 적절한 성장과 상태를 보전하기 위해 seeding 후 4일 마다 80% confluence 되었을 때 sub-culture를 진행해주었다.

인간 표피 멜라닌세포(Human epidermal melanocytes; moderately pigmented donor, HEMn-MP)는 Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 세포는 1% 인간 멜라닌세포 성장 보조제(human melanocyte growth supplements) 및 1% penicillin/streptomycin이 함유된 254 배지 Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)에 37°C, 5% CO₂ 및 습한 조건의 incubator에서 배양하였다. B16F10 및 HEMn-MP는 티로시나아제 활성(Tyrosinase activity) 및 멜라닌 함량(Melanin contents) 분석을 위해 72시간 동안 PH 및 α -MSH (200 nM)을 동시 처리하였다. α -MSH (200 nM) 및 알부틴(Arbutin) 100 μ M을 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였다.

PH의 지방생성 억제 실험에 사용된 3T3-L1 preadipocytes 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10 % bovine calf serum (B/S) 및 1% penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에 37°C, 95% air, 5% CO₂ 및 습한 조건의 incubator에서 배양하였다. 세포는 적절한 성장과 상태를 보전하기 위해 seeding 후 배양 배지(culture medium)를 격일로 교체해주었고 80% confluence 되었을 때 sub-culture를 진행해주었다.



B16F10 cells



Human epidermal melanocytes

▶ Cell line

- B16F10 mouse melanoma cells : Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)
- Human epidermal melanocytes (moderately pigmented donor, HEMn-MP) : Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

▶ Culture

- B16F10 cells → Medium : DMEM ^{a)} + 10% FBS ^{b)} + 1% penicillin-streptomycin
- HEMn-MP → Medium: 254 medium + 1% human melanocyte growth supplements + 1% penicillin-streptomycin
- Incubation : 5% CO₂ at 37°C

Figure 9. Cell lines and process of cell culture.

3. PH의 멜라닌생성 억제 평가

3.1. 세포독성평가

세포 생존율은 MTT 분석을 사용하여 측정되었다. MTT 실험은 살아있는 세포의 세포질 구획에서 주로 NAD(P)H 의존성 산화환원효소 효소에 의존하여 노란색의 수용성 기질인 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 보라색의 비수용성 formazan으로 환원시키는 능력을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 방법이다. 즉 formazan의 농도가 높을수록 세포 생존율이 높다는 것을 의미한다 (89). B16F10 세포(1.0×10^4 cells/well)를 24-well plate에 seeding 후 24 h 동안 세포 배양 방법에 명시된 조건과 동일한 조건으로 배양한 다음 1.57, 3.13, 6.25 및 12.5 μ M 농도의 PH로 72 h 동안 처리하였다. 그런 다음, MTT 용액이 0.5 g/L 농도로 희석되게 각각의 24 well에 첨가하고 4 h 동안 배양한 후 상층액을 제거하였다. 각각의 well을 Phosphate-buffered saline (PBS)로 한번 세척한 후 형성된 포르마잔 결정(formazan crystals)에 1 mL의 DMSO를 넣고 25°C에서 1 h 동안 용해시켰다. 흡광도는 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Swizerland)를 사용하여 540 nm에서 측정되었다.

3.2. Melanin contents 측정

B16F10 세포(5.0×10^4 cells/well) 및 HEMn-MP 세포(1.0×10^5 cells/well)를 6-well plate 각 well에 seeding 한 후 1.57, 3.13, 6.25, 12.5 μM 농도의 PH와 α -MSH (200 nM)을 동시 처리하였다. 멜라닌 생성 자극제 및 샘플을 처리한 세포는 72 h 동안 세포 배양 방법에 명시된 조건과 동일한 조건으로 배양하였다. 대조군으로는 아무것도 처리되지 않은 세포가 쓰였고 음성대조군으로는 α -MSH (200 nM)만 처리된 세포와 양성대조군으로는 PH 대신 arbutin (100 μM)을 처리한 세포가 사용되었다. 배양 후 상층액을 제거한 뒤, 세포를 PBS로 2회 세척하고 80°C에서 1 h 동안 1N NaOH (10% DMSO) 1mL에 용해시켰다. 실험은 3반복 실험으로 진행되었으며, 방출된 멜라닌은 microplate reader기를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

3.3. 세포내 tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포(8.0×10^4 cells/dish) 및 HEMn-MP(1.0×10^5 cells/well)를 60mm dish 및 6-well plate에 seeding하고 각각의 배양 배지에서 24 h 동안 세포 배양 방법에 명시된 조건과 동일한 조건으로 배양하였다. 다음으로, 세포를 3.13, 6.25, 12.5 μM PH, α -MSH (200 nM) 및 arbutin (100 μM)으로 처리한 후 72 h 동안 배양하였다. 그런 다음, 배양 배지를 제거하고, 세포를 1.5 mL tube에 collecting하고 1% protease inhibitor cocktail을 함유하는 RIPA buffer에 용해시켰다. 세포 용해물(Cell lysates)을 30 min 동안 10 min 마다 vortexing하여 세포를 완전히 용해한 뒤, 15,000 $\times g$ 에서 25 min 동안 원심분리를 진행하였다. 상층액을 collecting하고 BCA 정량 kit를 사용하여 상층액에 포함된 단백질 농도를 정량하였다. 다음으로, 96-well plate 각 well에 동일한 양으로 조정된 각각의 단백질 샘플 20 μL 와 L-DOPA (2 mg/mL) 80 μL 를 혼합하여 티로시나아제 활성 시험을 수행하였다. 96-well plate를 37°C에서 2 h 동안 배양한 후 microplate reader기를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.4. Western blot 분석

B16F10 세포(8.0×10^4 cells/well)를 60 mm dish에 seeding하고 배양 배지에 세포 배양 방법에 명시된 조건과 동일한 조건으로 24 h 동안 배양하였다. 다음으로, 세포를 3.13, 6.25, 12.5 μ M PH, α -MSH (200 nM) 및 arbutin (100 μ M)으로 처리한 후 시간 때 별로 발현하는 target 단백질을 확인하기 위해 1, 2, 3, 4, 24 h 동안 배양하여 세포를 collecting 하였다. 다음으로, 세포를 1% protease inhibitor cocktail을 함유하는 RIPA buffer에 용해시켰다. 세포 용해물(Cell lysates)을 30 min 동안 10 min 마다 vortexing하여 세포를 완전히 용해한 뒤, $15,000 \times g$ 에서 25 min 동안 원심분리를 진행하였다. 세포 용해물의 상층액을 collecting하고 BCA 정량 kit를 사용하여 상층액에 포함된 단백질 농도를 정량하였다. 같은 농도의 단백질이 포함된 상층액 및 2 \times Laemmli sample buffer (5% β -mercaptoethanol)를 1:1 비율로 혼합하고 5 min 동안 가열하여 Western blot 실험을 위한 샘플을 준비하였다. 동일한 양의 단백질(20 μ L)을 포함하는 샘플을 150 V에서 1 h 동안 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels에 로딩하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane으로 transfer하고 5% skim milk를 함유한 1x TBST로 1시간 동안 blocking한 후 Tris-buffered saline (20 mM Tris base, 137 mM NaCl, pH 7.6) containing 0.1% Tween-20 (TBST)로 6회 세척하였다. 그런 다음, membrane을 TBST(1:1000)에 희석한 1차 항체(Primary antibody)로 4°C에서 24 h 동안 반응시킨 후 TBST로 6회 세척하였다. 그런 뒤, 1차 항체가 붙은 membrane을 TBST(1:3000)에 희석한 2차 항체(Secondary antibody)로 1 h 동안 25°C에서 반응시킨 후, 다시 6회 세척하였다. 각각의 표적 단백질 밴드는 Enhanced chemiluminescence (ECL) kit를 사용하여 검출되었다.

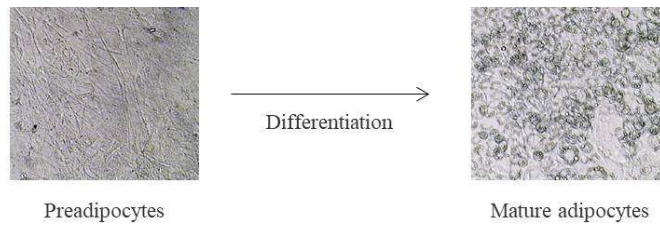
3.5. 통계처리

모든 실험은 3회 수행되었으며 결과 값은 mean \pm SD로 표시되었다. 대조군과 샘플 처리군 사이의 차이는 student's *t*-test를 사용하여 그 유의성을 평가하였다. 유의값은 $p < 0.05(*)$, $p < 0.01(**)$, $p < 0.01(aa)$, $p < 0.01(bb)$ 로 표시하였다.

4. PH의 지방생성 억제 평가

4.1. 지방세포 분화

지방세포로의 분화를 위해 3T3-L1 preadipocytes를 B/S 배지(DMEM, 10% B/S, 1% P/S)를 사용하여 5×10^4 cells/well 밀도로 24-well plate에 seeding하고 2일간 배양한 뒤 세포 confluency가 100%에 도달했을 때 배양 배지를 교체해주고 2일 동안 더 유지하였다. 분화 유도 직전 상태(day 0)의 3T3-L1 preadipocytes에 MDI (DMEM, 1% P/S, 10% FBS, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 μ M dexamethasone (DEX), 10 μ g/mL insulin)를 처리하여 2일 동안 전지방세포의 지방 분화를 유도하였다. 2일 뒤(day 2), 세포에 DMEM, 1% P/S, 10% FBS 및 10 μ g/mL insulin을 함유하는 새로운 분화 배지를 처리하여 2일 동안 더 배양하였다. 그런 다음 세포를 분화 후 배지(post-differentiation medium; DMEM, 10% FBS, 1% P/S)로 교체하여 2일 동안 배양하였고(day 4), day 8이 될 때 까지 2일 마다 분화 후 배지로 교체해주며 분화를 유도하였다. PH의 지방 생성 억제 효과를 확인하기 위해 분화가 완료될 때까지 분화 배지와 함께 12.5, 25, 50 및 100 μ M 농도의 PH를 세포에 처리하였다.



- Cell line
 - 3T3-L1 preadipocytes : American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)
- Culture
 - 3T3-L1 preadipocytes → Medium : DMEM ^{a)} + 10% B/S ^{b)} + 1% penicillin-streptomycin
 - Mature adipocytes → Post-differentiation medium : DMEM + 10% FBS ^{c)} + 1% penicillin-streptomycin
 - Incubation : 5% CO₂ at 37°C

Figure 10. Cell lines and process of cell culture.

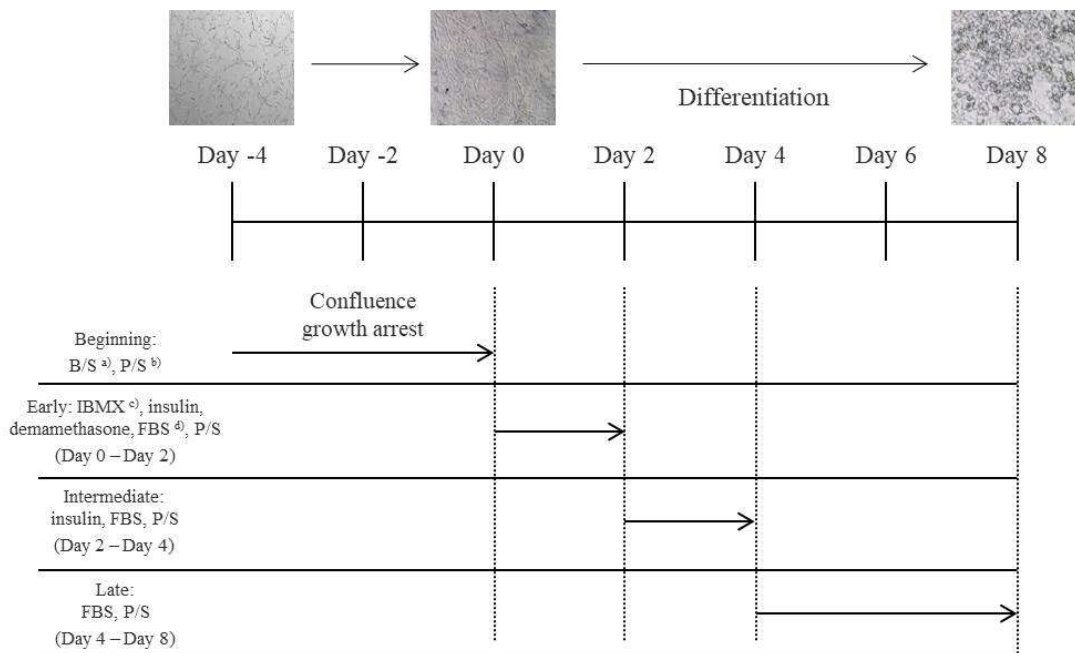


Figure 11. Adipocytes differentiation.

4.2. 세포독성평가

3T3-L1 preadipocytes를 24-well plate에 seeding한 뒤 day 0 까지 배양하였다. 이어서, 세포에 MDI (DMEM, 1% P/S, 10% FBS, 0.5mM IBMX, 1 μ M, 10 μ g /mL insulin)와 함께 PH(12.5, 25, 50, 100, 및 200 μ M)를 처리하고 48 h 동안 배양하였다. 그런 다음, 각 well의 상층액을 수거하였고 LDH 활성은 EZ-LDH 분석 키트를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 정량화한 뒤 세포독성을 평가하였다. 배양 배지는 volume control (blank)로 사용되었고, 각 well의 흡광도는 microplate reader기를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

4.3. Oil Red O 염색 및 triglyceride 분석

지질 축적(lipid accumulation)은 지방세포 분화를 통해 지질 방울(lipid droplet)이 형성되면 Oil Red O를 통해 지질 방울을 염색하여 그 양을 확인할 수 있다. 분화가 완료된 24-well plate 안의 세포를 PBS로 부드럽게 2회 세척하고 10% formalin을 처리하여 30 min 동안 고정하였다. 그 후, 고정된 세포를 탈이온수(deionized water)로 부드럽게 세척하고 준비된 Oil Red O working solution을 각 well에 처리하여 세포를 25°C에서 30 min 동안 염색하였다. Oil Red O working solution은 탈이온수 및 2회 여과된 Oil Red O stock solution (2-propanol containing 0.5% Oil Red O)을 6:4 비율로 희석하여 사용하였다. 염색 후, Oil Red O working solution을 탈이온수로 세척하여 제거하였고 세포 건조를 방지하기 위해 PBS를 넣어 보관하였다. 염색된 지질 방울의 모양 및 분화된 양상을 확인하고 현미경을 이용하여 사진 촬영을 하였다. 지질 축적량을 정량화하기 위해 2-propanol (300 μ L)을 각 well에 첨가하고 shaker에서 30 min 동안 녹였다. 각 well의 흡광도는 microplate reader기를 사용하여 540 nm에서 측정하였다. Triglyceride 함량은 EZ-triglyceride quantification assay kit DoGenBio (Guro-gu, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정 및 정량하였다. 지질 및 triglyceride 함량 분석은 day 8 까지 분화를 유도한 지방세포를 사용하였다.

4.4. Western blot 분석

3T3-L1 preadipocytes를 6-well plate에 seeding하고 day 0 까지 배양하였다. 그런 다음, 세포에 12.5, 25, 50, 100 μM 농도의 PH 및 MDI 분화 배지 (DMEM, 1% P/S, 10% FBS, 0.5 mM IBMX, 1 μM , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin)를 처리 하였고 다양한 표적 단백질의 발현을 확인하기 위해 상이한 시간 동안 분화를 유도하였다. 각 well의 세포를 차가운 PBS로 세척하고 1% protease inhibitor cocktail, 150 mM sodium chloride, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 및 2 mM EDTA로 조성된 RIPA buffer를 사용하여 세포를 용해하였다. 세포 용해물을 10 min 마다 3번 vortexing하고 11,000 x g에서 원심분리해준 뒤 상층액을 collecting하였다. 상층액의 단백질 농도는 BCA kit를 사용하여 정량하였고 동일한 양의 단백질(15-30 μg)을 사용하여 각각의 Western loading sample을 만들었다. 그런 다음 western loading sample을 5 min 동안 95°C에서 가열하고 4°C에서 냉각시켰다. 각 western loading sample에 있는 동일한 양의 단백질을 전기영동을 수행하여 6%-12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels에 무게별로 분리하고 Trans-blot Turbo (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 polyvinylidene difluoride membrane으로 transfer 하였다. 단백질이 transfer 된 membrane을 5% skim milk가 포함된 TBST (20 mM Tris base, 137 mM NaCl, pH 7.6, and 0.1% Tween-20)를 사용하여 25°C에서 1 h 동안 blocking 한 후 TBST로 10분 동안 6회 세척하였다. 그런 다음, membrane을 TBST(1:1000)에 희석한 1차 항체(Primary antibody)로 4°C에서 24 h 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane을 TBST로 6회 세척하고 2차 항체(1:1,000)로 25°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBST로 다시 6회 세척하고 ECL kit를 사용하여 표적 단백질의 발현을 확인하였다.

4.5. 통계처리

모든 데이터의 결과는 mean \pm standard deviation (n = 3 per group)로 표현된다. Student's t-test를 이용한 통계적 분석의 경우 유의 값은 MDI 단독 처리군과 비교하여 * p < 0.05, ** p < 0.01, 미처리 세포 대조군과 비교하여 ## p < 0.01로 표시하였다.

III. 결 과

1. B16F10 및 HEMn-MP 세포에서 PH의 멜라닌생성 영향 평가

1.1. B16F10 세포에서 PH의 세포 생존율

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석을 사용하여 평가되었습니다. B16F10 세포에 대한 PH 세포독성이 없는 범위를 확인하기 위해 세포를 72시간 동안 다양한 농도의 PH(1.57-25 μ M)로 처리하였다. MTT 실험 결과 25 μ M PH로 처리한 세포는 아무것도 처리하지 않은 세포 대조군과 비교하여 MTT 결과가 65% 감소한 것으로 나타났다. 반면, PH 농도(1.57, 3.13, 6.25 및 12.5 μ M)를 처리한 세포는 아무것도 처리하지 않은 세포 대조군과 비교하여 MTT 값의 큰 변화가 없었다 (Figure 12). 따라서 다음의 PH 농도(1.57, 3.13, 6.25 및 12.5 μ M)에서 세포 증식에 대한 독성 효과가 없음이 사료되어 차후 실험에서는 1.57, 3.13, 6.25 및 12.5 μ M 농도의 PH를 처리하여 실험을 진행하였다.

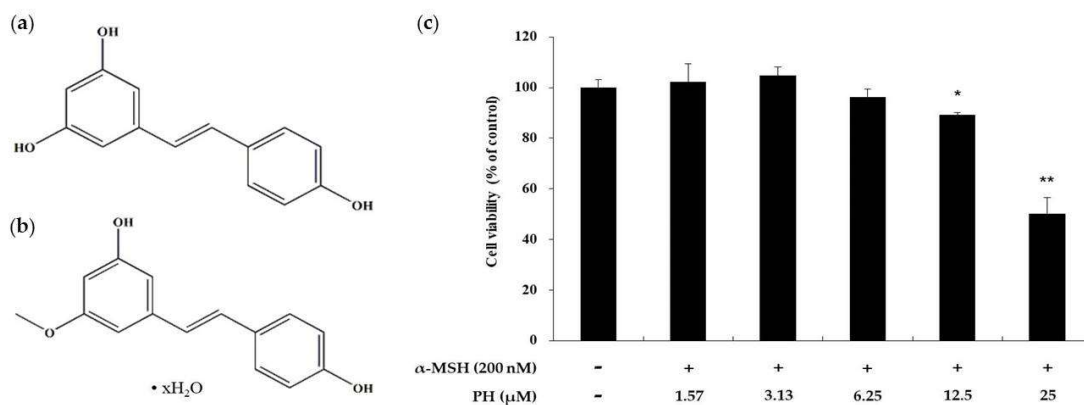


Figure 12. Effects of pinostilbene hydrate (PH) on the viability of B16F10 cells. Chemical structure of (a) resveratrol and (b) pinostilbene hydrate. (c) The cells were treated with various concentrations of PH for 72 h. Cell viability is expressed as percentages relative to untreated cells. The data are presented as the mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

1.2. Melanin contents 및 Tyrosinase 활성화에 대한 PH의 영향

PH가 멜라닌 합성 및 티로시나아제 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포에 독성이 없는 범위 내의 PH(1.57, 3.13, 6.25 및 12.5 μM)를 처리한 후 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성화 실험을 진행하였다. 이 실험에서 α -MSH (200 nM) 및 arbutin (100 μM)은 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용되었다. 세포의 멜라닌 함량(melanin contents)은 아무것도 처리되지 않은 세포 대조군과 비교하여 α -MSH (200 nM)만 처리된 세포에서 21% 증가함을 나타내었다. 반면, 처리된 PH 농도중 최고 농도인 12.5 μM 을 처리한 세포에서는 음성대조군과 비교하여 34% 유의하게 감소시켰다 (Figure 13a). 이러한 PH의 멜라닌 생성 억제 효과가 tyrosinase 활성화 억제에 의한 것인지 확인하기 위해 tyrosinase activity test를 진행하였다. Figure 13b를 보면, 음성대조군의 tyrosinase 활성화는 아무것도 처리되지 않은 세포와 비교하여 78% 증가함을 보였다. 반면, α -MSH (200 nM)로 자극된 세포에 3.13, 6.25, 12.5 μM 의 PH를 처리했을 시 음성대조군에 비해 각각 22%, 52%, 63% 씩 농도 의존적으로 감소함을 보였다. 또한 양성 대조군인 arbutin을 처리한 그룹에서는 음성대조군에 비해 tyrosinase 활성이 38% 감소함을 나타내었다. 따라서 이러한 결과는 PH의 멜라닌 생성 억제 효과가 세포내에서 tyrosinase 활성화 억제를 통해 일어난다는 것을 시사한다.

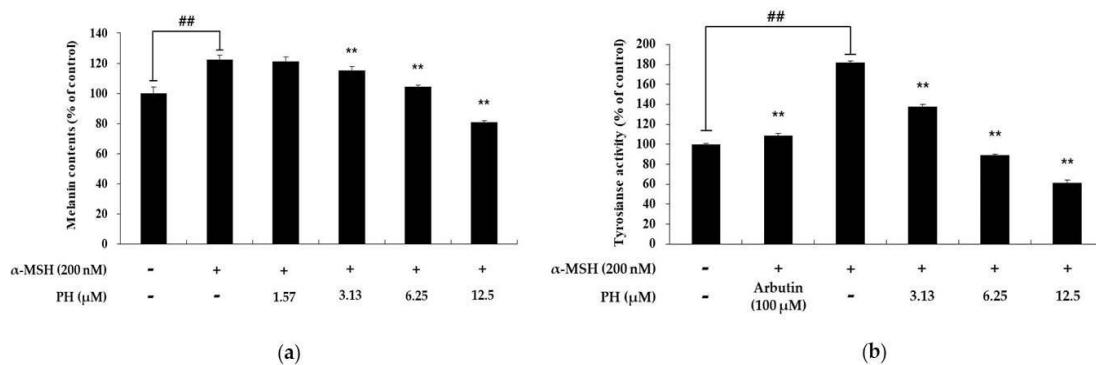


Figure 13. Effects of PH on melanin production and tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with PH at the indicated concentrations for 72 h. α-MSH (200 nM) and arbutin (100 μM) were used as a negative control and positive control, respectively. (a) The melanin content and (b) tyrosinase activity are expressed as percentages relative to untreated cells. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as mean ± SD. # p < 0.01 in comparison with the untreated cell group and **p < 0.01. compared with the α-MSH-treated group.

1.3. Western blot 분석

1) B16F10 세포에서 멜라닌생성 효소 및 MITF 발현에 대한 PH 효과

Tyrosinase, TRP-1 및 -2와 같은 멜라닌 생성 효소는 멜라닌 생성 과정 중에 관여하는 촉매제로써 중요한 역할을 하고 있다 또한 MITF는 멜라닌 생성 효소들의 전사인자로서 이러한 효소 발현에 영향을 끼쳐 세포에서 멜라닌 생성을 조절하는 역할을 한다 (13-15). 따라서 PH가 이러한 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현에 영향을 주는지 확인하기 위해 Western blot 실험을 진행하였다. B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소의 발현은 α -MSH (200 nM)만 처리된 세포에 비해 PH 처리 시 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 특히, 최고 농도인 12.5 μ M PH 처리군은 아무것도 처리하지 않은 세포 대조군보다 더 감소된 경향을 나타내었다 (Figure 14). 이러한 PH의 멜라닌 생성 효소 효과에 대한 MITF의 영향을 확인하기 위해 MITF 단백질 발현을 확인해 보았다. 먼저 PH를 처리하여 시간별 MITF의 발현량을 확인한 결과 3시간 처리 시 MITF의 발현이 가장 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 15a). 따라서 후속실험에서 다양한 농도의 PH를 3시간 동안 처리한 결과 농도 의존적으로 MITF 발현이 감소함을 확인하였다 (Figure 15b). 이러한 결과는 멜라닌 생성 효소 발현이 전사조절 인자인 MITF 발현 억제에 의해 하향조절됨을 나타낸다.

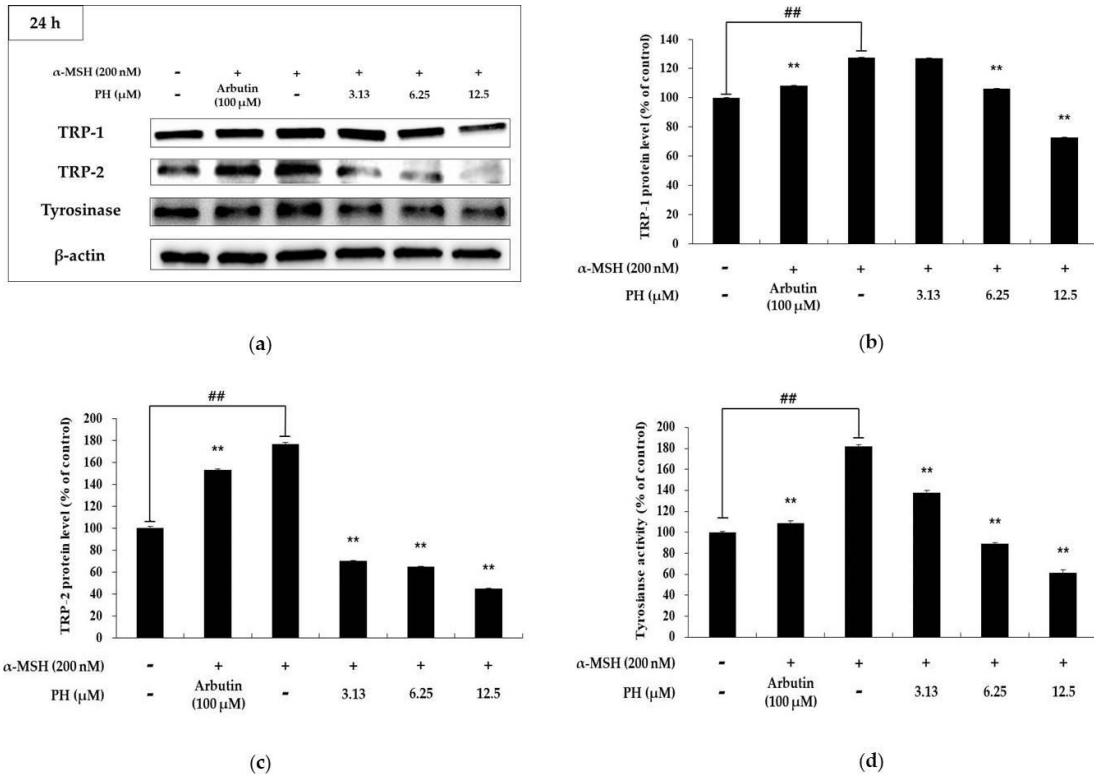


Figure 14. Effects of PH on the protein expression levels of TRP-1, TRP-2, and tyrosinase in B16F10 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of PH for 24 h. α -MSH (200 nM) and arbutin (100 μ M) were used as a negative and positive control, respectively. Protein levels were examined by Western blotting. (a) Western blotting and protein levels of (b) TRP-1, (c) TRP-2, and (d) tyrosinase. Results are expressed as percentages of untreated cells. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm SD. ## $p < 0.01$ in comparison with the untreated cell group and ** $p < 0.01$ compared with the α -MSH-treated group.

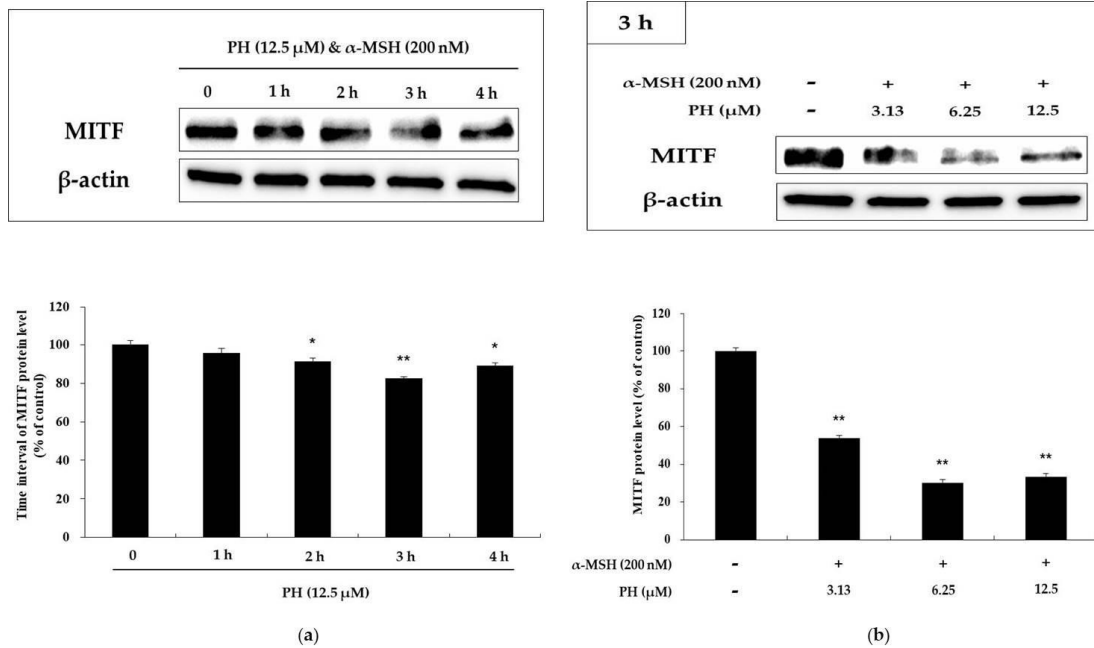


Figure 15. Effects of PH on MITF expression in B16F10 cells. (a) Cells were treated with 12.5 μM PH at different time intervals. (b) Cells were treated with the indicated concentrations of PH for 3 h. Protein levels were examined by Western blotting. Results are expressed as percentages of the untreated cells. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as the mean ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2) B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 PH 효과

PH가 B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로를 통해 MITF 발현을 억제한다는 것을 확인하기 위해 MAPK 인산화를 조사하였다. 그 결과, PH는 ERK 및 p38의 인산화를 농도 의존적으로 유의하게 증가 및 감소시켰지만 JNK 인산화에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 16). 다음은 ERK 인산화 증가가 tyrosinase 활성 억제에 관여하는지 여부를 결정하기 위해 ERK 특정 억제제인 PD98059를 사용하여 tyrosinase 활성 실험을 진행하였다. 그 결과, 200 nM α -MSH 단독 처리 및 cocktail(200 nM α -MSH, 10 μ M PD98059) 처리에 의해 tyrosinase 활성은 증가하였지만 각각 12.5 μ M PH 처리에 의해 활성이 억제하는 것을 보여 주었다 (Figure 17). 따라서 이러한 결과는 PH가 세포에서 ERK MAPK 및 p38 MAPK 신호 전달 경로를 통해 전사인자인 MITF의 발현을 억제하고 멜라닌 생성 효소의 발현을 감소시켜 최종적으로 멜라닌 생성을 하향조절 함을 나타낸다.

3) B16F10 세포에서 AKT 신호 전달 경로에 대한 PH 효과

최근 연구에 따르면 AKT의 인산화 증가는 B16F10 세포에서 멜라닌 생성을 하향조절 한다고 보고되었다 (24,25). 따라서 PH가 AKT 인산화 조절과 관련이 있음을 확인하기 위해 α -MSH로 자극된 세포를 다양한 농도의 PH로 처리하여 그 인산화 발현 정도를 확인하였다. 결과는 AKT의 인산화가 PH 처리에 의해 농도 의존적으로 유의하게 증가함을 보여주었다 (Figure 18). 이러한 결과를 통해 PH가 AKT 인산화를 증가시켜 멜라닌 생성을 감소시킴을 알 수 있다.

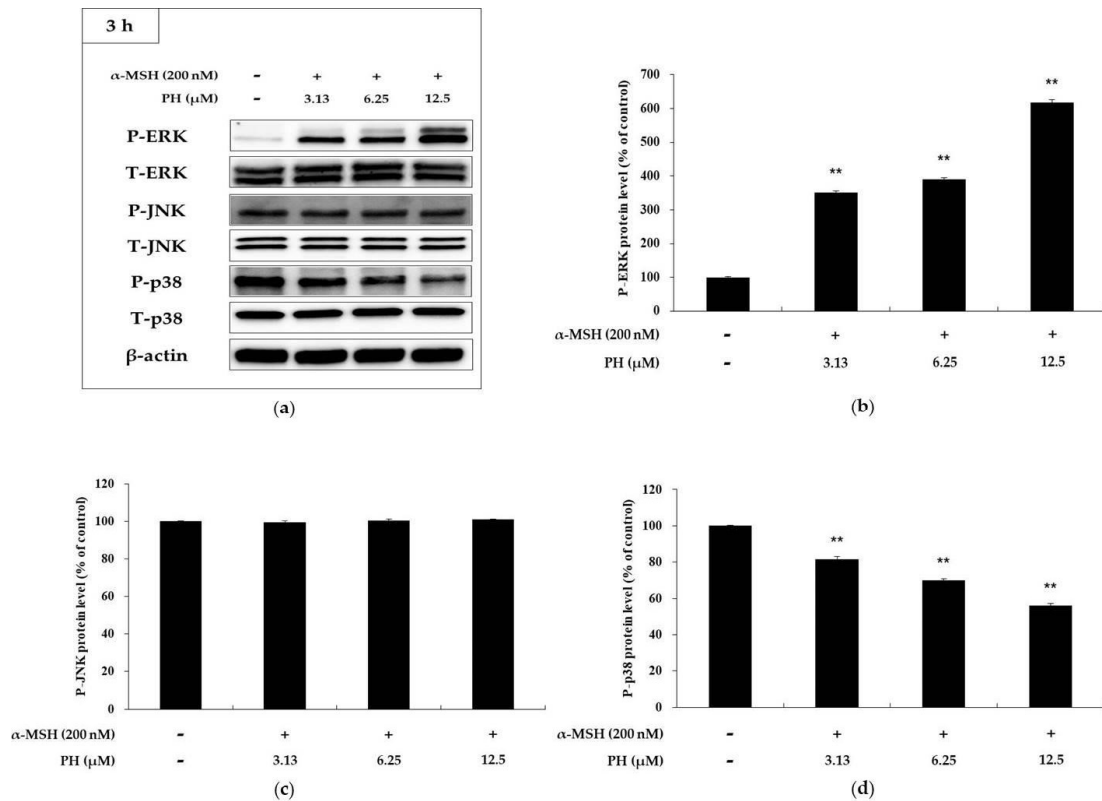


Figure 16. Effects of PH on phosphorylation of ERK, p38, and JNK. B16F10 cells treated with PH at the indicated concentrations for 3 h. (a) Western blotting results and protein levels of (b) p-ERK, (c) p-JNK, and (d) p-p38. Results are expressed as percentages of the untreated cells. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$. P: phosphorylated, T: total.

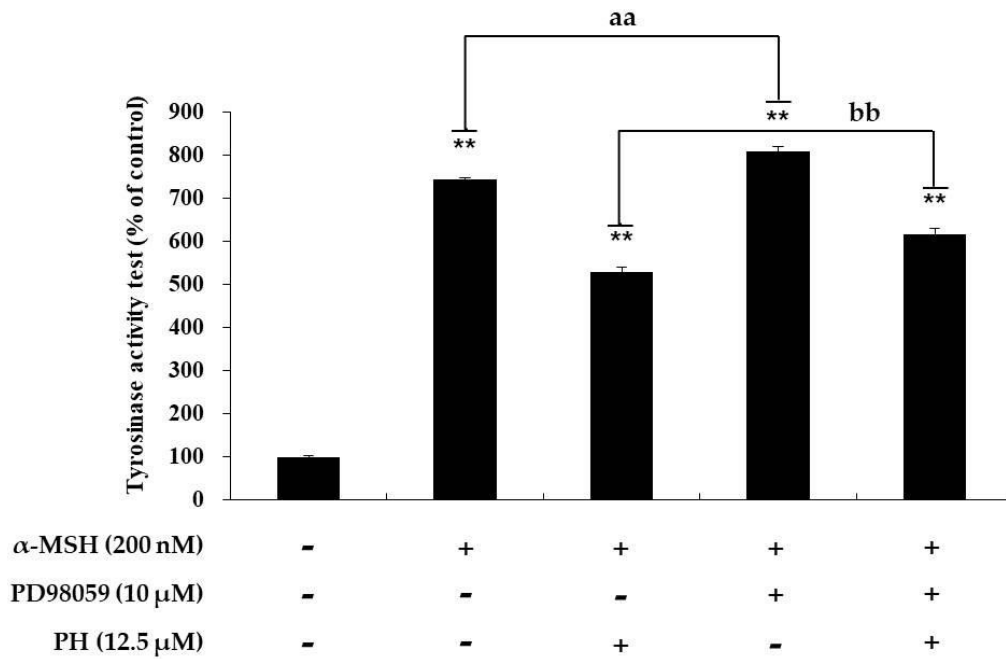
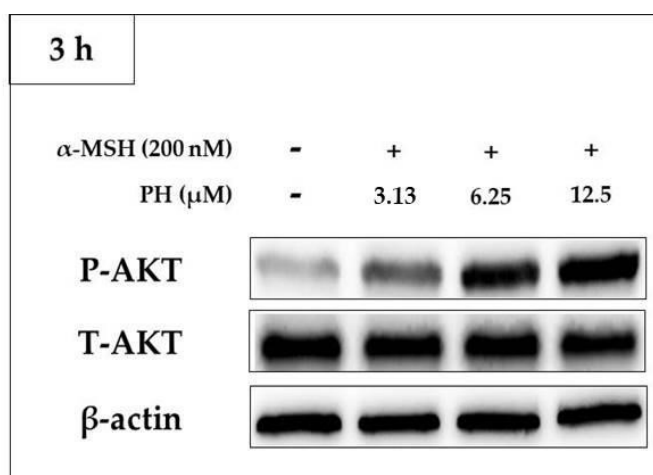
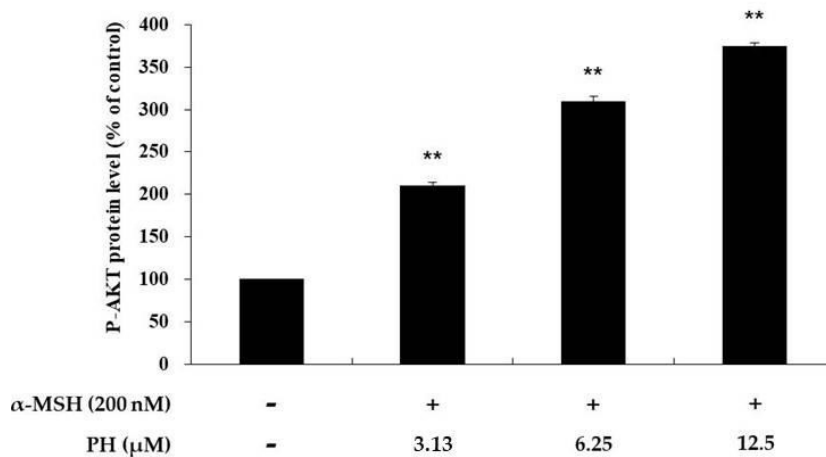


Figure 17. Effects of PD98059, an ERK inhibitor, on tyrosinase activity in B16F10 cells. Cells were treated with α -MSH (200 nM) or PD98059 (10 μ M) alone or in combination with or without PH at a single concentration of 12.5 μ M. Results are expressed as percentages of the untreated cells. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$, aa $p < 0.01$, bb $p < 0.01$.



(a)



(b)

Figure 18. Effects of PH on AKT phosphorylation. B16F10 cells were treated with PH at the indicated concentrations for 3 h. (a) The Western blotting results and (b) protein levels of p-AKT. Results are expressed as percentages of the untreated cells. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$. P: phosphorylated, T: total.

1.4. 인간 표피 멜라닌세포(HEMn-MP)에서 PH의 멜라닌생성 억제 효과

취 흑색종 세포인 B16F10 세포에서 PH의 멜라닌 저해 활성이 정상 인간 멜라닌 세포에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 PH로 처리한 인간 표피 멜라닌 세포(HEMn-MP)에서 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성을 조사하였다. 이 실험에서 α -MSH (200 nM) 및 arbutin (100 μ M)은 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용되었다. 결과는 α -MSH 단독 처리 세포의 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성이 아무 것도 처리하지 않은 세포 대조군과 비교하여 각각 23% 및 24% 증가함을 보여주었다. 이와 대조적으로 양성대조군인 arbutin을 처리한 세포에서는 α -MSH 단독 처리 세포와 비교하여 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성이 각각 9% 및 22% 감소하였다. 또한 PH 3.13, 6.25, 12.5 μ M을 처리한 세포에서의 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성은 α -MSH 단독 처리 세포와 비교하여 각각 2%, 20%, 38% 및 40%, 52%, 68%로 처리한 농도에 따라 유의하게 감소하였다 (Figure 19).

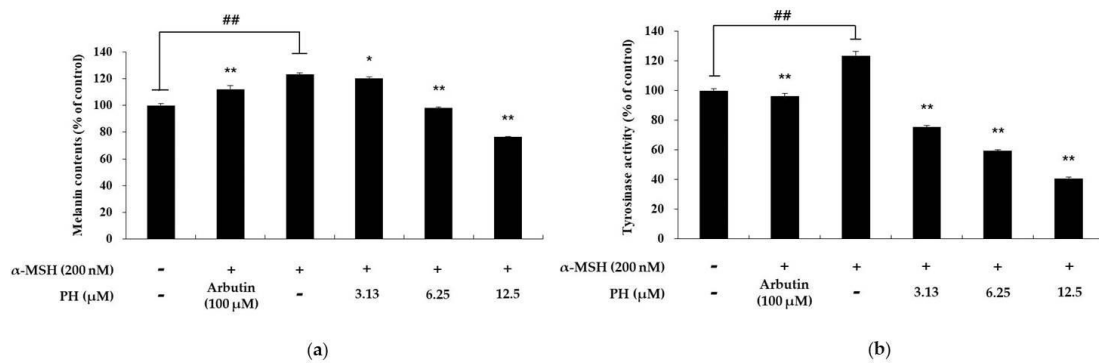


Figure 19. Effects of PH on melanin production and tyrosinase activity in normal human melanocytes. Cells were treated with PH at the indicated concentrations for 72 h. α -MSH (200 nM) and arbutin (100 μ M) were used as a negative and positive control, respectively. (a) The melanin content and (b) tyrosinase activity are expressed as percentages relative to untreated cells. All experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed as the mean \pm SD. ## $p < 0.01$, compared with the untreated cell group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with the α -MSH-treated group.

2. 3T3-L1 adipocytes에서 PH가 지방생성에 미치는 영향

2.1. 3T3-L1 지방세포에 대한 PH의 독성

3T3-L1 지방세포에 대한 PH의 독성을 확인하기 위해 LDH assay를 수행하였고, 분화 48시간 후에 배지로 방출된 LDH의 양을 정량하였다. 12.5, 25, 50 및 100 μM 농도의 PH 처리는 대조군 세포와 비교하여 배지 내 LDH 함량에는 큰 차이가 없었다. 그러나 200 μM 농도의 PH 처리는 배지 내 LDH 함량이 대조군 세포에 비해 46% 증가하였다 (Figure 20c). 이 결과를 바탕으로 PH는 200 μM 농도에서 세포독성이 있음을 확인하였고, 12.5, 25, 50, 및 100 μM 의 PH를 처리하여 차후 실험을 진행하였다.

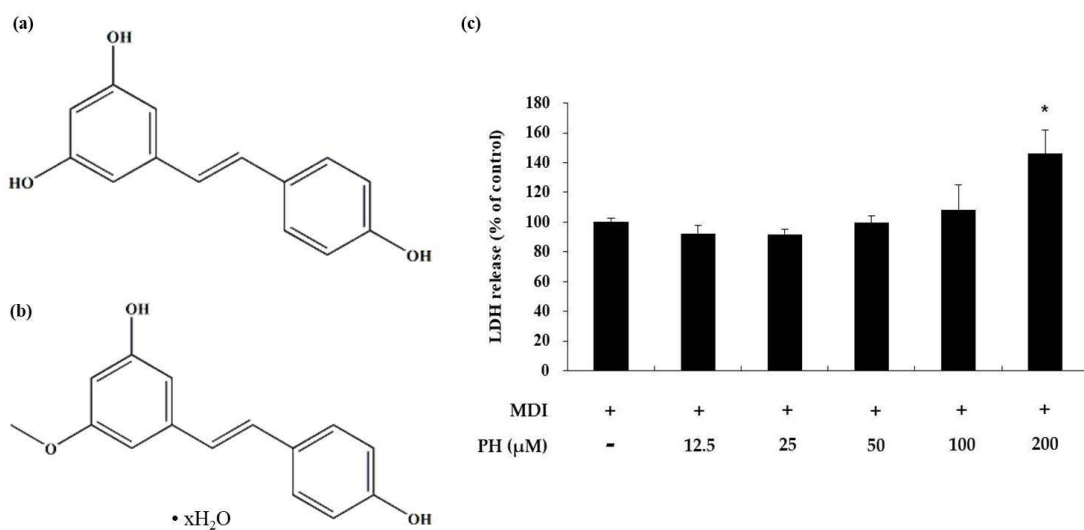


Figure 20. Effects of PH on cytotoxicity in 3T3-L1 adipocytes. The chemical structure of (a) Resveratrol and (b) Pinostilbene hydrate. Adipocyte differentiation was induced in post-confluent cells using IBMX/DEX/insulin (MDI) differentiation medium, and the cells were treated with indicated concentrations of PH for 48 h. (c) Cytotoxicity was measured using the LDH assay. LDH release is expressed as percentages relative to the control group (MDI treated only). All values are presented as mean \pm standard deviation. (n=3 per group). * indicates significantly different versus MDI alone ($p < 0.05$).

2.2. 3T3-L1 지방세포에서 지질 축적 (lipid accumulation) 및 triglyceride 함량에 대한 PH의 영향

분화가 완료된 성숙한 지방세포(mature adipocytes)는 지질 방울(lipid droplet)을 형성하여 중성지방(triglyceride)을 포함한 지질(lipid)을 축적한다 (51). 이는 Oil Red O (ORO) 염색 분석을 통해 축적된 지질을 시각적으로 확인할 수 있고 그 양 또한 측정할 수 있다. 본 연구에서는 PH가 지질 축적 억제에 영향을 미치는지 알아보기 위해 3T3-L1 세포에 다양한 농도의 PH를 함유한 분화 배지를 처리하여 8일 동안 분화를 유도한 후 ORO 염색 분석을 수행하였다. 지질 축적은 아무것도 처리하지 않은 세포 대조군과 비교하여 분화가 유도된 지방세포에서 3.2배 증가한 것을 확인할 수 있었다. 하지만 지방세포 분화 과정 동안 12.5, 25, 50 및 100 μM 의 PH를 처리한 그룹에서는 지질 축적을 각각 13.2%, 9.4%, 21.3% 및 67.9% 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 21b). 다음으로 중성지방(TG) 함량 분석은 PH가 성숙한 지방세포에서 TG 함량을 감소시키는지 여부를 확인하기 위해 수행되었다. TG 함량은 아무것도 처리하지 않은 세포 대조군과 비교하여 성숙한 지방세포에서 현저하게 높았지만, PH(12.5, 25, 50 및 100 μM)처리 시 성숙한 지방세포와 비교하여 각각 2.2%, 3.1%, 31.4% 및 72.6% 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 21c).

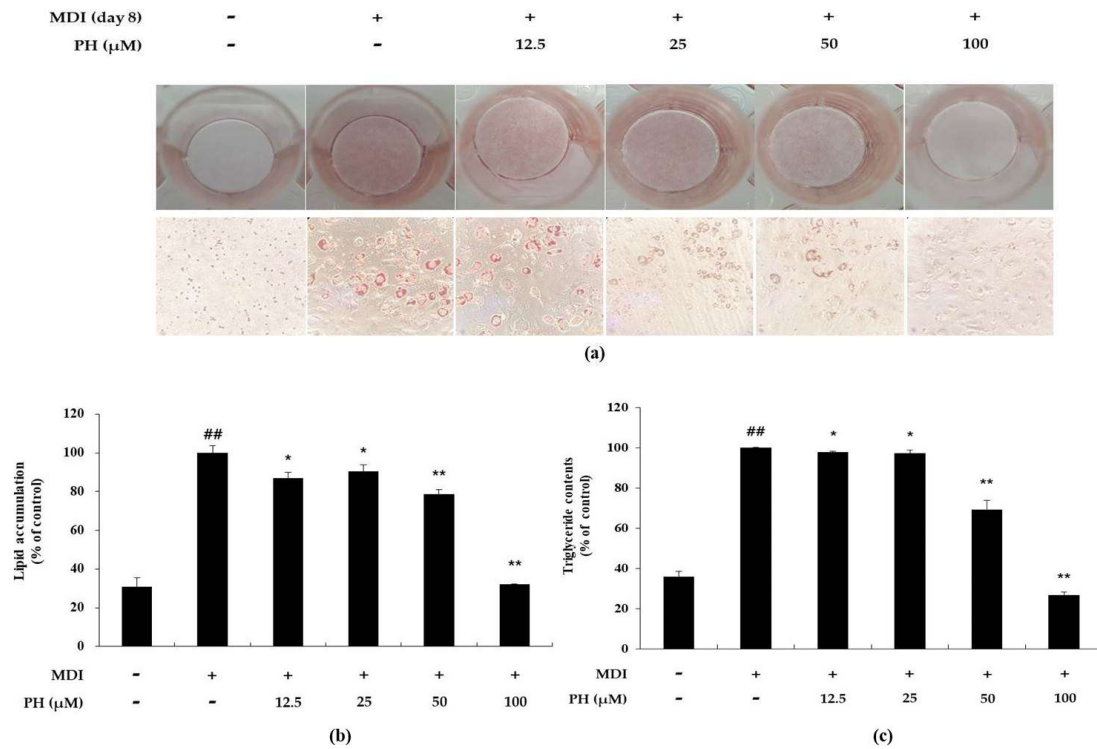


Figure 21. Effect of PH on lipid accumulation and triglyceride content in 3T3-L1 adipocytes. Adipocyte differentiation was induced in post-confluent cells using MDI differentiation medium, and the cells were treated with indicated concentrations of PH for 8 days. (a) Differentiated adipocytes were stained using Oil Red O on day 8 and the cell image visualized by microscopy at 100 \times magnification. (b) The stained lipid droplets were dissolved using 2-propanol and measured using a spectrophotometer to quantify lipid accumulation. (c) The reduction in TG content was quantified using the EZ-triglyceride quantification assay kit. Lipid accumulation and TG content are expressed as percentages relative to the control group treated with MDI alone. All values are presented as mean \pm standard deviation. (n=3 per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicates significant differences versus the MDI-only control. ## $p < 0.01$ indicates significant differences versus an untreated control.

2.3. Western bolt 분석

1) 지방 생성 관련 전사 인자(adipogenic-related transcription factors) 발현에 대한 PH의 영향

지방 세포의 분화 및 지질 축적은 지방 생성 전사 인자의 발현과 관련이 있다 (59,60). 이들 전사인자의 발현에 대한 PH의 영향을 조사하기 위해 6일 동안 분화를 유도한 3T3-L1 지방세포를 사용하여 Western blot 분석을 수행하였다. 결과는 PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c 및 FABP4와 같은 지방 생성 관련 전사 인자의 발현이 미처리 세포 대조군보다 분화된 지방 세포에서 증가하였음을 보여주었다. 그러나 이러한 지방 생성 관련 전사인자들의 단백질 발현은 그래프에 표시된 농도의 PH 처리에 의해 감소하였음을 보여주었다 (Figure 22).

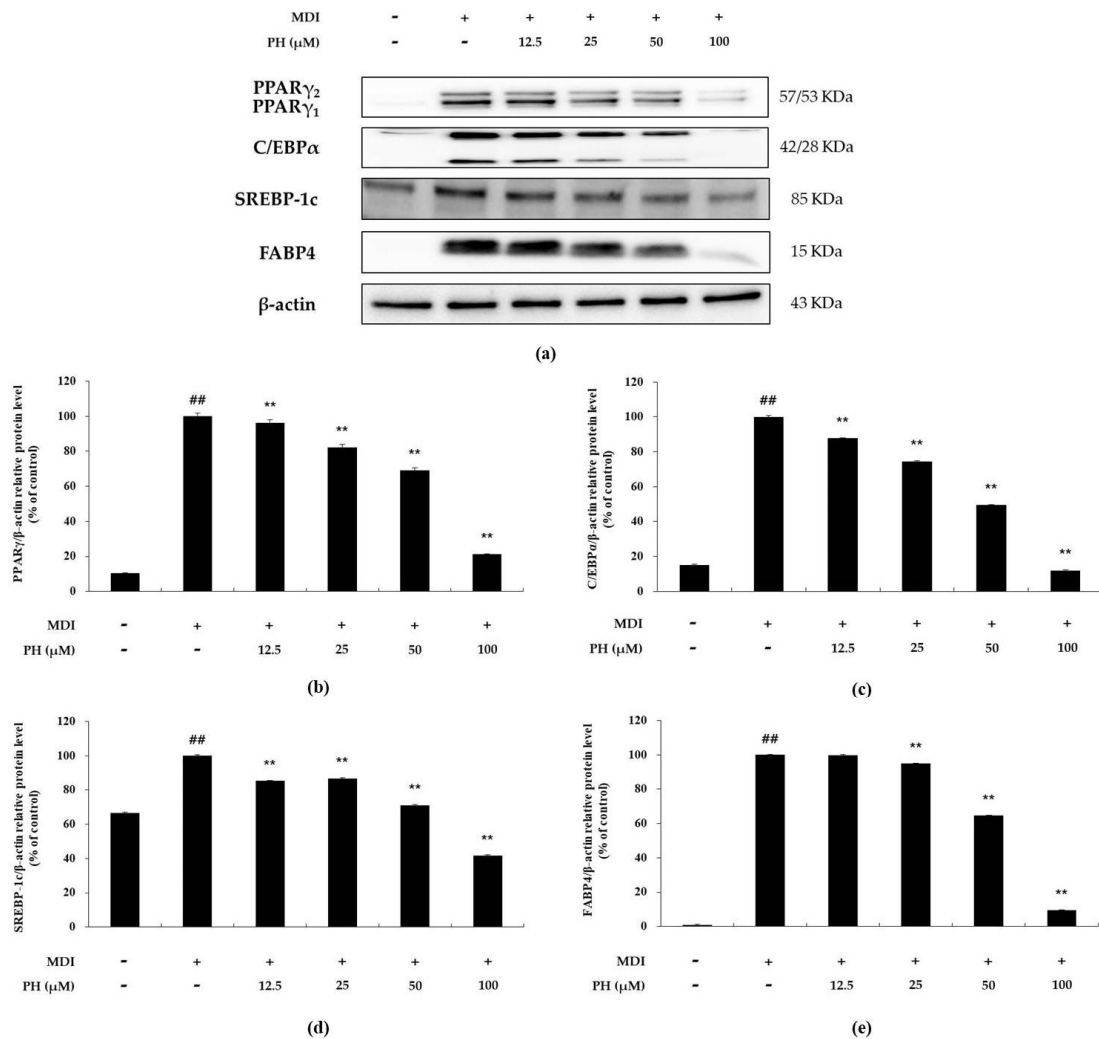


Figure 22. Effect of PH on expression of adipogenesis-related transcription factors. Adipocyte differentiation was induced in post-confluent cells using MDI differentiation medium and treated indicated concentrations of PH for 6 days. (a) Western blot of PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c, FABP4, and β -actin in 3T3-L1 adipocytes. The relative protein levels of (b) PPAR γ / β -actin, (c) C/EBP α / β -actin, (d) SREBP-1c/ β -actin, and (e) FABP4/ β -actin are presented as the mean \pm standard deviation from three independent measurements using the ImageJ program. The results in the relative protein

levels are expressed as percentages relative to the control group treated with MDI alone. ** $p < 0.01$ indicates significantly differences versus the MDI-only control. ## $p < 0.01$ indicates significant differences versus an untreated control.

2) MAPK 인산화에 대한 PH의 영향

여러 지방 생성 관련 메커니즘의 활성화가 PH에 의해 억제되는지 여부와 억제된다면 어떤 신호 전달 경로를 통해 억제되는지를 확인하기 위해 관련 메커니즘 연구(mechanistic study)가 수행되었다. 여러 신호 전달 경로 중 MAPK 신호 전달 경로는 다양한 세포의 자극에 의해 활성화되어 특정 부위의 인산화를 통해 다양한 세포내 반응을 유도하며, 그 구성요소로는 ERK, JNK 및 p38이 있다. 최근 연구에 따르면 MAPK의 활성화는 지방 생성의 초기 단계에서 전지방세포 분화에 영향을 미친다고 보고되었다 (70,71). 따라서 PH가 분화 유도된 3T3-L1 세포에서 ERK (P-ERK), JNK (P-JNK) 및 p38 (P-p38)의 인산화를 억제하는지 확인하기 위해 Western blot 분석을 수행하였다. 결과는 P-ERK, P-JNK 및 P-p38은 미처리 세포 대조군과 비교하여 분화 유도된 세포 대조군에서 상향조절되었다. 이와는 대조적으로, 각각의 인산화 된 단백질 발현 수준은 분화 유도된 세포 대조군에 비해 PH 처리 시 감소하는 경향을 나타내었다 (Figure 23). 따라서 결과는 PH가 MAPK 신호 전달 경로에서 인산화의 억제를 통해 지방 생성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.

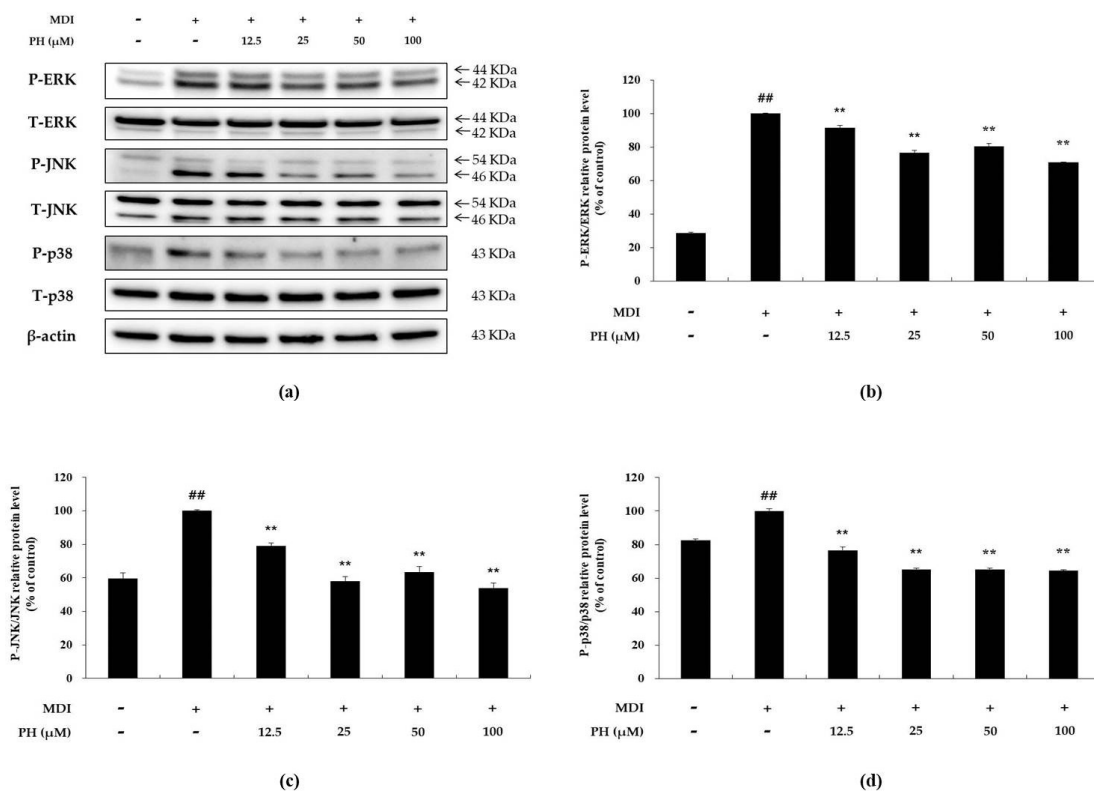


Figure 23. Effect of PH on the phosphorylation of MAPK. Adipocyte differentiation was induced in post-confluent cells using MDI differentiation medium, and the cells were treated with indicated concentrations of PH for 30 min. (a) The western blot result of P-ERK/ERK, P-JNK/JNK, P-p38/p38, and β-actin in 3T3-L1 adipocytes. The relative protein levels of (b) P-ERK/ERK, (c) P-JNK/JNK, and (d) P-p38/p38 are presented as the mean ± standard deviation from three independent measurements using the ImageJ program. The results in the relative protein levels are expressed as percentages relative to control cells treated with MDI alone. ** $p < 0.01$ indicates significant differences versus the MDI-only control. ## $p < 0.01$ indicates significant differences versus an untreated control.

3) AKT 관련 신호 전달 경로에 대한 PH의 영향

AKT 인산화(P-AKT)는 지방 생성 관련 전사 인자 발현의 조절자로서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 (64). 따라서 P-AKT에 대한 PH의 영향을 확인하기 위해 Western blot 분석을 수행하여 P-AKT 단백질 수준을 확인하였다. Figure 24a에 나타난 바와 같이, P-AKT 발현은 미처리 세포 대조군과 비교하여 분화 유도된 세포 대조군에서 현저히 높았지만, 농도 의존적으로 PH 처리에 의해 유의하게 감소하였음을 보여주었다. 최근 연구에 따르면 P-AKT는 지방생성 관련 인자인 CREB의 인산화(P-CREB) 및 C/EBP β 발현에 영향을 미치고, 또한 활성화된 CREB 및 C/EBP β 는 PPAR γ 및 C/EBP α 발현을 증가시켜 지방세포 분화를 유도한다고 보고되었다 (67-69,84). 결과는 P-CREB 및 C/EBP β 단백질 발현이 분화 유도된 세포 대조군에 비해 PH 처리에 의해 감소되었음을 보여주었다 (Figure 24b). 따라서 이러한 결과는 PH가 AKT 인산화 억제를 통해 지방세포 분화와 관련된 하위영역(downstream) 단백질들의 발현 및 활성을 감소시켜 지방 생성의 하향 조절을 유도한다는 것을 나타낸다.

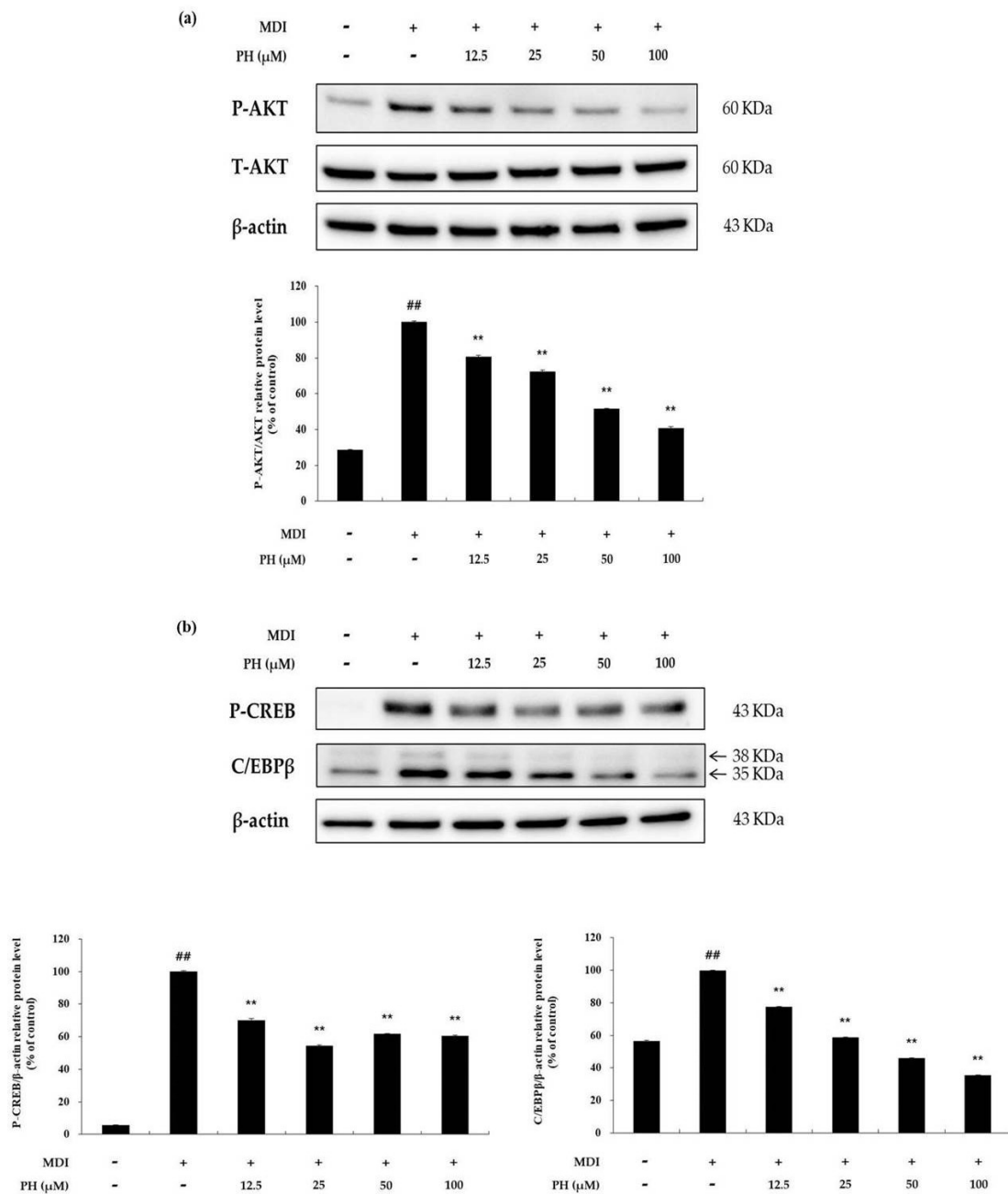


Figure 24. Effect of PH on the AKT-related signaling pathways. Adipocyte differentiation was induced in post-confluent cells using MDI differentiation medium, and the cells were treated with indicated concentrations of PH for 30 min (AKT) and 2 h (P-CREB, C/EBP β). (a) Result of Western blotting and protein levels of P-AKT/AKT and β -actin. (b)

Result of Western blotting and protein levels of P-CREB, C/EBP β , and β -actin in 3T3-L1 adipocytes. The relative protein levels of P-AKT/AKT, P-CREB/ β -actin, and C/EBP β / β -actin are presented as the mean \pm standard deviation from three independent measurements using the ImageJ program. The results in the relative protein levels are expressed as percentages relative to control cells treated with MDI alone. ** $p < 0.01$ indicates significantly differences versus the MDI-only control. ## $p < 0.01$ indicates significant differences versus an untreated control.

4) AMPK 신호 전달 경로에 대한 PH의 영향

에너지 대사의 중요한 조절자인 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 인산화(Thr 172)에 의해 활성화되고 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 비활성화에 관여하여 지질 생성을 억제한다 (72-75). Figure 25a에 나타낸바와 같이, 분화가 유도된 세포 대조군에 비해 PH 처리 시 AMPK(P-AMPK) 및 ACC(P-ACC)의 인산화가 증가하였다. 특히, P-AMPK 및 P-ACC 단백질 수준은 100 μ M PH 처리에서 각각 2.4배 및 2.3배 증가하였다. 이와 같이 PH 처리로 인한 P-AMPK 및 P-ACC 단백질 발현의 증가가 지질 생성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 3T3-L1 세포를 8일 동안 분화시킨 후 지질 생성 관련 단백질의 발현을 확인하였다. 결과는 FAS 및 FABP4의 단백질 발현이 PH 처리에 의해 감소되는 것으로 나타났다 (Figure 25b). 이러한 결과들은 PH가 AMPK 신호 전달 경로를 활성화하여 분화된 3T3-L1 세포에서 지질 생성 억제를 유도함을 시사한다.

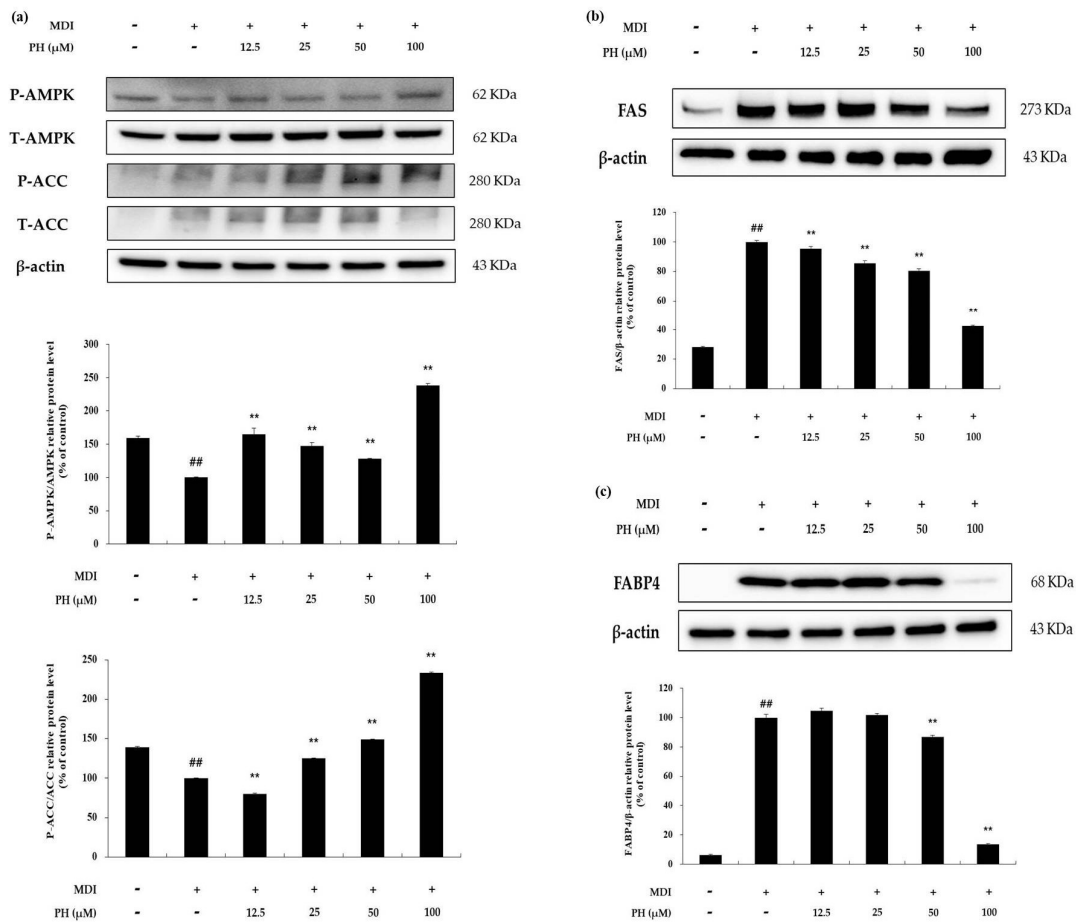


Figure 25. Effect of PH on the AMPK signaling pathways. Adipocyte differentiation was induced in post-confluent cells using MDI differentiation medium, followed by treatment with the indicated concentrations of PH for 6 days (AMPK, ACC) and 8 days (FAS, FABP4). (a) Results of western blotting analysis, and the protein levels of P-AMPK/AMPK, P-ACC/ACC, and β -actin. (b) Results of western blotting analysis, and the protein levels of FAS and β -actin in 3T3-L1 adipocytes. (c) Result of western blotting analysis, and the protein levels of FABP4 and β -actin in 3T3-L1 adipocytes. The relative protein levels of P-AMPK/AMPK, P-ACC/ACC, FAS/ β -actin, and FABP4/ β -actin are presented as the mean \pm standard deviation from three independent measurements using the ImageJ program. The relative

protein levels are expressed as percentages relative to protein levels of control cells treated with MDI alone. ** $p < 0.01$ indicates significant differences versus the MDI-only control. ## $p < 0.01$ indicates significant differences versus an untreated control.

IV. 고찰

멜라닌의 주된 역할로는 인체의 착색을 결정하고 자외선(UV)으로 인한 광 손상으로부터 피부를 보호하는 것이다. 그러나 과도하게 생성된 멜라닌은 흑색종(melanoma), 주근깨(Freckles), 검버섯(lentigo), 반점(blotches)과 같은 과색소침착증(hyperpigmentation)을 유발할 수 있다 (1-8). 지방조직은 다양한 내분비 호르몬 및 사이토카인의 분비, 에너지저장 및 대사를 통해 체내의 항상성을 유지하는 중요한 역할을 한다 (46,47). 그러나 비만으로 인한 지방세포의 크기 증가(비대;hypertrophy)와 과도한 생산(과형성;hyperplasia)은 체내의 항상성에 영향을 주어 결국 제2형 당뇨병(type 2 diabetes), 고혈압(hypertension), 고지혈증(hyperlipidemia), 심혈관질환(cardiovascular disease), 암(cancer) 등의 합병증을 유발할 수 있다 (48-50). 따라서 멜라닌 및 지방생성 조절에 관여하는 새로운 물질들을 찾고 그 작용 기전을 연구하는 것은 과색소침착증 및 비만을 치료하는데 있어 기본적인 연구 전략이 될 수 있다.

천연물에는 다양한 생리활성 효과가 있는 폴리페놀(Polyphenolic) 화합물이 존재하며 광범위하게 연구되고 있다 (39,40). 스틸베노이드(Stilbenoid)는 다양한 식물 중에서 자연적으로 발생하는 폴리페놀 화합물로 stilbene 구조(C6-C2-C6)의 기본 골격을 가지며 resveratrol과 같이 다양한 형태의 유도체로 존재한다(76). Resveratrol의 생리활성 특성에는 항염(anti-inflammatory), 항산화(antioxidative), 신경 보호(neuroprotective), 심장 보호(cardioprotective), 항암(anticancer) 및 항비만 효과(anti-obesity effects)가 있다 (26-31). 그러나 Resveratrol은 환경적 불안정성(sensitive to UVR, oxygen, alkaline pH, high temperature)으로 인해 생체이용률(bioavailability) 및 생체활성(bioactive)이 감소하는 결과가 발생한다. 따라서 최근에는 많은 resveratrol 유도체들, 특히 pinostilbene을 포함한 메틸화 화합물(methylated compound)이 활발히 연구되고 있다 (32-34,39,40,77).

이 연구에서는 resveratrol 유도체인 pinostilbene hydrate (PH)의 멜라닌 및 지방생성 억제 효과에 초점을 맞추고 B16F10 세포와 3T3-L1 지방세포를 사용하여

그 효능을 평가하였다. 또한 각각의 관련된 신호 전달 경로를 확인하기 위해 mechanistic study를 수행하였다. 그 결과, PH는 B16F10 세포 및 3T3-L1 지방 세포에서 멜라닌과 지방생성을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

먼저 멜라닌 생성에 대한 PH의 영향을 확인하기 위해 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성 실험을 수행하였고 tyrosinase, TRP-1 및 -2와 같은 멜라닌 생성 효소 및 이들의 전사인자인 MITF의 단백질 발현을 확인하기 위해 Western blot 분석을 수행하였다. 또한 어떤 신호전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 MAPK 및 AKT 경로에서 인산화에 대한 PH의 영향을 Western blot을 통해 확인하였다. 마지막으로 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성 실험을 진행하여 인간 표피 멜라닌세포(HEMn-MP)에서 PH가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하였다.

세포독성이 없는 PH의 농도를 확인하기 위해 MTT 실험을 진행하였다. 결과는 PH 처리 농도 (1.57, 3.13, 6.25 및 12.5 μ M)에서 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았음을 나타내었다 (Figure 12). 또한, α -MSH로 자극된 B16F10 세포에 독성이 없는 농도의 PH를 처리한 결과 농도 의존적으로 tyrosinase 활성 및 멜라닌 함량을 감소시켰다 (Figure 13).

이전 연구들은 멜라닌 생성 효소(tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2)의 발현은 MITF에 의해 전사적으로 조절되고, MITF 억제는 멜라닌 생성 효소의 발현을 억제하여 결국 B16F10 세포에서 멜라닌 생성이 하향조절 된다고 보고되었다 (13-17). 이러한 결과를 확인하기 위해 α -MSH로 유도된 B16F10 세포에 PH를 처리하여 Western blot 실험을 진행해본 결과, MITF 및 멜라닌 생성 효소의 발현이 농도 의존적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 14 및 15). 이러한 결과는 PH가 MITF 발현 억제에 영향을 미쳐 멜라닌 생성 효소의 발현을 감소시키고 결국 멜라닌 생성의 하향 조절을 유도한다는 것을 나타낸다.

AKT 신호 전달 경로는 B16F10 세포에서 멜라닌 생성에 관여하는 것으로 보고되었다. 증가된 AKT 인산화는 CREB의 인산화를 감소시켜 MITF 발현을 억제하고 MITF가 tyrosinase 프로모터에 결합하는 것을 방지하여 멜라닌 생성 억제를 유도한다 (24,25). 따라서 PH가 AKT 신호 전달 경로에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해 Western blotting 분석을 수행하여 AKT 인산화 수준을

조사하였다. 그 결과, PH는 AKT의 인산화를 유의하게 증가시켰음을 보여주었고 이러한 결과는 PH가 AKT 신호 전달 경로를 통해 MITF의 발현을 억제하여 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 나타낸다 (Figure 18).

최근 연구들에 따르면 MAPK 신호 전달 경로는 멜라닌 생성에 관여한다. MAPK에서 p38 및 JNK의 인산화 증가는 MITF의 발현을 증가시켜 전사활성을 유도하고 결국 멜라닌 관련 효소들의 발현을 증가시킨다. 따라서 p38 및 JNK 인산화의 억제는 MITF 발현을 억제시키고 멜라닌 생성의 하향조절로 이어진다 (41). 반면, ERK 인산화의 증가는 멜라닌 생성을 억제하는 음성조절경로이다 (21-23). 이전 연구들에 따르면 ERK의 인산화는 MITF의 serine 73을 인산화 하여 유비퀴틴 의존성 프로테아좀 경로(ubiquitin-dependent proteasome pathway)를 통해 MITF 분해를 유도하고 tyrosinase 전사를 억제한다는 것이 보고되었다 (15,42). 따라서 MAPK 경로에서 PH의 영향을 확인하기 위해 Western blot을 진행한 결과, PH는 농도 의존적으로 ERK의 인산화를 유의하게 증가시켰고 p38의 인산화를 감소시켰다. 그러나 JNK 인산화에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 16).

ERK 경로의 인산화 증가가 멜라닌 생성에 관여하는지 확인하기 위해 ERK 억제제인 PD98059를 사용하여 tyrosinase 활성을 확인하였다. 200 nM α -MSH 단독 처리 및 cocktail(200 nM α -MSH, 10 μ M PD98059) 처리에 의해 tyrosinase 활성은 증가하였지만 각각 12.5 μ M PH 처리에 의해 활성이 억제하는 것을 보여주었다. 특히 tyrosinase 활성은 PH에 의해 억제되었으나 PD98059의 ERK 인산화 억제 작용으로 인해 tyrosinase 활성은 α -MSH 단독 처리 군에 비해 cocktail 처리 군에서 덜 억제된 것을 확인할 수 있었다. 이는 ERK 인산화가 tyrosinase 활성과 관련이 있음을 보여준다 (Figure 17). 따라서 이와 같은 결과는 PH가 B16F10 세포에서 ERK 및 p38 신호 전달 경로를 통해 MITF 발현을 약화시킴으로써 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 말해준다.

또한, 쥐 흑색종 세포에서 PH의 멜라닌 생성 억제 효과가 정상 인간 멜라닌 세포에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 인간 표피 멜라닌 세포에 PH를 처리하여 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성을 측정했다. 그 결과, 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성은 PH 처리에 의해 억제되는 것으로 확인되었고, 이는 PH가 정

상 인간 멜라닌 세포에서도 멜라닌 생성 억제 효과가 있음을 나타낸다 (Figure 19).

다음으로 지방 생성에 대한 PH의 영향을 확인하기 위해 Oil Red O 염색 및 TG 정량 분석 키트를 사용하여 지질 축적 및 TG 함량에 대한 분석을 수행하였다. 또한 지방생성 관련 전사인자의 발현을 확인하고 신호 전달 경로를 밝히기 위해 Western blotting을 수행하였다.

LDH는 세포질에 존재하는 안정한 효소로 정상적으로 세포막을 통과할 수 없으나 세포막이 손상되거나 세포가 사멸되면 배지로 방출된다 (78,79). 따라서 PH의 세포독성이 없는 농도를 확인하기 위해 LDH release 분석을 수행한 결과 12.5, 25, 50, 및 100 μ M에서 독성이 없는 것으로 나타났다 (Figure 20c). 분화가 완료된 성숙한 지방 세포는 지질 방울을 형성하여 중성지방을 포함한 지질을 축적한다 (80). Figure 21에서 보는 바와 같이 PH는 지방세포 분화 8일째에 지질 축적 및 TG 함량을 억제하였다. 이러한 결과는 PH가 세포 독성이 없는 범위에서 지질 축적 및 TG 생성 억제를 통해 지방생성을 억제하고 있음을 시사한다.

최근 연구에 따르면 지방생성은 지방세포 형성 및 지질 축적에 중요한 과정이며 C/EBP α , PPAR γ , SREBP-1c, FAS 및 FABP4와 같은 주요 전사 인자에 의해 조절된다 (59,60). 지방생성에 관여하는 주요 전사인자의 발현에 대한 PH의 영향을 조사하기 위해 Western blot 분석을 수행한 결과, PH가 처리된 세포에서 이러한 전사인자의 단백질 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 보여주었다 (Figure 22).

이전 연구들을 통해 MAPK 신호 전달 경로는 지방생성에 깊이 관여한다고 알려져 있다. MAPK 계열 중 하나인 ERK는 지방생성 과정에서 세포 증식 및 분화에 중요한 역할을 한다. 활성화된 ERK는 지방생성 전사인자인 C/EBP α , β , PPAR γ 의 발현을 증가시켜 전지방세포에서 지방세포로의 분화를 유도한다 (64,70,71). 또한, p38 MAPK는 지방 생성 초기 단계에서 세포 분화를 촉진한다 (81,82). JNK MAPK는 지방세포가 분화하는 동안 음성 및 양성 조절 모두 관련이 있다고 보고되었다 (83). 결과는 ERK, JNK 및 p38 MAPK의 인산화가 PH 처리에 의해 감소되었음을 보여주었다 (Figure 23). 이전 연구에서는 AKT 의존성 신호 전달 경로가 지방생성과 관련이 있다고 보고되었다. P-AKT에 의한

CREB의 인산화는 C/EBP β 활성을 유도한다. 핵에 위치하고 있는 활성화된 C/EBP β 는 C/EBP α 및 PPAR γ 의 발현을 상향 조절하여 지방생성을 유도한다 (84). 이 연구에서 PH는 AKT의 인산화를 유의하게 감소시켰고 P-CREB 및 C/EBP β 단백질 발현을 억제하는 경향을 보였다 (Figure 24). 이러한 결과를 바탕으로, PH는 MAPK 및 AKT의 인산화를 억제하여 하위 기전의 단백질 활성을 억제하고, 지방생성 관련 전사인자의 발현을 하향 조절하여 궁극적으로 지방 생성을 억제함을 시사한다.

AMP-activated protein kinase (AMPK)는 체내에서 지방산의 합성과 분해를 통해 에너지 대사를 조절하고 에너지 항상성을 유지한다. AMPK는 Thr172의 인산화를 통해 활성화된다. 인산화 된 AMPK는 acetyl-CoA carboxylase (ACC)의 비활성화를 유도하여 지방생성 동안 SREBP-1c, FABP4 및 FAS 단백질 발현 억제를 통해 지질생성을 하향 조절한다 (85-88). 결과는 PH 처리 시 AMPK 및 ACC 인산화가 증가하는 것으로 나타났다. 특히 AMPK 및 ACC의 인산화는 가장 높은 농도의 PH(100 μ M)로 처리했을 시 현저하게 증가함을 보여주었다 (Figure 25a). 이러한 AMPK 경로가 지방생성의 후기 단계에서 지질생성에 관여하는 FAS 및 FABP4 발현에 영향을 미치는지 확인해 보았다. 결과는 PH 처리에 의해 지질 생성 관련 단백질 발현이 감소되었음을 보여 주며 (Figure 25b 및 c), 이는 PH가 AMPK 신호 전달 경로를 통해 성숙한 지방 세포에서 지질 생성을 억제한다는 것을 시사한다.

본 연구는 B16F10 세포와 3T3-L1 지방세포에서 멜라닌 및 지방생성에 대한 PH의 억제 효과를 평가한 첫 번째 연구이다. 먼저 B16F10 세포에서 실험 결과는 PH가 MAPK/AKT 신호 전달 경로에서 ERK 및 AKT 인산화를 증가시키고 p38 인산화를 감소시켜 MITF 발현 억제를 유도하고 결국 멜라닌 생성 억제 효과를 갖는다는 것을 보여주었다 (Figure 26). 또한 B16F10 쥐 흑색종 세포 및 정상 인간 멜라닌 세포에서 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성이 PH 처리에 의해 억제된다는 것을 확인하였다. 그 다음으로 지방세포에서의 실험 결과는 PH가 성숙한 지방세포에서 지질과 중성지방 축적을 억제한다는 것을 확인하였다. 또한 Mechanistic study는 PH가 MAPK 및 AKT 의존성 인슐린 신호 전달 및 AMPK 신호 전달 경로를 통해 지방생성 관련 전사인자의 발현을 조절함으로써

지방생성 및 지질생성을 하향 조절하는 것으로 나타났다 (Figure 27). 따라서 이러한 결과를 바탕으로 PH는 과색소침착증(hyperpigmentation) 치료 및 피부 미백 제품의 구성 요소로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 비만 및 비만 관련 대사 장애를 예방하는 잠재적 치료제로 사용될 수 있음을 시사한다. 그러나 향후 PH의 직접적인 인체 적용을 위해서는 인체 피부 안전성 테스트 및 *in-vivo* 실험과 같은 안전성과 생체 내 효능 평가를 위한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

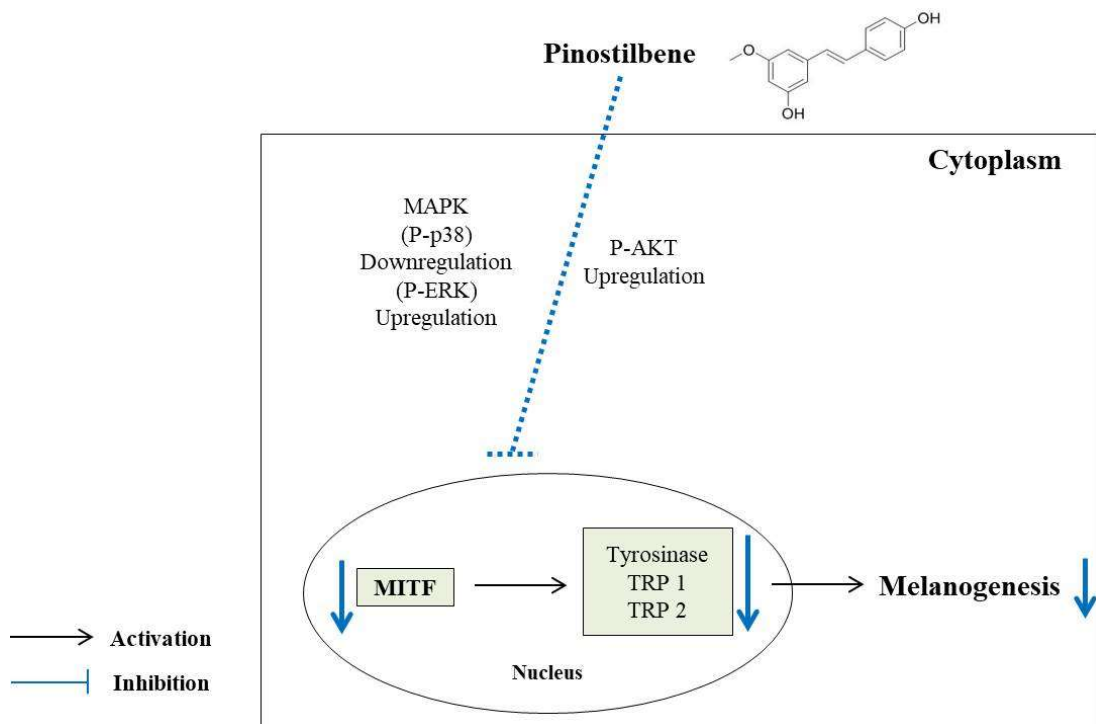


Figure 26. Pinostilbene reduces melanogenesis by P-ERK and P-AKT upregulation and P-p38 downregulation in B16F10 melanoma cells.

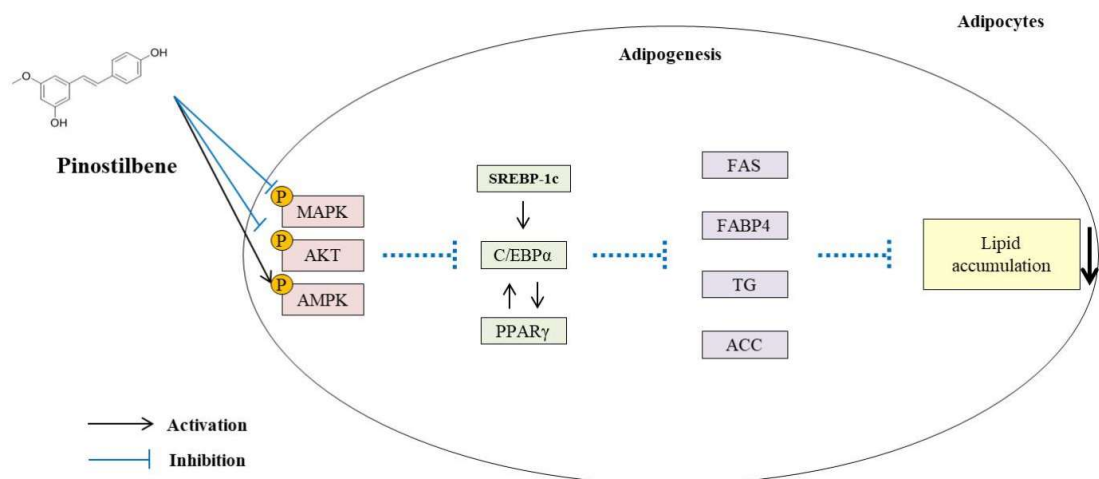


Figure 27. Pinostilbene downregulates adipogenesis and lipogenesis by regulating the expression of adipogenesis-related factors via the MAPK and AKT-dependent insulin signaling, and AMPK signaling pathways.

V. 참고 문헌

1. Hearing, V. J. Biogenesis of pigment granules: A sensitive way to regulate melanocyte function, *J. Dermatol. Sci* **2005**, *37*, 3 - 14.
2. Bonaventure, J.; Domingues, M.J.; Larue, L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells, *Pigment Cell Melanoma Res* **2013**, *26*, 316 - 325, doi:10.1111/pcmr.12080.
3. Tadokoro, T.; Yamaguchi, Y.; Batzer, J.; Coelho, S.G.; Zmudzka, B.Z.; Miller, S.A.; Wolber, R.; Beer, J.Z.; Hearing, V.J. Mechanisms of skin tanning in different racial/ethnic groups in response to ultraviolet radiation, *J. Invest. Dermatol* **2005**, *124*, 1326 - 1332, doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23760.x.
4. Tabassum, N.; Hamdani, M. Plants used to treat skin diseases, *Pharmacogn. Rev* **2014**, *8*, 52 - 60, doi:10.4103/0973-7847.125531.
5. D'ISCHIA, M.; Wakamatsu, K.; Cicoira, F.; Mauro, E.D.; Garcia-Borron, J.C.; Commo, S.; Galván, I.; Ghanem, G.; Kenzo, K.; Meredith, P.; et al. Melanins and melanogenesis: From pigment cells to human health and technological applications, *Pigment Cell Melanoma Res* **2015**, *28*, 520 - 544, doi:10.1111/pcmr.12393.
6. Brenner, M.; Hearing, V.J. The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem. Photobiol* **2008**, *84*, 539 - 549, doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x.
7. Miyamura, Y.; Coelho, S.G.; Wolber, R.; Miller, S.A.; Wakamatsu, K.;

- Zmudzka, B.Z.; Ito, S.; Smuda, C.; Passeron, T.; Choi, W.; et al. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation, *Pigment Cell Res* **2007**, *20*, 2 - 13, doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00358.x.
8. Briganti, S.; Camera, E.; Picardo, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res* **2003**, *16*, 101 - 110, doi:10.1034/j.1600-0749.2003.00029.x.
9. Sugumaran, M. Reactivities of quinone methides versus o-quinones in catecholamine metabolism and eumelanin biosynthesis, *Int. J. Mol. Sci* **2016**, *17*, 1576, doi:10.3390/ijms17091576.
10. Hearing, V.J.; Jimenez, M. Mammalian tyrosinase—The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem* **1987**, *19*, 1141 - 1147, doi:10.1016/0020-711X(87)90095-4.
11. Jiménez-Cervantes, C.; Solano, F.; Kobayashi, T.; Urabe, K.; Hearing, V.J.; Lozano, J.A.; Garcia-Borrón, J.C. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1), *J. Biol. Chem* **1994**, *269*, 17993 - 18000.
12. Tsukamoto, K.; Jackson, I.J.; Urabe, K.; Montague, P.M.; Hearing, V.J. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase, *EMBO J* **1992**, *11*, 519 - 526, doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05082.x.
13. Sun, M.; Xie, H.F.; Tang, Y.; Lin, S.Q.; Li, J.M.; Sun, S.M.; Hu, X.L.; Huang, Y.X.; Shi, W.; Jian, D. G protein-coupled estrogen receptor

enhances melanogenesis via cAMP-protein kinase (PKA) by upregulating microphthalmia-related transcription factor-tyrosinase in melanoma, *J. SteroidBiochem. Mol. Biol* **2017**, *165*, 236 - 246, doi:10.1016/j.jsbmb.2016.06.012.

14. Bentley, N.J.; Eisen, T.; Goding, C.R. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: Activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator, *Mol. Cell. Biol* **1994**, *14*, 7996 - 8006, doi:10.1128/mcb.14.12.7996.
15. Vachtenheim, J.; Borovansky, J. "Transcription physiology" of pigment formation in melanocytes: Central role of MITF, *Exp. Dermatol* **2010**, *19*, 617 - 627, doi:10.1111/j.1600-0625.2009.01053.x.
16. Chan, C.F.; Huang, C.C.; Lee, M.Y.; Lin, Y.S. Fermented broth in tyrosinase- and melanogenesis inhibition, *Molecules* **2014**, *19*, 13122 - 13135, doi:10.3390/molecules190913122.
17. Kim, A.; Yim, N.H.; Im, M.; Jung, Y.P.; Liang, C.; Cho, W.K.; Ma, J.Y. Ssanghwa-tang, an oriental herbal cocktail, exerts anti-melanogenic activity by suppression of the p38 MAPK and PKA signaling pathways in B16F10 cells, *BMC Complement. Altern. Med* **2013**, *13*, 214, doi:10.1186/1472-6882-13-214.
18. Ahn, J.H.; Jin, S.H.; Kang, H.Y. LPS induces melanogenesis through p38 MAPK activation in human melanocytes, *Arch. Dermatol. Res* **2008**, *300*, 325 - 329, doi:10.1007/s00403-008-0863-0.
19. Widlude, H.R.; Fisher, D.E. Microphthalmia-associated transcription factor:

A critical regulator of pigment cell development and survival, *Oncogene* **2003**, *22*, 3035 - 3041, doi:10.1038/sj.onc.1206443.

20. Saha, B.; Singh, S.K.; Sarkar, C.; Bera, R.; Ratha, J.; Tobin, D.J.; Bhadra, R. Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB, *Pigment Cell Res* **2006**, *19*, 595 - 605, doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00348.x.
21. Wu, L.C.; Lin, Y.Y.; Yang, S.Y.; Weng, Y.T.; Tsai, Y.T. Antimelanogenic effect of c-phycocyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways, *J. Biomed. Sci* **2011**, *18*, 74, doi:10.1186/1423-0127-18-74.
22. Kang, S.J.; Choi, B.R.; Lee, E.K.; Kim, S.H.; Yi, H.Y.; Park, H.R.; Song, C.H.; Lee, Y.J.; Ku, S.K. Inhibitory Effect of Dried Pomegranate Concentration Powder on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells; Involvement of p38 and PKA Signaling Pathways, *Int. J. Mol. Sci* **2015**, *16*, 24219 - 24242, doi:10.3390/ijms161024219.
23. Han, J.S.; Sung, J.H.; Lee, S.K. Antimelanogenesis Activity of Hydrolyzed Ginseng Extract (GINST) via Inhibition of JNK Mitogen-activated Protein Kinase in B16F10 Cells, *J. Food Sci* **2016**, *81*, H2085 - H2092, doi:10.1111/1750-3841.13380.
24. Im, D.S.; Lee, J.M.; Lee, J.; Shin, H.J.; No, K.T.; Park, S.H.; Kim, K. Inhibition of collagenase and melanogenesis by ethanol extracts of *Orostachys japonicus* A. Berger: Possible involvement of Erk and Akt signaling pathways in melanoma cells, *Acta Biochim. Biophys. Sin* **2017**, *49*, 945 - 953, doi:10.1093/abbs/gmx090.

25. Yao, C.; Jin, C.L.; Oh, J.H.; Oh, I.G.; Park, C.H.; Chung, J.H. Ardisia crenata extract stimulates melanogenesis in B16F10 melanoma cells through inhibition ERK1/2 and Akt activation, *Mol. Med. Rep* **2015**, *11*, 653 - 657, doi:10.3892/mmr.2014.2697.
26. Shrotriya, S.; Agarwal, R.; Sclafani, R.A. A perspective on chemoprevention by resveratrol in head and neck squamous cell carcinoma, *Adv. Exp. Med. Biol* **2015**, *815*, 333 - 348, doi:10.1007/978-3-319-09614-8_19.
27. Varoni, E.M.; Lo Faro, A.F.; Sharifi-Rad, J.; Iriti, M. Anticancer molecular mechanisms of resveratrol, *Front Nutr* **2016**, *3*, 8, doi:10.3389/fnut.2016.00008.
28. Buhrmann, C.; Shayan, P.; Kraehe, P.; Popper, B.; Goel, A.; Shakibaei, M. Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through upregulation of intercellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer, *Biochem. Pharmacol* **2015**, *98*, 51 - 68, doi:10.1016/j.bcp.2015.08.105.
29. Ma, L.; Li, W.; Wang, R.; Nan, Y.; Wang, Q.; Liu, W.; Jun, F. Resveratrol enhanced anticancer effects of cisplatin on non-small cell lung cancer cell lines by including mitochondrial dysfunction and cell apoptosis, *Int. J. Oncol* **2015**, *47*, 1460 - 1468, doi:10.3892/ijo.2015.3124.
30. Fremont, L. Biological effects of resveratrol, *Life Sci* **2000**, *66*, 663 - 673, doi:10.1016/S0024-3205(99)00410-5.

31. Lin, F.Y.; Hsieh, Y.H.; Yang, S.F.; Chen, C.T.; Tang, C.H.; Chou, M.Y.; Chuang, Y.T.; Lin, C.W.; Chen, M.K. Resveratrol suppresses TPA-induced matrix metalloproteinase-9 expression through the inhibition of MAPK pathways in oral cancer cells, *J. Oral. Pathol. Med* **2015**, *44*, 699 - 706, doi:10.1111/jop.12288.
32. Wen, W.; Lowe, G.; Roberts, C.M.; Finlay, J.; Han, E.S.; Glackin, C.A.; Dellinger, T.H. Pterostilbene Suppresses Ovarian Cancer Growth via Induction of Apoptosis and Blockade of Cell Cycle Progression Involving Inhibition of the STAT3 Pathway, *Int. J. Mol. Sci* **2018**, *19*, 1983, doi:10.3390/ijms19071983.
33. Mikstacka, R.; Przybylska, D.; Rimando, A.M.; Baer-Dubowska, W. Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by trans-resveratrol methyl ethers, *Mol. Nutr. Food Res* **2007**, *51*, 517 - 524, doi:10.1002/mnfr.200600135.
34. Chao, J.; Li, H.; Cheng, K.W.; Yu, M.S.; Chang, R.C.; Wang, M. Protective effects of pinostilbene, a resveratrol methylated derivative, against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells, *J. Nutr. Biochem* **2010**, *21*, 482 - 489, doi:10.1016/j.jnutbio.2009. 02.004.
35. Sun, Y.; Wu, X.; Cai, X.; Song, M.; Zheng, J.; Pan, C.; Qiu, P.; Zhang, L.; Zhou, S.; Tang, Z.; et al. Identification of pinostilbene as a major colonic metabolite of pterostilbene and its inhibitory effects on colon cancer cells, *Mol. Nutr. Food Res* **2016**, *60*, 1924 - 1932, doi:10.1002/mnfr.201500989.
36. Hsieh, M.J.; Chin, M.C.; Lin, C.C.; His, Y.T.; Lo, Y.S.; Chuang, Y.C.; Chen, M.-K. Pinostilbene hydrate suppresses human oral cancer cell

metastasis by downregulation of matrix metalloproteinase-2 through the mitogen-activated protein kinase signaling pathway, *Cell Physiol. Biochem* **2018**, *50*, 911 - 923, doi:10.1159/000494476.

37. Wang, T.T.; Schoene, N.W.; Kim, Y.S.; Mizuno, C.S.; Rimando, A.M. Differential effects of resveratrol and its naturally occurring methylether analogs on cell cycle and apoptosis in human androgen-responsive LNCaP cancer cells, *Mol. Nutr. Food Res* **2010**, *54*, 335 - 344, doi:10.1002/mnfr.200900143.
38. Uesugi, D.; Hamada, H.; Shimoda, K.; Kubota, N.; Ozaki, S.; Nagatani, N. Synthesis, Oxygen Radical Absorbance Capacity, and Tyrosinase Inhibitory Activity of Glycosides of Resveratrol, Pterostilbene, and Pinostilbene, *Biosci. Biotechnol. Biochem* **2017**, *81*, 226 - 230, doi:10.1080/09168451.2016.1240606.
39. Nathan, R.P.; Julia, L.B. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding, *Cell Biochem. Biophys* **2009**, *53*, 75 - 100, doi:10.1007/s12013-009-9043-x.
40. Yemmen, M.; Landolsi, A.; Hamida, J.B.; Mégraud, F.; Trabelsi Ayadi, M. Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia, *Cell. Mol. Biol* **2017**, *63*, 87 - 95, doi:10.14715/cmb/2017.63.9.16.
41. D'Mello, S.A.N.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Askarian-Amiri, M.E. Signaling Pathways in Melanogenesis, *Int. J. Mol. Sci* **2016**, *17*, 1144, doi:10.3390/ijms17071144.

42. Kim, D.S.; Kim, S.Y.; Chung, J.H.; Kim, K.H.; Eun, H.C.; Park, K.C. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes, *Cell Signal* **2002**, *14*, 779 - 785, doi:10.1016/s0898-6568(02)00024-4.
43. Carneiro, I.P.; Elliott, S.A.; Siervo, M.; Padwal, R.; Bertoli, S.; Battezzati, A.; Prado, C.M. Is Obesity Associated with Altered Energy Expenditure?, *Adv. Nutr* **2016**, *7*, 476 - 487. doi:10.3945/an.115.0.08755.
44. Rosen, E.D.; Spiegelman, B.M. Molecular regulation of adipogenesis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **2000**, *16*, 145 - 171, doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.145.
45. Van Dam, A.D.; Boon, M.R.; Berbée, J.F.P.; Rensen, P.C.N.; Van Harmelen, V. Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development, *Eur J Pharmacol* **2017**, *816*, 82 - 92, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.03.051.
46. Jo, J.; Gavrilova, O.; Pack, S.; Jou, W.; Mullen, S.; Sumner, A.E.; Cushman, S.W.; Periwal, V. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth, *PLoS Comput. Biol* **2009**, *5*, e1000324, doi: 10.1371/journal.pcbi.1000324.
47. Zhang, J.; Tang, H.; Deng, R.; Wang, N.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Liu, Y.; Li, F.; Wang, X.; Zhou, L. Berberine suppresses adipocyte differentiation via decreasing CREB transcriptional activity, *PLoS One* **2015**, *10*, e0125667, doi: 10.1371/journal.pone.0125667.
48. Guh, D.P.; Zhang, W.; Bansback, N.; Amarsi, Z.; Birmingham, C.L.; Anis,

- A.H. The Incidence of Co-Morbidities Related to Obesity and Overweight: A Systematic Review and Meta-Analysis, *BMC Public Health* **2009**, *9*, 88, doi: 10.1186/1471-2458-9-88.
49. Wickelgren, I. Obesity: how big a problem?, *Am. Assoc. Adv. Sci* **1998**, *280*, 1364 - 1367, doi: 10.1126/science.280.5368.1364.
50. Kang, J.G.; Park, C.Y.; Anti-obesity drugs: a review about their effects and safety, *Diabetes Metab J* **2012**, *36*, 13 - 25, doi: 10.4093/dmj.2012.36.1.13.
51. Morrison, R.F.; Farmer, S.R. Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation, *J Cell Biochem* **1999**, *75*, 59 - 67, doi: 10.1002/(sici)1097-4644(1999)75:32+<59::aid-jcb8>3.3.co;2-t.
52. Ahmadian, M.; Duncan, R.E.; Jaworski, K.; Sarkadi-Nagy, E.; Sul, H.S. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue, *Future Lipidol* **2007**, *2*, 229 - 237, doi: 10.2217/17460875.2.2.229.
53. Coelho, M.; Oliveira, T.; Fernandes, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ, *Arch Med Sci* **2013**, *9*, 191 - 200, doi: 10.5114/aoms.2013.33181.
54. Trzeciak-Ryczek, A.; Tokarz-Deptuła, B.; Niedźwiedzka-Rystwej, P.; Deptuła, W. Adipose tissue - component of the immune system, *Centr Eur J Immunol* **2011**, *36*, 95 - 99.
55. Costa, J.V.; Duarte, J.S. Adipose tissue and adipokines, *Acta Med Port* **2006**, *19*, 251 - 256.

56. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism, *Arq Bras Endocrinol Metabol* **2006**, *50*, 216 - 229.
57. Kiess, W.; Petzold, S.; Topfer, M.; Garten, A.; Blüher, S.; Kapellen, T.; Körner, A.; Kratzsch, J. Adipocytes and adipose tissue, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2008**, *22*, 135 - 153, doi: 10.1016/j.beem.2007.10.002.
58. Laclaustra, M.; Corella, D.; Ordovas, J.M. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue, *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2007**, *17*, 125 - 139. doi: 10.1016/j.numecd.2006.10.005.
59. Bernlohr, D.A.; Bolanowski, M.A.; Kelly, T.J.; Lane, M.D. Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J Biol Chem* **1985**, *260*, 5563 - 5567.
60. Green, H.; Kehinde, O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells, *Cell* **1976**, *7*, 105 - 113.
61. Tontonoz, P.; Hu, E.; Spiegelman, B.M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor, *Cell* **1994**, *79*, 1147 - 1156, doi: 10.1016/0092-8674(94)90006-x.
62. Huang, B.; Yuan, H.D.; Kim, D.Y.; Quan, H.Y.; Chung, S.H. Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis via regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways, *J Agric Food Chem* **2011**, *59*, 3666 - 3673, doi: 10.1021/jf104814t.

63. Hsu, C.L.; Lin, Y.J.; Ho, C.T.; Yen, G.C. Inhibitory effects of garcinol and pterostilbene on cell proliferation and adipogenesis in 3T3-L1 cells, *Food Funct* **2012**, *3*, 49 - 57, doi: 10.1039/c1fo10209e.
64. Mayer, C.M.; Belsham, D.D. Insulin directly regulates NPY and AgRP gene expression via the MAPK MEK/ERK signal transduction pathway in mHypoE-46 hypothalamic neurons, *Mol Cell Endocrinol* **2009**, *307*, 99 - 108, doi: 10.1016/j.mce.2009.02.031.
65. Zhang, H.H.; Huang, J.; Düvel, K.; Boback, B.; Wu, S.; Squillace, R.M.; Wu, C.; Manning, B.D. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway, *PLoS One* **2009**, *4*, e6189, doi: 10.1371/journal.pone.0006189.
66. Kim, J.B.; Wright, H.M.; Wright, M.; Spiegelman, B.M. ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand, *Proc Natl Acad Sci* **1998**, *95*, 4333 - 4337, doi: 10.1073/pnas.95.8.4333.
67. Liu, G.S.; Chan, E.C.; Higuchi, M.; Dusting, G.J.; Jiang, F. Redox mechanisms in regulation of adipocyte differentiation: beyond a general stress response, *Cell* **2012**, *1*, 976 - 993, doi: 10.3390/cells1040976.
68. Zhang, J.W.; Klemm, D.J.; Vinson, C.; Lane, M.D. Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein β gene during adipogenesis, *J Biol Chem* **2004**, *279*, 4471 - 4478, doi: 10.1074/jbc.M311327200.
69. Clarke, S.L.; Robinson, C.E.; Gimble, J.M. CAAT. Enhancer binding

proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 promoter, *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *240*, 99 - 103, doi: 10.1006/bbrc.1997.7627.

70. Wang, F.; Tong, Q. SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPAR γ , *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 801 - 808, doi: 10.1091/mbc.E08-06-0647.
71. Kim, G.S.; Park, H.J.; Woo, J.H.; Kim, M.K.; Koh, P.O.; Min, W.; Ko, Y.G.; Kim, C.H.; Won, C.K.; Cho, J.H. Citrus aurantium flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells, *BMC Complement Altern Med* **2012**, *12*, 31, doi: 10.1186/1472-6882-12-31.
72. Towler, M.C.; Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling, *Circ Res* **2007**, *100*, 328-341, doi: 10.1161/01.RES.0000256090.42690.05.
73. Carling, D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control, *Trends Biochem Sci* **2004**, *29*, 18-24, doi: 10.1016/j.tibs.2003.11.005.
74. Woods, A.; Azzout-Marniche, D.; Foretz, M.; Stein, S.C.; Lemarchand, P.; Ferré, P.; Foufelle, F.; Carling, D. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase, *Mol Cell Biol* **2000**, *20*, 6704-6711, doi: 10.1128/MCB.20.18.6704-6711.2000.
75. Foretz, M.; Carling, D.; Guichard, C.; Ferré, P.; Foufelle, F. AMP-activated

protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes, *J Biol Chem* **1998**, *273*, 14767-14771, doi: 10.1074/jbc.273.24.14767.

76. Akinwumi, B.C.; Bordun, K.A.M.; Anderson, H.D. Biological Activities of Stilbenoids, *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 792, doi: 10.3390/ijms19030792.
77. Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M.H.; Oatis Jr, J.E.; Walle, U.K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans, *Drug Metab Dispos* **2004**, *32*, 1377-1382, doi: 10.1124/dmd.104.000885.
78. Chan, F.K.; Moriwaki, K.; Rosa, M.J.D. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity, *Methods Mol Biol* **2013**, *979*, 65-70, doi: 10.1007/978-1-62703-290-2_7.
79. Smith, S.M.; Wunder, M.B.; Norris, D.A.; Shellman, Y.G. A Simple Protocol for Using a LDH-Based Cytotoxicity Assay to Assess the Effects of Death and Growth Inhibition at the Same Time, *PLoS One* **2011**, *6*, e26908, doi: 10.1371/journal.pone.0026908.
80. Kang, S.U.; Kim, H.J.; Kim, D.H.; Han, C.H.; Lee, Y.S.; Kim, C.H. Nonthermal plasma treated solution inhibits adipocyte differentiation and lipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes via ER stress signal suppression, *Scientific Reports* **2018**, *8*, 2277.
81. Engelman, J.A.; Berg, A.H.; Lewis, R.Y.; Lin, A.; Lisanti, M.P.; Scherer, P.E. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 35630-35638, doi: 10.1074/jbc.274.50.35630.

82. Guru, A.; Issac, P.K.; Velayutham, M.; Saraswathi, N.T.; Arshad, A.; Arockiaraj, J. Molecular Mechanism of Down-Regulating Adipogenic Transcription Factors in 3T3-L1 Adipocyte Cells by Bioactive Anti-Adipogenic Compounds, *Mol. Biol. Rep* **2021**, *48*, 743 - 761, doi: 10.1007/s11033-020-06036-8.
83. Qi, R.; Liu, H.; Wang, Q.; Wang, J.; Yang, F.; Long, D.; Huang, J. Expressions and Regulatory Effects of P38/ERK/JNK Maps in the Adipogenic Trans-Differentiation of C2C12 Myoblasts, *Cell. Physiol. Biochem* **2017**, *44*, 2467 - 2475, doi: 10.1159/000486169.
84. Son, Y.H.; Ka, S, Kim, A.Y.; Kim, J.B. Regulation of Adipocyte Differentiation via MicroRNAs, *Endocrinol Metab (Seoul)* **2014**, *29*, 122-135, doi: 10.3803/EnM.2014.29.2.122.
85. Hardie, D.G.; Ross, F.A.; Hawley, S.A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2012**, *13*, 251 - 262, doi: 10.1038/nrm3311.
86. Herzig, S.; Shaw, R.J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2018**, *19*, 121 - 135, doi:10.1038/nrm.2017.95.
87. Day, E.A.; Ford, R.J.; Steinberg, G.R. AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases, *Trends Endocrinol. Metab* **2017**, *28*, 545 - 560, doi: 10.1016/j.tem.2017.05.004.
88. Laurent, G.; German, N.J.; Saha, A.K.; de Boer, V.C.J.; Davies, M.; Koves,

T.R.; Dephoure, N.; Fischer, F.; Boanca, G.; Vaitheesvaran, B.; Lovitch, S.B.; Sharpe, A.H.; Kurland, I.J.; Steegborn, C.; Gygi, S.P.; Muoio, D.M.; Ruderman, N.B.; Haigis, M.C. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase, *Mol Cell* **2013**, *50*, 686 - 698, doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.012.

89. Gerlier, D.; Thomasser, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J. Immunol Methods* **1986**, *94*, 57-63, doi: 10.1016/0022-1759(86)90215-2.

VI. 연구 성과

학위과정 동안 위의 실험 방법들을 적용하여 천연물 및 천연물에서 분리된 화합물에 대한 생리활성을 평가하였고 그에 따른 연구 성과는 다음과 같다.

논문 게재 완료: 주저자 (SCI(E): 6편, SCOPUS: 1편, 총 7편).

1. Chung et al. Inhibitory Effects of Pinostilbene on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes: A Study of Possible Mechanisms, *Int. J. Mol* **2021**, *22*, 13446, doi: 10.3390/ijms222413446.
2. Chung et al. Anti-Melanogenic Effects of *Paederia foetida* L. Extract via MAPK Signaling-Mediated MITF Downregulation, *Cosmetics* **2021**, *8*, 22, doi: 10.3390/cosmetics8010022.
3. Chung et al. Inhibitory Effects of Pinostilbene Hydrate on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells via ERK and p38 Signaling Pathways, *Int. J. Mol* **2020**, *21*, 4732, doi: 10.3390/ijms21134732.
4. Chung et al. Anti-Melanogenic Effects of Bergamottin via Mitogen-Activated Protein Kinases and Protein Kinase B Signaling Pathways, *NPC* **2019**, *14*, 1-6, doi: 10.1177/1934578X19862105.
5. Chung et al. 8-Methoxycoumarin enhances melanogenesis via the MAPKase signaling pathway, *Pharmazie* **2019**, *74*, 529-535, doi: 10.1691/ph.2019.9553.
6. Chung et al. Anti-Melanogenic Effects of Hydroxyectoine via MITF

Inhibition by JNK, p38, and AKT Pathways in B16F10 Melanoma Cells, *NPC* **2019**, *14*, 1-6, doi: 10.1177/1934578X19858523.

7. Chung et al. Antimelanogenic Effects of Polygonum tinctorium Flower Extract from Traditional Jeju Fermentation via Upregulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Protein Kinase B Activation, *Int. J. Mol* **2018**, *19*, 2895, doi: 10.3390/ijms19102895.

Article

Inhibitory Effects of Pinostilbene on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes: A Study of Possible Mechanisms

You Chul Chung and Chang-Gu Hyun *

Jeju Inside Agency & Cosmetic Science Center, Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea; jyc8385@hanmail.net

* Correspondence: cghyun@jejunu.ac.kr; Tel.: +82-64-754-3542

Abstract: Resveratrol is a phytoalexin with multiple bioactive properties, including antioxidative, neuroprotective, cardioprotective, and anticancer effects. However, resveratrol exhibits structural instability in response to UV irradiation, alkaline pH, and oxygen exposure. Thus, resveratrol derivatives have attracted considerable research interest. In this study, we aimed to evaluate the anti-adipogenic effects of pinostilbene hydrate (PH), a methylated resveratrol derivative, in 3T3-L1 cells. We also evaluated the mechanisms underlying the effects of PH on adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. Oil Red O staining, lipid accumulation assay, and triglyceride (TG) content assay revealed that PH significantly inhibited lipid and TG accumulation without cytotoxicity. In addition, we determined that PH decreased the expression of adipogenesis-related transcription factors, such as PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c, and FABP4, and the phosphorylation of MAPK and protein kinase B (AKT). Moreover, PH attenuated the expression of CREB and C/EBP β , while increasing the phosphorylation of AMPK and ACC, and decreasing the expression of fatty acid synthase and FABP4. Based on these results, we suggest that PH suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells via the activation of the AMPK signaling pathway and the inhibition of the MAPK and AKT insulin-dependent signaling pathways.

Keywords: pinostilbene; resveratrol; 3T3-L1 cells; adipogenesis; MAPK; AKT; AMPK; CREB



Citation: Chung, Y.C.; Hyun, C.-G. Inhibitory Effects of Pinostilbene on Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes: A Study of Possible Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13446. <https://doi.org/10.3390/ijms222413446>

Academic Editors: Antonella D'Anneo and Mariama Lauricella

Received: 13 November 2021

Accepted: 12 December 2021

Published: 14 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Obesity is caused by the accumulation of excess calories in the body when the energy gained via the consumption of high-calorie foods exceeds its utilization [1]. If this energy imbalance continues, most of the excess energy is converted to triglycerides via fatty acids and accumulates in adipocytes, resulting in weight gain [2,3]. Early stages of obesity are characterized by an increase in adipocyte size (hypertrophy), whereas the later stages are marked by an increase in the number of adipocytes (hyperplasia) [4,5]. Hypertrophy and hyperplasia result in an abnormal increase in the levels of hormones and cytokines secreted from adipose tissue, leading to pathological conditions such as type 2 diabetes, hypertension, hyperlipidemia, cardiovascular disease, and cancer [6–8].

Adipose tissue, commonly known as body fat, is composed of adipocytes, which are formed by the differentiation of preadipocytes through the process of adipogenesis and store excess energy in the form of triglycerides [9]. Furthermore, when there is an energy deficit in the body, adipose tissue releases triglycerides, which are stored in adipocytes in the form of glycerol and fatty acids, to supply energy [10]. In addition to this energy storage function, adipose tissue plays a role in various biological processes, such as the immune response and glucose and lipid metabolism, and serves as an endocrine organ by secreting various hormones such as adiponectin, leptin, and adipisin [11–16]. Therefore, adipose tissue is highly important for maintaining physiological homeostasis.

Adipogenesis is an important process in adipocyte formation and lipid accumulation, and the major transcription factors regulating this process are CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP α), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), sterol

Communication

Anti-Melanogenic Effects of *Paederia foetida* L. Extract via MAPK Signaling-Mediated MITF Downregulation

You Chul Chung ¹, Jung No Lee ², Bong Seok Kim ³ and Chang-Gu Hyun ^{1,*}

¹ Jeju Inside Agency & Cosmetic Science Center, Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea; jyc8385@hanmail.net

² CoseedBioPharm Co., Ltd., Jeju 63309, Korea; jnlee2000@hanmail.net

³ Bio-Convergence Center, Jeju Technopark, Jeju 63243, Korea; kbs6953@jejutp.or.kr

* Correspondence: cghyun@jejunu.ac.kr; Tel.: +82-64-754-3542

Abstract: In this study, in order to explore the anti-melanogenic effect of PFE (*Paederia foetida* L. extract) and suggest its availability, B16F10 cells, which are murine melanoma cells, were stimulated with alpha-Melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) to conduct an in vitro experiment. Treatment with PFE in B16F10 cells with activated melanogenesis due to stimulants showed that PFE significantly inhibits melanin content as well as intracellular tyrosinase activity within a range that does not cause cytotoxicity. In addition, Western blot assay demonstrated that PFE strongly inhibited the protein expression of not only tyrosinase-related protein (TRP)-1, -2, and tyrosinase, but also microphthalmia-associated transcription factor (MITF). Moreover, mechanism studies have shown that PFE processing inhibited the activation of melanin production by regulating the phosphorylation of each mitogen-activated protein kinase (MAPK) family in the MAPK signaling pathway. To test the biocompatibility of PFE on human skin, a primary skin irritation test was performed. The results revealed that PFE did not have any side effects on human skin. These findings suggest that PFE holds great potential as a skin whitening agent and in the prevention of hyperpigmentation disorders.

Keywords: *Paederia foetida* L.; anti-melanogenesis; MAPK; skin whitening; B16F10 melanoma cell; bioactivity; ERK; JNK



Citation: Chung, Y.C.; Lee, J.N.; Kim, B.S.; Hyun, C.-G. Anti-Melanogenic Effects of *Paederia foetida* L. Extract via MAPK Signaling-Mediated MITF Downregulation. *Cosmetics* **2021**, *8*, 22. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8010022>

Academic Editor: Kazuhisa Maeda

Received: 1 February 2021

Accepted: 12 March 2021

Published: 15 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Melanin is present extensively in the tissues of the skin, eyes, and hair of mammals. Melanin is synthesized in melanosomes in the cytoplasm of melanocytes, which are dendritic cells; its expression is regulated by various mechanisms within the cells and is transferred to surrounding keratinocytes. Melanin is composed of brownish-black eumelanin as well as reddish-yellow pheomelanin. In particular, the amount of eumelanin plays a crucial role in determining the coloration in mammals. The major act of melanin is absorbing ultraviolet radiation and blocking its penetration into the human body, protecting the skin from photo-damage [1–6]. Thus, lack of melanin from the epidermis exposes skin to harmful UV light, and this may cause hypopigmentation disorders, including vitiligo, albinism, and grey hair [7,8]. However, excessive accumulation in the skin due to abnormal over-expression of melanin pigments can also lead to the development of skin disease, including lentigo, melanoma, blotches, and freckles, etc. [9,10].

Important enzymes involved in melanogenesis include tyrosinase and tyrosinase-related protein 1, 2 (TRP-1, -2). L-Tyrosine, an essential amino acid in the initial stages of melanin synthesis, which is converted to dihydroxyl-L-phenylalanine (L-DOPA) through hydroxyl reaction by tyrosinase, and L-DOPA is oxidized to DOPAquinone, and then DOPochrome. The DOPochrome obtained thusly is converted to 5,6-dihydroxy-2-indolylcarboxylic acid (DHICA) by TRP-2. Ultimately, DHICA is transformed into in-dole-5,6-quinone-carboxylic acid by TRP-1 to produce black or brown eumelanin. Tyrosinase is

Article

Inhibitory Effects of Pinostilbene Hydrate on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells via ERK and p38 Signaling Pathways

You Chul Chung and Chang-Gu Hyun *

Jeju Inside Agency & Cosmetic Science Center, Department of Chemistry and Cosmetics,

Jeju National University, Jeju 63243, Korea; jyc8385@hanmail.net

* Correspondence: cghyun@jejunu.ac.kr; Tel.: +82-64-754-3542

Received: 10 June 2020; Accepted: 30 June 2020; Published: 2 July 2020



Abstract: Melanin protects our skin from harmful ultraviolet (UV) radiation. However, when produced in excess, it can cause hyperpigmentation disorders, such as melanoma, freckles, lentigo, and blotches. In this study, we investigated the effects of pinostilbene hydrate (PH) on melanogenesis. We also examined the underlying mechanisms of PH on melanin production in B16F10 cells. Our findings indicated that PH significantly inhibits melanin content and cellular tyrosinase activity in cells without causing cytotoxicity. In addition, Western blot analysis showed that PH downregulated the protein levels of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase, and other melanogenic enzymes, such as tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). Although PH activated the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), it inhibited p38 mitogen-activated protein kinases (p38). Furthermore, the inhibition of tyrosinase activity by PH was attenuated by treatment with PD98059 (a specific ERK inhibitor). Additionally, p-AKT was upregulated by PH treatment. Finally, the inhibitory effects of PH on melanin content and tyrosinase activity were confirmed in normal human melanocytes. These results suggest PH downregulates melanogenesis via the inhibition of MITF expression, followed by the MAPKase signaling pathways. Thus, PH may be used to treat or prevent hyperpigmentation disorders and in functional cosmetic agents for skin whitening.

Keywords: B16F10 melanoma cell; p38; ERK; whitening; pinostilbene hydrate (PH); anti-melanogenesis

1. Introduction

Melanin is composed of pheo- and eumelanin. It is synthesized by specialized organelles, melanosomes, in melanocytes in the skin after exposure to stimulating factors, including UV light and stress. Melanocytes are located in the epidermal-dermal junction and transfer melanosomes to the surrounding keratinocytes. The primary role of melanin, in particular eumelanin, is to determine the coloration of human skin, eyes, and hair. In addition, it protects against photo-damage caused by ultraviolet radiation by scavenging free radicals or dispersing UV light [1–6]. However, the excessive expression of melanin can result in the development of hyperpigmentation disorders, including melanoma, freckles, lentigo, and blotches [7,8].

Melanogenesis is related to a complex signaling process that occurs within melanocytes and involves melanogenic enzymes, such as tyrosinase and tyrosinase-related protein (TRP)-1 and -2. Tyrosinase is a key enzyme in the process of melanogenesis and catalyzes the oxidation of L-tyrosine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) into DOPAquinone. DOPAquinone undergoes intramolecular cyclization to form cycloDOPA, which is further oxidized into DOPA chrome. DOPA chrome is then transformed into 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)



Anti-Melanogenic Effects of Bergamottin via Mitogen-Activated Protein Kinases and Protein Kinase B Signaling Pathways

Natural Product Communications
 July 2019; 1-6
 © The Author(s) 2019
 Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
 DOI: 10.1177/1934578X19862105
journals.sagepub.com/home/npx



You Chul Chung¹, Yun Beom Kim², Bong Seok Kim³, and Chang-Gu Hyun¹

Abstract

In this study, we examined the inhibitory effects of bergamottin on melanogenesis in B16F10 murine melanoma cells, together with its effects on the mechanism of melanin synthesis. α -Melanocyte stimulating hormone-stimulated B16F10 cells were treated with various concentrations of bergamottin, with arbutin as a positive control. Bergamottin significantly decreased the melanin content and tyrosinase activity without showing any cytotoxicity. In addition, bergamottin treatment significantly downregulated the expression of tyrosinase-related protein-1,2 and tyrosinase by suppressing the expression of microphthalmia-associated transcription factor. The phosphorylation status of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and protein kinase B (AKT) was examined to determine the mechanism underlying the antimelanogenic effects of bergamottin. Bergamottin treatment increased the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and AKT, but decreased the phosphorylation of p38 and c-Jun N-terminal kinase in the B16F10 cells. Moreover, the use of PD98059 (ERK inhibitor) and LY294002 (AKT inhibitor) corroborated these findings, indicating that bergamottin inhibits melanogenesis via the MAPKase and AKT signaling pathway. Thus, bergamottin has potential for treating hyperpigmentation disorders and can be a promising chemical for skin-whitening in the cosmetic industry.

Keywords

bergamottin, coumarins, MAPKs, AKT, whitening, bioactivity

Received: May 30th, 2019; Accepted: June 17th, 2019.

Melanogenesis describes the production process of melanin pigment in melanocytes.^{1,2} Melanocytes are dendritic cells of the neuroectoderm located at the basal layer in the epidermal-dermal junction, which deliver melanosomes to surrounding keratinocytes.^{3,4} In mammals, the biosynthesis of melanin is induced by several stimuli, including UV radiation, skin irritation, metabolic disorders, and other underlying problems.⁵ Melanin is important for protecting against photo-damage caused by harmful UV radiation and coloration of skin and hair in mammals.⁶ However, overproduction and accumulation of melanin may cause skin diseases, such as lentigo, aging, freckles, and other hyperpigmentation disorders.^{7,8}

Tyrosinase largely regulates the process of melanin synthesis in early stages, as it catalyzes the *o*-hydroxylation of L-tyrosine (monophenol) to L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and the subsequent oxidation of L-DOPA to dopaquinone.⁹ In addition, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) oxidizes 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) to indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid in mice but has not been reported to have the same activity in humans. Tyrosinase-related protein-2 (TRP-2), also known as dopachrome tautomerase, is able to isomerize dopachrome to form DHICA.¹⁰

Recent studies have indicated that microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is an important transcriptional regulator which regulates the expression of essential melanogenic enzymes, such as TRP-1, -2, and tyrosinase. UV-induced α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) stimulates the expression of MITF by activating signaling pathway-related enzymes, including protein kinase A (PKA) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) responder element binding protein (CREB). In addition, the increased MITF binds to the M-box of tyrosinase promoters, further regulating the expression of melanogenic enzymes. Accordingly, it has recently been reported that hyperpigmentation can be prevented by the inhibition of MITF.^{11,12}

¹ Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Republic of Korea

² NewMedion Co., Ltd., Jeju City, Jeju, Republic of Korea

³ Bio-Convergence Center, Jeju Technopark, Republic of Korea

Corresponding Author:

Chang-Gu Hyun, Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea.
 Email: cghyun@jejunu.ac.kr



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

Department of Chemistry and Cosmetics¹, Jeju National University, Jeju; Department of Chemistry BT-Convergent Pharmaceutical Engineering², Sunmoon University, Chungnam, Republic of Korea

8-Methoxycoumarin enhances melanogenesis via the MAPKase signaling pathway

YOU CHUL CHUNG^{1,§}, SEUNG-YOUNG KIM^{2,§}, CHANG-GU HYUN^{1,*}

Received May 8, 2019, accepted June 7 2019

*Corresponding author: C-G. Hyun, Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

cghyun@jeju.ac.kr

[§]These authors contributed equally to this work

Pharmazie 74 (2019)

doi: 10.1691/ph.2019.9553

8-Methoxycoumarin (8-methoxy-chromen-2-one), isolated from *R. graveolens* L., is able to alleviate arthritis by inhibition of proinflammatory cytokines. However, its effects on melanogenesis have largely remained unreported. The present study examined the effects of 8-methoxycoumarin on melanogenesis in B16F10 murine cells, together with its effect on the mechanism of melanin synthesis. The cells were treated with different concentrations of 8-methoxycoumarin; α -MSH was used as the positive control. We found 8-methoxycoumarin to significantly increase the melanin content of the cells without exerting any cytotoxicity. In addition, it significantly upregulated the expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 and 2 via inducing the expression of microphthalmia-associated transcription factor. Furthermore, we demonstrated the involvement of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway-mediated phosphorylation of p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK), and inhibition of phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) to be responsible for enhanced melanin production. Use of SB203580 (p38 inhibitor) and SP600125 (p-JNK inhibitor) corroborated these findings. Additionally, we investigated the effects of 8-methoxycoumarin on protein kinase B (AKT) phosphorylation and protein kinase A (PKA) signaling pathway (using H89, a PKA inhibitor). These results suggested that 8-methoxycoumarin increases melanogenesis via the MAPK signaling pathway. Based on these findings, we conclude that 8-methoxycoumarin could serve as a potential compound for treating hypopigmentation disorders. It could also serve as a promising chemical for hair depigmentation treatment in the cosmetic industry.

1. Introduction

Melanin is the major pigment produced by specialized organelles, called melanosomes present in the melanocytes (Bonaventure et al. 2013; Briganti et al. 2003). Melanocytes are dendritic cells derived from the neuroectoderm and are found in the basal layer of the skin epidermis; these produce vesicles called melanosomes and deliver them to the surrounding keratinocytes (Sturm et al. 2001; Tadokoro et al. 2005; Schadendorf et al. 2015; Gibbs et al. 2000; Cichorek et al. 2013). Melanin has many types, such as the brownish black eumelanin and reddish yellow pheomelanin, which are responsible for determining the skin and hair color (Thody et al. 1991; Lamoreux et al. 2001; Hearing et al. 2005). Another important function of melanin in the epidermis is to prevent the skin from damage from harmful UV radiation by scavenging free radicals or dispersing the incoming UV light (Anderson et al. 1981; Brenner et al. 2008). Consequently, a defective melanin synthesis or melanogenesis leads to hypopigmentation and increases the risk of skin cancer and various pigmentary disorders.

Melanin biosynthesis is a complex process that occurs inside melanocytes and involves tyrosinase and other melanogenic enzymes, such as tyrosinase-related protein (TRP)-1 and 2. Tyrosinase serves as the rate-limiting enzyme in a two-step synthesis of melanin: It catalyzes the hydroxylation of l-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenyl-l-alanine (l-DOPA; diphenol) and oxidation of l-DOPA to dopaquinone (Hearing et al. 1987). The expression of tyrosinase is regulated by microphthalmia-associated transcription factor (MITF) that binds to the M-box of the tyrosinase promoter to activate its expression and of other melanogenic enzymes (Bentley et al. 1994; Vachtenheim et al. 2010).

Recent studies have implicated mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p38 in melanogenesis through regulation of MITF expression (Ahn et al. 2008; Widlude et al. 2003; Saha et al. 2006). An increased phosphorylation of p38 and JNK increases the expression of MITF and melanogenic enzymes, leading to melanogenesis (Kang et al. 2015; Han et al. 2016). In addition, a reduced phosphorylation of ERK increases the transcription of tyrosinase, which activates melanogenesis (Wu et al. 2011). Thus, regulation of the MAPK signaling pathway is considered a strategic target for the regulation of melanogenesis. Furthermore, c-AMP-dependent protein kinase A (PKA) has been reported to activate MITF transcription via phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein (CREB) (Chan et al. 2014; Kim et al. 2013). Other reports suggest inhibition of the phosphatidylinositol-3-kinase PI3K/AKT signaling pathway to upregulate melanogenesis by MITF degradation (Kim et al. 2015; Chung et al. 2018).

Recently, many researchers have focused on melanogenesis stimulators as potential options to treat hypopigmentation of skin and hair (Niu et al. 2017). For instance, several compounds, especially methylated compounds isolated from natural sources, have been reported to induce melanogenesis in B16F10 cells (Niu et al. 2017; Alesiani et al. 2009; Yang et al. 2006; Yoon et al. 2015; Chung et al. 2017; Yoon et al. 2007).

Ruta graveolens L., an herb commonly known as rue, has been used in traditional medicine for treating diseases such as rheumatism and dermatitis, and eye ailments (Gentile et al. 2015). Recently, a study demonstrated the inhibitory activity

Pharmazie 74 (2019)

9553-1



Original Article

Anti-Melanogenic Effects of Hydroxyectoine via MITF Inhibition by JNK, p38, and AKT Pathways in BI6F10 Melanoma Cells

Natural Product Communications
June 2019; 1-6
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1934578X19858523
journals.sagepub.com/home/npx



You C. Chung^{1*}, Min-Jin Kim^{2*}, Eun Y. Kang³, Yun B. Kim³, Bong S. Kim⁴,
Sung-Min Park³, and Chang-Gu Hyun¹

Abstract

Melanin plays a role in determining human skin color of a person, and a large amount of melanin makes the skin color look darkened. The proper amount of melanin formation protects our skin from UV radiation, but excessive melanin production causes hyperpigmentation and leads to freckles, melasma, and lentigo. In this study, we investigated the inhibitory effect of hydroxyectoine on melanogenesis and its mechanism in BI6F10 cells. Melanin content and cellular tyrosinase activity were determined. The expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), and the activities of tyrosinase and other melanogenesis-related enzymes, such as tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein 2, were also examined. Hydroxyectoine treatment significantly inhibited melanin production and intracellular tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Western blot analysis showed that hydroxyectoine also reduced the expressions of tyrosinase and TRP-1. In addition, hydroxyectoine significantly reduced the expression of MITF, a major regulator of melanin production, and inhibited the phosphorylation of p38, c-Jun N-terminal kinase, and activated the protein kinase B. The results demonstrated that hydroxyectoine inhibits the expression of MITF through the inhibition or activation of melanin-related signaling pathways and downregulates melanogenesis by inhibiting melanogenic enzyme expression and tyrosinase activity. Hydroxyectoine has potential value in functional cosmetics applications, such as whitening.

Keywords

BI6F10 melanoma cell, hydroxyectoine, melanin, tyrosinase, MITF, whitening, TRP-1, melanogenesis, p-AKT, p-JNK, p-p38

Received: February 28th, 2019; Accepted: March 18th, 2019.

Melanin refers to the black or brown pigment present in the tissues of skin or eyes of many animals. The primary role of melanin is to protect the skin by blocking excess ultraviolet (UV) radiation. Also, the quantity of melanin present determines the skin color. Melanin is produced in melanocytes and is transferred through the dendrites of melanocytes to specific epidermal cells (keratinocytes). In these epidermal cells, melanin forms a hat-like structure around the nucleus to protect genes from UV radiation, scavenge free radicals, and protect cellular proteins. However, excess production of melanin can lead to skin diseases that include melisma, freckles, lentigo, age spots, and other hyperpigmentation syndrome.^{1,2}

In melanocytes, tyrosinase oxidizes the amino acid tyrosine as a substrate to form the dark brown pigment termed eumelanin. Tyrosinase is the key enzyme in the first 2 steps

of melanin biosynthesis in which L-tyrosine is hydroxylated to the *o*-diphenol product L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). L-3,4-Dihydroxyphenylalanine is further

¹ Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Korea

² Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju, Gyeongbuk, Korea

³ NewMedion Co., Ltd., Jeju City, Jeju, Korea

⁴ Bio-Convergence Center, Jeju Technopark, Korea

*The authors You C. Chung and Min-Jin Kim contributed equally to the work.

Corresponding Author:

Chang-Gu Hyun, Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea.
Email: cghyun@jejunu.ac.kr



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

Article

Antimelanogenic Effects of *Polygonum tinctorium* Flower Extract from Traditional Jeju Fermentation via Upregulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Protein Kinase B Activation

You Chul Chung ¹, Ji-Hye Ko ¹, Hyun-Kyu Kang ¹, Seoyeon Kim ¹, Choon Il Kang ²,
Jung No Lee ³, Sung-Min Park ³ and Chang-Gu Hyun ^{1,*}

¹ Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, Jeju 63243, Korea; jyc8385@hanmail.net (Y.C.C.); asdfg12309@daum.net (J.-H.K.); superxyz1993@naver.com (H.-K.K.); asksy613@naver.com (S.K.)

² JejuIndi Inc., Seogwipo-si, Jeju 63635, Korea; indi0701@daum.net

³ R&D Center, CoSeedBioPham Co., Chungbuk 28161, Korea; jnlee2000@hanmail.net (J.N.L.); smp@coseed.co.kr (S.-M.P.)

* Correspondence: cghyun@jejunu.ac.kr; Tel.: +82-64-754-3542

Received: 30 June 2018; Accepted: 4 September 2018; Published: 24 September 2018



Abstract: This study was carried out to investigate the antimelanogenic effects of a *Polygonum tinctorium* flower extract obtained using red nuruk, a traditional Jeju barley-based fermentation starter. We also studied the mechanism of action of the *P. tinctorium* fermented flower extract (PTFFE) in mouse melanoma cells (B16F10). Cells were treated with various concentrations (62.5, 125 and 250 µg/mL) of PTFFE and the results showed that PTFFE significantly decreased the melanin content and tyrosinase activity without being cytotoxic. In addition, PTFFE strongly inhibited the expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein 2 by decreasing the expression of the microphthalmia-associated transcription factor, as shown by a western blot assay. Furthermore, PTFFE inhibited melanogenesis via upregulation of the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and protein kinase B, also known as AKT. We also used inhibitors such as PD98059 (a specific ERK inhibitor) or LY294002 (an AKT inhibitor) to determine whether the signaling pathways are involved. High-performance liquid chromatography fingerprinting showed the presence of a quercetin glucoside (isoquercitrin) and quercetin in PTFFE. To test the potential for PTFFE application as a cosmetic material, we also performed a primary skin irritation test on human skin. In this assay, PTFFE did not induce any adverse reactions at the treatment dose. Based on these results, we suggest that PTFFE may be considered a potential antimelanogenesis candidate for topical applications.

Keywords: *Polygonum tinctorium*; nuruk; ERK; antimelanogenesis; whitening; fermentation

1. Introduction

Melanin determines the skin color and its primary role is to prevent skin damage from harmful ultraviolet (UV) radiation. However, excessive production of melanin causes skin diseases such as freckles, melisma, lentigo and other hyperpigmentation syndromes [1,2]. Thus, studies on inhibition of melanogenesis have focused on medical and cosmetic treatments for skin depigmentation and whitening. Tyrosinase acts as a very important enzyme, catalyzing the oxidation of L-tyrosine as well as L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) to DOPAquinone. DOPAquinone thus formed, undergoes intramolecular cyclization to form leucoDOPAchrome, which is further oxidized to DOPAchrome [3].

Recent studies have also indicated that the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and melanogenic enzymes such as tyrosinase-related proteins 1 and 2 (TRP-1 and TRP-2) contribute to