



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

석사학위논문

마우스 세포에서
Acenocoumarol의 멜라닌 생성
억제 및 항염증 효과 규명

제주대학교대학원

화학과

한현주

2022년 8월



마우스 세포에서
Acenocoumarol의 멜라닌 생성
억제 및 항염증 효과 규명




지도교수 현창구

한현주

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2022년 8월

한현주의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 尹景燮 
위 원 朴慶淳 
위 원 玄昌久 

제주대학교 대학원

2022년 8월

A Study on the Anti-melanogenesis and
Anti-inflammation Effects of Acenocoumarol in
Mouse Cell Lines

Hyun-Ju Han

(Supervised by professor Chang-Gu Hyun)

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

2022. 08.

This thesis has been examined and approved.

Kyung - Sup Yoon

Kyungsoon Park

CHANG-GU HYUN

06121

Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

In this study, coumarin derivatives acenocoumarol and warfarin demonstrated the inhibition and anti-inflammatory effects of melanogenesis in mouse cells. The effect of inhibiting melanogenesis was confirmed in B16F10 cells, and both acenocoumarol and warfarin significantly reduced melanin production. Subsequently, the effect of acenocoumarol on the signal transmission path in B16F10 cells was investigated. Acenocoumarol inhibited the expression of melanin-producing enzymes (tyrosinase, TRP-1, TRP-2). And it was confirmed that the expression of MITF, which regulates the production of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2, was suppressed. In addition, it was confirmed that the expression of MITF was suppressed through various signal transmission paths, and finally melanin production was suppressed. Therefore, inhibiting the production of excessive melanin through the regulation of various signaling pathways helps prevent various diseases and can be considered a promising strategy for the treatment of hyperpigmentation and the development of whitening agents. In addition, anti-inflammatory effects of acenocoumarol were investigated in LPS-stimulated RAW 264.7 cells, which significantly reduced the expression of iNOS and COX-2 through various signaling pathways and ultimately reduced the production of inflammatory agents (NO, PGE2) and pro-inflammatory cytokines. Therefore, inhibiting the activation of macrophages and the generation of inflammatory mediators can be seen as a promising strategy for improving inflammatory diseases and developing anti-inflammatory treatments.

Key word : coumarin derivatives, acenocoumarol, warfarin, B16F10, RAW 264.7, anti-melanogenesis, anti-inflammation.

목 차

ABSTRACT	1
목 차	2
LIST OF FIGURES	4
I. 서 론	6
II. 재료 및 방법	15
1. 시료 및 시약	15
2. 실험방법	17
2.1. 세포 배양	17
2.2. 세포 생존율	18
2.3. Melanin contents 측정	19
2.4. Tyrosinase activity 측정	20
2.5. Nitric oxide 생성량 측정	21
2.6. Prostaglandin E ₂ 및 전염증성 cytokine 생성량 측정	22
2.7. Western blot	23
3. 통계처리	24
III. 결과	25
1. B16F10 세포에서 coumarin 계열 화합물의 멜라닌 생성 영향 평가	25
1.1. 세포 생존율	25
1.2. Melanin contents	27
1.3. Tyrosinase activity	29
2. B16F10 세포에서 acenocoumarol의 멜라닌 생성 영향 평가	31
2.1. Western blot	31

1) 멜라닌 생성 효소 발현	31
2) MITF 발현	33
3) Wnt/ β -catenin 신호전달경로	35
4) MAPKs 신호전달경로	37
5) cAMP/PKA 신호전달경로	39
6) PI3K/AKT 신호전달경로	41
3. RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol의 항염증 효능 평가	43
3.1. 세포 생존율	43
3.2. Nitric oxide 생성량	45
3.3. Prostaglandin E ₂ 생성량	47
3.4. 전염증성 cytokine 생성량	49
3.5. Western blot	51
1) iNOS, COX-2 발현	51
2) MAPKs 신호전달경로	53
3) NF- κ B 신호전달경로	55
IV. 고 찰	58
V. 참고문헌	66

LIST OF FIGURES

Figure 1. Regulation of melanogenesis through different signaling pathways.	11
Figure 2. Melanin biosynthesis pathway.	11
Figure 3. Regulation of inflammation through different signaling pathways.	12
Figure 4. Structure of coumarin derivatives.	14
Figure 5. The effect of coumarin derivatives on the viability in B16F10 melanoma cells.	26
Figure 6. The effect of coumarin derivatives on production of melanin in α -MSH-stimulated B16F10 cells.	28
Figure 7. The effect of coumarin derivatives on tyrosinase activity in α -MSH-stimulated B16F10 cells.	30
Figure 8. The effect of acenocoumarol on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells.	32
Figure 9. The effect of acenocoumarol on MITF protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells.	34
Figure 10. The effect of acenocoumarol on β -catenin, P-GSK3 β and P- β -catenin protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells.	36
Figure 11. The effect of acenocoumarol on MAPKs protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells.	38
Figure 12. The effect of acenocoumarol on PKA protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells.	40

Figure 13. The effect of acenocoumarol on AKT protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells.	42
Figure 14. The effect of acenocoumarol on the viability in RAW 264.7 cells.	44
Figure 15. The effect of acenocoumarol on production of Nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells.	46
Figure 16. The effect of acenocoumarol on production of PGE ₂ in LPS-induced RAW 264.7 cells.	48
Figure 17. The effect of acenocoumarol on production of pro-inflammation cytokines in LPS-induced RAW 264.7 cells.	50
Figure 18. The effect of acenocoumarol on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells.	52
Figure 19. The effect of acenocoumarol on MAPKs protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells.	54
Figure 20. The effect of acenocoumarol on I κ B- α and P-I κ B- α protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells.	56
Figure 21. The effect of acenocoumarol on NF- κ B (p65) protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells.	57
Figure 22. Regulation of melanogenesis signaling pathway through acenocoumarol.	65
Figure 23. Regulation of inflammation signaling pathway through acenocoumarol.	65

I. 서 론

인간의 피부색은 표피의 멜라닌, 혈관에 존재하는 헤모글로빈, 피하 조직의 카로틴과 같은 색소 등의 영향을 받는데 이 중 멜라닌 색소의 양과 분포에 따라 피부의 외부 색이 결정된다[1]. 멜라닌은 피부, 눈, 모발의 색을 담당하며, 자외선의 유해한 영향과 산화 스트레스와 같은 환경 요인의 유해한 영향으로부터 피부를 보호하는 중요한 역할을 한다[2-4].

멜라닌을 생성하는 멜라닌 세포 (melanocyte)는 약 1:36의 비율로 피부 표피의 기저층에서 약 36개의 각질세포 (keratinocyte)로 둘러싸여 있다 [5,6]. 멜라노솜이라고 불리는 리소좀 관련 기관에서 합성된 멜라닌은 수상 돌기를 통해 인접한 각질세포로 운반되어 피부에 착색을 부여하게 된다 [7,8].

앞서 설명한 바와 같이 멜라닌은 다양한 요인으로부터 피부를 보호하는데 중요한 역할을 한다. 하지만 멜라닌이 과도하게 생성되어 피부에 축적되면 기미, 주근깨, 검버섯 등과 같은 과색소 침착장애를 유발할 수 있으며 멜라닌 전구체의 독성으로 인한 세포 사멸 및 피부암 등의 질병을 유발할 수 있다[1,9]. 또한, 지속적인 자외선 노출은 DNA 손상, 유전자 돌연변이, 면역 체계 장애 또는 광노화를 초래할 수 있다[2,10]. 따라서 과도한 멜라닌의 생성을 억제하는 것은 각종 질병을 예방하는 데 도움이 되며 우리는 멜라닌 생성을 억제하는 천연 화합물을 조사하고자 한다.

멜라닌 세포에서 멜라닌의 합성은 tyrosinase와 tyrosinase 관련 단백질 TRP-1 및 TRP-2에 의해 촉매된다[9]. Tyrosinase 활성은 인간의 피부 색소 침착 정도와 강한 상관관계를 가지고 있기 때문에 tyrosinase의 활성 억제는 곧 피부 색소 침착 정도를 낮춰준다는 것을 의미한다[11]. Tyrosinase는 L-tyrosin을 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)

으로 수산화시키고, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)가 DOPA quinone으로 산화되는 것을 촉매한다. DOPA quinone은 DOPA chrome로 전환되며 TRP-2는 DOPA chrome을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) 또는 5,6-dihydroxyindole (DHI)로 전환시킨다. 마지막으로 DHICA와 DHI는 TRP-1에 의해 산화되어 최종적으로 흑갈색을 띠는 유멜라닌 (Eumelanin)을 생성한다[12-14].

피부의 각질세포가 자외선에 노출되면 펩타이드 호르몬인 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)이 분비된다[15]. 분비된 α -MSH는 세포막에 있는 melanocortin 1 receptor (MC1R)와 결합하여 멜라닌 세포를 활성화시켜 멜라닌의 합성이 일어난다[16-19].

Tyrosinase 관련 단백질의 조절에서 가장 중요한 전사인자는 MITF (microphthalmia associated transcription factor)이다. 자극된 MITF는 M-box와 결합하고 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도하게 된다[20,21].

MITF는 Frizzled(Fz) 수용체의 활성화, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)의 비활성화 및 β -catenin 축적의 자극을 통한 Wnt/ β -catenin 신호전달경로의 표적이다[22-24]. Frizzled(Fz)가 자극을 받으면 GSK3 β (Ser 9)는 인산화되고 Wnt/ β -catenin 경로에서 비활성화된다[25]. 이어서 β -catenin은 축적되어 여러 단백질과 상호작용하는 핵으로 옮겨지며 T-cell factor-lymphoid-enhancing factor(TCF-LEF) 전사인자와 복합체를 형성하고, 이후 MITF 발현을 증가시킨다[26,27]. Tyrosine 216번 잔기에서 인산화된 GSK3 β 는 β -catenin을 순차적으로 인산화시키고, 인산화된 β -catenin은 유비퀴틴 메커니즘을 통해 분해된다[28,29].

다양한 세포 활동에 관여하는 MAPK는 extra cellular signal regulated kinases (ERK), c-jnk N-terminal (JNK), p38으로 구성되어 있다[30,31].

c-kit 자극에 의한 ERK의 인산화는 serine 73에서 MITF를 인산화시켜 MITF의 유비퀴틴화 및 분해가 일어나 궁극적으로 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 하향 조절을 통해 멜라닌의 합성을 감소시키는 반면[32-34], JNK와 p38의 인산화는 멜라닌을 증가시키는 것으로 보고되었다[35,36].

α -MSH가 MC1R에 결합하면 adenylate cyclase (AC)를 활성화시켜 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)를 증가시킨다[37-39]. cAMP의 증가로 인해 protein kinase A (PKA)가 증가하고 cAMP response element binding protein (CREB)를 인산화한다[40,41]. CREB의 인산화는 MITF의 발현을 유도하며 이는 멜라닌 생성을 촉진한다[42-45].

자극된 MC1R은 또 다른 경로를 활성화시킨다. 자극된 MC1R로 인해 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)가 활성화되면 막 인지질인 phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PIP₂)를 인산화하도록 하여 phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (PIP₃)로의 전환을 촉매한다[46-50]. PIP₃로 인해 AKT는 세포막으로 모집되어 인산화된다[51]. PI3K/AKT 경로의 억제는 멜라닌 생성의 증가와 연관이 있다[52,53]. 따라서 AKT가 인산화되면 MITF의 발현을 감소시키고 궁극적으로 멜라닌의 생성은 억제된다[54].

현재 hydroquinone[55], arbutin[56] 및 kojic acid[57]와 같은 다양한 피부 미백제들은 피부 색소 침착을 예방하거나 치료하기 위해 사용되고 있다 [58]. 그러나 hydroquinone의 장기적인 투여는 자극성, 접촉성 피부염을 유발하고[59], hydroquinone 유사체인 arbutin은 강한 유전 독성을 가지고 있고, 인체에서 hydroquinone으로 전환되는 것으로 보고되었다[60,61]. 또한 kojic acid에 의한 발암 가능성과 알레르기 접촉 피부염도 이전 연구에서 보고되었다[62,63]. 따라서, 효과적이고 안전한 피부 저자극제를 찾는 데 초점을 맞추려고 한다.

염증은 외상, 감염, 조직손상 또는 염증과정에 대한 보호 반응이며[64,65], 유해한 조건 하에 항상성을 유지하는 중요한 면역 기능이다[66]. 하지만 장기간에 걸친 만성염증은 류마티스 관절염, 심장병, 당뇨병, 암, 천식, 염증성 장 질환, 알츠하이머병 등 다양한 질병을 유발한다[67-69].

대식세포는 염증 및 면역반응의 조절에 중요한 역할을 한다[70-72]. 내독소로 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포 외막에 존재하며, LPS가 대식세포를 자극하면 활성화된 대식세포는 NO, PGE₂ 및 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등 전염증성 cytokine을 생성한다[73,74]. 그러나 염증성 매개체와 전염증성 cytokine의 과잉 생산은 자가면역질환, 심혈관질환, 암과 같은 많은 질병을 유발할 수 있다[75,76]. 따라서 대식세포의 활성화와 염증 매개체의 생성을 억제하는 것은 염증성 질환의 개선과 항염증 치료법의 개발을 위한 유망한 전략으로 여길 수 있다[77,78].

LPS 자극 시 cytokine에 의해 유도될 수 있는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 전염증성 효소는 여러 염증성 질환에서 함께 작용하는 것으로 밝혀졌다[79,80]. 활성화된 대식세포는 iNOS를 생성시키며 이는 L-arginine의 산화를 촉매하여 NO를 생성한다[81]. NO는 면역, 염증, 신경, 심혈관을 포함한 많은 기관에서 생리학적 과정에 관여한다[82]. 하지만 iNOS에 의해 NO가 지속적으로 생성되면 패혈성 쇼크 및 염증성 질환과 같은 유해한 결과를 얻을 수 있다[83]. PGE₂ 또한 염증 반응의 매개체로써 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 유도되며 PGE₂는 염증 및 발암을 포함한 다양한 병리생리학 과정에 관여하고 있다[84]. 따라서 iNOS와 COX-2 발현에 대한 이중 억제 효과를 가진 화합물은 염증성 또는 만성 면역 장애의 치료를 진전시키는데 잠재력이 있을 것이다.

염증과 관련된 다양한 신호 경로 중 toll-like receptor 4 (TLR4) 경로는 중요한 메커니즘 중 하나로 간주된다[85]. 자극되지 않은 대식세포에서 LPS는 TLR4에 결합하며 TLR4의 활성화는 세포 신호를 전달하여 NF- κ B와 MAPKs 신호전달 경로의 활성화를 초래한다[86,87].

Extra cellular signal regulated kinases (ERK), c-jnk N-terminal (JNK), p38과 같은 MAPK는 세포 성장과 분화의 조절뿐만 아니라 cytokine 및 스트레스에 대한 세포 반응의 조절에 중요한 역할을 하는 신호 분자 그룹이다[88]. MAPKs의 인산화는 활성화된 대식세포에서 전염증성 cytokine과 염증 매개체의 생성을 증가시킨다[89,90].

Nuclear factor κ B (NF- κ B) 신호전달경로는 iNOS, COX-2와 같은 전염증 유도 효소와 염증 관련 단백질의 조절을 통해 면역 및 염증성 반응에 필수적인 역할을 한다[91,92]. 자극되지 않은 상태에서 NF- κ B는 p50, p65 subunits으로 구성되어 있으며 세포질에서 inhibitor κ B- α (I κ B- α)와의 상호작용을 통해 세포질에서 비활성상태로 유지된다[93,94]. LPS에 의해 대식세포가 자극되면 I κ B kinase (IKK)에 의해 I κ B- α 는 인산화되어 유비퀴틴화 및 분해가 일어나며 자유로워진 NF- κ B는 핵으로 옮겨져 전염증성 cytokine 및 iNOS와 COX-2의 상향조절을 통해 다양한 염증 신호 경로를 조절한다[95-97].

현재 비스테로이드 항염증제(NSAIDs)는 항염증제, 진통제로 널리 사용되고 있다[98]. 하지만 NSAIDs가 독성을 가지고 있으며 심근경색과 같은 부작용을 유발하며 NSAIDs 과다복용 환자에게는 경련, 혼수, 급성 신부전 등 심각한 임상 후유증이 보고되고 있다[99,100]. 따라서 효과적이고 안전한 항염증제를 찾는 데 초점을 맞추려고 한다.

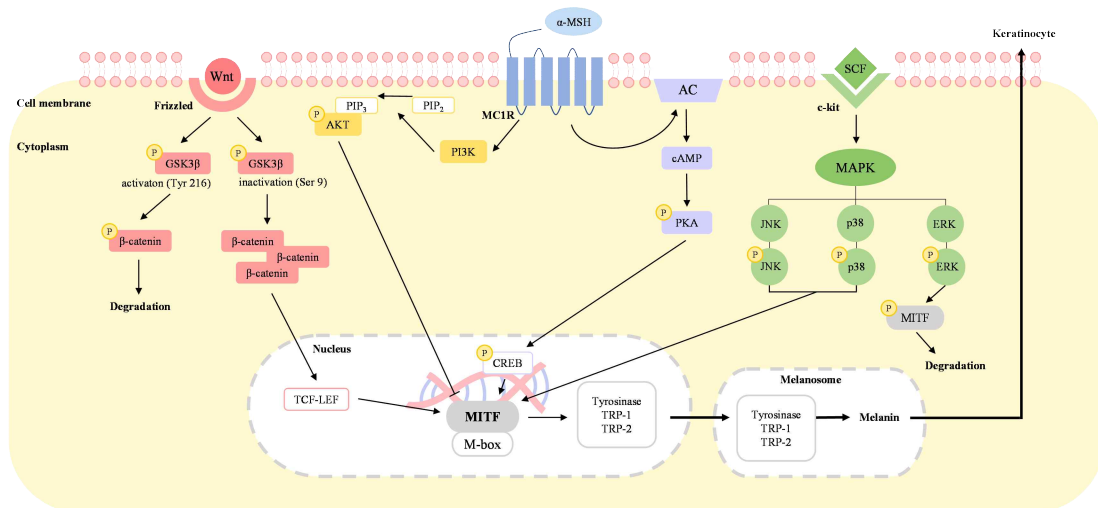
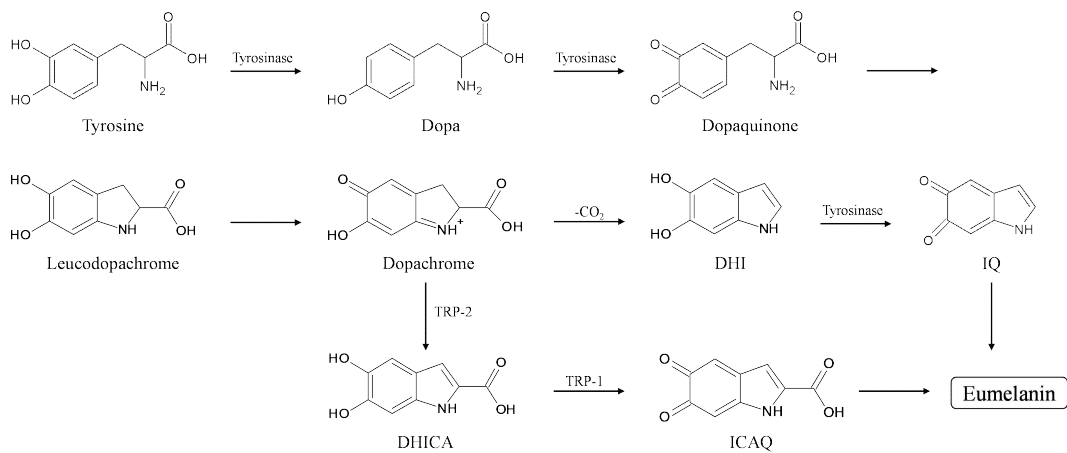


Figure 1. Regulation of melanogenesis through different signaling pathways.



5

Figure 2. Melanin biosynthesis pathway.

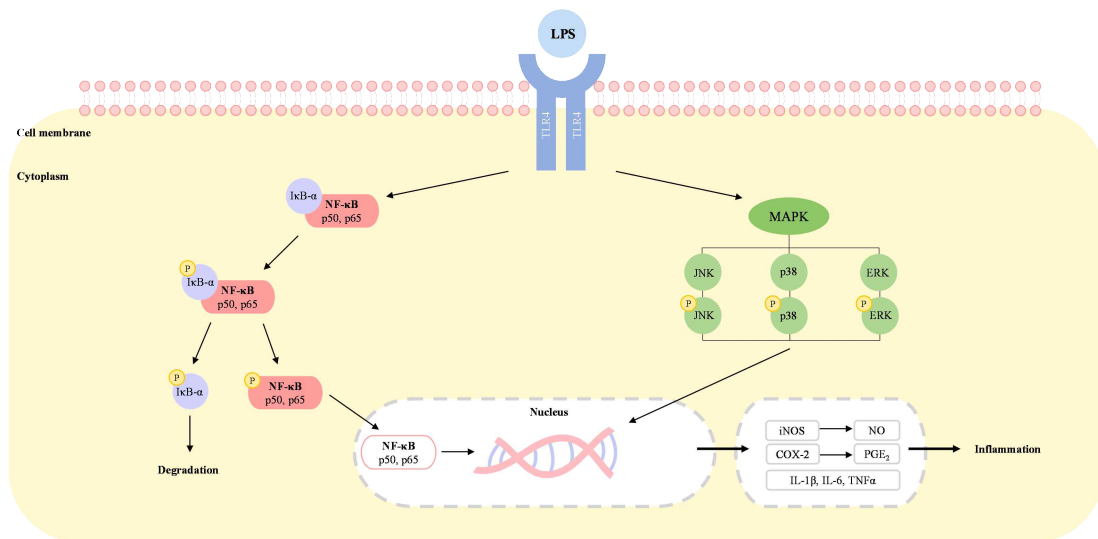


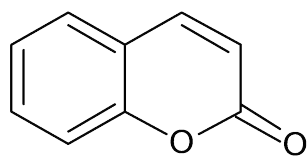
Figure 3. Regulation of inflammation through different signaling pathways.

Coumarin은 benzene에 α -pyrone 고리가 결합 되어있는 화합물이다 [101]. 이러한 유형의 α -benzopyrone 구조는 약한 결합 상호작용을 통해 유기체의 다양한 효소 및 수용체와 쉽게 상호 작용할 수 있도록 하여 약제로서의 광범위한 잠재력을 나타낸다[102,103]. Coumarin은 *Dipteryx odorata*에서 처음 발견되었으며 식물에서도 많이 발견되는 페놀성 물질로 구성되며 현재까지 1300개 이상의 화합물이 확인되었다[104]. 현재까지 coumarin은 항암[105], 항증식[106], 항산화[107], 항균[108], 항응고[109], 항염증[110], 항바이러스[111], 항우울제[112] 등 다양한 약리학적 활성을 보이고 있다.

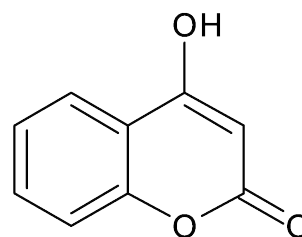
4-Hydroxycoumarin은 coumarin의 4번 위치에 -OH가 결합 되어있는 구조이며 4-Hydroxycoumarin과 그 유도체들은 혈관 내에 비정상적으로 일어나는 혈전 형성을 방지하는 항응고제로 사용되어왔다[113,114]. 또한 항염증[115], 항암[116], 진통제[117], 항균[118], 등 다양한 약리학적 활성을 가지고 있다고 알려져 있다.

4-Hydroxycoumarin 유도체인 acenocoumarol과 warfarin은 일반적으로 사용되는 경구 항응고제이며 혈전증 예방에 효과가 있다고 알려져 있다 [119,120]. 이들은 혈액응고인자 (II, VII, IX, X)의 의존 합성을 억제하기 때문에 비타민 K 길항제라고도 부른다[121,122]. 현재 acenocoumarol과 warfarin은 항응고제, 항암, 항 HIV 활성을 가진다고 보고되었다[123]. 하지만 두 물질 모두 멜라닌 증감에 대한 연구와 항염증에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 B16F10 세포에서 acenocoumarol과 warfarin의 멜라닌 생성 억제 효과와 acenocoumarol이 B16F10 세포에서 신호전달경로에 미치는 영향을 조사해보고자 한다. 또한 LPS 자극 RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol의 항염증 효과를 조사하고자 한다.

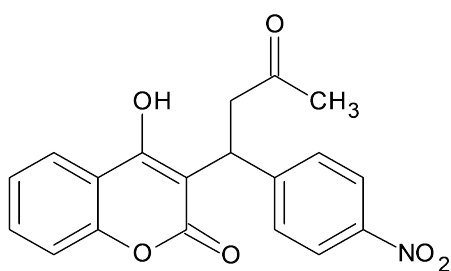
(a)



(b)



(c)



(d)

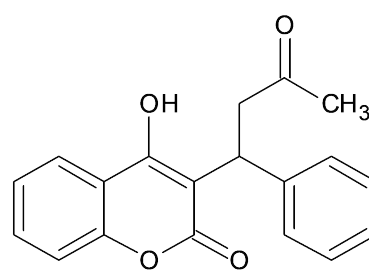


Figure 4. Structure of coumarin derivatives. (a) Coumarin, (b) 4-Hydroxycoumarin, (c) Acenocoumarol (d) Warfarin.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 acenocoumarol은 TCI (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며 warfain은 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포를 배양하기 위해 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)과 penicillin-streptomycin (P/S)을 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 fetal bovine serum (FBS)는 Merck Millipore (Burlington, MA, USA)에서 구입하였다.

세포 실험을 하기 위해 사용된 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), protease/phosphatase inhibitor cocktail, sodium hydroxide (NaOH), L-DOPA, Lipopolysaccharide (LPS), griess reagent는 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dimethyl sulfoxide (DMSO), phosphate buffered saline (PBS), tris-buffered saline (TBS), sodium dodecyl sulfate (SDS), radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, enhanced chemiluminescence (ECL) kit는 Biosesang (Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다. BCA protein assay kit와 0.5% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (10 \times)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였으며, tween 20과 2 \times laemmli sample buffer는 Bio-rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였으며, skim milk는 BD Difco (Sparks, MD, USA)에서 구입하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit 중 PGE₂는 abcam (Cambridge, EN, UK)에서, IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다.

Western blot을 위해 사용된 1차 항체 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였으며,

COX-2는 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였고, p-ERK, ERK, p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-PKA, PKA, p-AKT, AKT, p-GSK-3 β , GSK-3 β , p- β -catenin, β -catenin, iNOS, p-I κ B- α , I κ B- α , p65, lamin B, β -actin과 2차 항체 anti-mouse, anti-rabbit는 Cell signaling technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

2. 실험방법

2.1. 세포 배양

B16F10 mouse melanoma cell은 ATCC: The Global Bioresource Center (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, RAW 264.7 murine macrophage cell은 Korea Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin-streptomycin이 함유된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지에 37°C, 5% CO₂의 조건에서 각각 3, 2일 간격으로 계대배양 하였다.

2.2. 세포 생존율

Coumarin 계열 화합물이 세포의 생존에 영향을 미치는지 알아보기 위해 MTT법을 수행하였다. B16F10 세포를 24 well plate에 1.5×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양시키고, 다양한 농도의 시료를 처리하여 72시간 동안 배양시켰다. RAW 264.7 세포는 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양시키고, 다양한 농도의 시료와 LPS를 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 배양 후 MTT 시약을 $0.2 \text{ mg}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 3시간 동안 반응시켰다. 배지 제거 후 DMSO를 1 mL 넣어 25°C 에서 20분간 보라색의 formazan 결정을 용해시켰다. Microplate reader를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. Melanin contents 측정

B16F10 세포에서 coumarin 계열 화합물들이 melanin 생성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 melanin contents를 수행하였다. 60 mm cell culture dish에 B16F10 세포를 8.0×10^4 cells/dish로 분주하여 24시간 동안 배양시켰고, 다양한 농도의 시료와 α -MSH를 (100 nM) 처리하여 72시간 동안 배양시켰으며 양성대조군으로는 arbutin (200 μ M)을 처리하여 배양된 세포가 사용되었다. 배지를 제거하고 차가운 1 \times PBS buffer로 2회 세척 후 lysis buffer (RIPA buffer, 1% protease inhibitor cocktail)를 200 μ L씩 넣어 20분 동안 4°C에서 lysis 하였다. Lysis 후 cell scraper를 이용해 cell을 모아 1.5 mL e-tube에 옮겨 vortexing 하였다. 15000 rpm, -8°C의 조건에서 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하여 pellet을 얻었으며 pellet은 800 μ L의 1 N NaOH (10% DMSO)를 넣어 90°C에서 10분간 용해하였다. 96 well plate에 200 μ L씩 넣어주었으며 microplate reader를 이용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. Tyrosinase activity 측정

60 mm cell culture dish에 B16F10 세포를 8.0×10^4 cells/dish로 분주하여 24시간 동안 배양시켰고, 다양한 농도의 시료와 α -MSH를 (100 nM) 처리하여 72시간 동안 배양시켰으며 양성대조군으로는 arbutin (200 μ M)을 처리하여 배양된 세포가 사용되었다. 배지를 제거하고 차가운 $1 \times$ PBS buffer로 2회 세척 후 lysis buffer (RIPA buffer, 1% protease inhibitor cocktail)를 200 μ L씩 넣어 20분 동안 4°C에서 lysis 하였다. Lysis 후 cell scraper를 이용해 cell을 모아 1.5 mL e-tube에 옮겨 vortexing 하였다. 15000 rpm, -8°C의 조건에서 20분 동안 원심분리를 진행하였다. 원심분리 후 상층액을 얻었으며 단백질의 농도는 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였다. 96 well plate에 20 μ g/mL로 정량한 단백질 20 μ L와 2 mg/mL L-DOPA 80 μ L을 넣어주고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 흡광도는 microplate reader를 이용하여 490 nm의 파장에서 측정하였다.

2.5. Nitric oxide 생성량 측정

Coumarin 계열 화합물이 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 생성된 nitric oxide를 저해하는지 확인하기 위해 세포 배양액에 존재하는 Nitric oxide의 양을 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양시키고, 다양한 농도의 시료와 LPS를 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 양성대조군으로는 L-NIL (40 μM)을 처리하여 배양된 세포가 사용되었다. 배양 후 세포 배양액 100 μL 와 griess reagent 100 μL 를 혼합하였다. 흡광도는 microplate reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 측정하였다.

2.6. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 전염증성 cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 생성량 측정

Coumarin 계열 화합물이 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성량을 저해하는지 확인하기 위해 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양시키고, 다양한 농도의 시료와 LPS를 (1 μ g/mL) 처리하여 24시간 동안 배양하였다. PGE₂ 생성량 측정 시 양성대조군으로는 NS 398 (100 nM)을 처리하여 배양된 세포가 사용되었다. 흡광도는 microplate reader를 이용하여 405 nm 혹은 450 nm의 파장에서 측정하였다.

2.7. Western blot

B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 8.0×10^4 cells/dish로 분주하여 24시간 동안 배양시켰고, 다양한 농도의 시료와 α -MSH를 (100 nM) 처리하여 단백질 발현 시간에 따라 배양시켰으며 양성대조군으로는 arbutin (200 μ M)을 처리하여 배양된 세포가 사용되었다. RAW 264.7 세포는 60 mm cell culture dish에 6.0×10^5 cells/dish로 분주하여 24시간 동안 배양시켰고, 다양한 농도의 시료와 LPS를 (1 μ g/mL) 처리하여 단백질 발현 시간에 따라 배양시켰다. 배양 후, 배지를 제거하고 차가운 1 \times PBS buffer로 2회 세척 후 lysis buffer (RIPA buffer, 1% protease inhibitor cocktail)를 200 μ L씩 넣어 20분 동안 4°C에서 lysis 하였다. Lysis 후 cell scraper를 이용해 cell을 모아 1.5 mL e-tube에 옮겨 vortexing 하였다. 15000 rpm, -8°C의 조건에서 20분 동안 원심분리를 진행하였다. 원심분리 후 상층액을 얻었으며 단백질의 농도는 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였다. Loading sample은 30 μ g/mL로 정량한 단백질과 2 \times laemmli sample buffer를 1:1 비율로 혼합하여 100°C에서 5분간 가열하였다. 제조한 loading sample은 SDS-polyacrylamide gel로 전기영동을 통해 단백질을 크기별로 분리하였다. 분리된 단백질은 gel에서 PVDF membrane으로 transfer 하였고, membrane은 1 \times TBS-T (Tris-Buffered Saline with 1% Tween 20)로 녹인 5% skim milk에 2시간 동안 blocking 되었다. Blocking 후 membrane을 1 \times TBS-T로 10분간 총 6회 세척하고, 1 \times TBS-T에 1:2000의 비율로 용해된 1차 항체를 4°C에서 overnight 반응시켰다. 다시 1 \times TBS-T로 10분간 총 6회 세척하고, 1 \times TBS-T에 1:1000의 비율로 용해된 2차 항체를 25°C에서 2시간 동안 반응시켰다. membrane을 다시 1 \times TBS-T로 10분간 총 6회 세척하고, ECL kit를 사용하여 단백질을 발현시키고 chemidoc (WL, VILBER LOURMAT, France)을 이용해 현상하였다.

3. 통계처리

모든 실험의 결과는 세 번의 반복 실험을 통해 평균과 표준편차 (평균 \pm SD)로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's t-test를 사용하여 p-value로 나타내었고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 로 표시하였고, 미처리 세포 대조군과 비교하여 # $p < 0.01$ 로 표시하였다.

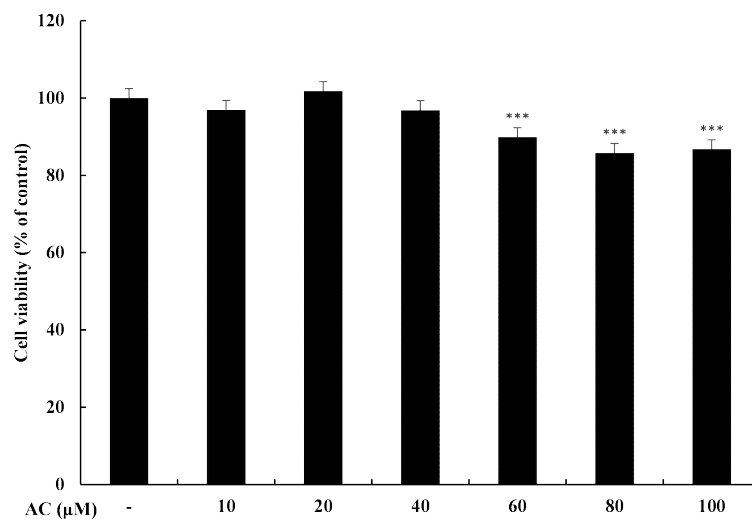
Ⅲ. 결 과

1. B16F10 세포에서 coumarin 계열 화합물의 멜라닌 생성 영향 평가

1.1. 세포 생존율

B16F10 세포에서 coumarin 계열 화합물이 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해서 MTT법을 수행하였다. Coumarin 계열 화합물들의 다양한 농도 (10, 20, 40, 60, 80 및 100 μM)를 각각 처리하여 72시간 동안 배양시켰다. 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 기준은 미처리 세포 대조군 대비 90% 이상의 생존율을 갖는 것으로, acenocoumarol과 warfarin 모두 60 μM 미만의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 5). 따라서 acenocoumarol과 warfarin은 10, 20 및 40 μM 의 농도에서 이후 실험을 진행하였다.

(a)



(b)

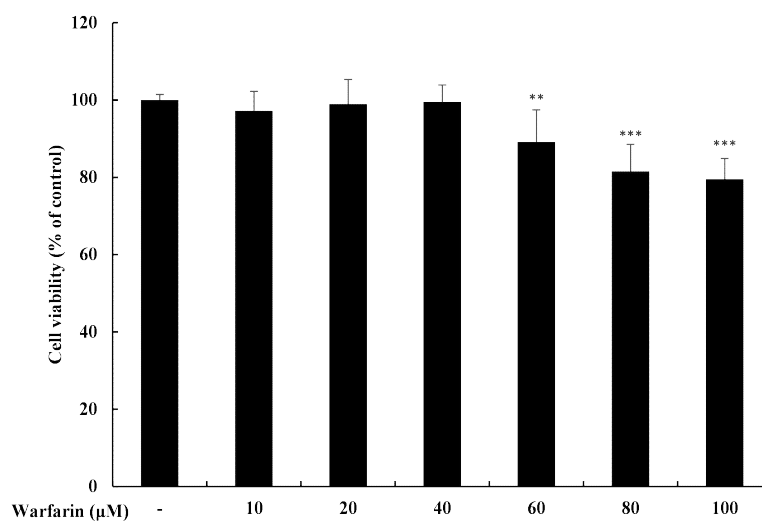
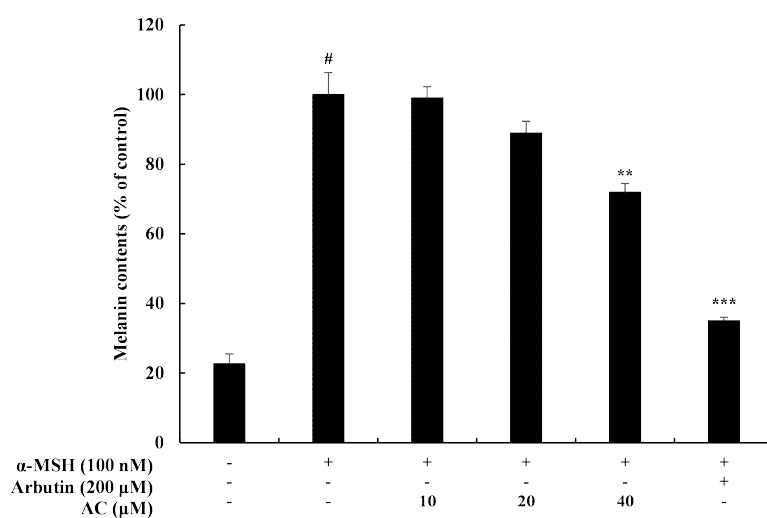


Figure 5. The effect of coumarin derivatives on the viability in B16F10 melanoma cells. The cells were treated coumarin derivatives (10, 20, 40, 60, 80 and 100 μM) for 72 h. Cytotoxicity of (a) Acenocoumarol, (b) Warfarin was evaluated using the MTT assay. Cell viability is expressed as percentages relative to untreated cells. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs unstimulated control group.

1.2. Melanin contents

B16F10 세포에서 coumarin 계열 화합물이 세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 멜라닌 함량 측정 실험을 진행하였다. Acenocoumarol과 warfarin을 다양한 농도 (10, 20 및 40 μM)로 72시간 동안 처리하였다. α -MSH (100 nM)와 arbutin (200 μM)은 각각 음성대조군과 양성대조군으로 사용되었다. 그 결과 coumarin 계열 화합물 중 acenocoumarol의 멜라닌 감소 효과가 더 우수했다. Acenocoumarol과 warfarin의 멜라닌 함량은 음성대조군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μM 에서 acenocoumarol은 28.04%, warfarin은 23.74% 감소함을 확인하였다(Fig. 6).

(a)



(b)

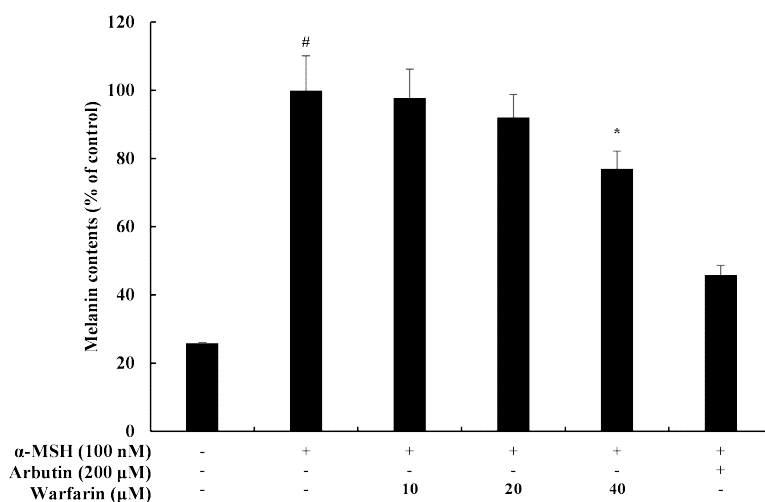


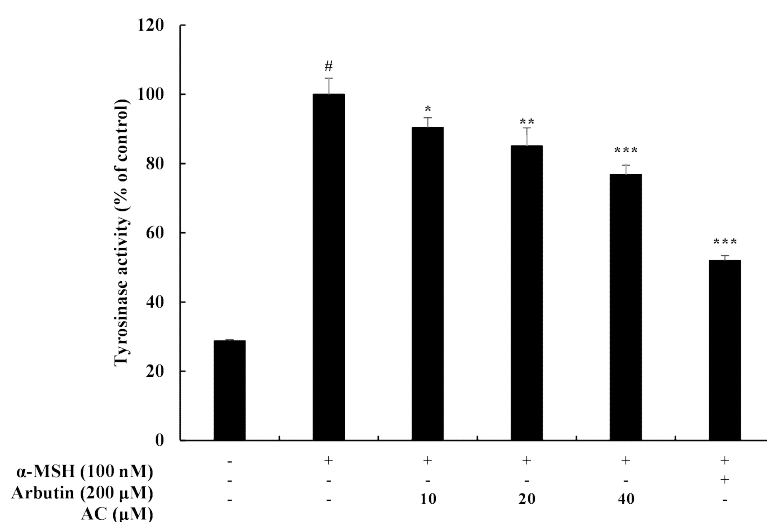
Figure 6. The effect of coumarin derivatives on production of melanin in α -MSH-stimulated B16F10 cells. The cells were treated (a) Acenocoumarol, (b) Warfarin (10, 20 and 40 μ M) for 72 h. α -MSH was used as the negative control and arbutin (200 μ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated experiments. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone.

1.3. Tyrosinase activity

B16F10 세포에서 coumarin 계열 화합물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 tyrosinase activity 실험을 진행하였다. Acenocoumarol과 warfarin을 다양한 농도 (10, 20 및 40 μM)로 72시간 동안 처리하였으며 α -MSH (100 nM)와 arbutin (200 μM)은 각각 음성대조군과 양성대조군으로 사용되었다. Acenocoumarol과 warfarin의 tyrosinase 활성은 음성대조군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μM 에서 acenocoumarol은 23.19%, warfarin은 6.03% 감소함을 확인하였다(Fig. 7).

따라서 coumarin 계열 화합물 중 acenocoumarol의 tyrosinase 활성 감소 효과가 가장 우수함을 확인하였고 이후 acenocoumarol에 대한 추가 실험을 진행하였다.

(a)



(b)

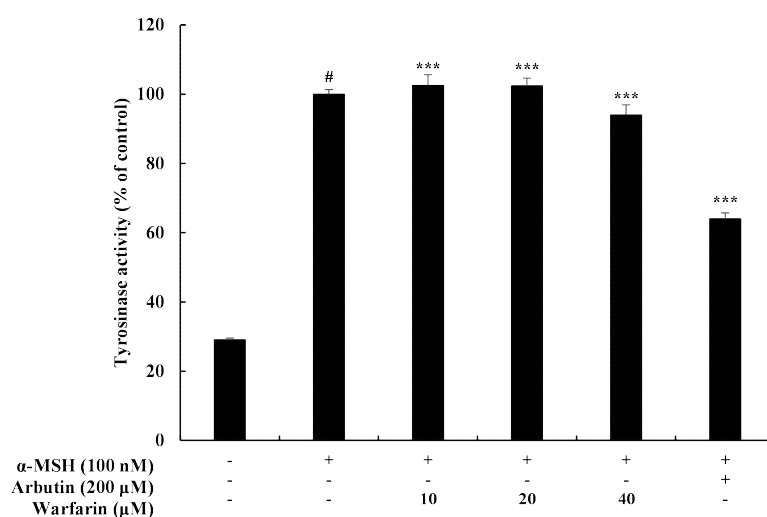


Figure 7. The effect of coumarin derivatives on tyrosinase activity in α -MSH-stimulated B16F10 cells. The cells were treated (a) Acenocoumarol, (b) Warfarin (10, 20 and 40 μ M) for 72 h. α -MSH was used as the negative control and arbutin (200 μ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated experiments. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone.

2. B16F10 세포에서 acenocoumarol의 멜라닌 생성 영향 평가

2.1. Western blot

1) 멜라닌 생성 효소 발현

B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소 발현량에 영향을 미치는 acenocoumarol의 영향을 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소의 발현량은 α -MSH (100 nM) 처리군과 비교했을 때 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히 acenocoumarol은 최고 농도인 40 μ M에서 tyrosinase를 35.59%, TRP-1을 58.98%, TRP-2를 33.31% 감소시켰다(Fig. 8).

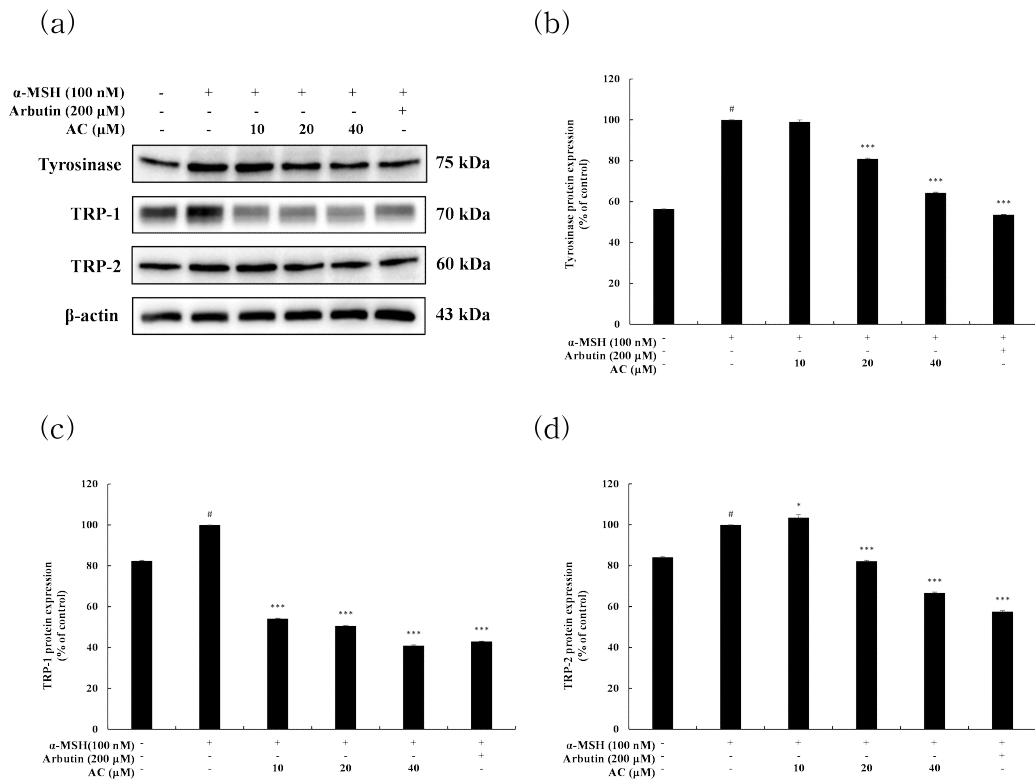


Figure 8. The effect of acenocoumarol on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells. The cells were treated with acenocoumarol (10, 20 and 40 μ M) for 48 h in the presence of α -MSH (100 nM). (a) Western blotting results, (b) Tyrosinase protein expression, (c) TRP-1 protein expression, (d) TRP-2 protein expression. α -MSH was used as the negative control and arbutin (200 μ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone.

2) MITF 발현

MITF는 tyrosinase 관련 단백질의 조절인자이며 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 promoter의 M-box와 결합하여 멜라닌 생성을 유도한다고 알려져 있다[20,21]. 따라서 B16F10 세포에서 MITF 발현량에 미치는 acenocoumarol의 영향을 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 B16F10 세포에서 MITF의 발현량은 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있으며 α -MSH (100 nM) 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μ M에서 약 79.56% 감소시켰다(Fig. 9). 이러한 결과를 통해 acenocoumarol은 B16F10 세포에서 MITF의 발현을 억제해 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

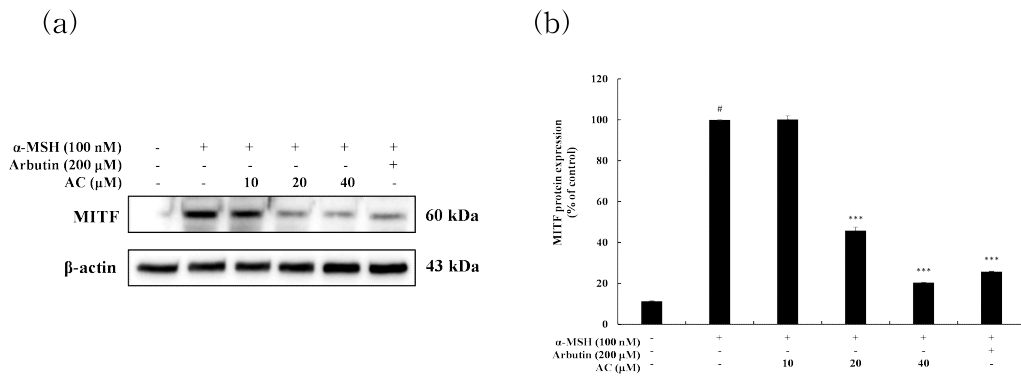


Figure 9. The effect of acenocoumarol on MITF protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells. The cells were treated with acenocoumarol (10, 20 and 40 μ M) for 40 h in the presence of α -MSH (100 nM). (a) Western blotting results, (b) MITF protein expression. α -MSH was used as the negative control and arbutin (200 μ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone.

3) Wnt/ β -catenin 신호전달경로

Wnt/ β -catenin 신호전달경로에서 Frizzled(Fz) 수용체의 활성화는 GSK3 β 의 비활성화 및 β -catenin 축적의 자극을 통해 최종적으로 MITF 발현을 증가시킨다[22-24]. 따라서 B16F10 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호전달경로를 통해 acenocoumarol이 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. Acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 β -catenin과 P-GSK3 β 의 발현량은 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있으며, P- β -catenin의 발현량은 증가하는 것을 확인할 수 있다. β -catenin과 P-GSK3 β 의 발현량은 α -MSH (100 nM) 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μ M에서 각각 36.05%, 48.32% 감소했고, P- β -catenin의 발현량은 45.16% 증가했다(Fig. 10). 이와 같은 결과를 통해 acenocoumarol은 B16F10 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호전달경로를 통해 최종적으로 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

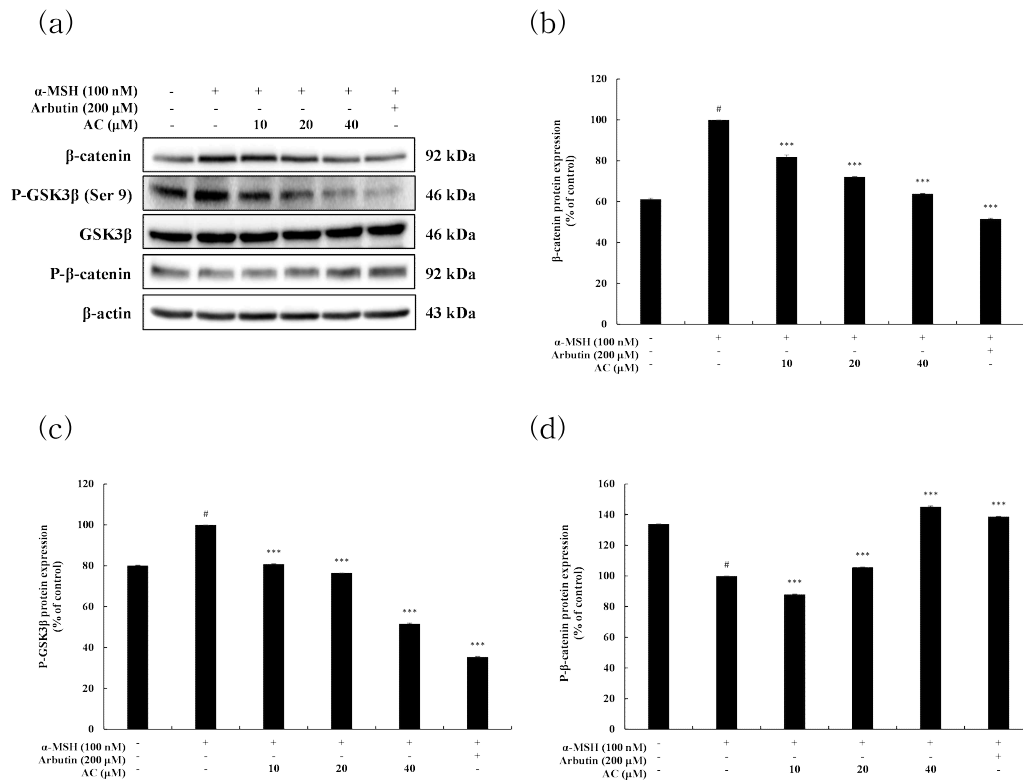


Figure 10. The effect of acenocoumarol on β -catenin, P-GSK3 β and P- β -catenin protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells. The cells were treated with acenocoumarol (10, 20 and 40 μ M) for 24 h in the presence of α -MSH (100 nM). (a) Western blotting results, (b) β -catenin protein expression, (c) P-GSK3 β protein expression, (d) P- β -catenin protein expression. α -MSH was used as the negative control and arbutin (200 μ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone.

4) MAPKs 신호전달경로

MAPK 신호전달경로 중에서 ERK는 MITF를 인산화시켜 궁극적으로 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 하향 조절을 통해 멜라닌의 합성을 감소시키는 반면[32-34], JNK와 p38의 인산화는 멜라닌을 증가시키는 것으로 보고되고 있다[35,36]. 따라서 B16F10 세포에서 acenocoumarol이 MAPKs 신호전달경로를 통해 MITF의 발현을 감소시키고 궁극적으로 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. Acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 음성 신호전달경로인 ERK의 발현량을 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있고, 양성 신호전달경로인 JNK와 p38은 감소하는 것을 확인할 수 있다. ERK의 발현량은 α -MSH (100 nM) 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μ M에서 약 206.19% 증가했으며 JNK와 p38의 발현량은 각각 60.09%, 48.50% 감소했다(Fig. 11). 다음과 같은 결과를 통해 acenocoumarol은 B16F10 세포에서 MAPKs 신호전달경로를 통해서 최종적으로 MITF의 발현을 억제해 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

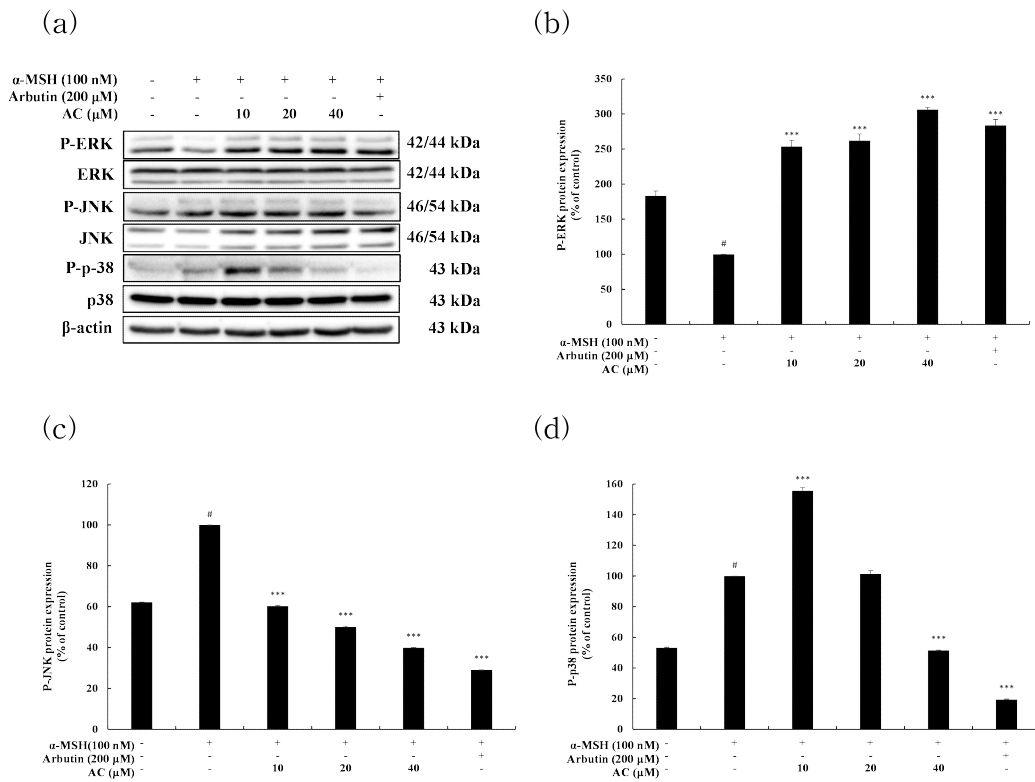


Figure 11. The effect of acenocoumarol on MAPKs protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells. The cells were treated with acenocoumarol (10, 20 and 40 μ M) for 4 h in the presence of α -MSH (100 nM). (a) Western blotting results, (b) P-ERK protein expression, (c) P-JNK protein expression, (d) P-p38 protein expression. α -MSH was used as the negative control and arbutin (200 μ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone.

5) cAMP/PKA 신호전달경로

cAMP/PKA 신호전달경로에서 MC1R이 자극을 받게 되면 AC가 활성화되어 cAMP를 증가시킨다. cAMP의 증가로 인해 PKA가 인산화되며 핵안으로 이동해 CREB을 인산화하여 MITF의 발현을 유도한다[37-45]. 따라서 B16F10 세포에서 PKA 신호전달경로를 통해 acenocoumarol이 PKA의 발현을 감소시켜 멜라닌 생성 억제를 억제하는지 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 B16F10 세포에서 PKA의 발현량을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였으며 α -MSH (100 nM) 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μ M에서 약 43.05% 감소시켰다(Fig. 12). 이러한 결과를 통해 acenocoumarol은 B16F10 세포에서 MITF의 발현을 억제해 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

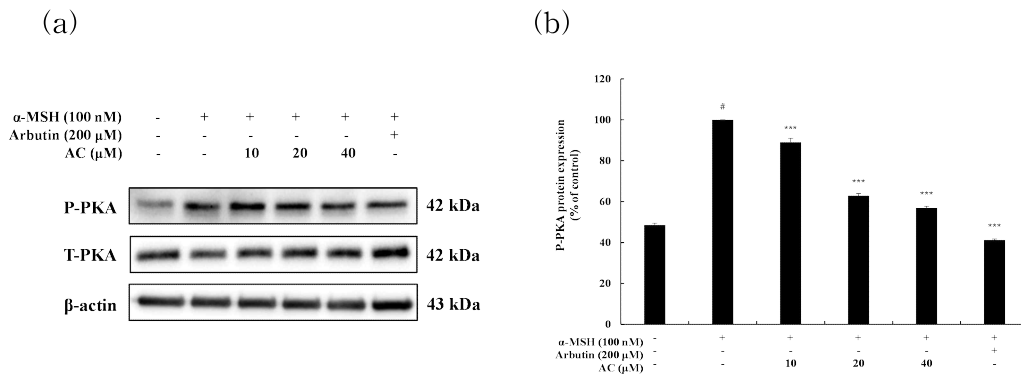


Figure 12. The effect of acenocoumarol on PKA protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells. The cells were treated with acenocoumarol (10, 20 and 40 μ M) for 24 h in the presence of α -MSH (100 nM). (a) Western blotting results, (b) P-PKA protein expression. α -MSH was used as the negative control and arbutin (200 μ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone.

6) PI3K/AKT 신호전달경로

PI3K/AKT 경로의 억제는 멜라닌 생성의 증가와 연관이 있다고 알려져 있으며 AKT가 인산화되면 MITF의 발현을 감소시키고 궁극적으로 멜라닌의 생성은 억제된다고 보고되어 있다[52-54]. 따라서 B16F10 세포에서 AKT 신호전달경로를 통해 acenocoumarol이 MITF의 발현을 감소시켜 멜라닌 생성 억제를 억제하는지 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 B16F10 세포에서 AKT의 발현량을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였으며 α -MSH (100 nM) 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μ M에서 약 145.88% 증가시켰다(Fig. 13). 이러한 결과를 통해 acenocoumarol은 B16F10 세포에서 AKT의 인산화를 증가시켜 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

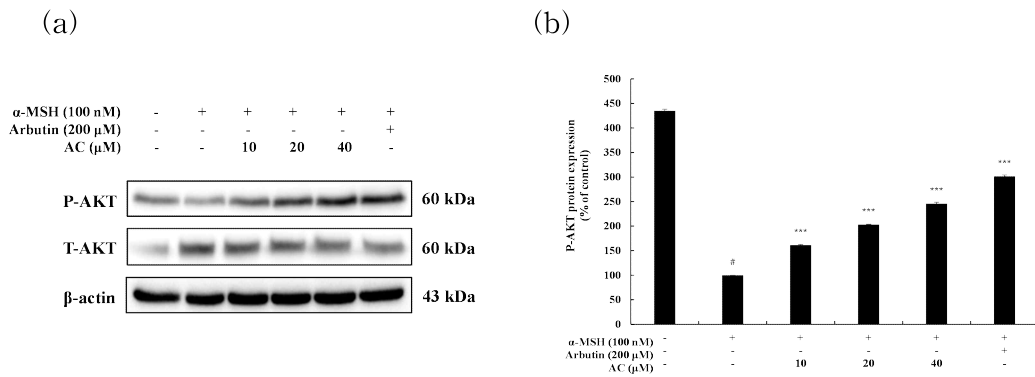


Figure 13. The effect of acenocoumarol on AKT protein expression in α -MSH-stimulated B16F10 cells. The cells were treated with acenocoumarol (10, 20 and 40 μ M) for 4 h in the presence of α -MSH (100 nM). (a) Western blotting results, (b) P-AKT protein expression. α -MSH was used as the negative control and arbutin (200 μ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone.

3. RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol의 항염증 효능 평가

3.1. 세포 생존율

RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol이 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해서 MTT법을 수행하였다. Acenocoumarol을 다양한 농도 (15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 및 500 μ M)를 각각 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 기준은 미처리 세포 대조군 대비 90% 이상의 생존율을 갖는 것으로, acenocoumarol은 500 μ M 미만의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 14). 따라서 31.3, 62.5, 125 및 250 μ M의 농도에서 이후 실험을 진행하였다.

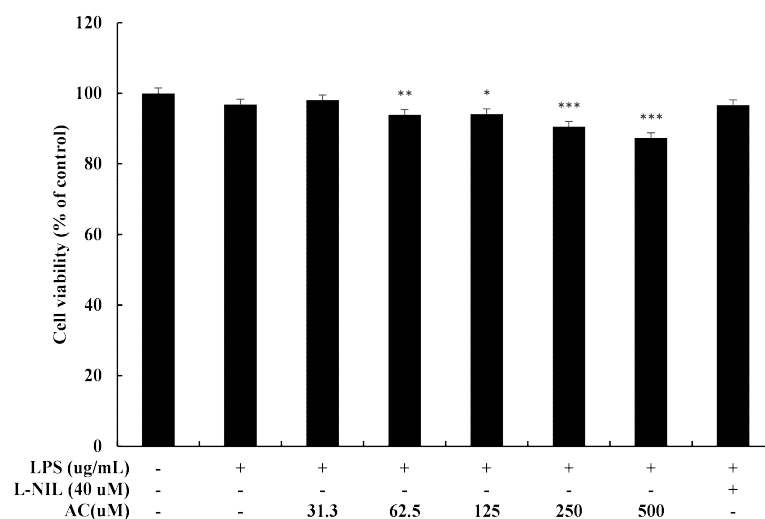


Figure 14. The effect of acenocoumarol on the viability in RAW 264.7 cells. The cells were treated acenocoumarol (31.3, 62.5, 125, 250 and 500 µM) and LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. L-NIL (40 µM) was used as the positive control. Acenocoumarol was evaluated using the MTT assay. Cell viability is expressed as percentages relative to untreated cells. The results are presented as the mean ± SD from three repeated experiments. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

3.2. Nitric oxide 생성량

LPS 자극에 의해 활성화된 대식세포는 iNOS를 생성시키며 이는 L-arginine의 산화를 촉매하여 NO를 생성하며 지속적으로 생성된 NO는 패혈성 쇼크 및 염증성 질환과 같은 유해한 결과를 얻을 수 있다[81,83]. 따라서 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol이 세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 생성된 nitric oxide를 저해하는지 확인하였다. Acenocoumarol을 다양한 농도 (31.3, 62.5, 125 및 250 μ M)로 24시간 동안 처리하였으며 iNOS 억제제인 L-NIL (40 μ M)은 양성대조군으로 사용되었다. 그 결과 acenocoumarol은 nitric oxide의 생성량을 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리군 대비 약 62.88% 감소시켰으며 이는 특이적 억제제로 사용된 L-NIL보다 nitric oxide 생성 저해율이 현저히 높은 것을 확인할 수 있다(Fig. 15).

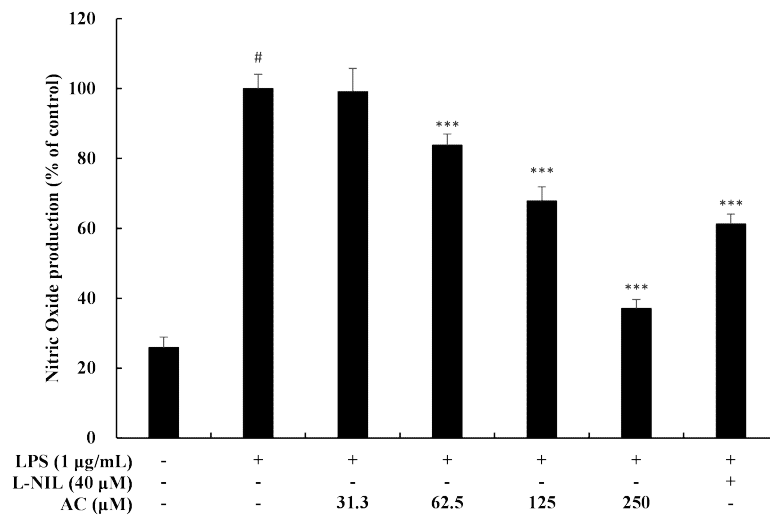


Figure 15. The effect of acenocoumarol on production of Nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated acenocoumarol (31.3, 62.5, 125 and 250 µM) and LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. L-NIL (40 µM) was used as the positive control. The amount of Nitric oxide in the medium was measured using a Griess reagent. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated experiments. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

3.3. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성량

LPS 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 PGE₂ 는 COX-2에 의해 유도되며 PGE₂는 염증 및 발암을 포함한 다양한 병리생리학 과정에 관여하고 있다[84]. 따라서 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol 이 세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 생성된 PGE₂ 생성량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. Acenocoumarol을 다양한 농도 (31.3, 62.5, 125 and 250 μ M)로 24시간 동안 처리하였으며 COX-2 억제제인 NS 398 (100 nM)은 양성대조군으로 사용되었다. 그 결과 acenocoumarol은 PGE₂의 생성량을 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리군 대비 약 41.44% 감소시켰으며 이는 특이적 억제제로 사용된 COX-2보다 PGE₂ 생성 저해율이 현저히 높은 것을 확인할 수 있다(Fig. 16).

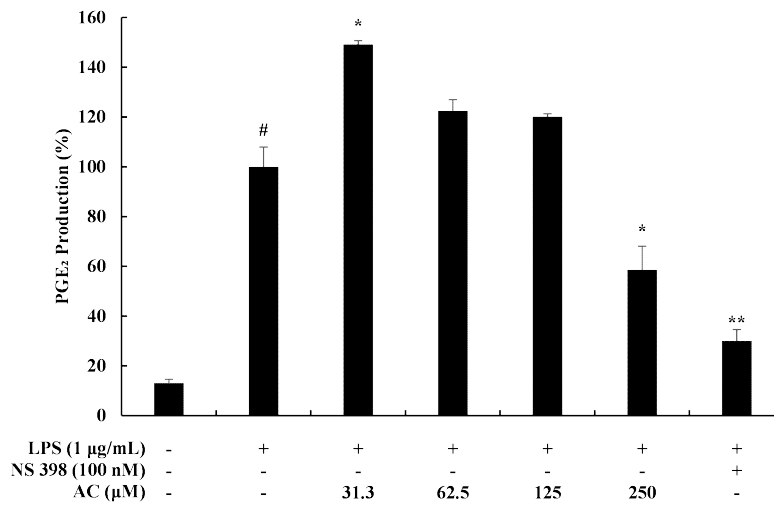


Figure 16. The effect of acenocoumarol on production of PGE₂ in LPS–induced RAW 264.7 cells. The cells were treated acenocoumarol (31.3, 62.5, 125 and 250 µM) and LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. NS 398 (100 nM) was used as the positive control. The PGE₂ production was determined using an ELISA kit. The results are presented as the mean ± SD from two repeated experiments. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

3.4. 전염증성 cytokine 생성량

LPS 자극에 의해 활성화된 대식세포에는 여러 신호전달경로를 통해 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등 다양한 염증성 cytokine을 생성한다[73,74]. LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol이 세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 생성된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. Acenocoumarol을 다양한 농도 (31.3, 62.5, 125 and 250 μ M)로 24시간 동안 처리하였다. 그 결과 acenocoumarol은 LPS로 자극된 세포에서 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량의 생성량 농도 의존적으로 감소시켰으며, 각각 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리군 대비 15.99%, 43.73%, 23.29% 감소시켰다 (Fig. 17).

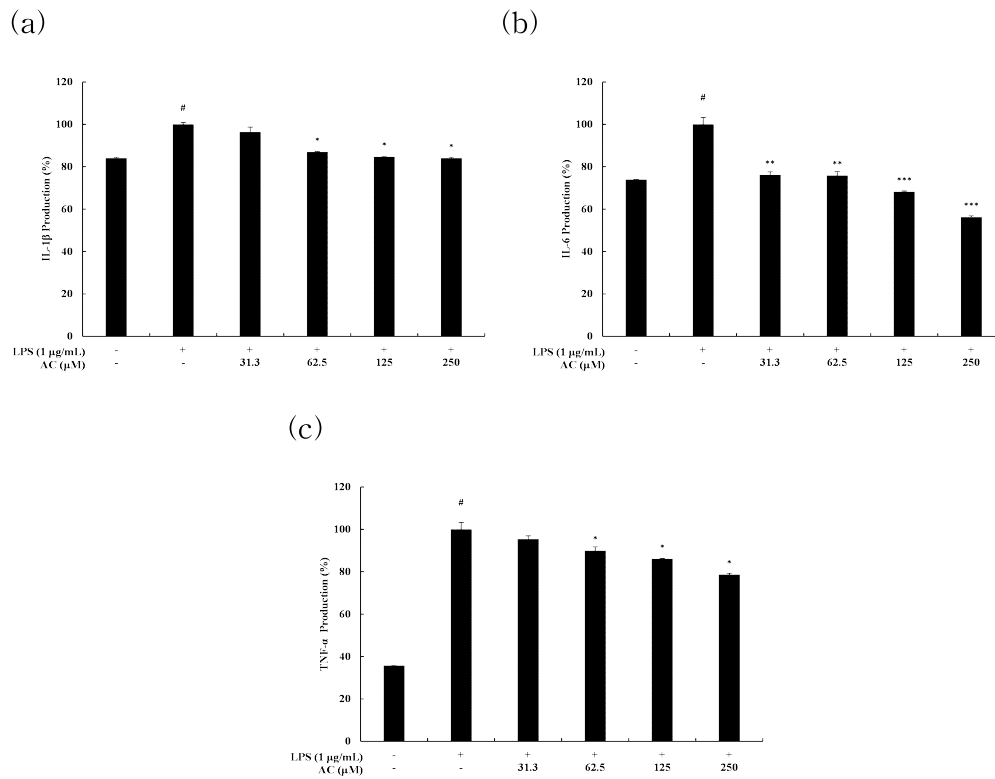


Figure 17. The effect of acenocoumarol on production of pro-inflammation cytokines in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated acenocoumarol (31.3, 62.5, 125 and 250 μM) and LPS (1 μg/mL) stimulation for 24 h. The (a) IL-1β production, (b) IL-6 production, (c) TNF-α production was determined using an ELISA kit. The results are presented as the mean ± SD from two repeated experiments. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

3.5. Western blot

1) iNOS, COX-2 발현

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2 발현량에 영향을 미치는 acenocoumarol의 영향을 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 RAW 264.7 세포에서 iNOS, COX-2의 발현량은 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인 할 수 있었으며 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 250 μM 에서 iNOS를 97.60%, COX-2을 67.09% 감소시켰다(Fig. 18). 이러한 결과를 통해 iNOS, COX-2 발현의 감소가 염증성 매개체인 NO와 PGE₂ 생성의 감소로 이어질 수 있음을 시사한다.

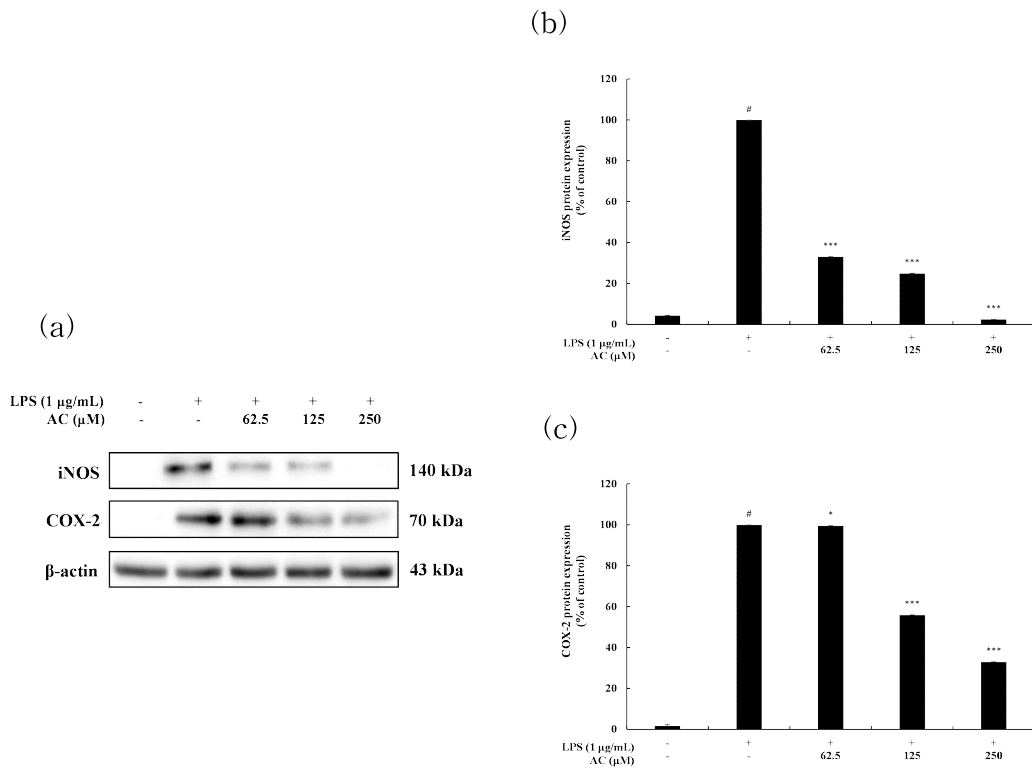


Figure 18. The effect of acenocoumarol on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated acenocoumarol (62.5, 125 and 250 µM) and LPS (1 µg/mL) stimulation for 22 h. (a) Western blotting results, (b) iNOS protein expression, (c) COX-2 protein expression. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

2) MAPKs 신호전달경로

MAPKs 신호전달경로에서 대식세포가 자극됨에 따라 인산화된 MAPKs는 전염증성 cytokine과 염증 매개체의 생성을 증가시킨다[89,90]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 ERK, JNK, p38 단백질 발현량에 영향을 미치는 acenocoumarol의 영향을 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 RAW 264.7 세포에서 ERK, JNK, p38의 발현량은 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있으며 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 250 μM 에서 ERK를 62.38%, JNK를 38.73%, p38을 60.62% 감소시켰다 (Fig. 19). 이는 acenocoumarol이 MAPKs 신호전달경로의 활성화를 억제해 염증성 매개체와 전염증성 cytokine의 생성 수준을 하향 조절함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

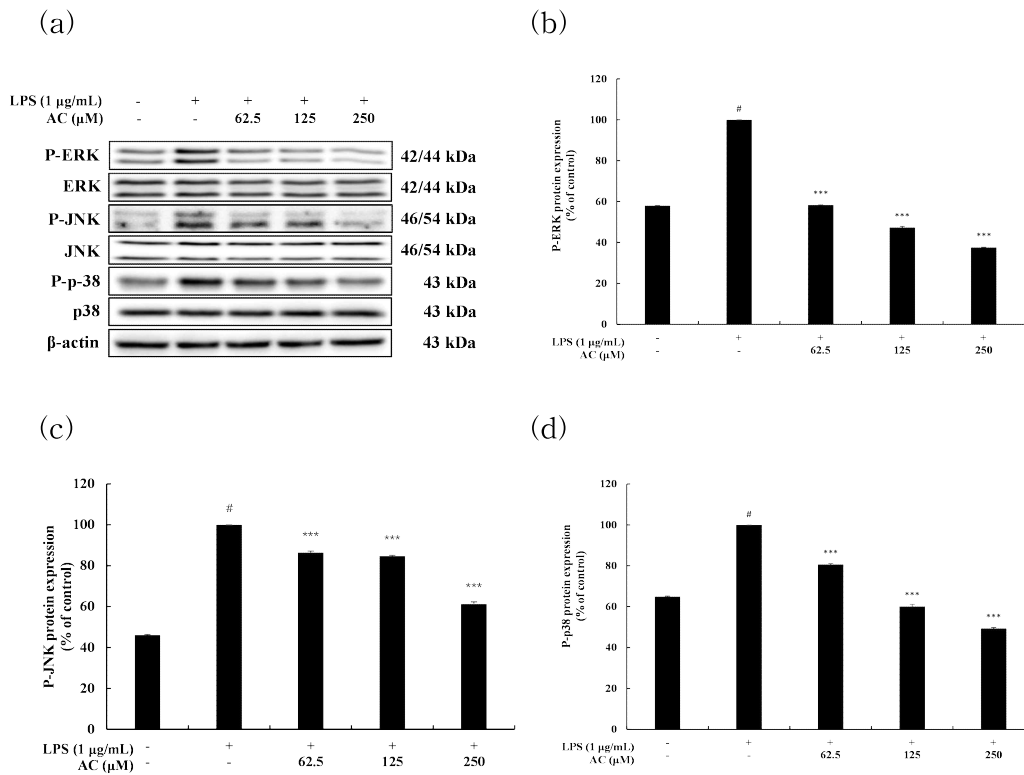


Figure 19. The effect of acenocoumarol on MAPKs protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated acenocoumarol (62.5, 125 and 250 μ M) and LPS (1 μ g/mL) stimulation for 20 min. (a) Western blotting results, (b) P-ERK protein expression, (c) P-JNK protein expression, (d) P-p38 protein expression. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

3) NF- κ B 신호전달경로

NF- κ B는 I κ B- α 와의 상호작용을 통해 세포질에서 비활성 상태로 유지되며 NF- κ B가 자극되면 IKK에 의해 I κ B- α 는 인산화되어 분해가 일어나며 NF- κ B는 핵으로 옮겨져 전염증성 cytokine 및 iNOS와 COX-2의 상향조절을 통해 다양한 염증 신호 경로를 조절한다고 보고 되어있다[93-97]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol이 NF- κ B 신호전달경로를 통해 전염증성 cytokine과 염증성 매개체의 생성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 I κ B- α 의 발현량은 증가하며, P-I κ B- α 의 발현량은 감소하는 것을 확인할 수 있다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 250 μ M에서 I κ B- α 를 137.84% 증가시켰으며, P-I κ B- α 를 97.19% 감소시켰다(Fig. 20).

LPS에 의해 자극된 대식세포에서 p65가 세포질에서 핵으로 전위되었는지 확인하기 위해 마찬가지로 western blot를 진행하였다. 세포질에서 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 p65의 발현량은 증가하며, 핵에서는 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 p65의 발현량은 감소하는 것을 확인할 수 있다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리군과 비교했을 때 최고 농도인 250 μ M에서 p65 (cytoplasm)를 62.55% 증가시켰으며, p65 (nucleus)를 51.85% 감소시켰다(Fig. 21). 이는 acenocoumarol이 I κ B- α 의 인산화 및 분해와 p65가 세포질에서 핵으로 전위되는 것을 막아 최종적으로 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

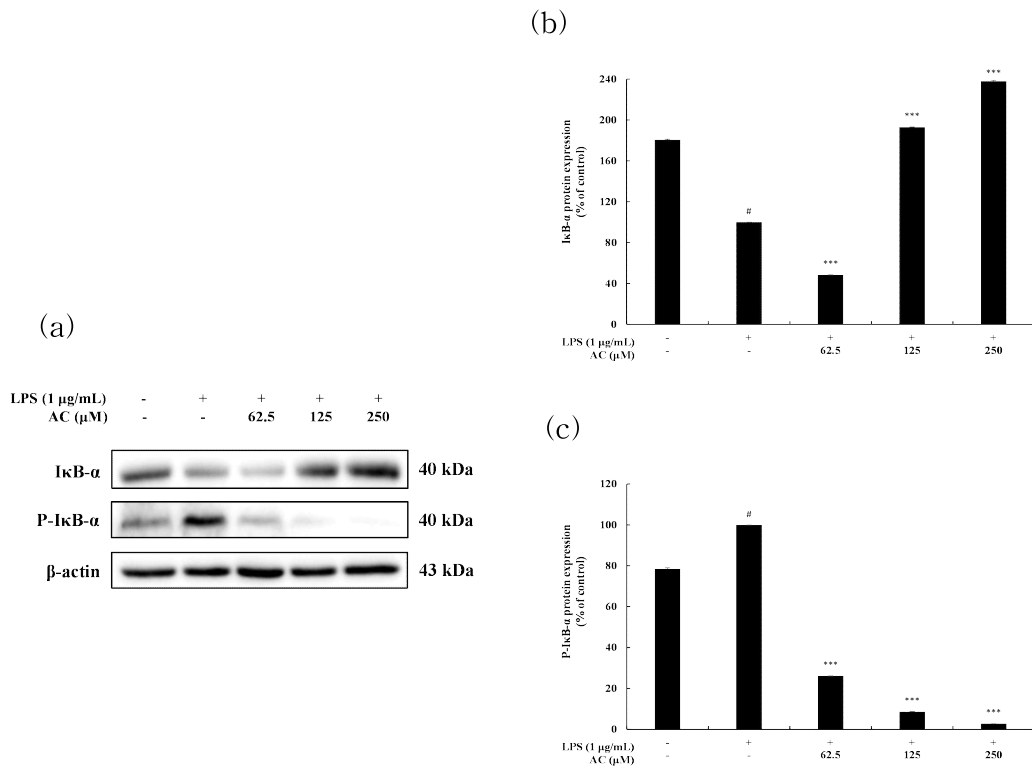


Figure 20. The effect of acenocoumarol on IκB-α and P-IκB-α protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated acenocoumarol (62.5, 125 and 250 µM) and LPS (1 µg/mL) stimulation for 20 min. (a) Western blotting results, (b) IκB-α protein expression, (c) P-IκB-α protein expression. The results are presented as the mean ±SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

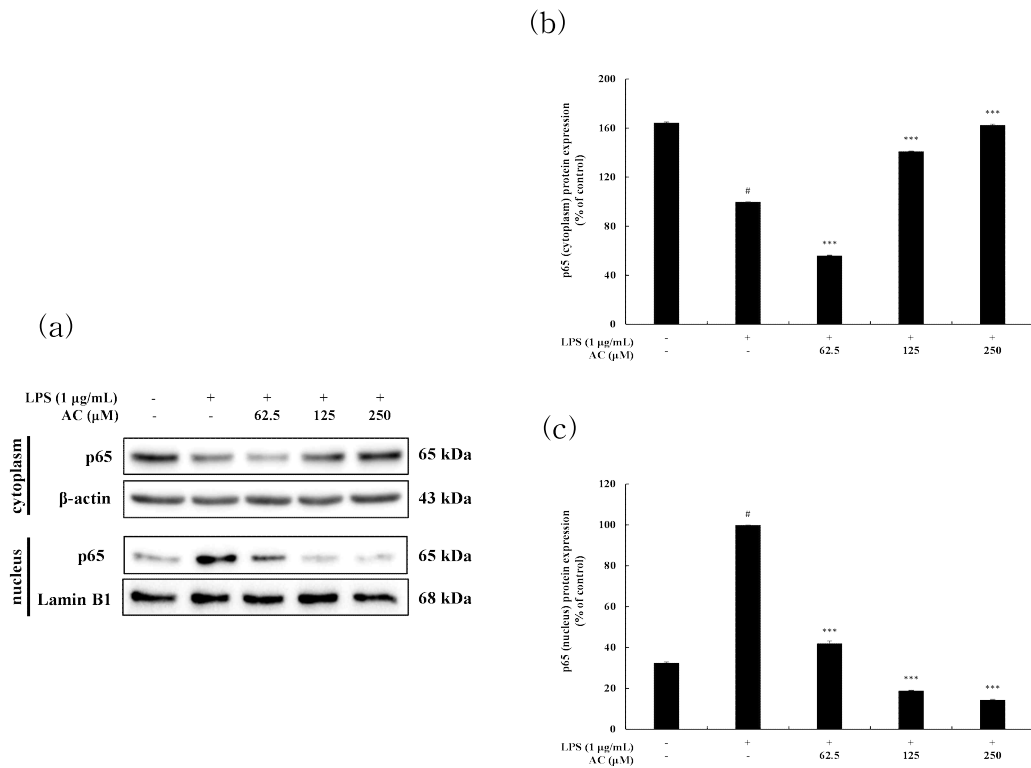


Figure 21. The effect of acenocoumarol on NF- κ B (p65) protein expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated acenocoumarol (62.5, 125 and 250 μ M) and LPS (1 μ g/mL) stimulation for 15 min. (a) Western blotting results, (b) p65 (cytoplasm) protein expression, (c) p65 (nucleus) protein expression. The results are presented as the mean \pm SD from three repeated measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs unstimulated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

IV. 고찰

Coumarin은 다양한 약리학적 및 생물학적 활성을 가진 페놀 화합물이며 대부분의 식물에서 발견된다[124]. 쿠마린 유도체들은 질병을 예방하고 치료하는 데 있어 잠재적인 역할을 가지고 있기때문에 상당한 관심을 끌고 있다[125,126]. 따라서 B16F10 세포에서 acenocoumarol과 warfarin의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였으며 더 나아가 acenocoumarol이 B16F10 세포의 신호전달경로에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 LPS 자극 RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol의 항염증 효과를 조사하였다.

멜라닌은 피부색을 결정하는 주요 구성 요소이며 자외선의 유해한 영향 혹은 산화 스트레스와 같은 환경 요인으로부터 피부를 보호하는 데 중요한 역할을 한다[2-4]. 하지만 멜라닌이 과도하게 생성되어 피부에 축적되면 기미, 주근깨, 검버섯 등과 같은 과색소 침착장애와 멜라닌 전구체의 독성으로 인한 세포 사멸 및 피부암 등의 질병을 유발할 수 있다[1,9]. 현재 다양한 피부 미백제들이 사용되고 있지만 부작용 유발한다는 연구가 보고되고 있다[56-63]. 따라서 우리는 효과적으로 멜라닌 생성을 억제하며 인체에 안전한 물질을 찾기 위한 실험을 진행하였으며 coumarin 계열 화합물은 그 효과를 입증하였다.

Coumarin 계열 화합물들의 멜라닌 생성을 확인하기 위해 B16F10 세포에서 acenocoumarol과 warfarin이 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 농도를 찾기 위한 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 acenocoumarol과 warfarin 모두 60 μ M 미만의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다. 따라서 acenocoumarol과 warfarin은 40 μ M 이하의 농도에서 이후 실험을 진행하였다.

세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 coumarin 계열 화합물의 멜라닌 함량 측정 실험을 진행하였다. Acenocoumarol과 warfarin은 40 μ M 이하의 농도에서 실험을 진행하였다. Acenocoumarol과 warfarin의 멜라닌 함량은 음성대조군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μ M에서 acenocoumarol은 28.04%, warfarin은 23.74% 감소함을 확인하였다.

마찬가지로 세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 coumarin 계열 화합물의 tyrosinase activity 실험을 진행하였다. Acenocoumarol과 warfarin은 40 μ M 이하의 농도에서 실험을 진행하였다. 두 물질의 tyrosinase 활성은 음성대조군과 비교했을 때 최고 농도인 40 μ M에서 acenocoumarol은 23.19%, warfarin은 6.03% 감소함을 확인하였다. 따라서 coumarin 계열 화합물 중 acenocoumarol이 멜라닌 생성 억제 효과와 tyrosinase 활성 감소 효과가 가장 우수함을 확인하였고 이후 acenocoumarol에 대한 추가 실험을 진행하였다.

Acenocoumarol이 B16F10 세포에서 다양한 신호전달경로를 통해 최종적으로 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 멜라닌 세포에서 멜라닌의 합성은 tyrosinase와 tyrosinase 관련 단백질 TRP-1 및 TRP-2에 의해 촉매 된다[9]. 따라서 멜라닌 생성 효소인 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현량을 확인하였다. 그 결과 B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소의 발현량은 α -MSH 처리군과 비교하여 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있다.

Tyrosinase 관련 단백질의 조절에서 가장 중요한 전사인자는 MITF이며, 자극된 MITF는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 promoter의 M-box와 결합하여 멜라닌 생성을 유도한다[20,21]. B16F10 세포에서 MITF의 발현량을 확인한 결과 α -MSH 처리군과 비교하여 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 MITF의 발현이 감소함으로써 멜라닌 생성 효소의

발현이 감소되고 최종적으로 멜라닌 생성이 감소한다.

Wnt/ β -catenin 신호전달경로에서 Fz 수용체가 자극을 받게 되면 GSK3 β (Ser 9)는 인산화되고 Wnt/ β -catenin 경로에서 비활성화 된다[25]. 이어서 β -catenin은 축적되어 핵으로 옮겨지며 TCF-LEF 전사인자와 복합체를 형성하고, 이후 MITF 발현을 증가시킨다[26,27]. Tyrosine 216번 잔기에서 인산화된 GSK3 β 는 β -catenin을 순차적으로 인산화시키고, 인산화된 β -catenin은 분해된다[28,29]. 실험 결과 B16F10 세포에서 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 β -catenin과 P-GSK3 β 의 발현량은 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 acenocoumarol이 GSK3 β (Ser 9)의 인산화를 억제하고 β -catenin이 축적되어 핵으로 옮겨지는 것을 억제하여 최종적으로 MITF 발현을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다. 반대로 P- β -catenin의 발현량은 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 acenocoumarol이 GSK3 β (Tyr 216)의 인산화에 의한 β -catenin의 인산화를 억제함으로써 최종적으로 MITF의 발현을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

ERK, JNK, p38으로 구성되어있는 MAPKs 신호전달경로 중에서 ERK의 인산화는 MITF를 인산화 및 분해시키며 최종적으로 멜라닌의 합성을 감소시키는 반면[32-34], JNK와 p38의 인산화는 멜라닌을 증가시킨다[35,36]. 실험 결과 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 음성 신호전달 경로인 ERK의 발현량은 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 MITF를 인산화 및 분해시켜 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다. 양성 신호전달경로인 JNK와 p38의 발현량은 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있으며 이는 MITF의 발현을 억제해 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

cAMP/PKA 신호전달경로에서 MC1R이 자극을 받게 되면 AC가 활성화되어 cAMP를 증가시킨다. cAMP의 증가로 인해 PKA가 인산화되며 핵안으로 이동해 CREB를 인산화하여 MITF의 발현을 유도한다[37-45]. 그 결과 B16F10 세포에서 PKA의 발현량은 α -MSH 처리군과 비교하여 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였으며 이는 acenocoumarol이 PKA의 인산화를 억제하여 MITF의 발현을 억제 시켜 궁극적으로 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

PI3K/AKT 경로의 억제는 멜라닌 생성의 증가와 연관이 있으며 자극된 MC1R은 PI3K를 인산화 시키며 막 인지질인 PIP₂를 인산화하여 PIP₃로의 전환을 촉매한다[46-50]. PIP₃로 인해 AKT는 세포막으로 모집되어 인산화되면 MITF의 발현을 감소시키고 궁극적으로 멜라닌의 생성은 억제된다[51,54]. 그 결과 B16F10 세포에서 AKT의 발현량은 α -MSH 처리군과 비교하여 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 acenocoumarol이 AKT의 인산화를 증가시켜 MITF의 발현을 감소시키고 궁극적으로 멜라닌의 생성을 억제한다.

염증은 해로운 자극을 제거하고 치유를 시작하기 위한 보호 반응이다 [127]. 하지만 장기간에 걸친 만성염증은 류마티스 관절염, 심장병, 당뇨병, 암, 천식, 염증성 장 질환, 알츠하이머병 등 다양한 질병을 유발한다[67-69]. 현재 항염증제, 진통제로 널리 사용되고 있는 비스테로이드 항염증제(NSAIDs)는 다양한 부작용과 NSAIDs를 과다복용한 일부 환자에게서는 경련, 혼수, 급성 신부전 등 심각한 임상 후유증이 보고되고 있다[115-117]. 따라서 인체에 안전하며 효과적인 항염증제를 찾기 위한 실험을 진행하였으며 acenocoumarol은 그 효과를 입증하였다.

Acenocoumarol의 항염증 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol이 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 농도를 찾기 위한 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과 500 μ M 미만의 농도에서 세포 독성을

보이지 않았으며 이후 실험은 250 μ M 이하의 농도에서 실험을 진행하였다. 활성화된 대식세포는 전염증성 효소인 iNOS를 생성시키며 이는 L-arginine의 산화를 촉매하여 NO를 생성하며 NO는 패혈성 쇼크 및 염증성 질환과 같은 유해한 결과를 얻을 수 있다[81,83]. RAW 264.7 세포에서 Nitric oxide 생성량을 측정한 결과 acenocoumarol의 농도가 증가함에 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

PGE₂ 또한 염증 반응의 매개체로써 COX-2에 의해 유도되며 PGE₂는 염증 및 발암을 포함한 다양한 병리생리학 과정에 관여한다[84]. RAW 264.7 세포에서 PGE₂ 생성량을 측정한 결과 acenocoumarol의 농도가 증가함에 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다.

LPS 자극에 의해 활성화된 대식세포는 여러 신호전달경로를 통해 염증성 매개체와 염증성 cytokine을 생성하게 되는데 염증성 cytokine이 과잉 생성되면 자가면역질환, 심혈관질환, 암과 같은 다양한 질병을 유발할 수 있다[73-76]. RAW 264.7 세포에서 염증성 cytokine의 생성량을 측정한 결과 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서 acenocoumarol이 염증성 매개체와 전염증성 cytokine의 생성을 억제하는 것을 확인하였으며 이는 염증성 질환의 개선과 항염증제의 개발로 이어질 수 있음을 시사한다.

Acenocoumarol이 RAW 264.7 세포에서 다양한 신호전달경로를 통해 최종적으로 염증성 매개체와 cytokine을 억제하는지 확인하기 위해서 이후 western blot 실험을 진행하였다. LPS 자극 시 cytokine에 의해 유도될 수 있는 iNOS, COX-2와 같은 전염증성 효소는 여러 염증성 질환에서 함께 작용한다[79,80]. 그 결과 RAW 264.7 세포에서 iNOS, COX-2의 발현량은 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다.

MAPKs 신호전달경로는 ERK, JNK, p38로 구성되어 있으며 MAPKs의 인산화는 활성화된 대식세포에서 전염증성 cytokine과 염증 매개체의 생성을 증가시킨다[89,90]. 그 결과 RAW 264.7 세포에서 ERK, JNK, p38의 발현량은 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이는 acenocoumarol이 MAPKs 신호전달경로의 활성화를 억제해 염증성 매개체와 전염증성 cytokine의 생성 수준을 하향 조절함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

NF- κ B 신호전달경로에서 NF- κ B는 I κ B- α 와의 상호작용을 통해 세포질에서 비활성 상태로 유지되며 NF- κ B가 자극되면 IKK에 의해 I κ B- α 는 인산화되어 분해가 일어나며 NF- κ B는 핵으로 옮겨져 전염증성 cytokine 및 iNOS와 COX-2의 상향조절을 통해 다양한 염증 신호 경로를 조절한다고 보고되어 있다[93-97]. 그 결과 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 I κ B- α 의 발현량은 증가하며, P-I κ B- α 의 발현량은 감소하는 것을 확인할 수 있다. 또한 세포질에서 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 p65의 발현량은 증가하며, 핵에서는 acenocoumarol의 농도가 증가함에 따라 p65의 발현량은 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 acenocoumarol이 I κ B- α 의 인산화 및 분해와 p65가 세포질에서 핵으로 전위되는 것을 막아 최종적으로 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 coumarin 유도체인 acenocoumarol과 warfarin의 멜라닌 생성 억제 효과를 B16F10 세포에서 확인하였으며 acenocoumarol과 warfarin 모두 유의하게 멜라닌을 감소시켰다. 이어서 acenocoumarol이 B16F10 세포에서 신호전달경로에 미치는 영향을 조사하였다. acenocoumarol은 멜라닌 생성 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하였으며 더 나아가 다양한 신호전달경로를 통해 궁극적으로 멜라닌 생성을 억제함을 확인하였다. 따라서 다양한 신호전달경로의 조절을 통해 과도한 멜라닌의 생성을 억제하는 것은 각종 질병을 예방하는 데 도움이 되며 과색소 침착증의 치료법과 미백제 개발을 위한 유망한 전략으로

여길 수 있다.

또한 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 acenocoumarol의 항염증 효과를 조사하였으며 acenocoumarol은 iNOS와 COX-2의 발현을 유의하게 감소시켰으며 더 나아가 다양한 신호전달경로를 통해 궁극적으로 염증성 매개체와 전염증성 cytokine의 생성을 감소시킴을 확인하였다. 따라서 대식세포의 활성화와 염증 매개체의 생성을 억제하는 것은 염증성 질환의 개선과 항염증 치료법의 개발을 위한 유망한 전략으로 여길 수 있다.

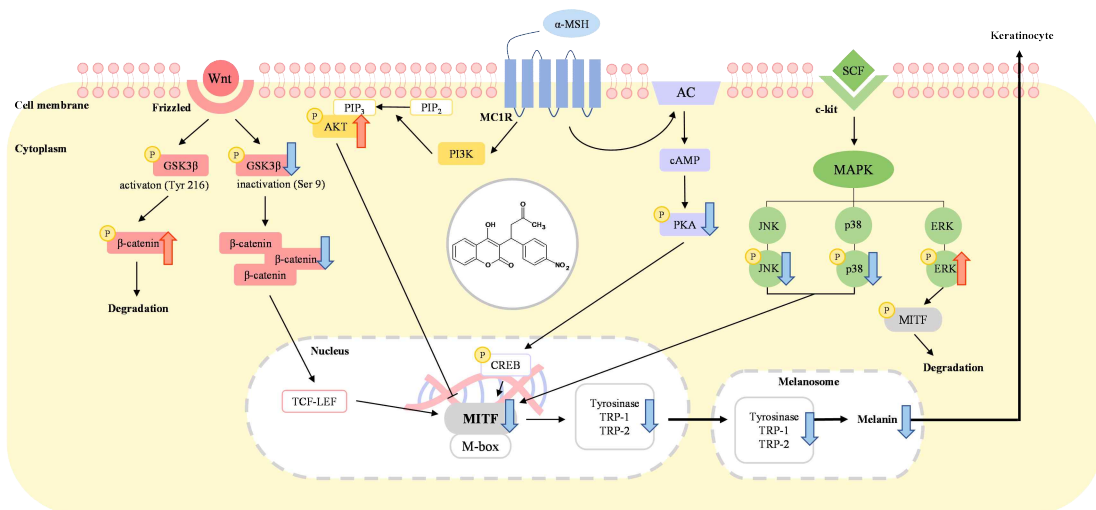


Figure 22. Regulation of melanogenesis signaling pathway through acenocoumarol.

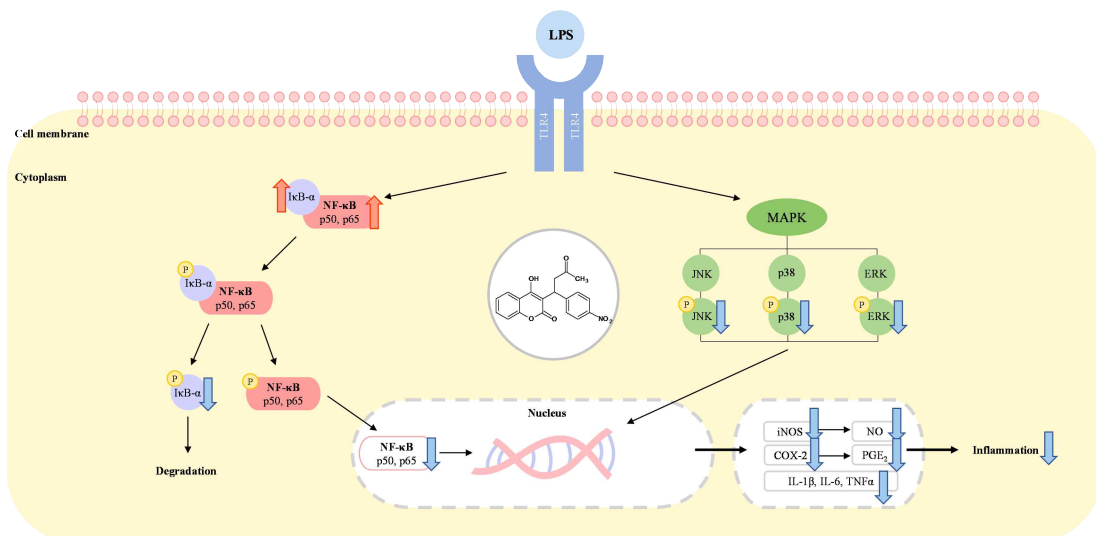


Figure 23. Regulation of inflammation signaling pathway through acenocoumarol.

V. 참고문헌

1. Chao Niu, Haji A Aisa. Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. *Molecules*, 2017, 22(8), 1303.
2. Thanigaimalai Pillaiyar, Manoj Manickam, Sang-Hun Jung. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell Signal*, 2017, 40, 99–115.
3. Zizi Hu, Xiaomei Sha, Lu Zhang, Sheng Huang, Zongcai Tu. Effect of Grass Carp Scale Collagen Peptide FTGML on cAMP-PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways in B16F10 Melanoma Cells and Correlation between Anti-Melanin and Antioxidant Properties. *Foods*, 2022, 11(3), 391.
4. Patrick A Riley. Melanogenesis and melanoma. *Pigment cell research*, 2003, 16(5), 548–52.
5. Gertrude-E Costin, Vincent J Hearing. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress, *FASEB journal*, 2007, 21(4), 976–94.
6. M Seiberg. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment cell research*, 2001, 14(4), 236–42.
7. R Buscà, R Ballotti. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment cell research*, 2000, 13(2), 60–9.

8. Michaela Brenner, Vincent J Hearing. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and photobiology*, 2008, 84(3), 539–49.
9. Mohammed Shariful Azam, Jae–Il Kim, Chang Geun Choi, Jinkyung Choi, Bonggi Lee, Hyeung–Rak Kim. Sargahydroquinolic Acid Suppresses Hyperpigmentation by cAMP and ERK1/2–Mediated Downregulation of MITF in α –MSH–Stimulated B16F10 Cells. *Foods*, 2021, 10(10), 2254.
10. M S Eller, K Ostrom, B A Gilchrest. DNA damage enhances melanogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(3), 1087–92.
11. Chin–Feng Chan, Ching–Cheng Huang, Ming–Yuan Lee, Yung–Sheng Lin. Fermented broth in tyrosinase– and melanogenesis inhibition. *Molecules*, 2014, 19(9), 13122–35.
12. Andrzej Slominski, Desmond J Tobin, Shigeki Shibahara, Jacobo Wortsman. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews*, 2004, 84(4), 1155 - 228.
13. Zahra Tayarani–Najaran, Maryam Akaberi, Mohsen Vatani, Seyed Ahmad Emami, Evaluation of antioxidant and anti–melanogenic activities of different extracts from aerial parts of *Nepeta binaludensis* Jamzad in murine melanoma B16F10 cells. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2016, 19(6), 662–9.
14. Gertrude–E Costin, Vincent J Hearing. Human skin pigmentation:

melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB journal*, 2007, 21(4), 976–94.

15. Jennifer J Hsiao, David E Fisher. The roles of microphthalmia–associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2014, 563, 28–34.

16. Abdelali Lehraiki, Patricia Abbe, Michael Cerezo, Florian Rouaud, Claire Regazzetti, Bérengère Chignon–Sicard, Thierry Passeron, Corine Bertolotto, Robert Ballotti, Stéphane Rocchi. Inhibition of melanogenesis by the antidiabetic metformin. *The Journal of investigative dermatology*, 2014, 134(10), 2589–97.

17. Kamal Uddin Zaidi, Sharique A Ali, Ayesha S Ali, Vijay Thawani. Natural melanogenesis stimulator a potential tool for the treatment of hypopigmentation disease. *Molecular Biology*, 2017, 2(1), 37–40.

18. Jennifer Y Lin, David E Fisher. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 2007, 445(7130), 843–50.

19. Ayako Kumagai, Nanao Horike, Yudai Satoh, Tatsuya Uebi, Tsutomu Sasaki, Yumi Itoh, Yoshiyuki Hirata, Kozue Uchio–Yamada, Kazuo Kitagawa, Shinichi Uesato, Hidehisa Kawahara, Hiroshi Takemori, Yasuo Nagaoka. A potent inhibitor of SIK2, 3, 3', 7–trihydroxy–4'–methoxyflavon (4'–O–methylfisetin), promotes melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *PloS one*, 2011, 6(10), e26148.

20. Stacey A N D'Mello, Graeme J Finlay, Bruce C Baguley, Marjan E Askarian–Amiri. Signaling Pathways in Melanogenesis. *International*

journal of molecular sciences, 2016, 17(7), 1144.

21. Hee-Young Park, Christina Wu, Laurie Yonemoto, Melissa Murphy-Smith, Heng Wu, Christina M Stachur, Barbara A Gilchrist. MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes. *The Biochemical journal*, 2006, 395(3), 571-8.

22. Larue L, Delmas V. The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Frontiers in Bioscience. Frontiers in bioscience*, 2006, 11, 733-42.

23. Barbara Bellei, Enrica Flori, Enzo Izzo, Vittoria Maresca, Mauro Picardo. GSK3beta inhibition promotes melanogenesis in mouse B16 melanoma cells and normal human melanocytes. *Cellular Signalling*, 2008, 20(10), 1750-61.

24. Alexander Schepsky, Katja Bruser, Gunnar J Gunnarsson, Jane Goodall, Jón H Hallsson, Colin R Goding, Eirikur Steingrímsson, Andreas Hecht. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with beta-catenin to determine target gene expression. *Molecular and cellular biology*, 2006, 26(23), 8914-27.

25. Ken-ichi Yasumoto 1, Kazuhisa Takeda, Hideo Saito, Ken-ichi Watanabe, Kazuhiro Takahashi, Shigeki Shibahara. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *The EMBO Journal*, 2002, 21(11), 2703-14.

26. Jinling Wu, Jean-Pierre Saint-Jeannet, Peter S Klein. Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. *Trends in neurosciences*, 2003, 26(1), 40-5.

27. Ilandarage Menu Neelaka Molagoda, Wisurumuni Arachchilage Hasitha Maduranga Karunarathne, Sang Rul Park, Yung Hyun Choi, Eui Kyun Park, Cheng–Yun Jin, Haiyang Yu, Wol Soon Jo, Kyoung Tae Lee, Gi–Young Kim. GSK–3 β –Targeting Fisetin Promotes Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells and Zebrafish Larvae through β –Catenin Activation. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(1), 312.

28. Te–Sheng Chang. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down–Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials*, 2012, 5(9), 1661–85.

29. Hans Clevers. Wnt/beta–catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006, 127(3), 469–80.

30. R Seger, E G Krebs. The MAPK signaling cascade. *FASEB journal*, 1995, 9(9), 726–35.

31. P Cohen. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends in cell biology*, 1997, 7(9), 353–61.

32. W Englaro, C Bertolotto, R Buscà, A Brunet, G Pagès, J P Ortonne, R Ballotti. Inhibition of the mitogen–activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 1998, 273(16), 9966–70.

33. T J Hemesath, E R Price, C Takemoto, T Badalian, D E Fisher. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c–Kit

signalling in melanocytes. *Nature*, 1998, 391(6664), 298–301.

34. W Xu, L Gong, M M Haddad, O Bischof, J Campisi, E T Yeh, E E Medrano. Regulation of microphthalmia–associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin–conjugating enzyme hUBC9. *Experimental cell research*, 2000, 255(2), 135–43.

35. Suman Kumar Singh, Chinmoy Sarkar, Shampa Mallick, Bidisha Saha, Rabindranath Bera, Ranjan Bhadra. Human placental lipid induces melanogenesis through p38 MAPK in B16F10 mouse melanoma. *Pigment cell research*, 2005, 18(2), 113–21.

36. Bidisha Saha, Suman Kumar Singh, Chinmoy Sarkar, Rabindranath Bera, Jagnyeswar Ratha, Desmond J Tobin, Ranjan Bhadra. Activation of the Mitf promoter by lipid–stimulated activation of p38–stress signalling to CREB. *Pigment cell research*, 2006, 19(6), 595–605.

37. Carlos Iván Rodríguez, Vijayasaradhi Setaluri. Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2014, 563, 22–7.

38. Marina Tsatmali, Janis Ancans, Anthony J Thody. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 2002, 50(2), 125–33.

39. Inês Ferreira dos Santos Videira, Daniel Filipe Lima Moura, Sofia Magina. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 2013, 88(1), 76–83.

40. M Karin. Signal transduction from the cell surface to the nucleus

through the phosphorylation of transcription factors. *Current opinion in cell biology*, 1994, 6(3), 415–24.

41. Maria Vittoria Schiaffino. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2010, 42(7), 1094–104.

42. Carmit Levy, Mehdi Khaled, David E Fisher. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine*, 2006, 12(9), 406–14.

43. Zuzanna Rzepka, Ewa Buszman, Artur Beberok, Dorota Wrześniok. From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*, 2016, 70(0), 695–708.

44. Jiri Vachtenheim, Jan Borovanský. "Transcription physiology" of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Experimental dermatology*, 2010, 19(7), 617–27.

45. H Y Park, M Kosmadaki, M Yaar, B A Gilchrist. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and molecular life sciences*, 2009, 66(9), 1493–506.

46. John A D’Orazio, Tetsuji Nobuhisa, Rutao Cui, Michelle Arya, Malinda Spry, Kazumasa Wakamatsu, Vivien Igras, Takahiro Kunisada, Scott R Granter, Emi K Nishimura, Shosuke Ito, David E Fisher. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV–induced tanning. *Nature*, 2006, 443(7109), 340–4.

47. Leah Ray Strickland, Harish Chandra Pal, Craig A Elmets, Farrukh Afaq. Targeting drivers of melanoma with synthetic small molecules and phytochemicals. *Cancer letters*, 2015, 359(1), 20–35.
48. Ioana Baldea, Lorin Giurgiu, Ioana Diana Teacoe, Diana Elena Olteanu, Florin Catalin Olteanu, Simona Clichici, Gabriela Adriana Filip. Photodynamic Therapy in Melanoma – Where do we Stand?. *Current medicinal chemistry*, 2018, 25(40), 5540–63.
49. Cecilia Herraiz, Jose C Garcia–Borron, Celia Jiménez–Cervantes, Conchi Olivares. MC1R signaling. Intracellular partners and pathophysiological implications. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 2017, 1863(10), 2448–61.
50. Bart Vanhaesebroeck, Maria A Whitehead, Roberto Piñeiro. Molecules in medicine mini–review: isoforms of PI3K in biology and disease. *Journal of molecular medicine*, 2016, 94(1), 5–11.
51. James M Cleary, Geoffrey I Shapiro. Development of phosphoinositide–3 kinase pathway inhibitors for advanced cancer. *Current oncology reports*, 2010, 12(2), 87–94.
52. R Buscà, C Bertolotto, J P Ortonne, R Ballotti. Inhibition of the phosphatidylinositol 3–kinase/p70(S6)–kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 1996, 271(50), 31824–30.
53. Mehdi Khaled, Lionel Larribere, Karine Bille, Jean–Paul Ortonne, Robert Ballotti, Corine Bertolotto. Microphthalmia associated transcription

factor is a target of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway. *The Journal of investigative dermatology*, 2003, 121(4), 831-6.

54. Jason S L Yu, Wei Cui. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*, 2016, 143(17), 3050-60.

55. Alessandra Lima Haddad, Luiz Fernando Matos, Flavia Brunstein, Lydia Masako Ferreira, Ademir Silva, Divaldo Costa Jr. A clinical, prospective, randomized, double-blind trial comparing skin whitening complex with hydroquinone vs. placebo in the treatment of melasma. *International journal of dermatology*, 2003, 42(2), 153-6.

56. K Maeda, M Fukuda. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1996, 276(2), 765-9.

57. K J Senthil Kumar, M Gokila Vani, Sheng-Yang Wang, Jiunn-Wang Liao, Li-Sung Hsu, Hsin-Ling Yang, You-Cheng Hseu. In vitro and in vivo studies disclosed the depigmenting effects of gallic acid: a novel skin lightening agent for hyperpigmentary skin diseases. *BioFactors*, 2013, 39(3), 259-70.

58. K Maeda, M Fukuda. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *Journal of the society of cosmetic chemists*, 1991, 42, 361-8.

59. S M D Macedo, E L B Lourenço, P Borelli, R A Fock, J M Ferreira Jr, S H P Farsky. Effect of in vivo phenol or hydroquinone

exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. *Toxicology*, 2006, 220(2-3), 126-35.

60. Sun-Long Cheng, Rosa Huang Liu, Jin-Nan Sheu, Shui-Tein Chen, Supachok Sinchaikul, Gregory Jiazer Tsay. Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *Journal of biomedical science*, 2007, 14(1), 87-105.

61. J L O'Donoghue. Hydroquinone and its analogues in dermatology - a risk-benefit viewpoint. *Journal of cosmetic dermatology*, 2006, 5(3), 196-203.

62. Yeon-Joo Kwak, Kyoung-Sook Kim, Kyung-Mi Kim, Hai Yang Yu, Eunsook Chung, Seok-Jo Kim, Jae-Young Cha, Young-Choon Lee, Jai-Heon Lee. Fermented *Viola mandshurica* inhibits melanogenesis in B16 melanoma cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2011, 75(5), 841-7.

63. Tamotsu Takizawa, Toshio Imai, Jun-ichi Onose, Makoto Ueda, Toru Tamura, Kunitoshi Mitsumori, Keisuke Izumi, Masao Hirose. Enhancement of hepatocarcinogenesis by kojic acid in rat two-stage models after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine or N-diethylnitrosamine. *Toxicological sciences*, 2004, 81(1), 43-9.

64. Carl Nathan, Points of control in inflammation, *Nature*, 2002, 420(6917), 846-52.

65. Andis Klegeris, Edith G McGeer, Patrick L McGeer, Therapeutic approaches to inflammation in neurodegenerative disease, *Current*

opinion in neurology, 2007, 20(3), 351–7.

66. Ruslan Medzhitov. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 2010, 140(6), 771–6.

67. Toby Lawrence, Derek A Willoughby, Derek W Gilroy. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2(10), 787–95.

68. Marc Feldmann. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Immunology*, 2002, 2(5), 364–71.

69. Luisa Minghetti. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Current opinion in neurology*, 2005, 18(3), 315–21.

70. Nagatoshi Fujiwara, Kazuo Kobayashi. Macrophages in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 2005, 4(3), 281–6.

71. Melissa Hunter, Yijie Wang, Tim Eubank, Christopher Baran, Patrick Nana-Sinkam, Clay Marsh. Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease. *Frontiers in bioscience*, 2009, 14(11), 4079–102.

72. Zheng-Shun Wen, Xing-Wei Xiang, Huo-Xi Jin, Xiang-Yang Guo, Li-Jia Liu, Yan-Na Huang, Xiao-Kun OuYang, You-Le Qu. Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages. *International journal of biological macromolecules*, 2016, 88, 403–13.

73. R J Ulevitch, P S Tobias. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Current opinion in immunology*, 1999, 11(1), 19–22.

74. Peng Wang, Qi Qiao, Ji Li, Wei Wang, Li-Ping Yao, Yu-Jie Fu. Inhibitory effects of geraniin on LPS-induced inflammation via regulating NF- κ B and Nrf2 pathways in RAW 264.7 cells. *Chemico-biological interactions*, 2016, 253, 134–42.

75. Guanwei Fan, Xiaorui Jiang, Xiaoyan Wu, Patrick Asare Fordjour, Lin Miao, Han Zhang, Yan Zhu, Xiumei Gao. Anti-Inflammatory Activity of Tanshinone IIA in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages via miRNAs and TLR4-NF- κ B Pathway. *Inflammation*, 2016, 39(1), 375–84.

76. Madhav Bhatia, Shabbir Mochhala. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *The Journal of pathology*, 2004, 202(2), 145–56.

77. Jiang Pi, Ting Li, Jianxin Liu, Xiaohui Su, Rui Wang, Fen Yang, Haihua Bai, Hua Jin, Jiye Cai. Detection of lipopolysaccharide induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages using atomic force microscope. *Micron*, 2014, 65, 1–9.

78. Tao Zhu, Wei Zhang, She-Jun Feng, Hua-Peng Yu. Emodin suppresses LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through a PPAR γ -dependent pathway. *International immunopharmacology*, 2016, 34, 16–24.

79. D C Goodwin, L M Landino, L J Marnett. Effects of Nitric oxide and Nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB journal*, 1999, 13(10), 1121–36.

80. Sangwon F Kim, Daniel A Huri, Solomon H Snyder. Inducible Nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science*, 2005, 310(5756), 1966–70.

81. C Nathan, Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB journal*, 1992, 6(12), 3051–64.

82. Q Xie, C Nathan. The high-output Nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of leukocyte biology*, 1994, 56(5), 576–82.

83. M A Titheradge. Nitric oxide in septic shock. *Biochimica et biophysica acta*, 1999, 1411(2–3), 437–55.

84. Jaya Gandhi, Lohit Khera, Nivedita Gaur, Catherine Paul, Rajeev Kaul. Role of Modulator of Inflammation Cyclooxygenase-2 in Gammaherpesvirus Mediated Tumorigenesis. *Frontiers in microbiology*, 2017, 8, 538.

85. Li Cui, Liang Feng, Zhen Hai Zhang, Xiao Bin Jia. The anti-inflammation effect of baicalin on experimental colitis through inhibiting TLR4/NF- κ B pathway activation. *International immunopharmacology*, 2014, 23(1), 294–303.

86. Lei Wu, Xueqin Li, Haifeng Wu, Wei Long, Xiaojian Jiang, Ting

Shen, Qian Qiang, Chuanling Si, Xinfeng Wang, Yunyao Jiang, Weicheng Hu. 5-Methoxyl Aesculetin Abrogates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation by Suppressing MAPK and AP-1 Pathways in RAW 264.7 Cells. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17(3), 315.

87. Vladimir Toshchakov, Bryan W Jones, Pin-Yu Perera, Karen Thomas, M Joshua Cody, Shuling Zhang, Bryan R G Williams, Jennifer Major, Thomas A Hamilton, Matthew J Fenton, Stefanie N Vogel. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nature immunology*, 2002, 3(4), 392-8.

88. E Nishida, Y Gotoh. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends in biochemical sciences*, 1993, 18(4), 128-31.

89. Yoshimitsu Yamazaki, Yasuhiro Kawano. Inhibitory effects of herbal alkaloids on the tumor necrosis factor- α and Nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264 macrophages. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 2011, 59(3), 388-91.

90. S J Ajizian, B K English, E A Meals. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible Nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *The Journal of infectious diseases*, 1999, 179(4), 939-44.

91. Shu Fang Liu, Asrar B Malik. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 2006, 290(4), L622-L645.

92. Min-Ji Bak, Van Long Truong, Hey-Sook Kang, Mira Jun, Woo-Sik Jeong. Anti-inflammatory effect of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 1-11.

93. P A Baeuerle, D Baltimore. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*, 1988, 242(4878), 540-6.

94. A S Baldwin Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, 1996, 14, 649-83.

95. I-Ni Hsieh, Anita Shin-Yuan Chang, Che-Ming Teng, Chien-Chih Chen, Chia-Ron Yang. Aciculatin inhibits lipopolysaccharide-mediated inducible Nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression via suppressing NF- κ B and JNK/p38 MAPK activation pathways. *Journal of biomedical science*, 2011, 18(1), 28.

96. Hong Yu Zhou, Eun Myoung Shin, Lian Yu Guo, Ui Joung Youn, KiHwan Bae, Sam Sik Kang, Li Bo Zou, Yeong Shik Kim. Anti-inflammatory activity of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF- κ B, JNK and p38 MAPK inactivation. *European journal of pharmacology*, 2008, 586(1-3), 340-9.

97. P P Tak, G S Firestein. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation*, 2001, 107(1), 7-11.
98. Jie Ren, Lixia Li, Yue Wang, Jingchen Zhai, Guangtong Chen, Kun Hu. Gambogic acid induces heme oxygenase-1 through Nrf2 signaling pathway and inhibits NF- κ B and MAPK activation to reduce inflammation in LPS-activated RAW264.7 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2019, 109, 555-62.
99. Laura J Hunter, David M Wood, Paul I Dargan. The patterns of toxicity and management of acute nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) overdose. *Open access emergency medicine*, 2011, 3, 39-48.
100. Dhikav Vikas, Singh S, Pathak Swati, Chawla A, Anand Karthika. Non-steroidal drug-induced gastrointestinal toxicity: Mechanisms and management. *J Indian Acad Clin Med*, 2003, 4(4), 315-22.
101. Konstantina C Fylaktakidou, Dimitra J Hadjipavlou-Litina, Konstantinos E Litinas, Demetrios N Nicolaides. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Current pharmaceutical design*, 2004, 10(30), 3813-33.
102. D Egan, R O'Kennedy, E Moran, D Cox, E Prosser, R D Thornes. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug metabolism reviews*, 1990, 22(5), 503-29.
103. Xin-Mei Peng, Guri L V Damu, Cheng- He Zhou. Current

developments of coumarin compounds in medicinal chemistry. *Current pharmaceutical design*, 2013, 19(21), 3884–930.

104. K N Venugopala, V Rashmi, B Odhav. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed research international*, 2013, 1–14.

105. Irena Kostova, Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, *Current medicinal chemistry. Anti–cancer agents*, 2005, 5(1), 29–46.

106. Ran An, Zhuang Hou, Jian–Teng Li, Hao–Nan Yu, Yan–Hua Mou, Chun Guo. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 4–Substituted Coumarin Derivatives as Antitumor Agents. *Molecules*, 2018, 23(9), 2281.

107. I Kostova, S Bhatia, P Grigorov, S Balkansky, V S Parmar, A K Prasad, L Saso. Coumarins as antioxidants. *Current medicinal chemistry*, 2011, 18(25), 3929–51.

108. N A Gormley, G Orphanides, A Meyer, P M Cullis, A Maxwell. The interaction of coumarin antibiotics with fragments of DNA gyrase B protein. *Biochemistry*, 1996, 35(15), 5083–92.

109. Christos Kontogiorgis, Orazio Nicolotti, Giuseppe Felice Mangiatordi, Massimiliano Tognolini, Foteini Karalaki, Carmine Giorgio, Alexandros Patsilnakos, Angelo Carotti, Dimitra Hadjipavlou–Litina, Elisabetta Barocelli. Studies on the antiplatelet and antithrombotic profile of anti–inflammatory coumarin derivatives. *Journal of enzyme inhibition*

and medicinal chemistry, 2015, 30(6), 925–33.

110. Jagdeep Grovera, Sanjay M. Jachak. Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. *RSC Advances*, 2015, 5(49), 38892–905.

111. Mohd Zaheen Hassan, Hasnah Osman, Mohamed Ashraf Ali, Mohamed Jawed Ahsan. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. *European journal of medicinal chemistry*, 2016, 123, 236–55.

112. Koeneni V Sashidhara, Abdhesh Kumar, Manavi Chatterjee, K Bhaskara Rao, Seema Singh, Anil Kumar Verma, Gautam Palit. Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin derivatives as antidepressant agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2011, 21(7), 1937–41.

113. Nohemí Salinas–Jazmín, Marisol de la Fuente, Ruth Jaimez, Mayra Pérez–Tapia, Armando Pérez–Torres, Marco A Velasco–Velázquez. Antimetastatic, antineoplastic, and toxic effects of 4-hydroxycoumarin in a preclinical mouse melanoma model, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2010, 65(5), 931–40.

114. Ilia Manolov, Caecilia Maichle–Moessmer, Nicolay Danchev. Synthesis, structure, toxicological and pharmacological investigations of 4-hydroxycoumarin derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 2006, 41(7), 882–90.

115. Ana Carolina Luchini, Patrícia Rodrigues–Orsi, Silvia Helena Cestari, Leonardo Noboru Seito, Aline Witaicenis, Claudia Helena

Pellizzon, Luiz Cláudio Di Stasi. Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2008, 31(7), 1343–50.

116. Marco Antonio Velasco-Velázquez, José Agramonte-Hevia, Diana Barrera, Alejandro Jiménez-Orozco, María Juana García-Mondragón, Nicandro Mendoza-Patiño, Abraham Landa, Juan Mandoki. 4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer letters*, 2003, 198(2), 179–86.

117. E ADAMI, E MARAZZI UBERTI, C TURBA. Experimental and statistical data on the analgesic action of 4-hydroxycoumarin. *Archivio italiano di scienze farmacologiche*, 1959, 9(1), 61–9.

118. Zahid H Chohan, Ali U Shaikh, Abdul Rauf, Claudiu T Supuran. Antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of novel N-substituted sulfonamides from 4-hydroxycoumarin. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2006, 21(6), 741–8.

119. Duxia Cao, Zhiqiang Liu, Peter Verwilt, Seyoung Koo, Paramesh Jangjili, Jong Seung Kim, Weiyang Lin. Coumarin-Based Small-Molecule Fluorescent Chemosensors. *Chemical reviews*, 2019, 119(18), 10403–519.

120. Anne M Holbrook, Jennifer A Pereira, Renee Labiris, Heather McDonald, James D Douketis, Mark Crowther, Philip S Wells.

Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Archives of internal medicine*, 2005, 165(10), 1095–106.

121. Talitha I Verhoef, William K Redekop, Ann K Daly, Rianne M F van Schie, Anthonius de Boer, Anke–Hilse Maitland–van der Zee. Pharmacogenetic–guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *British journal of clinical pharmacology*, 2014, 77(4), 626–41.

122. D Barcellona, M L Vannini, L Fenu, C Balestrieri, F Marongiu. Warfarin or acenocoumarol: which is better in the management of oral anticoagulants?. *Thrombosis and haemostasis*, 1998, 80(60), 899–902.

123. I. Hubert Joe, Irena Kostova, C. Ravikumar, M. Amalanathan, Simona Cîntă Pînzaru. Theoretical and vibrational spectral investigation of sodium salt of acenocoumarol. *Journal of raman spectroscopy*, 2009, 40(8), 1033–8.

124. L K Leal, A A Ferreira, G A Bezerra, F J Matos, G S Viana. Antinociceptive, anti–inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of ethnopharmacology*, 2000, 70(2), 151–9.

125. Hanan M Alshibl, Ebtehal S Al–Abdullah, Magedda E Haiba, Hamad M Alkahtani, Ghada E A Awad, Ahlam H Mahmoud, Bassant M M Ibrahim, Ahmed Bari, Alexander Villinger. Synthesis and Evaluation of New Coumarin Derivatives as Antioxidant, Antimicrobial, and Anti–Inflammatory Agents. *Molecules*, 2020, 25(14), 3251.

126. Christos Kontogiorgis, Anastasia Detsi, Dimitra Hadjipavlou – Litina. Coumarin–based drugs: a patent review (2008 – – present). *Expert opinion on therapeutic patents*, 2012, 22(4), 43754.

127. Xiaolong Xu, Peng Yin, Changrong Wan, Xinlu Chong, Mingjiang Liu, Peng Cheng, Jijia Chen, Fenghua Liu, Jianqin Xu. Punicalagin inhibits inflammation in LPS–induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4–mediated MAPKs and NF– κ B activation. *Inflammation*, 2014, 37(3), 956–65.