



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

석사학위논문

마우스 세포에서
6-Methylcoumarin의 항염증 및
멜라닌 생성 효과 규명

제주대학교 대학원

화학과

강진규

2022년 8월



마우스 세포에서 6-Methylcoumarin 화합물의 항염증 및 멜라닌 생성 규명

지도교수 현 창 구

강 진 규

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2022년 8월

강진규의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장	李南昊	
위 원	裴世源	
위 원	玄昌久	

제주대학교 대학원

2022년 8월

Anti-inflammatory and Melanogenic Effect of 6-methylcoumarin in Mouse Cells

Jin Kyu Kang

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

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

2022.06

This thesis has been examined and approved by

Nam Ho Lee

SE WON BAE

CHANG-GU HYUN

6/3

Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

In this study, we investigated the structural differences of 6-methylcoumarin (6-MC), 7-methylcoumarin (7-MC), 4-hydroxy-6-methylcoumarin (4H-6-MC), 4-hydroxy-7-methylcoumarin (4H-7-MC) for anti-inflammatory and melanogenesis effects in RAW 264.7 cells and B16F10 melanoma cells. Because 6-MC had the best anti-inflammatory and melanogenesis effects, we conducted a mechanism study in RAW 264.7 cells and B16F10 melanoma cells. As a result, 6-MC reduced the production of inflammatory mediators, nitric oxide (NO) and prostaglandin E₂ (PGE₂), and significantly reduced the production of pro-inflammatory cytokines Interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Furthermore, western blot results showed that the expression levels of iNOS and COX-2 decreased in a concentration-dependent manner during 6-MC treatment, and the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPKs) was also suppressed in a concentration-dependent manner. It also suppressed the phosphorylation of I κ B- α and transfer of NF- κ B from the cytoplasm to the nucleus. In B16F10 melanoma cells, 6-MC increased melanin content and tyrosinase activity in the absence of cytotoxicity. As a result of western blot, protein expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), TRP-2, and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) was increased upon treatment with 6-MC. In addition, 6-MC showed inhibition of ERK phosphorylation and AKT phosphorylation. These results suggest that 6-MC is a potential treatment for anti-inflammatory and hypopigmentation.

Key words: 6-methylcoumarin, RAW 264.7, Anti-inflammation, NF- κ B, MAPKs, B16F10, Melanogenesis, Tyrosinase, MITF, AKT

목 차

ABSTRACT	1
목 차	2
LIST OF FIGURES	4
I. 서 론	6
II. 재료 및 방법	11
1. 시료 및 시약	11
2. 세포 배양 및 세포 독성 평가	12
2.1. 세포 배양	12
2.2. 세포 독성 평가	13
3. 항염증 활성 평가	14
3.1. Nitric oxide (NO) 생성량 측정	14
3.2. Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 및 전 염증성 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α) 생성량 측정	15
3.3. Western blot	16
4. 미백 활성 평가	17
4.1. Melanin contents 측정	17
4.2. Tyrosinase activity 측정	18
4.3. Western blot	19
5. 통계처리	20

III. 결 과	21
1. RAW 264.7 세포에서 6-Methylcoumarin의 항염증 활성	21
1.1. 세포 독성 평가	21
1.2. NO (Nitric oxide) 생성량 측정	21
1.3. PGE ₂ 생성량 측정	23
1.4. 전염증성 cytokine 생성량 측정	25
1.5. iNOS, COX-2 발현량 측정	27
1.6. MAPKs 신호전달경로 측정	29
1.7. NF-κB 신호전달경로 측정	31
2. B16F10 세포에서 6-Methylcoumarin의 멜라닌 생성에 대한 영향	34
2.1. 세포 독성 평가	34
2.2. Melanin 함량 측정	36
2.3. Tyrosinase 활성 측정	38
2.4. 멜라닌 생성 효소 측정	40
2.5. MITF 발현량 측정	42
2.6. MAPKs 신호전달 경로	44
2.7. AKT 신호전달 경로	46
IV. 고 찰	48
V. 참고문헌	52

LIST OF FIGURES

- Figure 1.** The chemical structure of (a) 6-methylcoumarin (6-MC), (b) 7-methylcoumarin (7-MC), (c) 4-hydroxy-6-methylcoumarin (4H-6-MC), and (d) 4-hydroxy-7-methylcoumarin (4H-7-MC) 10
- Figure 2.** Effect of coumarin derivatives on nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells 22
- Figure 3.** Effect of 6-methylcoumarin on production of PGE₂ in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells 24
- Figure 4.** Effect of 6-methylcoumarin on production of pro-inflammatory cytokines in the LPS-stimulated RAW 264.7 cells 26
- Figure 5.** Effect of 6-MC on the protein expression level of iNOS and COX-2 in LPS-induced RAW 264.7 cells 28
- Figure 6.** Effect of 6-MC on phosphorylation level of MAPK in LPS-induced RAW 264.7 cells 30
- Figure 7.** Effect of 6-MC on the protein expression level of P-I κ B- α in LPS-induced RAW 264.7 cells 32
- Figure 8.** Effect of 6-MC on the protein expression level of NF- κ B in LPS-induced RAW 264.7 cells 33

Figure 9. Effect of 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC on the viability of B16F10 melanoma cells	35
Figure 10. Effect of 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC on production of melanin in B16F10 cells	37
Figure 11. Effect of 6-MC on tyrosinase activity in B16F10 cells	39
Figure 12. Effect of 6-MC on the level of TRP-1, TRP-2, Tyrosinase in B16F10 cells	41
Figure 13. Effect of 6-MC on the level of MITF in B16F10 cells	43
Figure 14. Effect of 6-MC on the level of P-ERK in B16F10 cells	45
Figure 15. Effect of 6-MC on the level of P-AKT in B16F10 cells	47

I. 서 론

염증반응은 병원체의 침입이나 조직손상 시 신체를 보호하는 필수적인 방어기전으로 작용과 발생 시기에 따라 급성 또는 만성 염증반응으로 구분할 수 있다[1,2]. 급성 염증반응에서는 대식세포가 항원에 의해 활성화되면서 전염증성 사이토카인 (interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)) 및 염증 매개체 (산화질소 (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂))가 분비되어 이물질을 제거하고 조직 재생과정을 통해 종료된다[3-6]. 염증반응 동안의 증상으로는 발열, 통증, 부종 등이 있다[7]. 이 염증반응에서 대식세포는 숙주의 방어와 항상성에 관여하며, 그람 음성 박테리아 세포벽의 성분인 Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화되어 여러 염증 매개체를 발현한다. 염증반응에서 대식세포는 표면 수용체인 Toll-like receptor 4 (TLR4)를 통해 자극을 받는다[8,9]. 이 자극은 Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 및 mitogen activated protein kinase (MAPKs)의 인산화 활성을 통해서 전염증성 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α)과 염증성 매개체 (NO 및 PGE₂)의 생성을 증가시킨다. 이러한 염증 매개체는 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하여 결국 신체 방어에 기여할 수 있다[10-21].

그러나 이러한 전염증성 사이토카인과 염증 매개체의 과발현은 유전적 돌연변이나 조직 및 신장 손상을 일으켜 신체에 치명적인 결과를 초래할 수 있다고 보고되고 있다[22]. 최근에는 환경오염이나 스트레스 증가로 인한 염증 매개체의 과잉생산으로 만성 염증이나 면역 과민반응이 발생하고 있다[23]. 그 결과 류머티즘 관절염, 암, 염증성 장 질환 등 여러 질병의 발병률이 증가하고 있다[24-30]. 따라서 염증반응의 조절은 생체의 유지에 매우 중요하며, 이로부터 생성되는 NO, PGE₂ 및 전염증성 사이토카인과 같은 염증 매개체의 생성 억제 효과를 통해 항염증 효과를 확인할 수 있다[31].

멜라닌(Melanin)은 피부, 머리카락 및 눈 색깔을 결정하는 주요 요인으로, 인간 피부 표피 기저층에 있는 멜라닌 세포에 의해 생성된다[32-34]. 멜라닌은 자외선

으로부터 피부를 보호하고 암 발병을 예방하는 데 중요한 역할을 한다[35]. 피부에서 과도한 멜라닌 합성은 기미, 검버섯, 일광 흑점 및 주근깨와 같은 과색소침착 (Hyperpigmentation)을 유발한다[36,37]. 하지만 피부의 멜라닌이 비정상적으로 소실되면 백반증 및 백색증과 같은 저색소침착 (Hypopigmentation)을 유발한다[38,39]. 백반증은 가장 흔한 탈색성 피부 질환으로 전 세계 인구의 0.5-2%의 유병률을 보이며, 멜라닌 세포의 손실과 멜라닌 감소를 특징으로 하는 다인성 장애이다. 면역학적, 유전적, 스트레스, 신경 기전 및 생화학적 요인을 포함하여 백반증의 가능한 많은 원인이 제안되었지만, 발병 원인은 완전히 밝혀지지 않았다[40-42]. 따라서 멜라닌 합성의 강력한 자극제의 발견은 이러한 색소 침착 장애를 치료하는 데 중요하다.

멜라닌은 멜라닌 세포 소기관인 멜라노솜 (Melanosome)에서 합성되며, 호르몬 신호, 자외선 조사 및 염증성 사이토카인을 포함한 다양한 자극에 의해 유도된다. 자외선에 노출된 각질 세포는 다양한 생체 인자를 방출하여 멜라닌 생성에 영향을 미치고, 생성된 멜라닌은 멜라닌 세포에서 다시 각질 세포로 이동한다[43-45]. 각질 세포는 멜라닌 합성을 유발하기 위해 멜라닌 세포의 melanocortin 1 receptor (MC1R)에 결합하는 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)를 분비한다. α -MSH는 adenylyl cyclase (AC)를 자극하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)를 자극하여 protein kinase A (PKA)의 핵으로의 전위를 활성화한다. cAMP는 cAMP response element binding protein (CREB)의 인산화를 통해 microphthalmia-related transcription factor (MITF)를 활성화한다. MITF는 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하며 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) 및 tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)와 같은 멜라닌 생성 효소의 발현을 조절한다[46-49].

또한, MITF는 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) 및 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로에 의해 조절된다. cAMP의 활성화는 PI3K, AKT 및 glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) 인산화를 억제하여 멜라닌 합성을 하향 조절한다[50-53]. 또한, cAMP의 활성화는 Ras 및

mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)를 조절하여 extracellular regulated protein kinase (ERK)의 인산화에 이어 MITF의 인산화를 유도하여 결과적으로 tyrosinase의 하향 조절 및 멜라닌 합성 억제를 유도한다[54-56].

Tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) 및 TRP-2는 멜라닌 생성에 중요한 효소이다. Tyrosinase는 tyrosine을 도파민의 대사 전구체인 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)으로 수산화시키고, 이를 DOPA quinone으로 빠르게 산화시키는 효소이다. 그 후 thiol (cysteine, glutathione)의 존재 여부에 따라 두 가지 합성 경로로 나뉜다. DOPA quinone은 Thiol의 존재 하에 cysteine과 반응하여 cysteinylDOPA를 형성하고, cysteinylDOPA는 산화되고 중합되어 황적색의 페오멜라닌 (Pheomelanin)이 생성된다. DOPA quinone이 thiol 없이 자발적 산화과정을 거치면 DOPA chrome으로 전환되며, TRP-1 및 TRP-2 효소에 의해 흑갈색의 유멜라닌 (Eumelanin)이 생성된다[57-60].

쿠마린은 박테리아, 곰팡이 및 식물의 shikimic acid 경로에서 합성되며 그 유도체에는 umbelliferone, esculetin, herniarin, psoralen, imperatorin이 포함된다. 최근 연구에 따르면 이러한 쿠마린 유도체는 항산화, 항염, 항균, 항바이러스 및 항암 기능을 포함한 생물학적 활성이 있다고 보고되고 있다. 또한, 쿠마린 골격의 다양한 치환기는 구조적 차이로 인해 다른 생물학적 활성을 나타낼 수 있으며, 이에 따라 효과가 증가하거나 감소할 수 있다[61-64].

쿠마린 및 그 유도체로부터 피부 염증 및 멜라닌 생성의 기능성 물질을 찾기 위한 스크리닝 과정 동안, 몇몇 쿠마린 유도체가 염증 및 멜라닌 생성에 대한 생체 활성을 갖는 것으로 관찰되었다[65]. 7,8-imethoxycoumarin이 NF- κ B 및 MAPK 신호전달경로를 통해 염증을 약화시킨다고 보고되었다[66]. 또한, 8-methoxycoumarin은 MAPK 경로를 통해 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 보고되었다[67]. 이러한 연구의 확장으로 유사한 구조를 가진 여러 쿠마린을 스크리닝하여 생물학적 활성과 관련된 구조적 특징을 확인하였다.

이 연구에서는 4개의 쿠마린 유도체인 (a) 6-methylcoumarin (6-MC), (b) 7-methylcoumarin (7-MC), (c) 4-hydroxy-6-methylcoumarin (4H-6-MC), (d) 4-hydroxy-7-methylcoumarin (4H-7-MC)들의 항염증 잠재력을 RAW 264.7 세포에서 NO 수준을 감소시키는 능력을 기반으로 평가하였으며, B16F10 멜라노마 세포에서는 멜라닌 함량을 기반으로 멜라닌 생성 효과를 평가하였다. 그중 가장 유망한 쿠마린인 6-MC를 선택하여 추가적인 기전 연구를 진행하였다(Fig. 1).

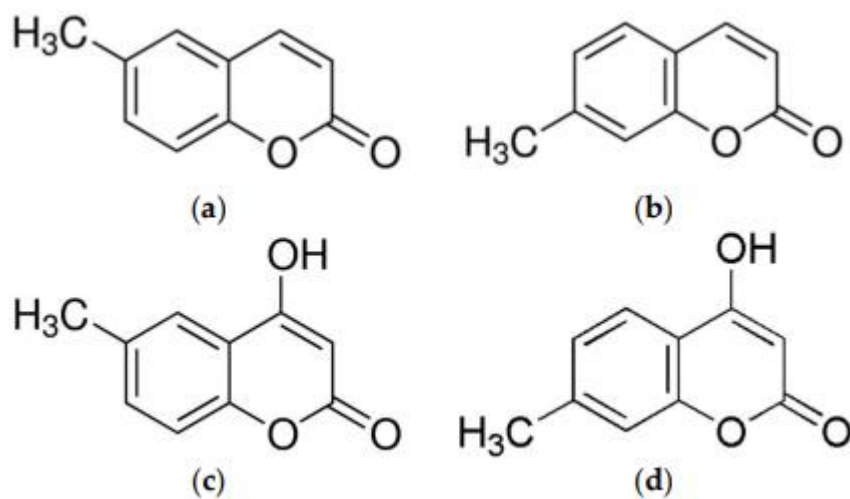


Figure 1. The chemical structure of (a) 6-methylcoumarin (6-MC), (b) 7-methylcoumarin (7-MC), (c) 4-hydroxy-6-methylcoumarin (4H-6-MC), and (d) 4-hydroxy-7-methylcoumarin (4H-7-MC).

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용한 6-methylcoumarin, 4-hydroxy-6-methylcoumarin, 7-methylcoumarin, 4-hydroxy-7-methylcoumarin 은 Tokyo Chemical Industry (Chuo-ku, Tokyo, Japan)에서 구매하였다.

Dimethyl sulfoxide (DMSO), L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, Griess reagent, sodium nitrite, protease inhibitor cocktail, and phosphate buffered saline (PBS)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

Lipopolysaccharides derived from Escherichia coli (LPS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 VWR (Radnor, PA, USA)에서 구매하였다.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, nuclear and cytoplasmic extraction reagents (NCER)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구매하였다.

Tris-buffered saline (TBS), enhanced chemiluminescence (ECL) kits는 Biosesang (Seongnam, Gyeonggi-do KOREA)에서 구매하였다.

단백질 발현량 측정을 위한 특이적 1차 항체와 anti-rabbit 및 anti-mouse 2차 항체는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구매하였다.

Interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor (TNF- α) ELISA kits는 R&D Systems Inc (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

2. 세포 배양 및 세포 독성 평가

2.1. 세포 배양

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

2.2. 세포 독성 평가

Sample의 세포 독성을 평가하기 위해서 MTT 법을 통해 세포 생존율을 측정하였다. MTT 법은 살아있는 세포 내 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 수용성의 노란색인 MTT가 환원되어 보라색의 불용성인 formazan을 형성하는 것을 원리로 한다.

RAW 264.7 세포는 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 다양한 농도의 sample을 처리하여 24시간 추가 배양하였다. 그 후, 0.2 mg/mL의 MTT 시약을 처리하고 4시간 동안 반응시켰다. 이후 상층액을 제거하고 1 mL의 DMSO를 넣어 잔류물을 용해시킨 후 spectrophotometric microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

B16F10 세포는 1.5×10^4 cells/well 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 다양한 농도의 Sample을 처리하여 72시간 추가 배양하였다. 그 후, 0.2 mg/mL의 MTT 시약을 처리하고 4시간 동안 반응시켰다. 이후 상층액을 제거하고 1 mL의 DMSO를 넣어 잔류물을 용해시킨 후 Spectrophotometric microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 항염증 활성 평가

3.1. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하고 23시간 후에 세포 독성이 나타나지 않은 다양한 농도의 Sample을 처리하고 1시간 후에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 LPS를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 상층액 100 μL 와 Griess reagent 100 μL 를 96 well plate에 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 spectrophotometric microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite로 표준검정곡선을 만들어 NO 생성량을 정량계산하였다.

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

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하고 23시간 후에 세포 독성이 나타나지 않은 다양한 농도의 Sample을 처리하고 1시간 후에 1 μ g/mL 농도의 LPS를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 배양액을 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후, 상층액을 취해 ELISA kit 제조사의 방법에 따라 PGE₂ 및 전염증성 cytokine의 함량을 측정하였다.

3.3. Western blot

RAW 264.7 세포를 60 mm cell culture dish에 6.0×10^5 cells/dish로 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 다양한 농도의 시료를 1시간 동안 전처리하고 단백질 발현 시간에 맞춰서 자극제인 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리 후 배양하였다. 배양 후, 상층액을 제거하고 차가운 1X PBS를 사용하여 2번 세척하고 Lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% NP40, 1% protein inhibitor cocktail)를 넣어주어 4°C에서 20분간 lysis 하였다. 이후 cell scraper를 사용하여 긁어준 후 -8°C, 15,000 rpm, 조건으로 20분간 원심 분리하고 상층액을 얻었다. BCA Protein assay kit를 사용하여 세포 용해물의 단백질 함량을 정량하고 2x Laemmli sample buffer를 1:1 비율로 혼합하고 100°C에서 5분간 가열하였다. 이후 단백질을 20 μg 으로 계산하고 Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)을 사용하여 전기영동을 함으로써 단백질을 크기별로 분리한 후 PVDF membrane으로 transfer 하고, 5% skim milk를 사용하여 실온에서 2시간 동안 blocking 하였다. 이후 1X T-TBS (1X TBS, 0.1% Tween 20)으로 10분간 총 6번 세척하고 적절한 1차 항체 (1:1000)를 사용하여 4°C 조건에서 8시간 동안 배양하였다. 그 후, 1X T-TBS를 사용하여 10분간 총 6번 세척하고 적절한 2차 항체 (1:3000)를 사용하여 4°C 조건에서 2시간 배양하고 1X TTBS를 사용하여 10분간 총 6회 세척하였다. 마지막으로 ECL kit를 사용하여 Chemidoc (VILBER LOURMAT, France)를 사용하여 현상하고 ImageJ Software를 사용하여 분석하였다.

4. 미백 활성 평가

4.1. Melanin contents 측정

B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 6.0×10^4 cells/dish로 분주하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포 독성이 없는 농도의 시료와 양성대조군인 α -MSH (100 nM)를 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 1X PBS를 사용하여 2번 세척하고 Lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% NP40, 1% protein inhibitor cocktail)를 넣어주어 4°C 조건에서 20분간 lysis 하였다. 이후, cell scraper를 사용하여 긁어준 후 -8°C, 15,000 rpm, 조건으로 20분간 원심 분리하여 상층액과 pellet을 분리하였다. pellet에 1 N NaOH (10% DMSO)를 600 μ L씩 넣어 90°C에서 15분간 처리하였다. 이후, 96 well plate에 100 μ L씩 옮겨 담아 spectrophotometric microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4.2. Tyrosinase activity 측정

B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 6.0×10^4 cells/dish로 분주하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포 독성이 없는 농도의 시료와 양성대조군인 α -MSH (100 nM)를 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 1X PBS를 사용하여 2번 세척하고 Lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% NP40, 1% protein inhibitor cocktail)를 넣어주어 4°C 조건에서 20분간 lysis 하였다. 이후, cell scraper를 사용하여 긁어준 후 -8°C, 15,000 rpm, 조건으로 20분간 원심 분리하여 상층액과 pellet을 분리하였다. 상층액을 BCA Protein assay kit를 사용하여 단백질을 정량하고 단백질 농도가 20 μ g/mL 되도록 희석하였다. 그 후, 96 well plate에 희석된 단백질 20 μ L와 L-DOPA (2 mg/ mL) 80 μ L를 넣고 37°C에서 2 시간 반응시킨 후 spectrophotometric microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4.3. Western blot

B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 7.0×10^4 cells/dish로 분주하고 24 시간 동안 배양한 후, 다양한 농도의 시료를 1시간 동안 전처리하고 단백질 발현 시간에 맞춰서 양성대조군인 α -MSH (100 nM) 처리 후 배양하였다. 배양 후, 상층액을 제거하고 차가운 1X PBS를 사용하여 2번 세척하고 Lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% NP40, 1% protein inhibitor cocktail)를 넣어주어 4°C에서 20분간 lysis 하였다. 이후, cell scraper를 사용하여 긁어준 후 -8°C, 15,000 rpm, 조건으로 20분간 원심 분리하고 상층액을 얻었다. BCA Protein assay kit를 사용하여 세포 용해물의 단백질 함량을 정량하고 2x Laemmli sample buffer를 1:1 비율로 혼합하고 100°C에서 5분간 가열하였다. 이 후, 단백질을 20 μ g으로 계산하고 Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)을 사용하여 전기영동을 함으로써 단백질을 크기별로 분리한 후 PVDF membrane으로 transfer 하고, 5% skim milk를 사용하여 실온에서 2시간 동안 blocking 하였다. 이후, 1X T-TBS (1X TBS, 0.1% Tween 20)으로 10분간 총 6번 세척하고 적절한 1차 항체 (1:1000)를 사용하여 4°C 조건에서 8시간동안 배양하였다. 그 후, 1X T-TBS를 사용하여 10분간 총 6번 세척하고 적절한 2차 항체 (1:3000)를 사용하여 4°C 조건에서 2시간 배양하고 1X T-TBS를 사용하여 10분간 총 6회 세척하였다. 마지막으로 ECL kit를 사용하여 Chemidoc (VILBER LOURMAT, France)를 사용하여 현상하고 ImageJ Software를 사용하여 분석하였다.

5. 통계처리

모든 실험 데이터들은 3번의 독립적인 실험을 평균 표준편차로 표시하였고, Student's t-test를 사용하여 p-value 값이 0.005보다 크면 유의한 것으로 간주하였고 다음과 같이 표기하였다. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

III. 결 과

1. RAW 264.7 세포에서 6-Methylcoumarin의 항염증 활성

1.1. 세포 독성 평가

RAW 264.7 mouse 대식세포에서 6-methylcoumarin (6-MC)과 유사한 구조를 가진 7-methylcoumarin (7-MC), 4-hydroxy-6-methylcoumarin (4H-6-MC), 4-hydroxy-7-methylcoumarin (4H-7-MC)의 세포 독성 평가를 위해 MTT assay를 진행하였다. 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC는 500 μ M까지 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있다.

1.2. NO (Nitric oxide) 생성량 측정

세포 독성이 나타나지 않은 범위인 500 μ M 이하의 농도에서 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC의 NO 생성량을 측정하였다. 각 화합물은 NO 생성량을 6-MC는 65.3%, 7-MC는 47.3%, 4H-6-MC는 32.1%, 4H-7-MC는 26.4% 억제 효과를 확인할 수 있었다. 그중 활성이 가장 뛰어난 6-MC에 대한 추가실험을 진행하였다.

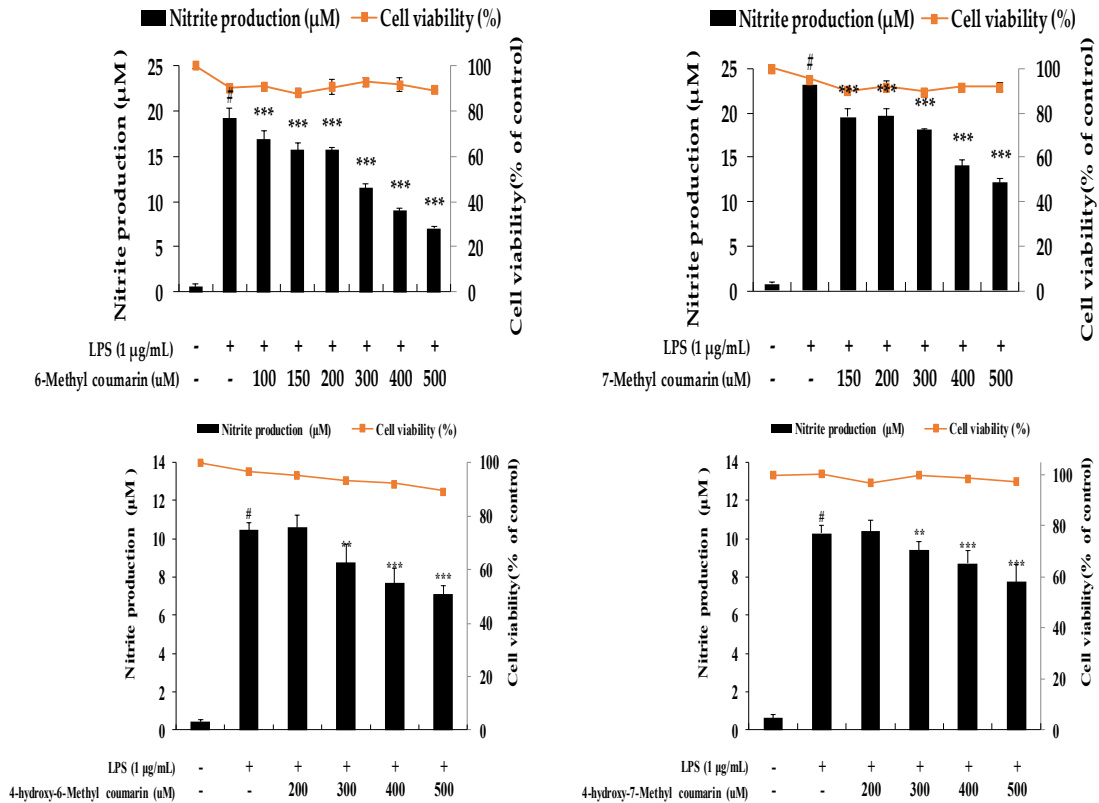
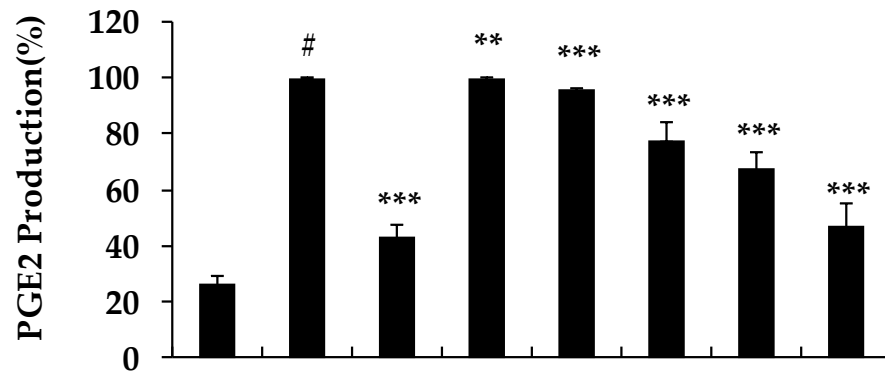


Figure 2. Effect of coumarin derivatives on nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only or with LPS plus various concentrations of coumarin derivatives for 24 h. Cell viability and NO production of LPS-induced RAW 264.7 cells subjected to (a) 6-methylcoumarin (6-MC), (b) 7-methylcoumarin (7-MC), (c) 4-hydroxy-6-methylcoumarin (4H-6-MC), (d) 4-hydroxy-7-methylcoumarin (4H-7-MC) treatment was measured using MTT and Griess reagents, respectively. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. #p < 0.001 versus untreated control group. **p < 0.01, ***p < 0.001 versus LPS alone.

1.3. PGE₂ 생성량 측정

6-MC의 PGE₂ 생성을 억제하는지 조사하기 위해 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. LPS 단독처리군은 control과 비교하였을 때 PGE₂ 생성량이 크게 증가하였고, 6-MC는 농도 의존적으로 PGE₂의 생성을 감소시켰다. 특히 최고 농도인 500 μM에서 PGE₂를 53.2% 감소시켰다.



LPS (1 μg/mL)	-	+	+	+	+	+	+	+
NS-398(100 nM)	-	-	+	-	-	-	-	-
6-methylcoumarin (μM)	-	-	-	100	200	300	400	500

Figure 3. Effect of 6-methylcoumarin on production of PGE₂ in the LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with 6-methylcoumarin (100, 200, 300, 400, and 500 μM) for 1 h and then stimulated for 20 h with LPS. N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulfonamide (NS-398) was used as a positive control. PGE₂ production was determined by ELISA. The results are presented as the mean ± SD from three independent measurements using the ImageJ program. #p < 0.001 versus untreated control group. **p < 0.01, ***p < 0.001 versus group treated with LPS alone.

1.4. 전염증성 cytokine 생성량 측정

6-MC의 전염증성 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α) 생성을 억제하는지 조사하기 위해 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. LPS 단독처리군은 control과 비교하였을 때 전염증성 cytokine 생성량이 크게 증가하였고, 6-MC는 농도 의존적으로 전염증성 cytokine의 생성을 감소시켰다. 특히 최고 농도인 500 μ M에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 를 각각 32.8%, 73.1%, 80.6% 감소시켰다.

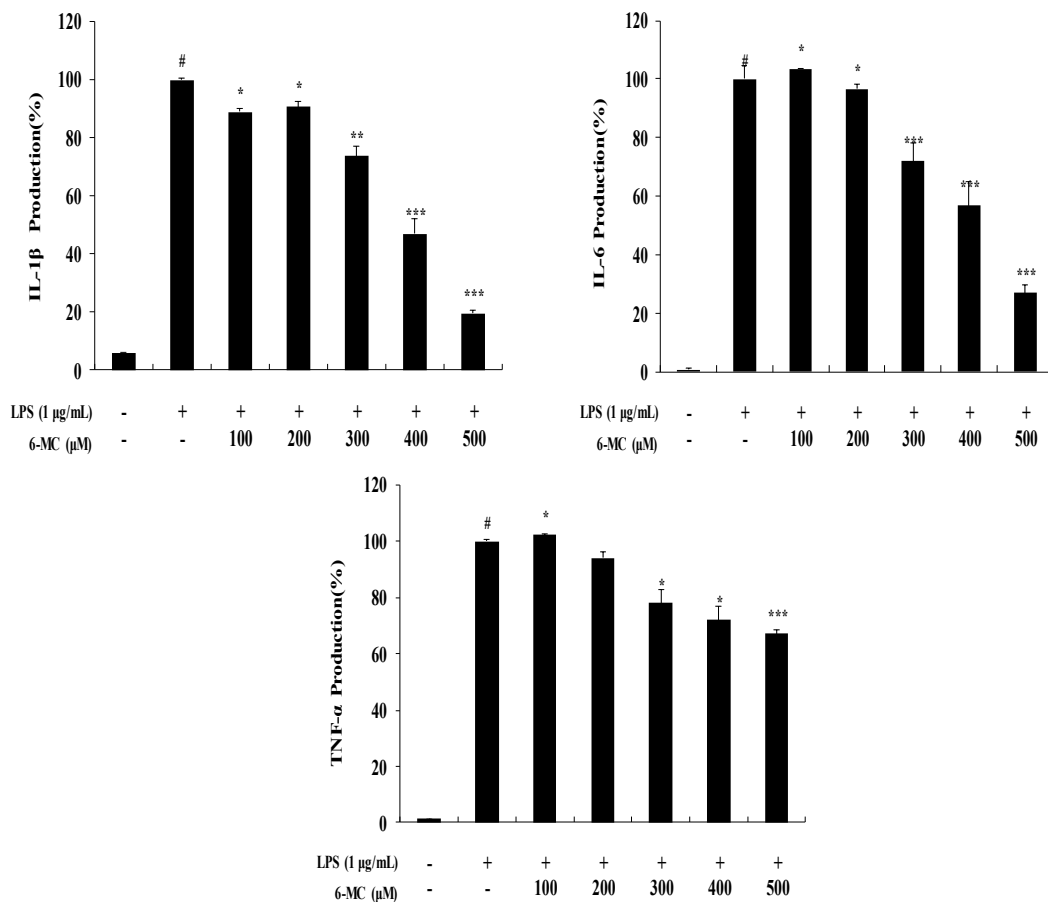


Figure 4. Effect of 6-methylcoumarin on production of pro-inflammatory cytokines in the LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with 6-methylcoumarin (100, 200, 300, 400, and 500 μ M) for 1 h and then stimulated for 20 h with LPS. IL-1 β , IL-6, TNF- α production were determined by ELISA. The results are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the ImageJ program. #p < 0.001 vs. untreated control group. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 versus group treated with LPS alone.

1.5. iNOS, COX-2 발현량 측정

6-MC의 NO와 PGE₂의 억제능력이 iNOS와 COX-2의 발현과 관련이 있는지 알아보기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 6-MC 200, 300, 400, 500 μ M 농도에서 iNOS를 33.8%, 54.52%, 70.79%, 92.79% 억제된 것을 확인할 수 있었고, COX-2 또한 40.8%, 62.7%, 78.2%, 95.78% 억제하였다. 이로써 6-MC가 iNOS와 COX-2 단백질 발현 억제를 통해 염증 매개체인 NO와 PGE₂의 생성을 억제한다는 것을 나타낸다.

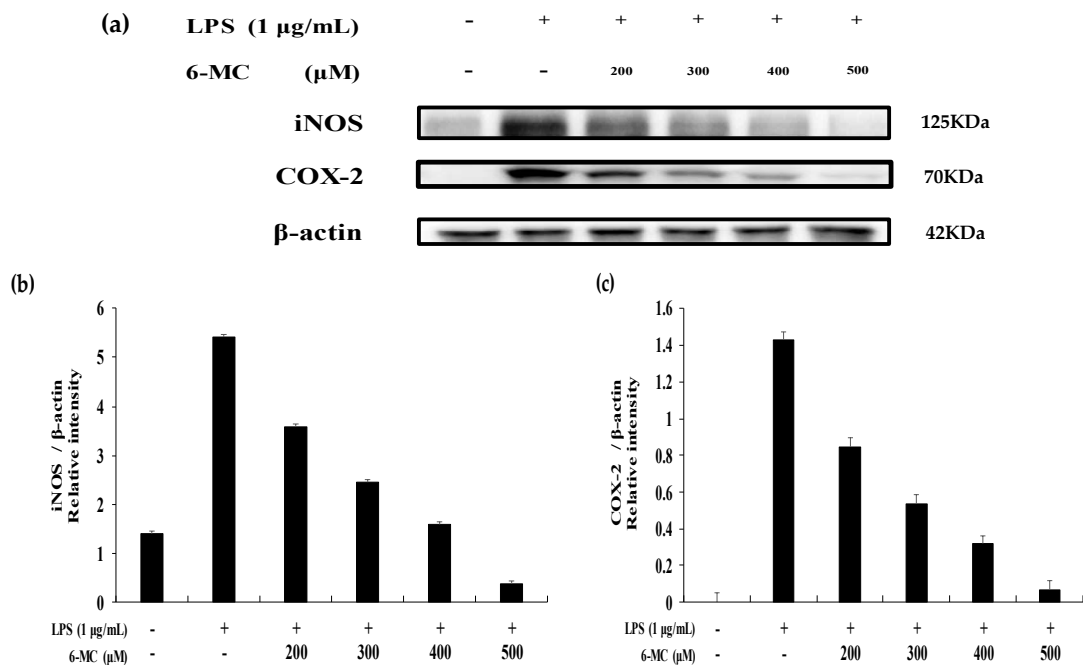


Figure 5. Effect of 6-MC on the protein expression level of iNOS and COX-2 in LPS-induced RAW 264.7 cells. (a) Result of Western blotting, and protein levels of (b) iNOS and (c) COX-2. Lysates were prepared from cells pretreated with 6-MC (200, 300, 400, and 500 μM) for 1 h and then treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 18 h. β -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against iNOS, COX-2, and β -actin. The results in the graphs are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the ImageJ program.

1.6. MAPKs 신호전달경로 측정

LPS는 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여 MAPKs (ERK, JNK p38)의 인산화를 유도하여 세포 신호 경로를 활성화하고 다양한 전염증성 사이토카인의 발현을 증가시킨다. 따라서 전염증성 사이토카인 발현에 대한 6-MC의 억제 효과가 MAPKs 인산화 억제에 의한 것인지 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. LPS 단독 처리군은 control군과 비교하였을 때 ERK는 4.1배, JNK는 3.1배, p38은 2.5배의 상당한 인산화가 있었다. 또한, 6-MC를 처리하였을 때 농도 의존적으로 ERK, JNK 및 p38의 인산화가 저해되는 것을 확인하였다. 따라서, 6-MC가 MAPK 인산화를 억제함으로써 전염증성 사이토카인 발현을 억제하는 것을 나타낸다.

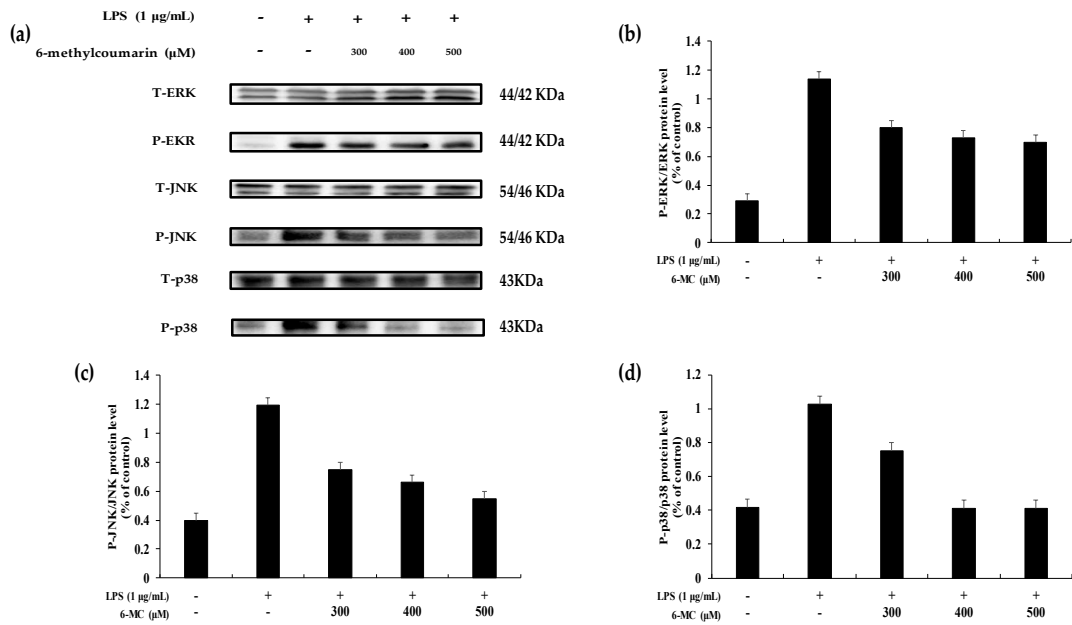


Figure 6. Effect of 6-MC on phosphorylation level of MAPK in LPS-induced RAW 264.7 cells. (a) Result of Western blotting, and protein levels of (b) P-ERK / ERK, (c) P-JNK / JNK, and (d) P-p38 / p38. Lysates were prepared from cells pretreated with 6-MC (300, 400, and 500 μM) for 1 h and then treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 15 min. β -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against phospho-ERK, T-ERK, phospho-JNK, T-JNK, phospho-p38, and T-p38. P: phosphorylated, T: total. The results in the graphs are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the ImageJ program.

1.7. NF- κ B 신호전달경로 측정

LPS가 대식세포 표면의 TLR4를 자극하여 I κ B- α 의 인산화를 유도하면 p-I κ B- α 는 분해되고 자유로워진 NF- κ B가 세포질에서 핵 내로 전위된다. 전위된 NF- κ B는 전염증성 사이토카인과 염증 매개체의 발현을 증가시킨다. 따라서 염증성 사이토카인 및 염증 매개체 발현에 대한 6-MC의 억제 효과가 NF- κ B 신호전달경로를 통한 것인지 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. 6-MC를 처리하였을 때 I κ B- α 의 인산화가 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였고, NF- κ B의 세포질에서 핵으로의 전위 또한 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 6-MC는 NF- κ B 신호전달경로를 통하여 염증을 억제한 것으로 시사된다.

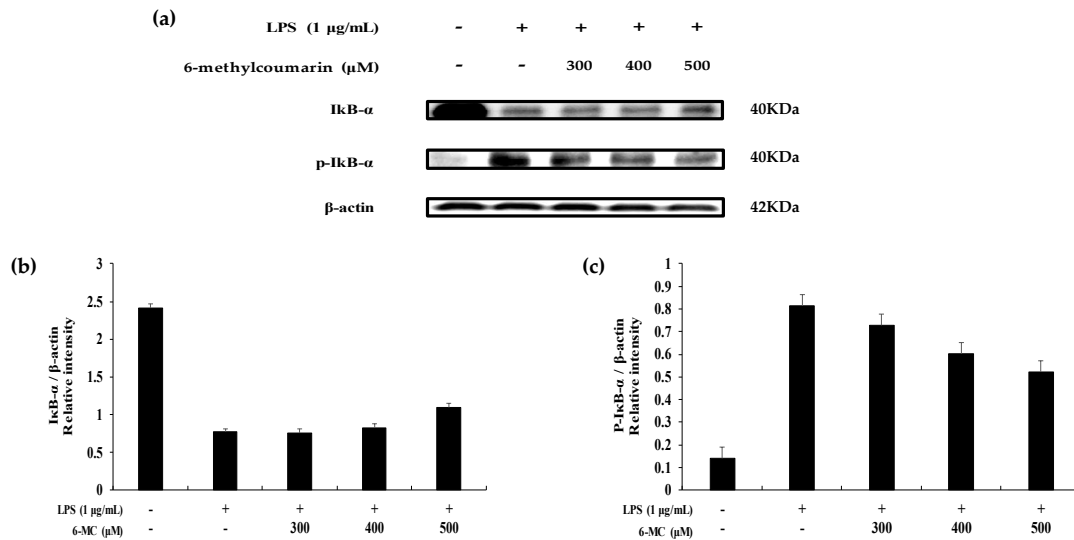


Figure 7. Effect of 6-MC on the protein expression level of P-I κ B- α in LPS-induced RAW 264.7 cells. (a) Result of Western blotting, and protein level of (b) I κ B- α and (c) P-I κ B- α . Lysates were prepared from cells pretreated with 6-MC (300, 400, and 500 μM) for 1 h and then treated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 20 min. β -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against phospho-I κ B- α , I κ B- α , and β -actin. The results in the graphs are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the ImageJ program.

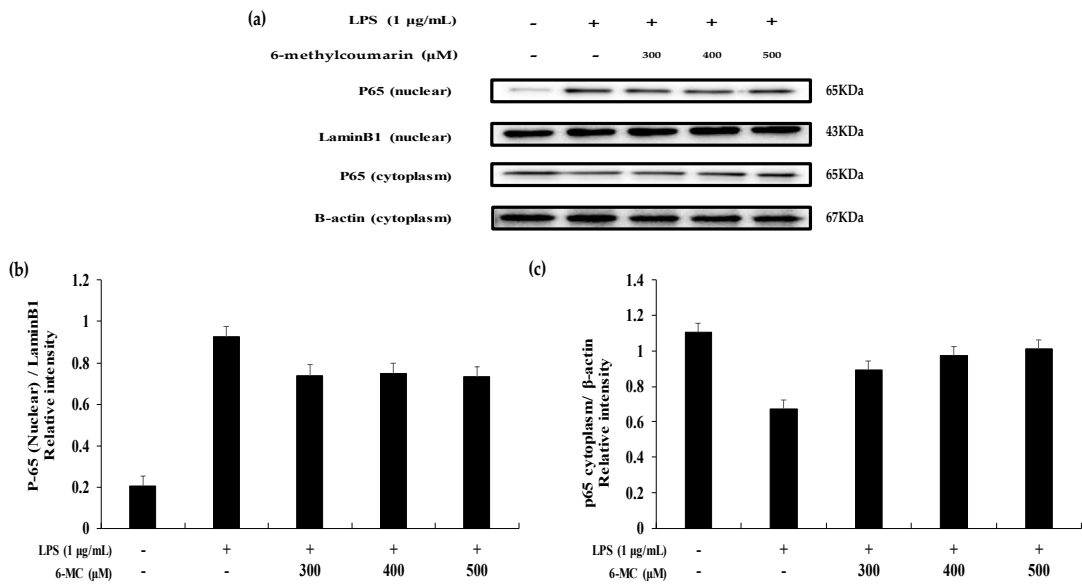


Figure 8. Effect of 6-MC on the protein expression level of NF- κ B in LPS-induced RAW 264.7 cells. (a) Result of Western blotting, and protein level of (b) P-65 (cytoplasm) and (c) P-65 (nucleus). Lysates were prepared from cells pretreated with 6-MC (300, 400, and 500 μ M) for 1 h and then treated with LPS (1 μ g/mL) for 15 min. β -actin and Lamin B1 were used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against NF- κ B / P-65, Lamin B1, and β -actin. The results in the graphs are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the ImageJ program.

2. B16F10 세포에서 6-Methylcoumarin의 멜라닌 생성에 대한 영향

2.1. 세포 독성 평가

B16F10 세포에서 6-methylcoumarin (6-MC)과 유사한 구조를 가진 7-methylcoumarin (7-MC), 4-hydroxy-6-methylcoumarin (4H-6-MC), 4-hydroxy-7-methylcoumarin (4H-7-MC)의 세포 독성 평가하기 위해 MTT assay를 진행하였다. 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC는 500 μ M까지 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있다.

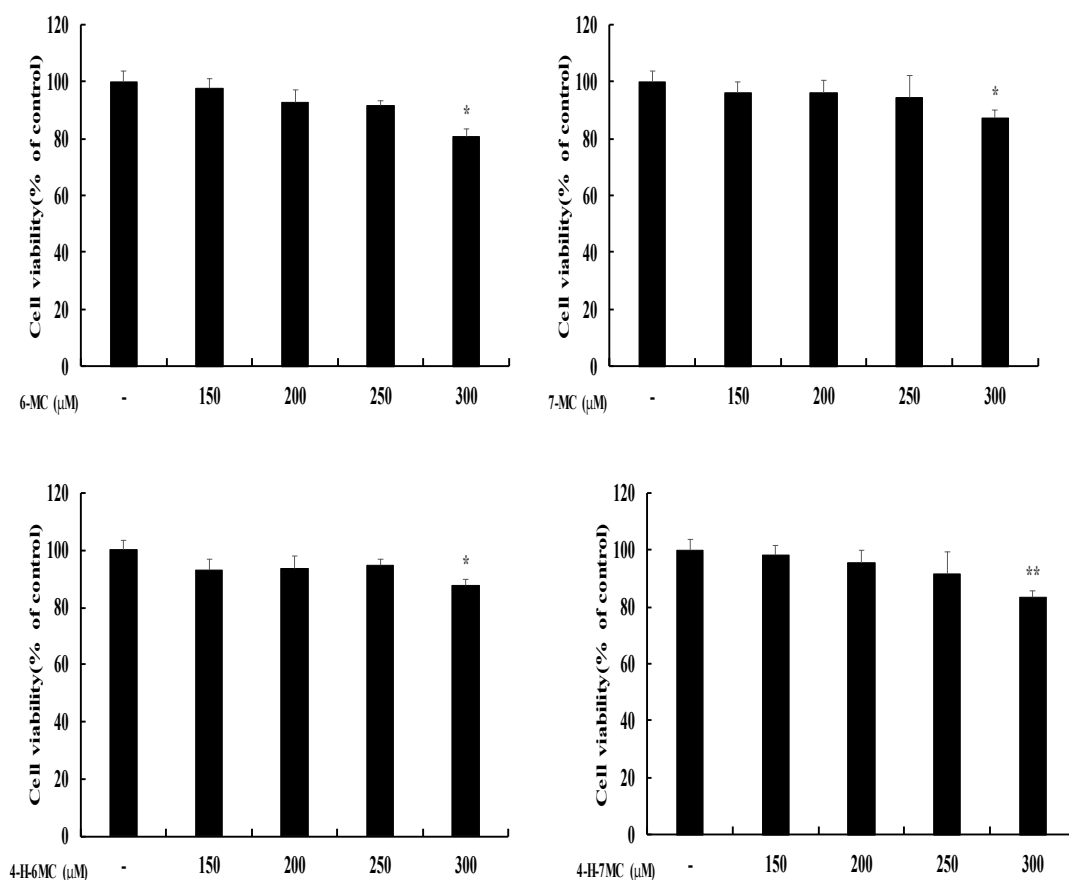


Figure 9. Effect of 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC on the viability of B16F10 melanoma cells. Cells were plated in 24-well plates (1.5×10^4 cells/well) for 24 h, and then treated with 6-MC (150, 200, 250, and 300 μM), 7-MC (150, 200, 250, and 300 μM), 4H-6-MC (150, 200, 250, and 300 μM), 4H-7-MC (150, 200, 250, and 300 μM) for 72 h. Cytotoxicity of 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC were evaluated using the MTT assay. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control group.

2.2. Melanin 함량 측정

세포 독성이 나타나지 않은 농도에서 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC의 멜라닌 생성량을 측정하였다. 그 결과 6-MC와 7-MC는 아무것도 처리하지 않은 control군에 비해 멜라닌 함량이 농도 의존적으로 증가하였다. 4H-6-MC와 4H-7-MC는 멜라닌 생성에 영향을 미치지 못하였다. 추후 연구에서는 멜라닌 생성 함량이 가장 많이 증가한 6-MC에 대해서 연구를 진행하였다.

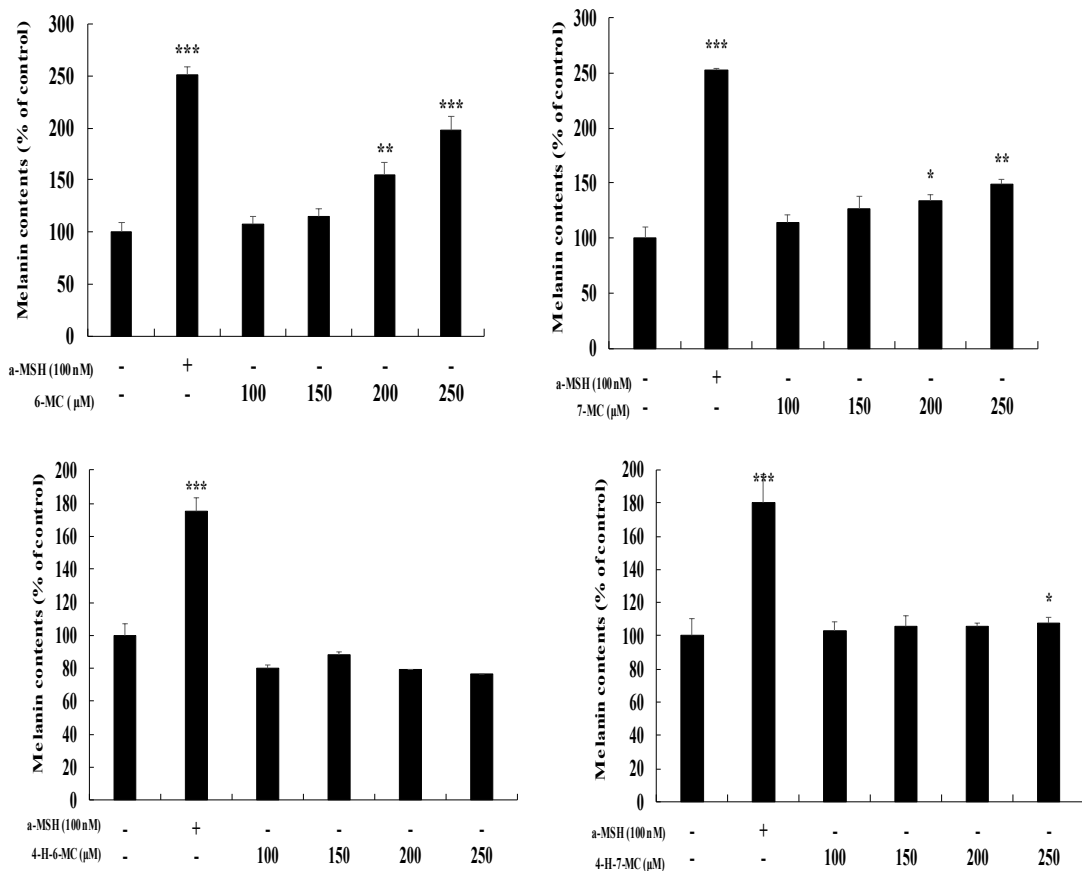


Figure 10. Effect of 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC on production of melanin in B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish (6.0×10^4 cells/dish) and incubated for 24 h, then treated with 6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC for 72 h. α -MSH was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control group.

2.3. Tyrosinase 활성 측정

멜라닌 생성 영향이 Tyrosinase 활성 증가에 의한 것인지 확인하기 위하여 Tyrosinase 활성 측정을 진행하였다. 아무것도 처리하지 않은 control 군에 비해 양성대조군인 α -MSH를 처리하였을 때 Tyrosinase 활성이 78% 증가한 것을 확인할 수 있었고, 샘플인 6-MC를 세포 독성이 없는 농도 (100, 150, 200, 250 μ M)를 처리 하였을 때 농도 의존적으로 Tyrosinase 활성이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히 최대 농도에서 61%의 Tyrosinase 활성이 증가한 것으로 보아 Melanin 생성 효과가 세포 내에서 Tyrosinase 활성을 통해 일어난다는 것을 시사한다.

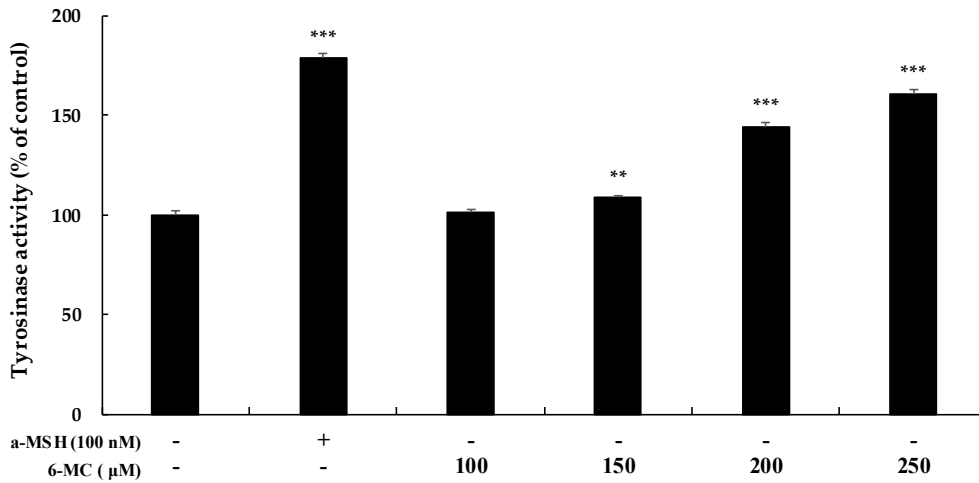


Figure 11. Effect of 6-MC on tyrosinase activity in B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish (6.0×10^4 cells/dish) and incubated for 24 h, then treated with 6-MC (100, 150, 200, and 250 μM) for 72 h. α -MSH was used as the positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control group.

2.4. 멜라닌 생성 효소 측정

TRP-1, TRP-2, Tyrosinase는 멜라닌 생성 효소로서 멜라닌 생성에 관여하는 촉매제의 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 6-MC의 멜라닌 증가가 TRP-1, TRP-2, Tyrosinase 멜라닌 생성 효소들의 발현과 관련이 있는지 확인하기 위해 Western blot 실험을 진행하였다. TRP-1, TRP-2, Tyrosinase는 양성대조군인 α -MSH 단독처리군은 아무것도 처리하지 않은 control군에 비해 발현이 증가한 것을 확인할 수 있다. 샘플인 6-MC는 세포독성이 없는 농도 (100, 200, 250 μ M) 처리시 TRP-1에서는 효과가 없음을 확인할 수 있었고, TRP-2, Tyrosinase에서 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 6-MC는 TRP-2, Tyrosinase 효소에 의해서 멜라닌 생성이 증가하였음을 시사한다.

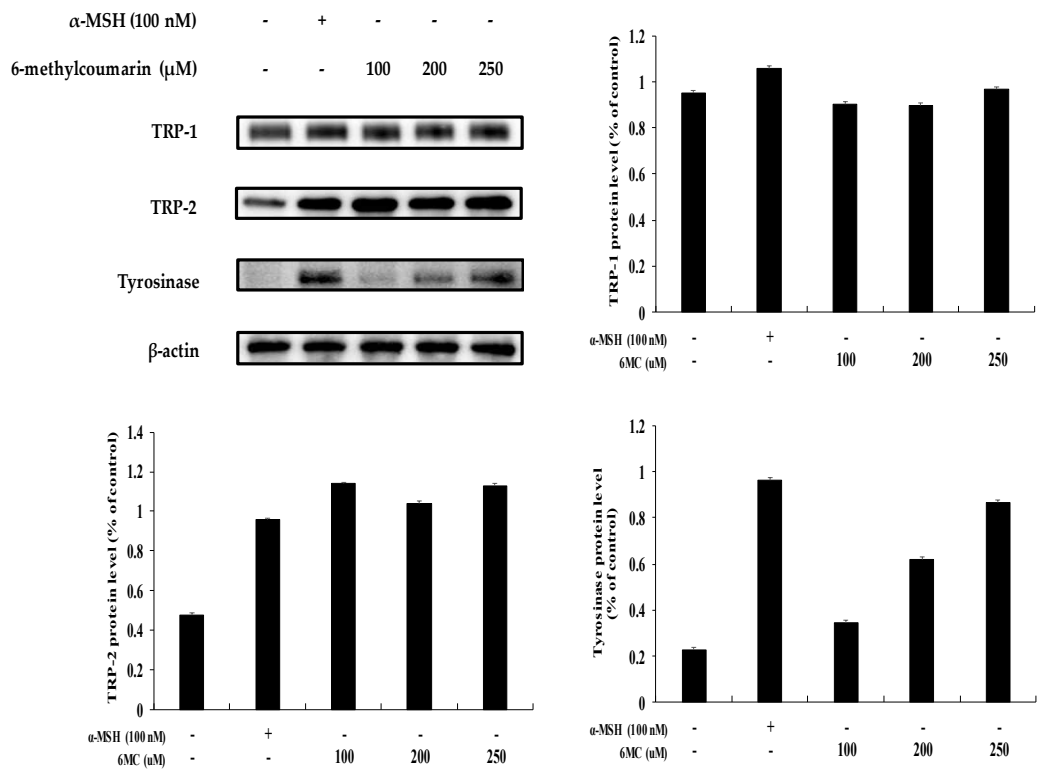


Figure 12. Effect of 6-MC on the level of TRP-1, TRP-2, Tyrosinase in B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish (7.0×10^4 cells/dish) and incubated for 24 h, then treated with 6-MC (100, 200, 250 μ M) for 72 h. α -MSH was used as the positive control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against TRP-1, TRP-2, Tyrosinase, and β -actin.

2.5. MITF 발현량 측정

멜라닌 생성 효소들의 조절인자인 MITF는 TRP-1, TPR-2, MITF와 같은 멜라닌 생성 효소들의 발현에 영향을 끼쳐 멜라닌 생성을 조절한다. 따라서 6-MC가 B16F10 세포내에서 MITF에 영향을 미치는지 조사하기 위하여 western blot을 진행하였다. 아무것도 처리하지 않은 control군에 비해 양성대조군인 α -MSH를 단독 처리하였을 때 MITF의 발현량은 증가한 것을 확인할 수 있다. 또한, 샘플인 6-MC를 처리하였을 때 농도 의존적으로 MITF의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 6-MC가 MITF의 발현량을 증가시켜 멜라닌 생성 효소의 발현이 증가한 것임을 시사한다.

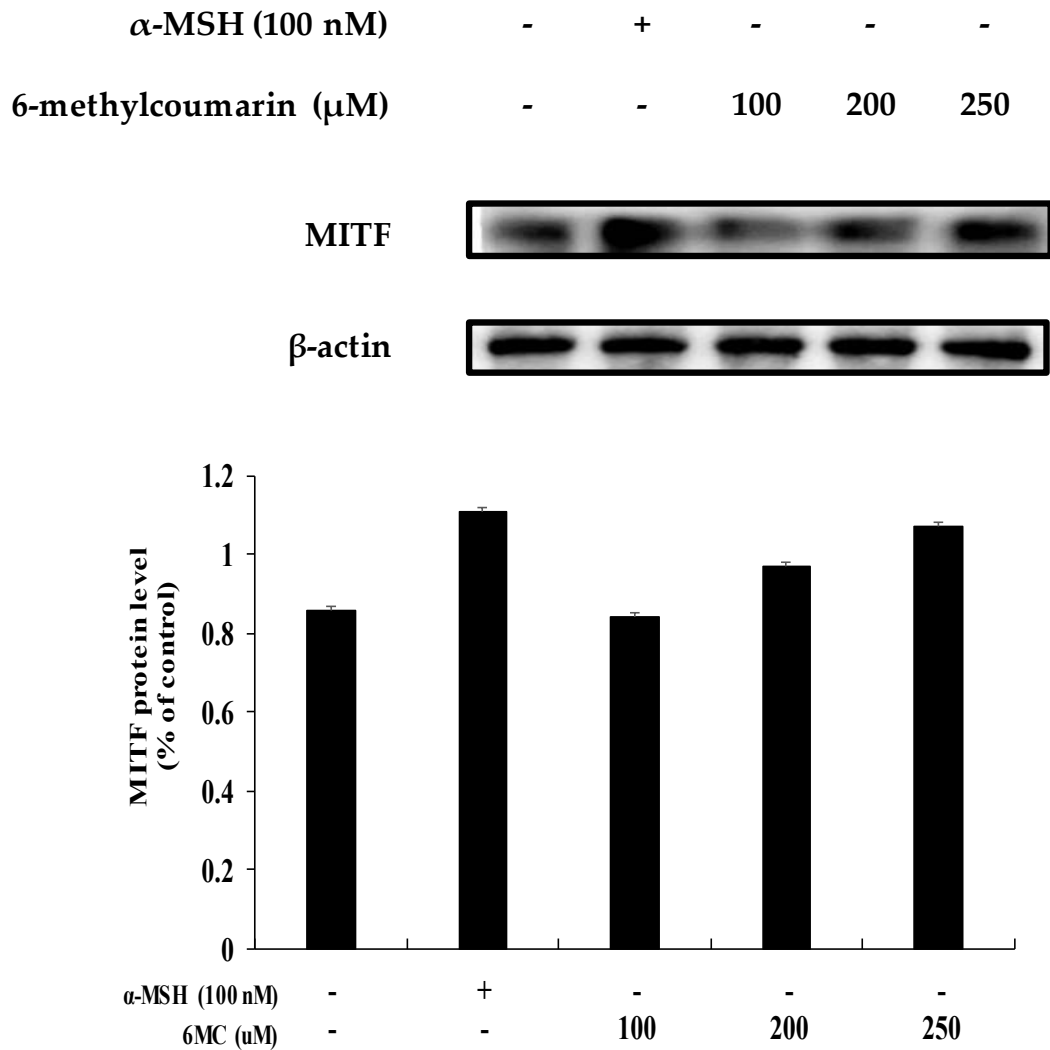


Figure 13. Effect of 6-MC on the level of MITF in B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish (7.0×10^4 cells/dish) and incubated for 24 h, then treated with 6-MC (100, 200, 250 μ M) for 72 h. α -MSH was used as the positive control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against MITF, and β -actin.

2.5. MAPKs 신호전달 경로

MAPKs 경로에 속하는 ERK는 인산화가 감소하면 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌을 증가시킨다. 따라서 MITF의 발현 증가가 ERK에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 양성대조군인 α -MSH 처리군은 아무것도 처리하지 않은 control군에 비해 ERK의 인산화를 감소시켰다. 또한, 샘플인 6-MC를 처리하였을 때 농도의존적으로 ERK의 인산화가 감소됨을 확인할 수 있다. 따라서 이러한 결과는 6-MC가 ERK의 인산화를 억제하여 MITF의 발현에 관여했다는 것으로 나타낸다.

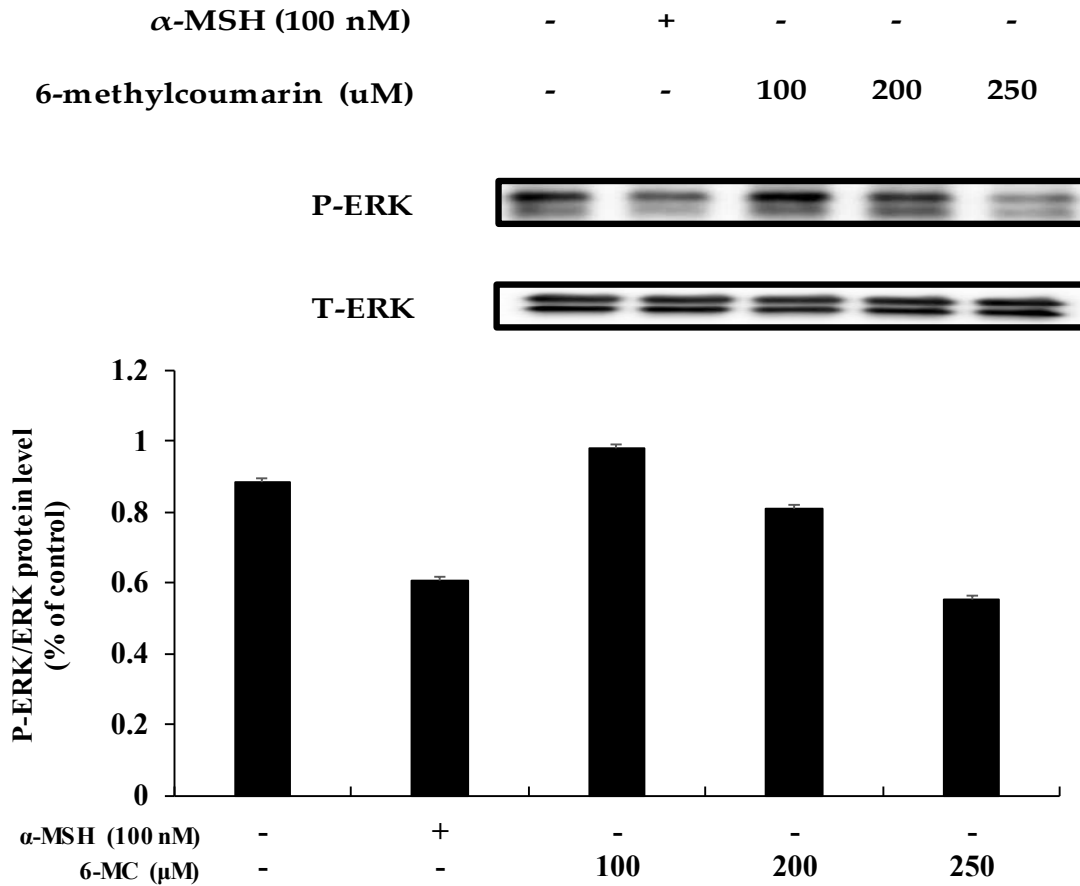


Figure 14. Effect of 6-MC on the level of P-ERK in B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish (7.0×10^4 cells/dish) and incubated for 72 h, then treated with 6-MC (100, 200, 250 μ M) for 24 h. α -MSH was used as the positive control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against P-ERK and T-ERK.

2.6. AKT 신호전달 경로

PI3K/AKT 신호전달경로에서 AKT의 인산화 감소는 멜라닌 생성을 증가시킨다. 따라서 6-MC가 B16F10 세포에서 AKT의 인산화를 억제시켜 멜라닌 생성을 증가시켰는지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 양성대조군인 α -MSH 단독처리군은 아무것도 처리하지 않은 control군에 비해서 AKT의 인산화를 유의적으로 억제시켰다. 샘플인 6-MC 또한 농도의존적으로 AKT의 인산화를 억제시켰다. 따라서 6-MC가 AKT의 인산화를 저해시켜 멜라닌 생성을 증가시킨 것으로 나타낸다.

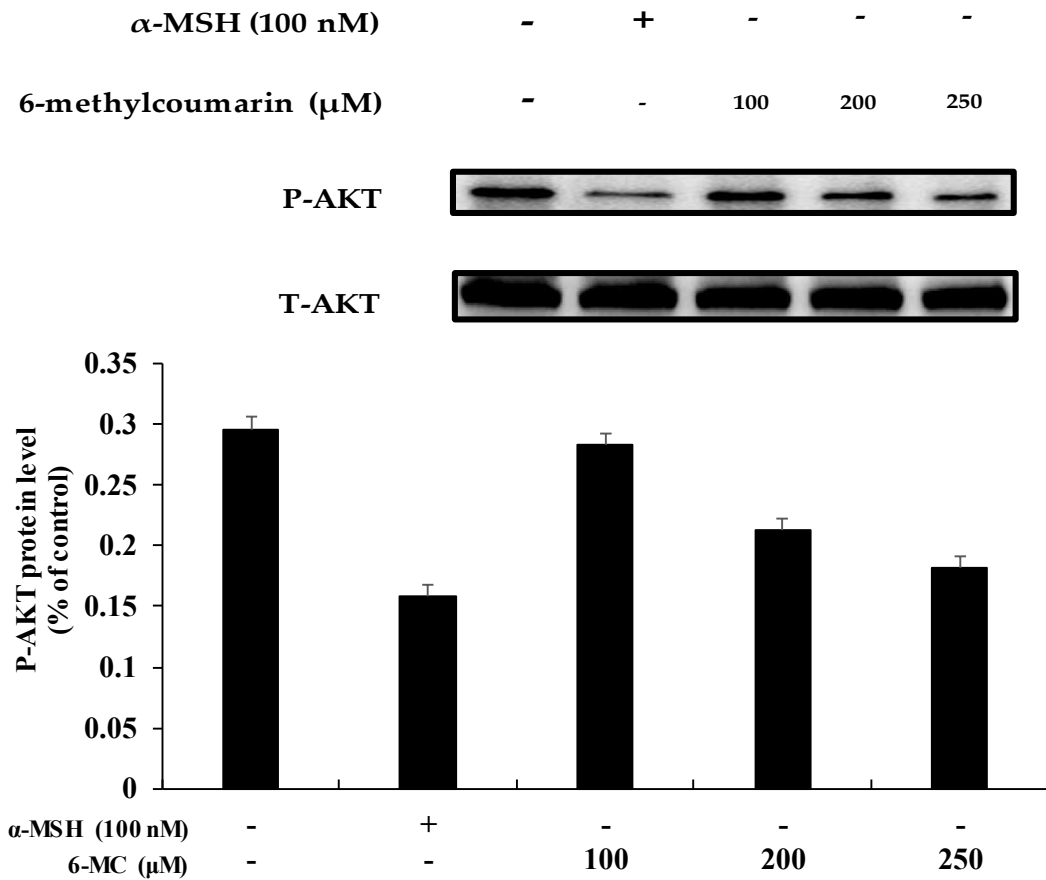


Figure 15. Effect of 6-MC on the level of P-AKT in B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish (7.0×10^4 cells/dish) and incubated for 72 h, then treated with 6-MC (100, 200, 250 μ M) for 24 h. α -MSH was used as the positive control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against P-AKT and T-AKT.

IV. 고찰

다양한 쿠마린과 그 유도체들은 항산화, 항염증, 항균, 항바이러스 및 항암 기능을 포함한 다양한 생물학적 활성에 대해 광범위하게 연구되어 왔다. 또한, 쿠마린 골격 내의 다양한 치환기는 구조적 차이로 인해 상이한 생물학적 활성을 나타낼 수 있다. 따라서, 구조적 차이에 기초한 생물학적 활성의 비교는 효과적인 기능성 물질을 예측하는 데 유용하다.

염증은 병원균의 침입이나 내인성 신호의 자극에 대한 응답으로 설명되며 정상적인 기능을 회복하기 위해 조직을 치료한다. 그러나 과도하게 지속되는 염증은 관절염, 폐렴, 간염 등 환자에게 심각한 상태를 초래할 수 있다. 따라서 염증 반응의 조절은 생체의 유지에 매우 중요하며, 이로부터 생성되는 염증성 매개체(NO, PGE₂) 및 전염증성 사이토카인과 같은 염증 매개체의 생성 억제 효과를 통해 항염증 효과를 확인할 수 있다.

6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC의 NO의 생성을 억제하는지 확인하기 위하여 우선 MTT법을 이용하여 세포독성을 확인하였다. 실험결과 세포독성이 나타나지 않은 500 μ M의 농도를 최고 농도로 하여 NO 생성량 측정 실험을 진행하였다. 6-MC와 7-MC는 항염증 활성이 우수하게 나타났지만, 이 두 개의 쿠마린 4번 위치에 하이드록시기가 붙은 4H-6-MC, 4H-7-MC는 NO 생성 저해 활성이 떨어지는 것을 발견했다. 이는 4번 위치에 붙은 하이드록시기가 항염증 관련 생물학적 효능에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 앞으로의 연구에서는 NO 생성 저해 활성이 가장 뛰어났던 6-MC를 바탕으로 추가 실험들을 진행하였다.

6-MC가 염증성 매개체인 PGE₂ 및 IL-6, IL-1 β , TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인 생성을 저해하는지 확인하기 위하여 ELISA kit를 사용하여 실험을 진행하였다. 그 결과 자극제인 LPS를 처리하였을 때 PGE₂, IL-6, IL-1 β , TNF- α 의

생성은 유의하게 증가하였고, 샘플인 6-MC를 처리하였을 때 농도의존적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

NO 합성효소인 iNOS의 발현 저하에 의해 NO가 억제된 것인지, PGE₂ 생성효소인 COX-2의 발현 저하에 의해 PGE₂가 억제된 것인지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 실험 결과 6-MC는 iNOS 및 COX-2의 발현량을 농도 의존적으로 감소시킨 것을 확인하였다. 이러한 결과는 6-MC가 iNOS를 저해하여 NO를 감소시키고, COX-2를 저해하여 PGE₂를 감소시킨 것을 알 수 있다.

염증반응의 주요 신호전달경로인 MAPKs는 인산화가 되면 iNOS, COX-2 및 전염증성 사이토카인의 발현을 증가시키고 염증반응을 일으킨다. 6-MC가 MAPKs 신호전달경로를 통하여 iNOS, COX-2, 및 전염증성 사이토카인을 감소시켰는지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 실험 결과 6-MC는 ERK, JNK, p38의 인산화를 농도의존적으로 억제하였다. 이러한 결과는 6-MC가 MAPKs 신호전달경로를 통하여 iNOS, COX-2, 및 전염증성 사이토카인의 생성을 저해한 것을 확인할 수 있다.

염증반응의 또 다른 대표적인 신호전달경로인 NF-κB는 평상시에는 IκB-α와 복합체를 이루어 비활성화 상태로 세포질 내에 존재한다. 이러한 NF-κB가 결합하고 있던 IκB-α가 인산화되어 분해되고, NF-κB는 세포질에서 핵으로 이동되어 염증 매개체 및 전염증성 사이토카인의 발현을 촉진한다. 6-MC가 NF-κB 신호전달경로를 통하여 항염증 효과가 있었는지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 실험 결과 6-MC는 IκB-α의 인산화를 억제하였고, NF-κB (p65)의 세포질에서 핵으로 가는 이동을 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 6-MC가 NF-κB 신호전달경로를 통해서 전염증성 사이토카인 및 염증 매개체들의 억제를 진행하여 항염증 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있다.

멜라닌은 자외선 및 외부자극을 받으면 멜라노솜에 의해 생성되고 피부를 자외선으로부터 보호하는 역할을 한다. 이러한 멜라닌의 생성이 감소되면 저색소

침착증인 백색증, 백반증과 같은 질병을 초래할 수 있다. 따라서 이러한 멜라닌을 적절히 조절하는 것은 매우 중요하다.

6-MC, 7-MC, 4H-6-MC, 4H-7-MC가 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 MTT 분석법을 이용하여 세포독성을 확인하였다. 세포독성이 없는 250 μ M 농도를 최고 농도로 하여 멜라닌 생성을 확인하는 Melanin content를 진행하였다. 6-MC와 7-MC는 모두 멜라닌을 농도의존적으로 증가시켰지만 4번 위치에 하이드록시기가 붙은 4H-6-MC, 4H-7-MC는 멜라닌 생성에 대한 영향을 미치지 못하였다. 이는 4번 위치의 하이드록시기가 쿠마린에서 멜라닌 생성에 대한 생물학적 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 앞으로의 연구에서는 멜라닌 생성 활성이 가장 뛰어났던 6-MC를 바탕으로 추가 실험들을 진행하였다.

멜라닌 생성에 대한 영향이 B16F10 세포 내에 Tyrosinase 활성에 의한 것인지 확인하기 위하여 Tyrosinase activity를 진행하였다. 자극제인 α -MSH를 단독 처리하였을 때 아무것도 처리하지 않은 control군보다 78% 증가하였고 6-MC를 처리하였을시 농도의존적으로 증가하였으며 최고 농도인 250 μ M 농도에서 최대 61%의 Tyrosinase의 활성을 증가시켰다. 이러한 결과를 바탕으로 6-MC가 Tyrosinase 활성을 증가시켜 멜라닌 생성에 영향을 준 것으로 확인된다.

TRP-1, TRP-2, Tyrosinase는 멜라닌 생성에 영향을 주는 효소들이다. 멜라닌 증가가 이러한 효소들에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 실험 결과 6-MC는 TRP-1에서는 영향을 주지 못하였지만 TRP-2, Tyrosinase의 발현은 증가시킨 것으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 6-MC는 TRP-2, Tyrosinase 효소 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 증가시킨 것으로 확인된다.

MITF의 발현이 증가하면 TRP-1, TRP-2, Tyrosinase와 같은 효소들의 발현이 증가한다. 따라서 6-MC의 멜라닌 생성 증가가 MITF의 영향이 있었는지 확

인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 실험 결과 6-MC는 MITF의 발현을 농도의존적으로 증가시켰다. 이러한 결과는 6-MC가 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성 효소들에 영향을 준 것으로 확인된다.

MAPKs 신호전달경로 중 ERK는 음성 신호전달경로로 ERK의 인산화가 감소하면 MITF를 증가시켜 멜라닌 생성을 증가시킨다. 따라서 6-MC가 MAPKs 신호전달 경로를 통해서 멜라닌 생성에 영향을 주었는지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 실험 결과 6-MC는 ERK의 인산화를 농도의존적으로 감소시킨 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 6-MC가 MAPKs 신호전달경로 중 ERK의 인산화에 관여하여 멜라닌 생성을 증가시킨 것으로 확인된다.

AKT의 인산화 증가는 B16F10 세포에서 멜라닌 생성을 하향조절한다. 반대로 AKT의 인산화를 감소시키면 멜라닌 생성을 증가시킨다. 따라서 6-MC가 AKT의 인산화를 감소시켜서 멜라닌 생성을 증가시켰는지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였다. 실험 결과 6-MC는 AKT의 인산화를 농도의존적으로 감소시켰다. 이러한 결과는 6-MC가 PI3K/AKT 신호전달경로를 통하여 멜라닌 생성을 증가시킨 것으로 확인된다.

결론적으로, 6-MC는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs 경로와 NF- κ B 신호전달 경로를 통하여 항염증 효과를 나타내었고, B16F10 멜라노마 세포에서는 AKT 신호전달경로와 ERK의 인산화를 억제하여 멜라닌 생성 효과를 나타내었다. 따라서 6-MC는 항염증제와 저색소침착증 치료제로 사용될 수 있음을 시사한다.

V. 참고 문헌

1. Barinig, C.; Bezema, T.; Calder, P.C.; Charloux, A.; Frossard, N.; Garssen, J.; Haworth, O.; Dilevskaya, K.; Levi-Schaffer, F.; Lonsdorfer, E.; et al. Activation of Resolution Pathways to Prevent and Fight Chronic Inflammation: Lessons From Asthma and Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1699.
2. Ward, P.A.; Lentsch, A.B. The Acute Inflammatory Response and Its Regulation. *Arch. Surg.* 1999, 134, 666 - 669.
3. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell* 2010, 140, 771 - 776.
4. Ferrero-Miliani, L.; Nielsen, O.H.; Andersen, P.S.; Girardin, S.E. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin. Exp. Immunol.* 2007, 147, 227 - 235.
5. Nathan, C.; Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010, 140, 871 - 882.
6. Zhou, Y.; Hong, Y.; Huang, H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF- κ B Signaling Pathway. *Kidney. Blood. Press. Res.* 2016, 41, 901 - 910.
7. Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010, 140, 805 - 820.
8. Frostegård, J.; Ulfgren, A.K.; Nyberg, P.; Hedin, U.; Swedenborg, J.; Andersson, U.; Hansson, G.K. Cytokine expression in advanced human

atherosclerotic plaques: Dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999, 145, 33 - 43.

9. Matthay, M.A.; Zimmerman, G.A.; Esmon, C.; Bhattacharya, J.; Collier, B.; Doerschuk, C.M.; Floros, J.; Gimbrone Jr, M.A.; Hoffman, E.; Hubmayr, R.D.; et al. Future research directions in acute lung injury: Summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 167, 1027 - 1035.
10. Reibman, J.; Talbot, A.T.; Hsu, Y.; Ou, G.; Jover, J.; Nilsen, D.; Pillinger, M.H. Regulation of expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human bronchial epithelial cells: Roles of protein kinase C and mitogen activated protein kinases. *J. Immunol.* 2000, 165, 1618 - 1625.
11. Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005, 1754, 253 - 262.
12. Carter, A.B.; Knudtson, K.L.; Monick, M.M.; Hunninghake, G.W. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 30858 - 30863.
13. Nakano, H.; Shindo, M.; Sakon, S.; Nishinaka, S.; Mihara, M.; Yagita, H.; Okumura, K. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 3537 - 3542.
14. Shin, J.S.; Kim, J.M.; An, W.G. Anti-inflammatory Effect of Red Ginseng

through Regulation of MAPK in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.
Korean J. Orient. Physiol. Pathol. 2012, 26, 293 - 300.

15. Paik, Y.H.; Schwabe, R.F.; Bataller, R.; Russo, M.P.; Jobin, C.; Brenner, D.A. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003, 37, 1043 - 1055.
16. Suzuki, H.; Chiba, T.; Kobayashi, M.; Takeuchi, M.; Furuichi, K.; Tanaka, K. In vivo and in vitro recruitment of an I κ B α ubiquitin ligase to I κ B α phosphorylated by IKK, leading to ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 256, 121 - 126.
17. Guha, M.; Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 2001, 13, 85 - 94.
18. Ghosh, S.; Hayden, H.S. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, 8, 837 - 848.
19. Majdalawieh, A.; Ro, H.S. Regulation of I κ B α function and NF- κ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediat. Inflamm.* 2010, 2010, 821 - 823.
20. Park, S.M.; Byun, S.H.; Kim, Y.W.; Cho, I.J.; Kim, S.C. Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on pro-inflammatory mediator in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Korean J. Herbol.* 2012, 27, 31 - 38.
21. He, G.; Karin, M. NF- κ B and STAT3—key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* 2011, 21, 159 - 168.

22. Jalava, P.I.; Salonen, R.O.; Pennanen, A.S.; Sillanpää, M.; Hälinen, A.I.; Happonen, M.S.; Hillamo, R.; Brunekreef, B.; Katsouyanni, K.; Sunyer, J.; et al. Heterogeneities in inflammatory and cytotoxic responses of RAW 264.7 macrophage cell line to urban air coarse, fine, and ultrafine particles from six European sampling campaigns. *Inhal. Toxicol.* 2007, 19, 213 - 225.

23. Manzi, S.; Wasko, M.C. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2000, 59, 321 - 325.

24. Abramson, S.B.; Amin, A.R.; Clancy, R.M.; Attur, M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2001, 15, 831 - 845.

25. Glezeva, N.; Baugh, J.A. Role of inflammation in the pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction and its potential as a therapeutic target. *Heart Fail. Rev.* 2014, 19, 681 - 694.

26. Manohar, M.; Verma, A.K.; Venkateshaiah, S.U.; Sanders, N.L.; Mishra, A. Pathogenic mechanisms of pancreatitis. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 2017, 8, 10 - 25.

27. Brenner, C.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Kroemer, G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J. Hepatol.* 2013, 59, 583 - 594.

28. Walford, H.H.; Doherty, T.A. STAT6 and lung inflammation. *JAKSTAT* 2013, 2, e25301.

29. Ekdahl, C.T.; Claassen, J.H.; Bonde, S.; Kokaia, Z.; Lindvall, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 13632 - 13637.

30. Kostova, I.; Raleva, S.; Genova, P.; Argirova, R. Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2006, 2006, 68274.
31. Pereira, T.M.; Franco, D.F.; Vitorio, F.; Kummerle, A.E. Coumarin compounds in medicinal chemistry: Some important examples from the last years. *Curr. Top. Med. Chem.* 2018, 18, 124 - 148.
32. Tsatmali, M.; Ancans, J.; Thody, A, J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem.* 2002, 50(2), 125-133.
33. She, Q.; Dong, Y.; Li, D.; An, R.; Zhou, T.; Nie, X.; Pan, R.; Deng, Y. ABCB6 knockdown suppresses melanogenesis through the GSK3- β / β -catenin signaling axis in human melanoma and melanocyte cell lines. *J Dermatol Sci.* 2022, S0923-1811(22)00093-7.
34. Uto, T.; Ohta, T.; Katayama, K.; Shoyama, Y. Silibinin promotes melanogenesis through the PKA and p38 MAPK signaling pathways in melanoma cells. *Biomed Res.* 2022, 43(2), 31-39.
35. Brenner, M.; Hearing, V.J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 2008, 84(3), 539-549.
36. Briganti, S.; Camera, E.; Picardo, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* 2003, 16(2), 101-110.
37. Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Jung, S.H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell Signal.* 2017, 40, 99-115.

38. Roy, S. Melanin, melanogenesis, and vitiligo. *Fortschr Chem Org Naturst.* 2007, 88, 131-185.
39. Yamaguchi, Y.; Hearing, V.J. Melanocytes and their diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014, 4(5), a017046.
40. Ezzedine, K.; Lim, H.W.; Suzuki, T.; Katayama, I.; Hamzavi, I.; et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the vitiligo global issues consensus conference. 2012, 25(3), E1-13.
41. Halder, R.M.; Chappell, J.L. Vitiligo update. *Semin Cutan Med Surg.* 2009, 28(2), 86-92.
42. Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A. Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules* 2018, 23, 250.
43. Hirobe, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011, 24, 462 - 478.
44. Liu, Y.J.; Lyu, J.L.; Kuo, Y.H.; Chiu, C.Y.; Wen, K.C.; Chiang, H.M. The Anti-Melanogenesis Effect of 3,4-Dihydroxybenzalacetone through Downregulation of Melanosome Maturation and Transportation in B16F10 and Human Epidermal Melanocytes. 2021, 22(6), 2823.
45. Lee, H.P.; Kim, D.S.; Park, S.H.; Shin, C.Y.; Woo, J.J.; Kim, J.W.; An, R.B.; Lee, C.; Cho, J.Y. Antioxidant Capacity of *Potentilla paradoxa* Nutt. and Its Beneficial Effects Related to Anti-Aging in HaCaT and B16F10 Cells. *Plants (Basel).* 2022, 11(7), 873.

46. Chan, C.F.; Huang, C.C.; Lee, M.Y.; Lin, Y.S. Fermented broth in tyrosinase-and melanogenesis inhibition. *Molecules* 2014, 19, 13122 - 13135.
47. Rzepka, Z.; Buszman, E.; Beberok, A.; Wrześniok, D. From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis. *Postepy Hig. I Med. Dosw. (Online)* 2016, 70, 695 - 708.
48. Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Jung, S.-H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell. Signal.* 2017, 40, 99 - 115.
49. She, Q.; Dong, Y.; Li, D.; An, R.; Zhou, T.; Nie, X.; Pan, R.; Deng, Y. ABCB6 knockdown suppresses melanogenesis through the GSK3- β / β -catenin signaling axis in human melanoma and melanocyte cell lines. *J Dermatol Sci.* 2022, S0923-1811(22)00093-7.
50. Cross, D.A.; Alessi, D.R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B.A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995, 378(6559), 785-789.
51. Khaled, M.; Larribere, L.; Bille, K.; Aberdam, E.; Ortonne, J.P.; Ballotti, R.; Bertolotto, C. Glycogen synthase kinase 3 β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *J. Biol. Chem.* 2002, 277(37), 33690 - 33697.
52. Lee, J.; Jung, K.; Kim, Y.S.; Park, D. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. *Life Sci.* 2007, 81(3), 249 - 254.
53. Kuo, Y.H.; Chen, C.C.; Lin, P.; You, Y.J.; Chiang, H.M. N-(4-bromophenethyl)

caffeamide inhibits melanogenesis by regulating AKT/glycogen synthase kinase 3 beta/microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase-related protein 1/tyrosinase. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2015, 16(12), 1111 - 1119.

54. Busca, R.; Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 2000, 13(2), 60 - 69.
55. Lee, H.E.; Kim, E.H.; Choi, H.R.; Sohn, U.D.; Yun, H.Y.; Baek, K.J.; Kwon, N.S.; Park, K.C.; Kim, D.S. Dipeptides inhibit melanin synthesis in Mel-Ab cells through down-regulation of tyrosinase. *Korean J. Physiol. Pharm.* 2012, 16(4), 287 - 291.
56. Drira, R.; Sakamoto, K. Sakuranetin induces melanogenesis in B16BL6 melanoma cells through inhibition of ERK and PI3K/AKT signaling pathways. *Phytother. Res.* 2016, 30(6), 997 - 1002.
57. Fitzpatrick, T.B.; Miyamoto, M.; Ishikawa, K. The evolution of concepts of melanin biology. *Arch Dermatol.* 1967, 96(3), 305-323.
58. Simon, J.D.; Peles, D.; Wakamatsu, K.; Ito, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology and function. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009, 22(5), 563-579.
59. Hearing, V.J. Determination of melanin synthetic pathway. *J Invest Dermatol.* 2011, 131(E1), 8-11.
60. Cichorek, M.; Wachulska, M.; Stasiewicz, A.; Tymińska, A. Skin melanocytes: Biology and development. *Adv. Derm. Allergol./Postępy Derm. I Alergol.* 2013,

30, 30-41.

61. Annunziata, F.; Pinna, C.; Dallavalle, S.; Tamborini, L.; Pinto, A. An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 4618.
62. Hoult, J.R.S.; Payá, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* 1996, 27, 713 - 722.
63. Zhu, J.J.; Jiang, J.G. Pharmacological and nutritional effects of natural coumarins and their structure-activity relationships. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017, 62, e1701073.
64. Kang, Y.S.; Chung, Y.C.; Lee, J.N.; Kim, B.S.; Hyun, C.-G. Anti-Inflammatory Effects of 6,7-Dihydroxy-4-Methylcoumarin on LPS-Stimulated Macrophage Phosphorylation in MAPK Signaling Pathways. *Nat. Prod. Commun.* 2021, 16, 1 - 8.
65. Lee, N.; Chung, Y.C.; Kang, C.I.; Park, S.-M.; Hyun, C.-G. 7,8-dimethoxycoumarin attenuates the expression of IL-6, IL-8, and CCL2/MCP-1 in TNF- α -treated HaCaT cells by potentially targeting the NF- κ B and MAPK pathways. *Cosmetics* 2019, 6, 41.
66. Chung, Y.C.; Kim, S.Y.; Hyun, C.-G. 8-Methoxycoumarin enhances melanogenesis via the mapkase signaling pathway. *Pharmazie* 2019, 74, 529 - 535.
67. Chung, Y.C.; Park, S.-M.; Kim, J.H.; Lee, G.S.; Lee, J.N.; Hyun, C.-G.

Anti-inflammatory Effect of Pradol in LPS-stimulated RAW264.7 Cells via NF- κ B Signaling Pathways. Nat. Prod. Commun. 2018, 13, 547 - 550.