



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 Pratiol의  
멜라닌 합성 증진과 항염증 효과

제주대학교 대학원

화학과

정 유 철

2018년 2월

# 마우스 세포에서 Prato1의 멜라닌 합성 증진과 항염증 효과

지도교수 현 창 구

정 유 철

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2018년 2월

정유철의 이학석사 학위논문을 인준함

|       |              |   |
|-------|--------------|---|
| 심사위원장 | <u>윤 경 섭</u> |  |
| 위 원   | <u>이 남 호</u> |  |
| 위 원   | <u>현 창 구</u> |  |

제주대학교 대학원

2018년 2월

# Effect of Pradol on the Melanogenesis Enhancement and Anti-inflammation in Mouse Cells

You Chul Chung

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

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

February, 2018

This thesis has been examined and approved by

Kyung-Sup Yoon

Nam Ho Lee

CHANG-GU HYUN

12/19

Date

Department of Chemistry  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

Pratol is a 7-hydroxy-4-methoxyflavone found in *Trifolium pratense*. In this study, we investigated the effects of pratol on melanogenesis and anti-inflammation. We also studied the mechanism of action of pratol in B16F10 melanoma and RAW 264.7 cells. The B16F10 cells and RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (6.25, 12.5, 25, and 50  $\mu$ M) and (25, 50, 100  $\mu$ M) of pratol respectively to observe its effects. The results in B16F10 cells showed that pratol significantly increased melanin content and tyrosinase activity without being cytotoxic. In addition, pratol strongly increased the expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 and 2 by enhancing the expression of microphthalmia-associated transcription factor. Furthermore, pratol stimulated melanogenesis via the phosphorylation of p38, c-Jun N-terminal kinases (JNK), and extracellular signal-regulated kinase (ERK). The findings from an assay searching for the inhibitor revealed that SB203580 (a specific p38 inhibitor) or SP600125 (a p-JNK inhibitor) attenuated pratol-induced cellular tyrosinase activity whereas PD98059 (an ERK inhibitor) did not. Additionally, pratol interfered with the phosphorylation of p-AKT. We also found that pratol-induced melanogenesis was reversed by H89, which is a specific protein kinase A inhibitor. The results in RAW 264.7 cells showed that pratol significantly decreased NO and PGE<sub>2</sub> production without any cytotoxic. In addition, pratol strongly decreased the expression of iNOS and COX-2. Furthermore, pratol reduced proinflammatory cytokines such as tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6. The results suggest that, owing to its multi-functional properties, pratol may be use as potential tanning agent or as therapeutic agent for hair depigmentation, hypopigmentation and inflammation.

Key words: Pratol, B16F10, Melanogenesis, Hypopigmentation, RAW 264.7, Inflammation

# 목 차

|   |    |
|---|----|
| ABSTRACT .....  | 1  |
| 목 차 .....   | 2  |
| LIST OF TABLE .....   | 4  |
| LIST OF FIGURES .....   | 5  |
| <br>  |    |
| I. 서 론 .....  | 8  |
| <br>  |    |
| II. 재료 및 방법 .....   | 18 |
| <br>  |    |
| 1. 시료 및 시약 .....  | 18 |
| 2. 세포배양 및 세포독성평가 .....  | 19 |
| 2.1. 세포배양 .....   | 19 |
| 2.2. 세포독성평가 .....   | 19 |
| 3. Melanoma cell 세포 내에서 Pradol의 멜라닌 생성 .....                          | 21 |
| 3.1. Melanin contents 측정 .....  | 21 |
| 3.2. 세포내 tyrosinase 활성 측정 .....                                       | 21 |
| 3.3. Western Blot 분석 .....  | 22 |
| 4. RAW 264.7 세포 내 항염증 활성 측정 .....                                     | 24 |
| 4.1. NO 생성 억제 측정 .....  | 24 |
| 4.2. Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) 억제 측정 .....     | 24 |
| 4.3. 염증매개성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) 억제 측정 ..... | 24 |
| 4.4. Western blot 분석 .....  | 25 |
| 5. 통계처리 .....   | 27 |
| <br>  |    |
| III. 결 과 .....  | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 1. B16F10 세포에서 멜라닌생성 및 세포생존에 대한 화합물들의 영향 .....                      | 28 |
| 2. B16F10 세포에서 세포생존 및 멜라닌생성에 관한 pratol 영향 .....                     | 30 |
| 2.1. B16F10 세포내에서 pratol의 세포 생존율 .....                              | 30 |
| 2.2. B16F10 세포내에서 pratol의 melanin contents .....                    | 30 |
| 2.3. B16F10 세포내에서 pratol의 tyrosinase 활성 .....                       | 32 |
| 2.4. Western blot 분석 .....  | 34 |
| 1) B16F10 세포에서 pratol의 멜라닌생성 관련 효소들과 MITF 발현 .....                  | 34 |
| 2) B16F10 세포내에서 pratol의 AKT 인산화 저해 .....                            | 37 |
| 3) MAPK에서 pratol에 의한 p-ERK, p-p38 그리고 p-JNK의 증가 .....               | 39 |
| 4) PKA 의존 신호 경로를 통한 pratol의 멜라닌생성 유도 .....                          | 39 |
| 3. RAW 264.7 세포내에서 pratol이 항염증 활성화에 미치는 영향 .....                    | 42 |
| 3.1. RAW 264.7 세포내에서 pratol의 세포 생존율 .....                           | 42 |
| 3.2. RAW 264.7 세포내에서 NO와 PGE <sub>2</sub> 생성억제에 대한 pratol의 영향 ..... | 44 |
| 1) Pratol의 NO 생성억제 .....  | 44 |
| 2) Pratol의 PGE <sub>2</sub> 생성억제 .....                              | 44 |
| 3) iNOS와 COX-2 발현 억제 .....  | 45 |
| 3.3. 염증매개성 cytokine들의 생성 억제 .....                                   | 48 |
| IV. 고 찰 .....   | 50 |
| V. 참고문헌 .....   | 56 |

## LIST OF TABLE

|  |    |
|--|----|
| <b>Table 1.</b> Effects of some natural compounds on melanin production and the viability of B16F10 melanoma cells. .... | 29 |
|--|----|

## LIST OF FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1.</b> Melanin production in melanocyte and pigmentary disorders .....   | 9  |
| <b>Figure 2.</b> Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 used as rate-limiting enzymes in melanogenesis .....  | 9  |
| <b>Figure 3.</b> The mechanism of melanogenesis. Positive regulation of melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cell .....                          | 12 |
| <b>Figure 4.</b> The mechanism of melanogenesis. Negative regulation of melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cell .....                          | 12 |
| <b>Figure 5.</b> Process of inflammation .....   | 14 |
| <b>Figure 6.</b> The mechanism of inflammation in RAW 264.7 cell, and inflammatory disorders .....   | 14 |
| <b>Figure 7.</b> Pictures and structural formulas of <i>Centella asiatica</i> (Madecassic acid) and <i>Glycyrrhiza uralensis</i> (Glabridin) ..... | 16 |
| <b>Figure 8.</b> Picture of <i>Trifolium pratense</i> L. and structural formula of pratol .....  | 16 |
| <b>Figure 9.</b> Process of cell culture .....   | 20 |
| <b>Figure 10.</b> Principle of MTT assay .....   | 20 |

## LIST OF FIGURES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 11.</b> Process of melanin contents test .....   | 23 |
| <b>Figure 12.</b> Process of tyrosinase activity test .....  | 23 |
| <b>Figure 13.</b> Principle of western blot assay .....  | 23 |
| <b>Figure 14.</b> Process of NO production test .....  | 26 |
| <b>Figure 15.</b> Principle of ELISA assay .....   | 26 |
| <b>Figure 16.</b> Structural formula of 7-methoxycoumarin, bergamottin, 8-mthox-<br>ycoumarin, stigmasterol, synephrine and pratol ..... | 28 |
| <b>Figure 17.</b> Effects of pratol on melanin production and the viability of<br>B16F10 melanoma cells .....                            | 31 |
| <b>Figure 18.</b> Effect of pratol on tyrosinase activity .....  | 33 |
| <b>Figure 19.</b> Effect of pratol on TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in<br>B16F10 cells .....                                   | 35 |
| <b>Figure 20.</b> Effect of pratol on MITF expression in B16F10 cells .....  | 36 |
| <b>Figure 21.</b> Effects of pratol on AKT phosphorylation .....   | 38 |

## LIST OF FIGURES

- Figure 22.** Effects of pratol on the phosphorylation of p-ERK, p-p38, and p-JNK ..... 40
- Figure 23.** Effect of MAPK inhibitors on pratol-induced tyrosinase activation in B16F10 cells ..... 41
- Figure 24.** Effects of pratol on the viability of RAW 264.7 cells ..... 43
- Figure 25.** Effect of pratol on NO and PGE<sub>2</sub> production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ..... 46
- Figure 26.** Effect of pratol on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ..... 47
- Figure 27.** Effect of pratol on TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ..... 49
- Figure 28.** Pratol enhances melanogenesis by p-p38 and p-JNK up-regulation and p-AKT down-regulation in B16F10 melanoma cells ..... 54
- Figure 29.** Pratol induces anti-inflammation by inhibiting the expression of COX-2, iNOS and cytokines such as NO, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ..... 55

## I. 서 론

자외선과 같은 외부 요인이 피부를 자극하면 표피와 피부 접합부 사이에 위치한 멜라닌세포 (Melanocyte)에서는 멜라노솜 (Melanosome)을 통한 멜라닌 (Melanin) 생성을 증가시키고 주변 각질세포 (Keratinocyte)로 멜라노솜을 전달한다. 이러한 작용으로 표피까지 옮겨간 멜라닌은 사람의 피부와 머리카락의 색을 결정하는 중요한 역할을 한다(1). 표피에 위치한 멜라닌은 자유라디칼을 흡수하거나 우리 몸에 들어오는 자외선을 분산시켜 자외선에 의한 광 손상을 강력하게 차단시킨다. 따라서 비정상적인 색소생성작용으로 인한 색소침착저하 (Hypopigmentation)는 백반증 (Vitiligo), 색소결핍증 (Albinism), 피부암 (Skin cancer) 및 새치 (gray hair)와 같은 색소결핍으로 인한 병적 질환의 원인이 된다(2).

Tyrosinase는 멜라닌세포 안에 있는 멜라노솜에서 멜라닌을 생성하는데 중요한 속도제한효소역할을 하고 있다. 멜라노솜에서 tyrosinase는 티로신을 수산화 시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로, DOPA를 산화시켜 dopaquinone으로 변형시킨다. 그 후 자동산화과정을 거쳐 최종적으로 흑갈색의 유멜라닌 (Eumelanin)을 생성한다. 따라서 tyrosinase 활성제들은 피부 테닝이나 모발탈색 치료제등으로 사용될 수 있고 백반증 및 색소결핍증과 같은 병적 질환의 치료를 위한 기능성 소재로도 사용될 수 있다(3-5).

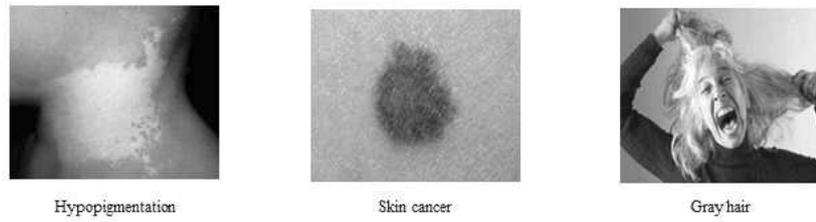
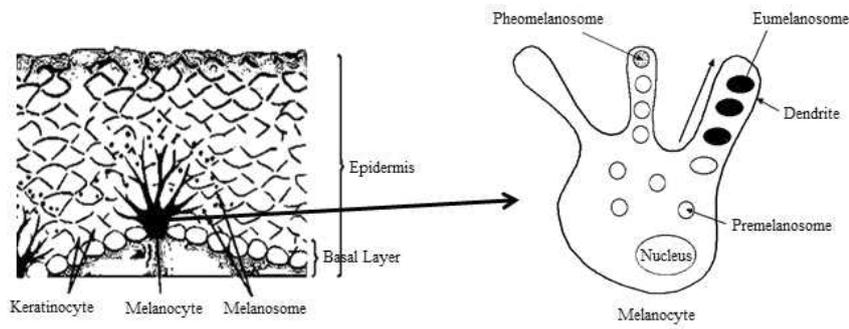


Figure 1. Melanin production in melanocyte and pigmentary disorders.

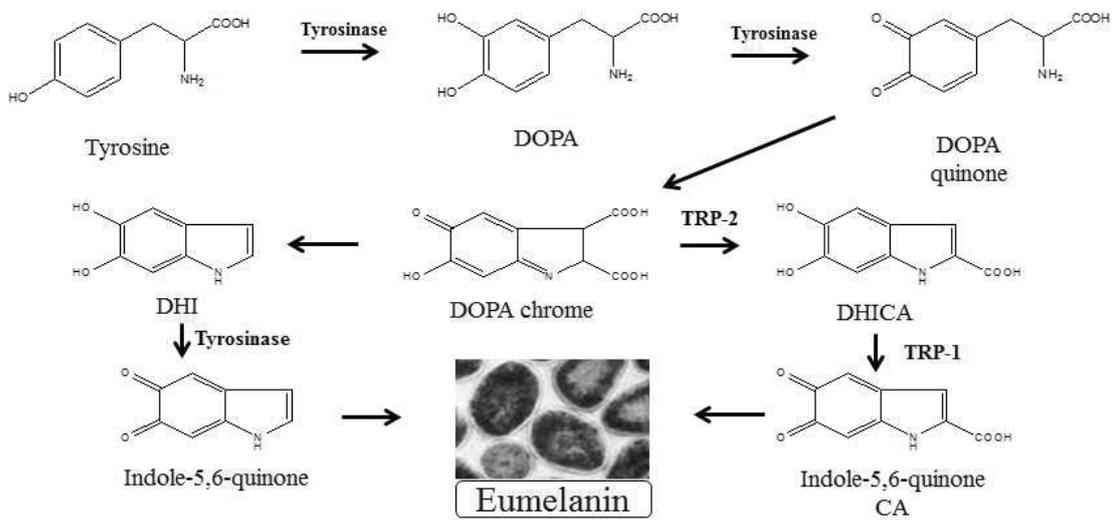


Figure 2. Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 used as rate-limiting enzymes in melanogenesis.

이러한 tyrosinase 효소의 발현은 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)로 인해 조절된다. 멜라닌 생성에 있어 MITF의 가장 중요한 역할로는 tyrosinase 프로모터에 있는 M-box란 곳에 결합하여 tyrosinase 발현을 증가시키는 것이고 tyrosinase-related protein (TRP-1, TRP-2)와 같은 멜라닌생성 관련 효소들의 발현 또한 증가시키는 것으로 알려져 있다(6-8). 최근 연구에 따르면 p38 MAPK, extracellular signal-regulated kinase (ERK) 그리고 c-Jun N-terminal kinase (JNK)가 포함된 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)가 MITF 발현 조절과 깊은 연관이 있다고 보고되고 있다(9-11). 또한 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 경로를 통해 활성화된 protein kinase A (PKA)는 멜라닌세포의 핵 안으로 이동하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-response element-binding protein (CREB)의 인산화를 증가시키고, 이 인산화 된 CREB는 MITF 프로모터에 있는 CRE란 곳에 결합하여 MITF의 발현을 유도하는 것으로 알려졌다. 이러한 과정은 tyrosinase 발현 증가로 이어지고 따라서 멜라닌생성의 증가로 나타난다(12,13).

더 나아가, 최근 보고된 연구결과들은 멜라닌합성이 몇몇의 신호전달경로를 통해 양성 또는 음성조절 된다는 것을 보여주고 있다. 대표적인 음성신호전달경로로는 ERK와 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT 연관 경로가 있다(14,15). Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)으로 인해 인산화 된 ERK는 MITF의 serine 73 부분을 인산화 하여 MITF를 degradation 시키고 인산화 된 AKT 또한 MITF를 인산화 하여 결국 멜라닌 합성을 저해하는 역할을 한다(16,17). 이와 같은 메커니즘을 근거로 천연물질을 이용하여 ERK와 AKT의 인산화 억제를 통한 멜라닌생성 증가를 나타내는 연구가 최근 보고되고 있다(18,19). 또한 MAPK의 JNK와 p38의 인산화 증가는 PKA 증가와 함께 MITF의 인산화를 막고 발현을 유도하여 tyrosinase 활성을 증가, 결국 멜라닌생성을 증가시키는 양성신호전달경로 역할을 하는 것으로 알려져 있다(20,21). 따라서 이러한 결과들은 (PI3K)/AKT 및 MAPK 신호전달 경로를 조절하여 멜라닌 색소의 발현을 증가시킬 수 있다는 것을 보여준다. 멜라닌생성활성은 자외선으로 인한 피부 DNA 손상 및 색소결핍에 따른 여러

병적 질환들로부터 우리 피부를 보호하는 역할을 한다(22). 최근 이러한 이유로 더 좋은 활성을 나타내는 멜라닌생성 활성제를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있고 여러 화합물들을 이용하여 태닝 화장품의 잠재적 물질 및 색소결핍치료제로 제안하는 연구들이 보고되고 있다(23-27).

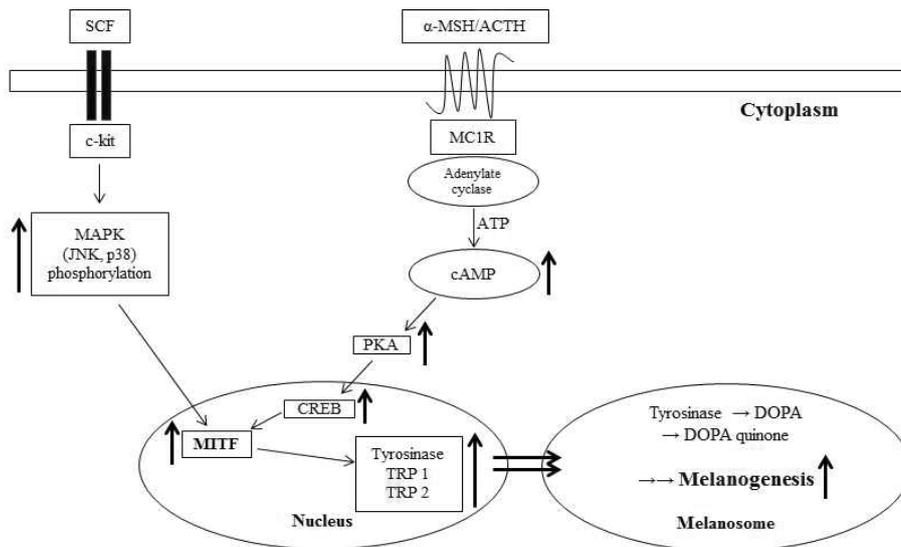


Figure 3. The mechanism of melanogenesis. Positive regulation of melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cell.

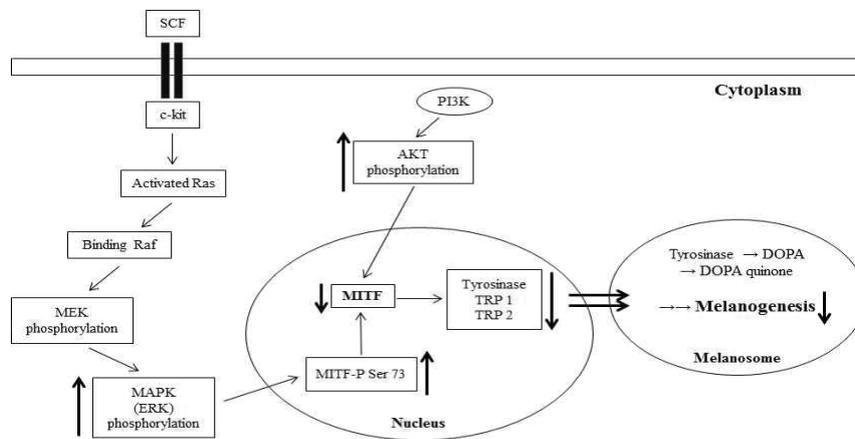
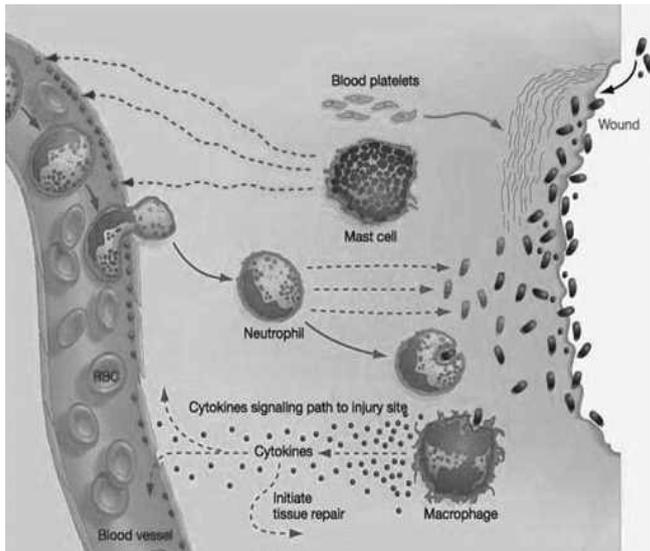


Figure 4. The mechanism of melanogenesis. Negative regulation of melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cell.

염증 (Inflammation)은 신체에 상처나 감염 등과 같은 물리, 화학적 반응이 가해질 때 손상된 부위를 통해 들어오는 외부세균 등으로부터 신체를 방어하고 손상부위를 복구시키려는 기전으로써 자극이 가해지면 손상된 조직과 세포에서 방어기작과 관련된 효소와 단백질들을 활성화시킨다(30). 이러한 염증반응으로 인해 신체의 손상된 부위는 치유될 수 있지만 지속된 염증반응은 신체조직에 손상을 가하고 때로는 암을 유발하기도 한다(31).

대식세포들은 신체조직에 자극이 가해지거나 외부로부터 침입해 온 세균 및 바이러스 등에 의해 활성화된다. 특히 그람음성균의 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 대식세포를 자극하여 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 및 mitogen activated protein kinase (MAPK) 경로와 같은 신호전달경로를 활성화시켜 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ) 및 IL-6와 같은 염증매개성 cytokine들의 분비와 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 염증반응인자들의 발현을 촉진시킨다(32,33). 다양한 포유류의 세포와 조직에서 NO는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 L-arginine로부터 생성된다. 또한 과 발현된 염증인자 및 염증매개성 cytokine들은 염증성질환인 류머티즘성관절염 (rheumatoid arthritis), 아테롬성 동맥경화증 (atherosclerosis), 당뇨병 (diabetes) 그리고 암 (cancer)등과 연관 있다고 보고되고 있다(34). 또 다른 대표적 염증반응인자인 PGE<sub>2</sub>는 대식세포 등의 세포막 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 prostaglandin으로의 변화를 촉진시키는 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 많이 발현되고 종양의 세포사멸억제와 혈관 생성유도를 통하여 종양생성에 관여한다(35,36).



1. Bacteria and other pathogens enter wound.
2. Platelets from blood release blood-clotting proteins at wound site.
3. Mast cells secrete factors that mediate vasodilation and vascular constriction. Delivery of blood, plasma, and cells to injured area increases.
4. Neutrophils secrete factors that kill and degrade pathogens.
5. Neutrophils and macrophages remove pathogens by phagocytosis.
6. Macrophages secrete hormones called cytokines that attract immune system cells to the site and activate cells involved in tissue repair.
7. Inflammatory response continues until the foreign material is eliminated and the wound is repaired.

Figure 5. Process of inflammation.

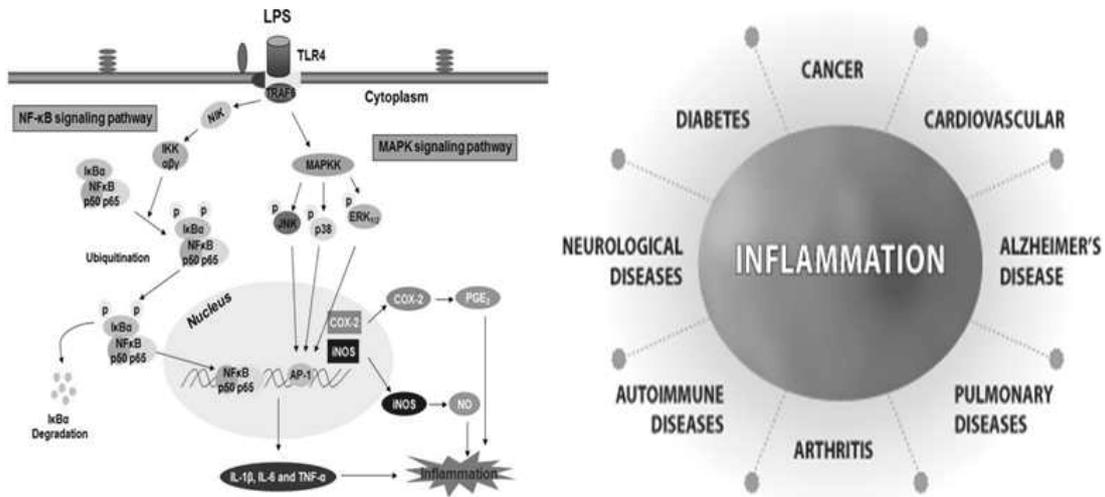


Figure 6. The mechanism of inflammation in RAW 264.7 cell, and inflammatory disorders.

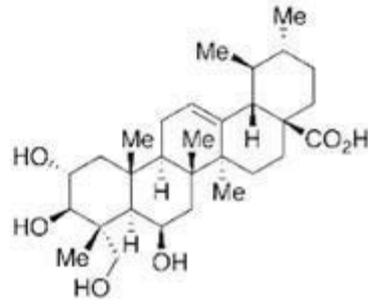
LPS로 자극된 대식세포에서 이러한 염증반응인자를 조절하는 신호전달경로로는 크게 NF- $\kappa$ B와 MAPK 경로가 있다. NF- $\kappa$ B는 일반적으로 세포질에서 inhibitor NF- $\kappa$ B (IkBa)와 결합한 상태로 활성이 없는 상태로 존재하다가 LPS 등의 자극으로 인한 인산화가 진행되고 IkBa의 degeneration이 일어나게 되면 활성을 갖고 핵 안으로 들어가 전사인자로 작용하여 iNOS, COX-2 및 염증매개 cytokine들의 합성을 증진시킨다(37,38). 따라서 NF- $\kappa$ B의 활성억제는 염증인자들의 발현을 억제할 수 있다는 것을 의미한다. 이와 같이 NO와 PGE<sub>2</sub>를 발현시키는 iNOS와 COX-2를 억제하고 염증매개성 cytokine들의 분비를 억제하는 화합물의 조사는 염증성질환치료를 위해 필요한 연구라 할 수 있다.

최근 병풀의 madecassic acid 감초의 glabridin과 같이 천연물로부터 분리된 화합물을 이용하여 효능을 연구하고 클린징, 핸드크림, 연고, 염색약, 샴푸, 린스, 화장수 등의 재형에 기능성 소재로 활용하는 사례들이 증가하고 있다(39,40). 병풀이나 감초는 예로부터 약제로 사용되고 있으며 피부염, 습진 및 항염증 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 예로부터 약제로 쓰였거나 민간요법으로 활용된 천연물로부터 분리한 화합물의 연구는 화장품에 적용할 수 있는 기능성 물질 발견의 가능성을 높여준다.

Pratol (7-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one)은 O-methylated flavone으로 붉은토끼풀 (red clover, *Trifolium pratense* L.)에서 분리한 물질이다(41). 붉은토끼풀은 쌍떡잎식물 장미목 콩과의 여러해살이풀이며 목초용으로 유럽에서 도입되어 현재 우리나라 곳곳에 야생으로 번져 자라고 있다. 제주도에 서도 목장주변이나 도로 등에서 흔히 볼 수 있는 식물이다. 예로부터 붉은토끼풀의 꽃, 잎, 줄기 모두 약제로 사용되고 있으며, 특히 꽃잎은 연고에 넣거나 물에 줄여 상처, 화상, 통풍 또는 눈병 치료에 이용되고 차로 끓여 마심으로써 해열, 기침, 천식을 완화시키는데 활용되었다(42,43).



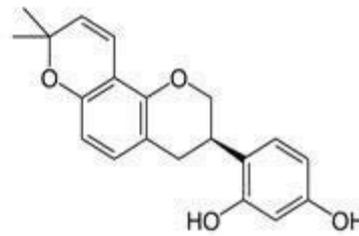
*Centella asiatica*



Madecassic acid



*Glycyrrhiza uralensis*

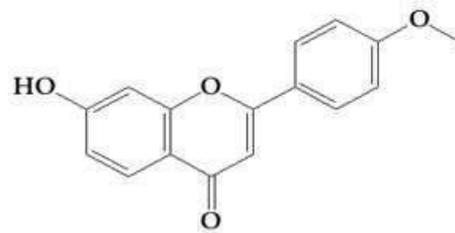


Glabridin

**Figure 7.** Pictures and structural formulas of *Centella asiatica* (Madecassic acid) and *Glycyrrhiza uralensis* (Glabridin).



*Trifolium pratense* L. (Red clover)



Pratol

**Figure 8.** Picture of *Trifolium pratense* L. and structural formula of pratol.

본 연구에서는 병풀의 Madecassic acid, 감초의 Glabridin과 같이 미백, 피부 태닝제 또는 흰머리방지과 같은 기능성 화장품에 적용할 수 있는 잠재적 물질을 찾기 위해 여러 종류의 천연물로부터 분리된 화합물들을 B16F10 melanoma 세포에 처리하여 멜라닌생성 경향 실험 (melanin contents test)을 수행하였다(Table 1). 그 결과, Pradol (7-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)chromen-4-one)에서 멜라닌생성 경향이 가장 크게 증가함을 알 수 있었고, 더 자세한 메커니즘과 영향력을 알아보기 위해 pradol을 B16F10 mouse melanoma 세포에 농도별로 처리하여 멜라닌생성 경향 실험, tyrosinase 활성 실험 (tyrosinase activity test) 그리고 멜라닌생성 연관 경로확인 실험을 수행하였다. 또한 pradol의 다른 활성효과를 확인하기 위해 실험들을 진행해본 결과 항염증 가능성을 확인하였다. Pradol의 항염증효과에 대한 연구가 아직 진행되지 않았음을 확인했고 따라서 항염증 활성을 확인하기 위해 다양한 농도의 pradol을 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에 처리하여 NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS 및 COX-2와 같은 cytokine들의 발현에 어떠한 영향을 주는지를 조사함과 동시에 western blot 실험을 진행하여 염증억제경로를 확인해 보았다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 pratol은 Extrasynthese (Genay CEDEX, France)에서 구입하였다. DMEM, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid BCA kit 그리고 ERK 억제제인 PD98059는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고 Dimethyl sulfoxide (DMSO),  $\alpha$ -MSH, NaOH, MTT, radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, PKA 억제제인 H-89, 그리고 NF- $\kappa$ B 억제제인 ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC)를 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. PGE<sub>2</sub> 및 전염증성 cytokines은 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 그리고 MITF의 primary antibody들은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터 구입하였다. p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, p-AKT, AKT 그리고  $\beta$ -actin antibody들은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. JNK 억제제인 SP600125와 p38 억제제인 SB203580는 각각 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)과 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) kit와 2 $\times$  Laemmli sample buffer는 각각 Biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)와 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하여 실험을 진행하였다.

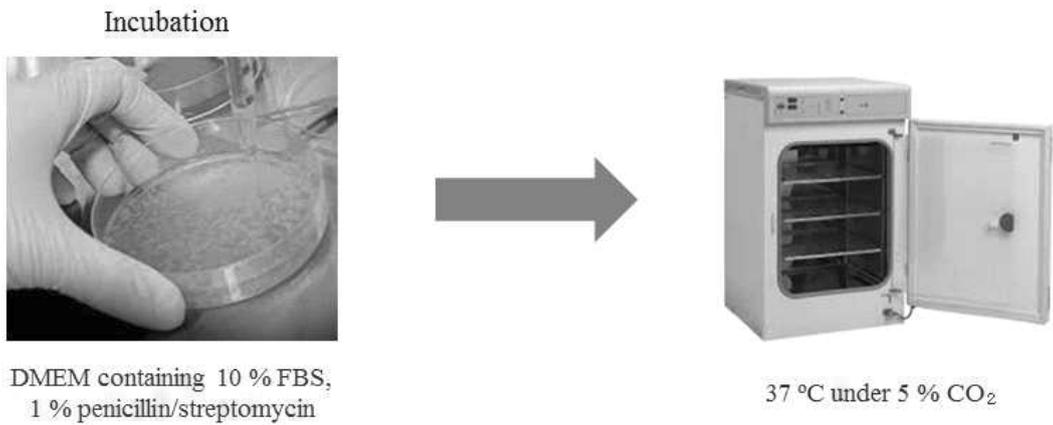
## 2. 세포 배양 및 세포독성평가

### 2.1. 세포배양

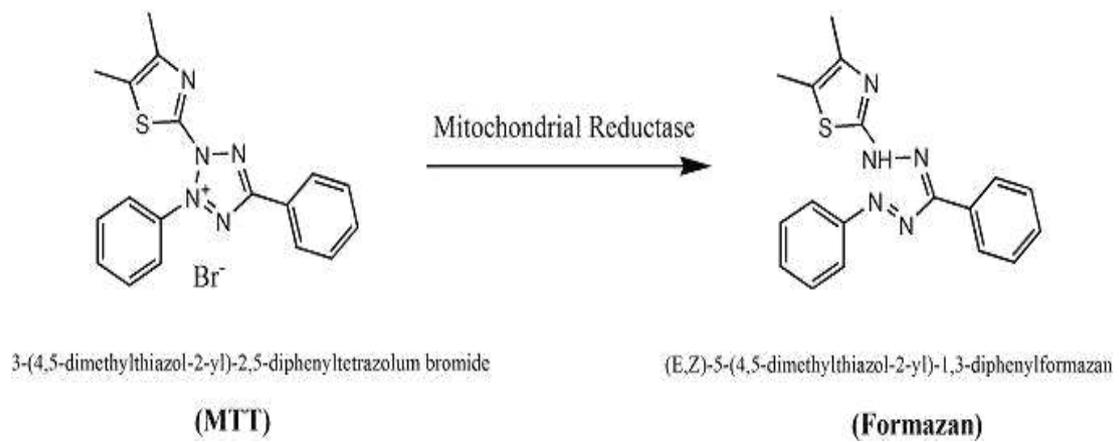
멜라닌생성실험에 사용된 B16F10 mouse melanoma 과 항염증실험에 사용된 RAW 264.7 세포들을 한국 세포주 은행 (Koeran Cell Line Bank)를 통해 구입하였다. 세포들을 1 % penicillin과 10 % fetal bovine serum (FBS)가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) 배지에 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건을 갖춘 incubator에서 배양하였다.

### 2.2. 세포독성평가

시료가 세포생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT 실험을 수행하였다. MTT 실험은 살아있는 세포 내 mitochondria의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 자주색을 띠는 비수용성의 formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용한 검사법이다. 즉 흡광도가 높게 나올수록 살아있는 세포가 많다는 것을 의미한다(28). B16F10과 RAW 264.7 세포를 1 % penicillin과 10 % FBS가 포함된 DMEM 배지에 24시간 동안 배양하였다. 각각의 well당 B16F10 ( $2.0 \times 10^4$  cells/well) 및 RAW 264.7 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well)만큼 24 well plate에 분주하고 48시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 상층액을 제거하고 DMEM 배지로 MTT시약을 (0.5 g/L) 농도로 희석하여 각각의 well에 400  $\mu$ L 씩 넣고 3시간 동안 처리하였다. 그런 다음 상층액을 제거하고 formazan crystals에 DMSO를 넣어 1시간 동안 실온에서 녹인 뒤 96 well plate에 옮겨 담아 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Swizerland)기를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.



**Figure 9.** Process of cell culture.



**Figure 10.** Principle of MTT assay.

### 3. Melanoma cell 세포 내에서 Pradol의 멜라닌 생성

#### 3.1. Melanin contents 측정

B16F10 mouse melanoma 세포를 6 well plate에 각 well 당 ( $5.0 \times 10^4$  cells/well)로 분주하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후 다양한 농도의 pradol (6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M)을 처리하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지가 쓰였고 양성대조군으로는  $\alpha$ -MSH (100 nM)만 처리하였다. 샘플들을 처리한 후 48시간 뒤, 상층액을 제거하고 각 well당 10 % DMSO가 첨가된 1 N NaOH를 1 mL 씩 넣고 70 °C에서 1시간동안 처리하였다. 그런 다음 각 well의 용액을 200  $\mu$ L 씩 96 well plate에 옮겨 담고 microplate reader기를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 bicinchoninic acid (BCA) 단백질 정량 kit를 사용하여 정량하였다.

#### 3.2. 세포내 tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포를 100 mm dish에 ( $1.0 \times 10^5$  cells/well)로 각각 분주 한 후, 48시간 동안 incubator에서 배양하였다. 그런 다음 pradol을 (6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M)로 각각의 dish에 처리하였고 양성대조군으로는  $\alpha$ -MSH (100 nM)과 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 제거해 주고 트립신을 처리하여 세포들을 dish에서 떼어 conical tube에 옮겨 담아  $11,000 \times g$ , 3분 동안 원심분리를 해 하였다. 상층액을 제거하고 가라앉은 세포에 RIPA buffer와 protease inhibitor cocktail (1.0 %)를 각각 처리하여 세포들을 용해시켰다. 세포 용해물을 1시간 동안 10분마다 vortexing 해주고 10분 동안  $13000 \times g$  으로 원심분리 해 주었다. 원심분리 후 상층액을 걷어 BCA protein assay로 단백질을 정량하였고 RIPA buffer로 희석하여 단백질농도를 맞춘 샘플들을 만들었다. 96 well plate 각 well에 이 샘플 20  $\mu$ L 와 L-DOPA (2 mg/mL) 80  $\mu$ L를 넣고 37 °C에서 2시간동안 배양한 후, microplate reader기를 사용하여 490 nm에서 흡광도를

측정하였다.

### 3.3. Western Blot 분석

B16F10 세포를 100 mm dish에 ( $1.0 \times 10^5$  cells/well)로 각각 분주한 뒤 48시간 동안 배양해 주었다. Pradol을 농도별로 (6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M) 처리하고 대조군으로는  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 처리하여 배양하였다. 세포들을 떼어 protease inhibitor cocktail (1.0 %)를 함유하고 있는 RIPA buffer를 넣고 1시간 동안 10분마다 vortexing을 하면서 세포들을 용해시켰다. 1300  $\times$  g으로 원심분리를 하고 상층액을 다른 e-tube에 옮겨 담은 후 BCA protein assay로 단백질 정량을 하였다. Western sample을 만들기 위해 20  $\mu$ g 으로 정량된 단백질과 2 $\times$  Laemmli sample buffer를 1:1 비율로 섞어준 다음 5분간 100  $^{\circ}$ C에서 끓였다. 샘플을 4  $^{\circ}$ C에서 식힌 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels에 각 lane 마다 샘플 20  $\mu$ L씩 넣고 1시간동안 loading하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane에 옮기고 Tris-buffered saline containing 0.4 % Tween 20 (TBST)로 녹인 5 % non-fat skim milk로 membrane의 단백질을 1시간 동안 blocking 하였다. 그 후, primary antibody를 1:1000 비율로 녹인 skim milk에 membrane을 24시간 동안 반응시켰다. TBST로 10분마다 6번 세척해준 뒤, 1:3000 비율로 TBST에 녹인 secondary antibody를 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 10분마다 6번 세척한 뒤 Enhanced chemiluminescence (ECL) kit를 사용하여 각각의 단백질밴드를 검출하였다.



Figure 11. Process of melanin contents test.

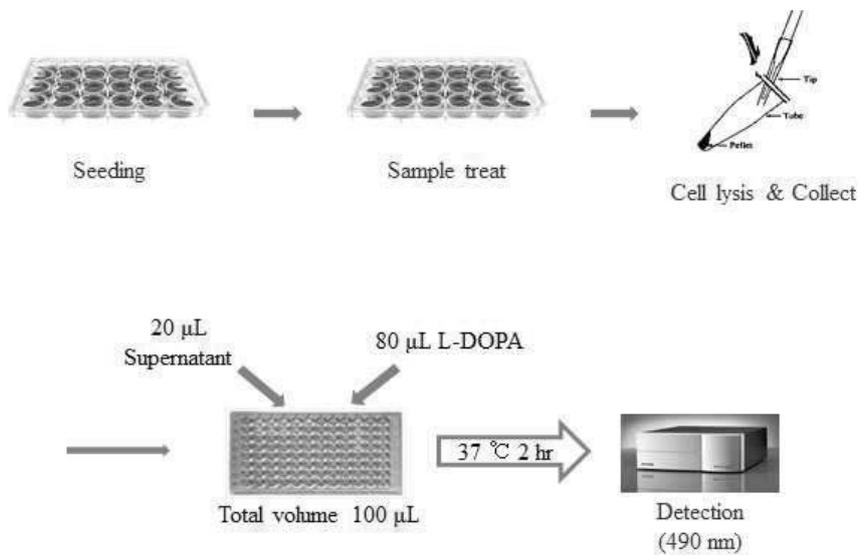


Figure 12. Process of tyrosinase activity test.

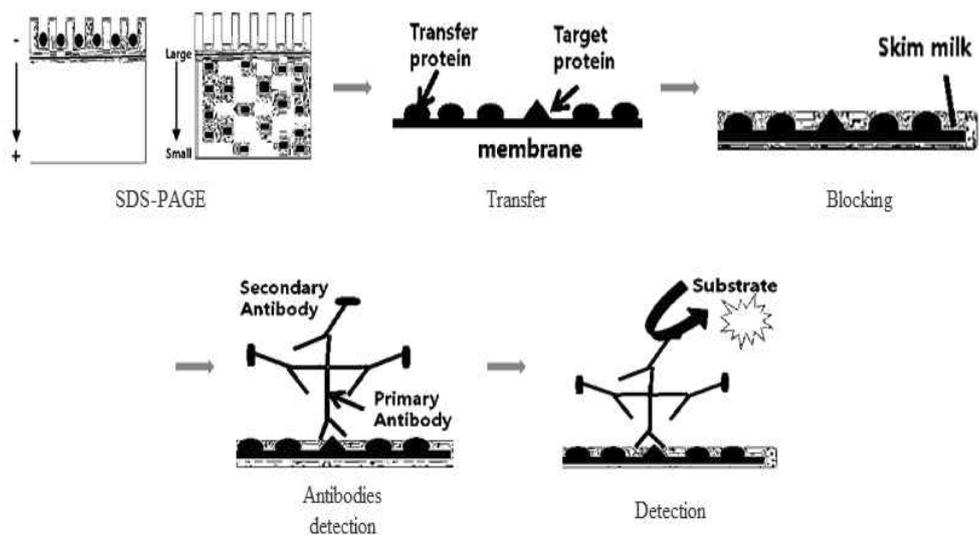


Figure 13. Principle of western blot assay.

## 4. RAW 264.7 세포 내 항염증 활성 측정

### 4.1. NO 생성 억제 측정

RAW 264.7 세포를 1 % penicillin과 10 % FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 24 well plate에 각 well당 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well)로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 다양한 농도로 희석된 pratol (25, 50, 100  $\mu$ M)과 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지와 LPS (1  $\mu$ g/mL)와 25  $\mu$ M APDC를 동시에 처리한 배지를 사용하였다. 그런 다음 각 well의 상층액 100  $\mu$ L와 Griess시약 100  $\mu$ L를 96 well plate에 혼합하여 빛을 차단한 상태에서 1시간동안 반응시킨 후 550 nm에서 microplate reader기를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

### 4.2. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 억제 측정

RAW 264.7 세포를 각 well당 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well)로 24 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 다양한 농도의 pratol (25, 50, 100  $\mu$ M)과 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 동시 처리한 배지 50  $\mu$ L를 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지와 LPS (1  $\mu$ g/mL)만 처리한 것, 그리고 LPS와 25  $\mu$ M APDC를 동시에 처리한 배지가 쓰였다. 24시간 후 배양액을 10,000 rpm에서 3분 동안 원심분리한 뒤 상층액을 걷어 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit를 사용하여 각 농도별 PGE<sub>2</sub> 함량을 측정하였다.

### 4.3. 염증매개성 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) 억제 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate 각 well에 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well)로 분주하고 24시간 동안 배양 하였다. 그 후, 다양한 농도의 pratol (25, 50, 100  $\mu$ M)과 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 동시 처리한 배지 50  $\mu$ L를 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하

였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지와 LPS (1 µg/mL)만 처리한 것, 그리고 LPS와 25 µM APDC를 동시에 처리한 배지를 사용하였다. 24 시간 후 배양액을 10,000 rpm에서 3분 동안 원심분리한 뒤 상층액을 걷어 mouse enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 각 농도별 염증매개성 cytokine들의 함량을 측정하였다.

#### 4.4. Western blot 분석

RAW 264.7 세포를 100 mm dish에 ( $1.5 \times 10^6$  cells/well)로 각각 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 다양한 농도의 pratol (25, 50, 100 µM)을 처리하고 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지와 LPS (1 µg/mL)만 처리한 것, 그리고 LPS와 25 µM APDC를 동시에 처리한 배지를 사용하였다. 세포들을 떼어 protease inhibitor cocktail (1.0 %)를 함유하고 있는 RIPA buffer를 넣고 1시간 동안 10분마다 vortexing을 하면서 세포들을 용해시켰다. 15분간  $1300 \times g$ 으로 원심분리를 해주고 상층액을 다른 e-tube에 옮겨 담은 후 BCA protein assay로 단백질 정량을 해주었다. Western sample을 만들기 위해 20 µg 으로 정량된 단백질과 2× Laemmli sample buffer를 1:1 비율로 섞어준 다음 5분간 100 °C에서 끓여 주었다. 샘플을 4 °C에서 식힌 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels에 각 lane 마다 샘플 20 µL씩 넣고 1시간 동안 loading해 주었다. 분리된 단백질들을 polyvinylidene difluoride membrane에 옮겨주고 Tris-buffered saline containing 0.4 % Tween 20 (TBST)로 녹인 5 % non-fat skim milk로 membrane의 단백질들을 1시간 동안 blocking 해 주었다. 그 후, primary antibody를 녹인 skim milk에 membrane을 24시간 동안 반응시켰다. TBST로 10분마다 6번 세척해준 뒤, 1:3000 비율로 TBST에 녹인 secondary antibody를 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 10분마다 6번 세척해준 뒤 Enhanced chemiluminescence (ECL) kit를 사용하여 각각의 단백질밴드를 검출하였다.

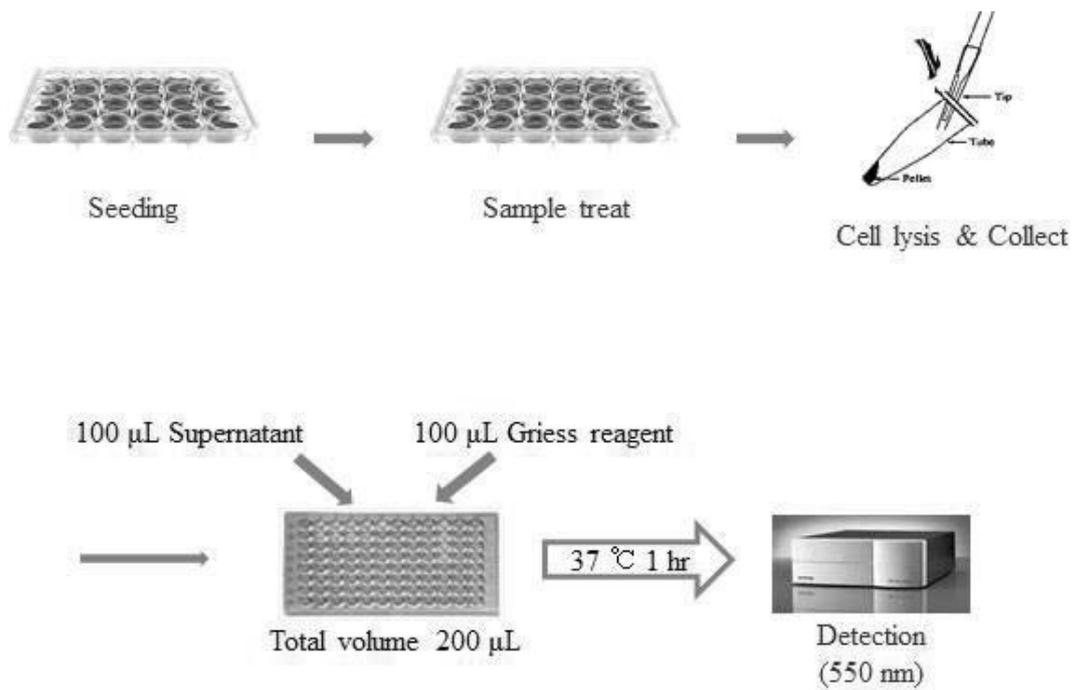


Figure 14. Process of NO production test.

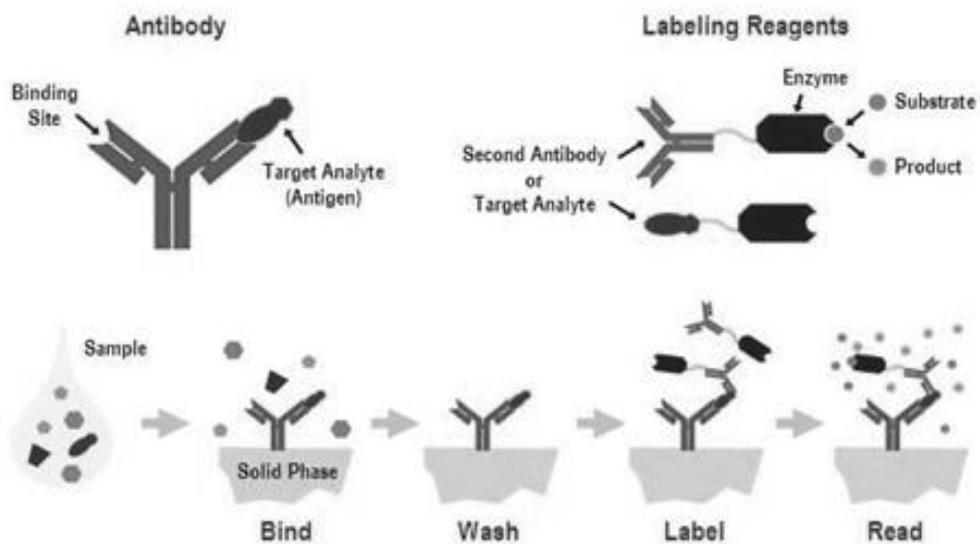


Figure 15. Principle of ELISA assay.

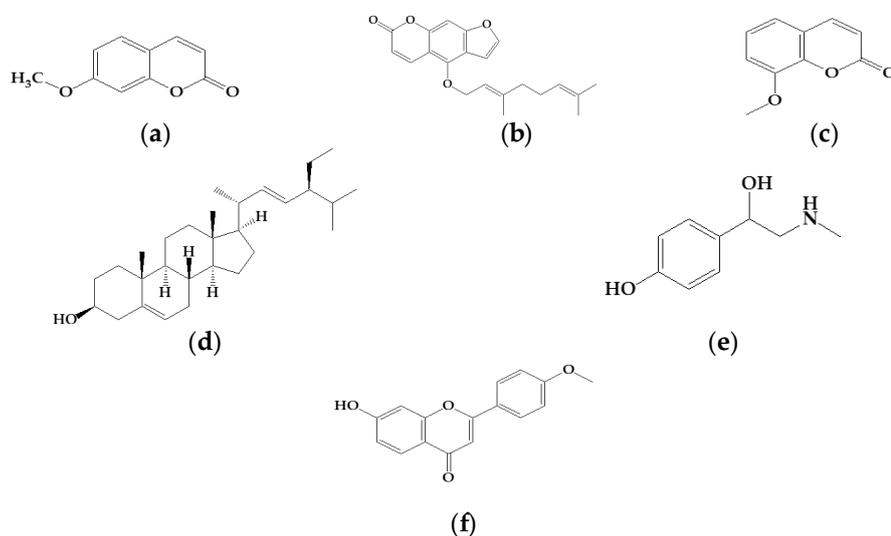
## 5. 통계처리

모든 실험결과들은 student's *t*-test를 사용하여  $p$ -values < 0.05 경우는 (\*),  $p$ -values < 0.01인 경우는 (\*\*)로 통계적으로 유의하다고 표시하였다. 각각의 결과들은 세 번의 독립적인 실험의 평균  $\pm$  SD로 나타내었다.

### III. 결 과

#### 1. B16F10 세포에서 멜라닌생성 및 세포생존에 대한 화합물들의 영향

최근 천연물로부터 분리 된 화합물을 이용하여 효능을 연구한 후 기능성소재로 화장품 재형에 적용하는 사례가 많이 이루어지고 있다. 따라서 본 실험에서는 미백이나 태닝제 또는 흰머리방지과 같은 기능성화장품에 적용할 수 있는 잠재적 물질을 찾기 위해 다음과 같이 천연물로부터 분리 된 화합물들을 B16F10 melanoma 세포에 처리하여 melanin contents 실험을 진행하였다(Figure 16).



**Figure 16.** Structural formula of (a) 7-methoxycoumarin (7-methoxychromen-2-one); (b) bergamottin ((E)-4-[3,7-dimethyl-2,6-octadien-yl]oxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one); (c) 8-methoxycoumarin; (d) stigmasterol ((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(E,2R,5S)-5-ethyl-6-methyl-hept-3-en-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol); (e) synephrine (4-[1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl]-phenol); (f) pratol

Table 1의 결과로 보아, pratol에서 멜라닌생성이 가장 크게 증가함을 알 수 있었다. 따라서 추가 실험에서는 pratol이 B16F10 세포에서 멜라닌생성과 멜라닌 생성 관련 단백질들의 발현을 어떻게 자극하는지에 대해 조사하였다.

**Table 1.** Effects of some natural compounds on melanin production and the viability of B16F10 melanoma cells.

| Compound          | Concentration ( $\mu\text{M}$ ) | Melanin Content (%) | Cell Viability (%) |
|-------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------|
| 7-Methoxycoumarin | 12.5                            | 108.5               | 99.7               |
|                   | 25                              | 100.7               | 89.4               |
|                   | 50                              | 96.5                | 93.2               |
|                   | 100                             | 87.6                | 95.2               |
| Bergamottin       | 12.5                            | 101.2               | 100.9              |
|                   | 25                              | 97.3                | 104.4              |
|                   | 50                              | 79.2                | 110.9              |
|                   | 100                             | 85.5                | 68.8               |
| Synephrine        | 12.5                            | 102.7               | 102.0              |
|                   | 25                              | 100.2               | 96.2               |
|                   | 50                              | 96.8                | 98.3               |
|                   | 100                             | 116.1               | 98.1               |
| Stigmasterol      | 12.5                            | 100.0               | 99.1               |
|                   | 25                              | 97.0                | 96.4               |
|                   | 50                              | 105.0               | 98.2               |
|                   | 100                             | 117.3               | 101.3              |
| 8-Methoxycoumarin | 12.5                            | 103.7               | 103.4              |
|                   | 25                              | 112.1               | 105.5              |
|                   | 50                              | 115.7               | 99.3               |
|                   | 100                             | 130.3               | 98.1               |
| Pratol            | 6.25                            | 99.2                | 101.0              |
|                   | 12.5                            | 108.9               | 99.2               |
|                   | 25                              | 176.2               | 92.1               |
|                   | 50                              | 208.7               | 88.4               |

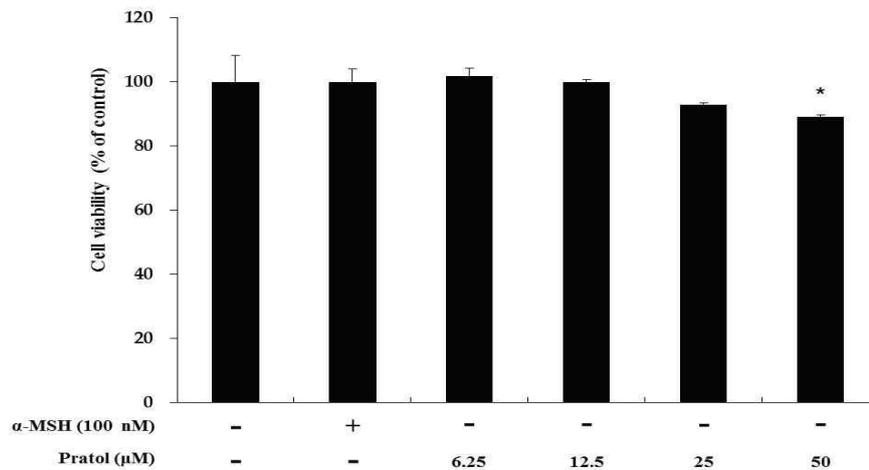
## 2. B16F10 세포에서 세포생존 및 멜라닌생성에 관한 pratol 영향

### 2.1. B16F10 세포내에서 pratol의 세포 생존율

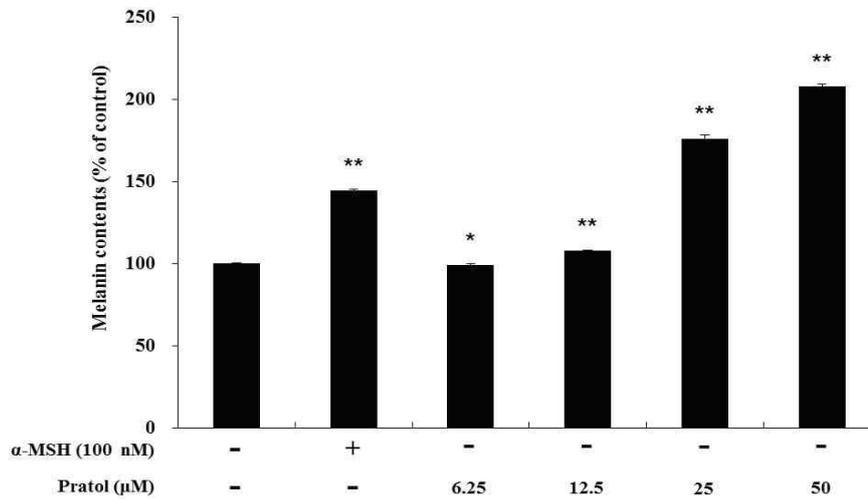
다음과 같은 농도의 pratol을 B16F10 세포에 처리했을 시 세포생존이 가능한지를 알아보기 위해 MTT실험을 수행하였다. Pratol을 농도별 (6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M)로 B16F10세포에 각각 처리하였고 양성대조군으로는  $\alpha$ -MSH (100 nM) 그리고 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 배지 DMEM을 사용하여 48시간 동안 배양하였다. MTT실험 결과, pratol의 세포생존율은 처리한 농도 내에서 큰 변화가 없었고, 따라서 이 농도 내에서는 세포독성이 실험결과에 큰 영향을 미치지 않았다(Figure 17a).

### 2.2. B16F10 세포내에서 pratol의 melanin contents

Pratol이 멜라닌합성에 미치는 경향을 알아보기 위해 다양한 농도의 pratol (6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M)을 그리고 대조군으로 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지, 양성대조군으로는  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 48시간 동안 세포에 처리하여 melanin contents 실험을 진행하였다. 그 결과, 멜라닌합성을 대조군과 비교해보면 양성대조군 ( $\alpha$ -MSH 100 nM)은 50 % 증가함을 보였고 고농도 (50  $\mu$ M)가 처리된 pratol에서는 대조군보다 108 % 증가함을 보였다. 또한 농도별로 처리했을 시 처리한 농도에 따라 멜라닌생성이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 17b). 따라서 이러한 결과는 pratol이 고농도로 갈수록 B16F10 세포에서 멜라닌합성을 증가시킨다는 것을 보여주고 있다.



(a)

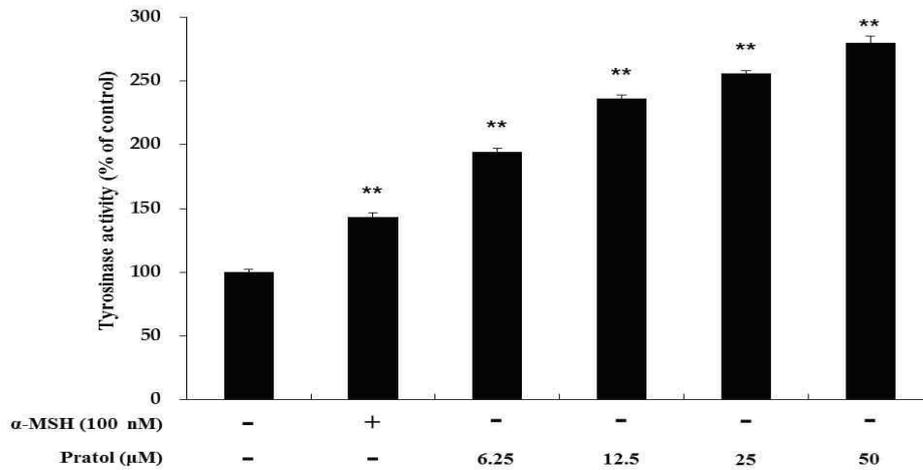


(b)

**Figure 17. Effects of pratol on melanin production and the viability of B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with pratol (6.25, 12.5, 25, or 50 μM) for 48 h. α-MSH (100 nM) was used as the positive control. (a) Cell viability and (b) melanin content are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. The data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments. \* indicates  $p < 0.05$ , whereas \*\* indicates  $p < 0.01$ .

### 2.3. B16F10 세포내에서 pratol의 tyrosinase 활성

Tyrosinase는 멜라닌합성에 필요한 효소로 잘 알려져 있다(5). 따라서 tyrosinase 활성실험을 통해 pratol이 B16F10 세포에서 tyrosinase발현과 활성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. B16F10 세포에 pratol (6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M)을 농도별로 각각 처리하고, 대조군 그리고 양성대조군을 처리한 결과 고농도로 갈수록 tyrosinase활성이 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 특히 고농도의 pratol처리 시 대조군과 비교하여 40 % 증가한 양성대조군 ( $\alpha$ -MSH 100 nM)보다 훨씬 큰 170 % 증가를 보였다(Figure 18). 이와 같은 결과를 통해, pratol은 멜라닌합성에 필요한 효소인 tyrosinase의 활성을 증가시켜 멜라닌생성을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다.



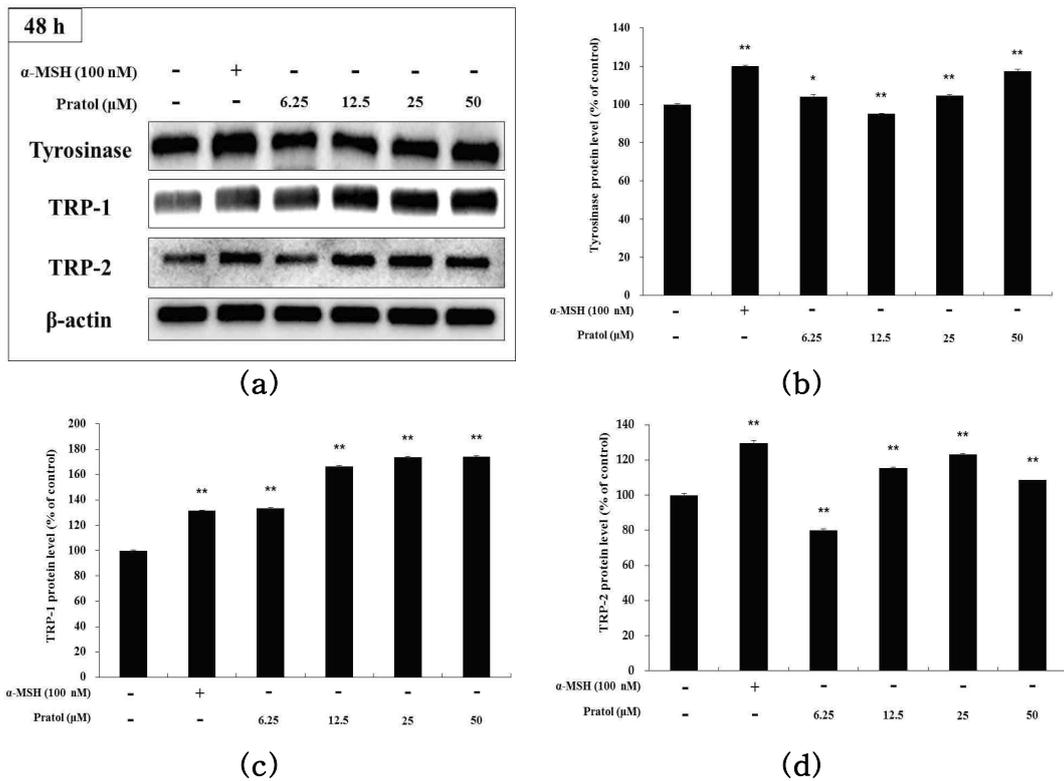
**Figure 18. Effect of pratol on tyrosinase activity.** B16F10 cells were treated with pratol (6.25, 12.5, 25, or 50  $\mu$ M)  $\alpha$ -MSH (100 nM) used as the positive control. The results are expressed as percentages compared to the value obtained for the control cells. The data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \*\* indicates  $p < 0.01$ .

## 2.4. Western blot 분석

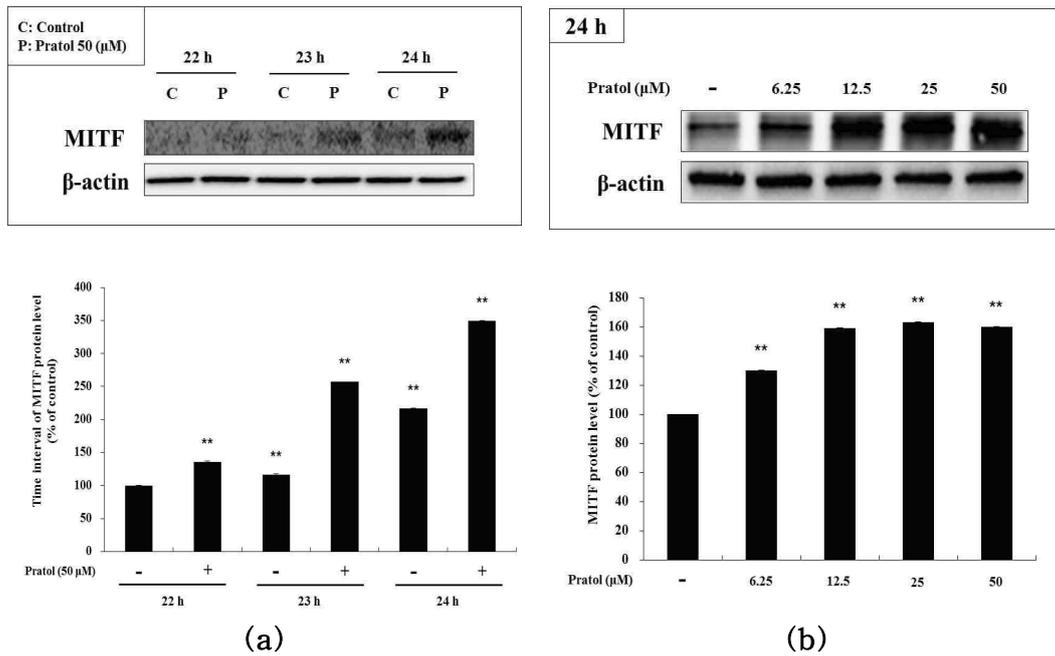
### 1) B16F10 세포에서 pratol의 멜라닌생성 관련 효소들과 MITF 발현

Tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2는 멜라닌생성에 중요한 역할을 하는 효소들이다(24). MITF는 tyrosinase의 M-box 라고 불리는 프로모터에 결합하여 tyrosinase 및 멜라닌 생성 관련 효소들의 발현을 유도함으로써 그 활성을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다(6-8). 따라서 pratol의 멜라닌생합성자극이 이러한 메커니즘을 통해 일어나는 것인지를 증명하기 위해 각 농도별에 따른 MITF와 tyrosinase 그리고 멜라닌관련 효소들의 단백질 발현 양을 비교하였고 실험은 western blot 분석법을 사용하여 수행하였다.

Figure 19에서 보이는 것과 같이, B16F10 세포에 pratol을 다양한 농도로 처리한 후 tyrosinase 및 TRP-1,2의 단백질발현 양을 확인한 결과 유의적으로 증가하고 있음을 알 수 있었다. Tyrosinase와 TRP-1,2의 전사조절을 좀 더 이해하기 위해 pratol이 MITF 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Figure 20a는 가장 고농도의 pratol을 처리했을 시 시간에 따른 MITF의 발현 양을 나타낸 것이고 figure 20b는 24시간동안 pratol 처리 시 농도별 MITF의 발현 양을 나타낸 것이다. Figure 20a에 따르면 pratol은 시간이 증가할수록 MITF의 발현 양을 증가시키고 24시간 처리 시 가장 높은 발현을 보임을 확인할 수 있다. 또한 figure 20b의 결과는 pratol을 24시간 처리 시 배지만 처리한 대조군보다 MITF의 발현양이 크게 증가하는 것을 보여주고 있다. 따라서 이와 같은 결과를 통해 pratol은 B16F10 세포에서 MITF의 발현을 자극하여 tyrosinase 및 멜라닌생성 관련 단백질들의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있다.



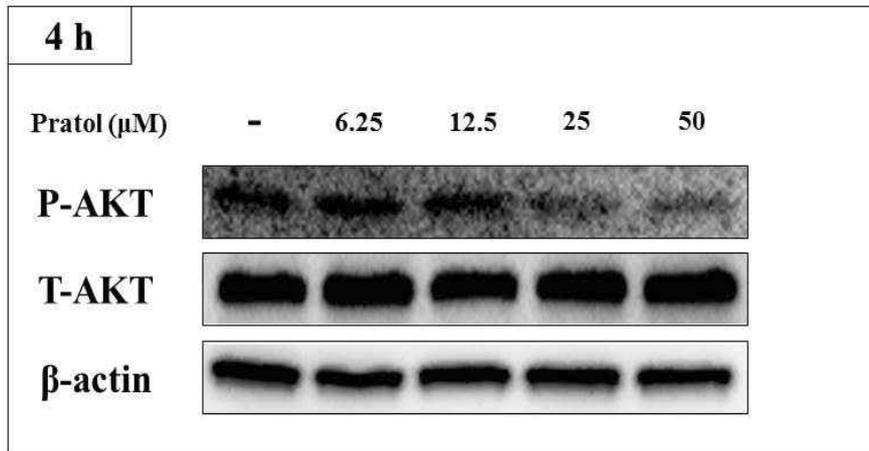
**Figure 19. Effect of pratol on TRP-1, TRP-2, and tyrosinase expression in B16F10 cells.** Cells were treated with various concentrations of pratol (6.25, 12.5, 25, or 50 μM) for 48 h. Protein levels were examined by western blotting. (a) Result of western bolting, and protein level of (b) tyrosinase; (c) TRP-1 and (d) TRP-2. Results are expressed as a percentage of the control. The data are presented as mean ± SD of at least three independent experiments. \* indicates  $p < 0.05$ , whereas \*\* indicates  $p < 0.01$ .



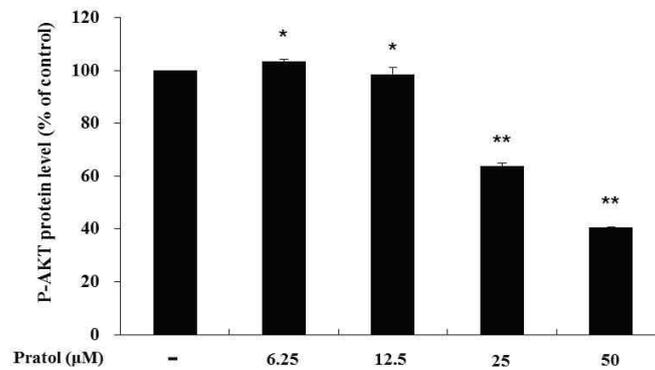
**Figure 20. Effect of pratol on MITF expression in B16F10 cells.** (a) Cells were treated with pratol (50  $\mu$ M) at different time intervals; (b) Cells were treated with various concentrations of pratol (6.25, 12.5, 25, or 50  $\mu$ M) for 24 h. Protein levels were examined by western blotting. Results are expressed as a percentage of the control. The data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \*\* indicates  $p < 0.01$ .

## 2) B16F10 세포내에서 pratol의 AKT 인산화 저해

선행된 연구들에 따르면 AKT 신호전달 경로는 AKT의 인산화를 통해 멜라닌 생성을 조절하는 것으로 보고되었다(18,19). 또한 최근 진행된 연구결과들은, AKT의 인산화는 MITF를 인산화 하여 멜라닌생성을 감소시킨다는 것을 보여주고 있다(16,17). 따라서 멜라닌생성 증가를 보이고 있는 pratol이 B16F10 세포의 AKT 신호전달경로에서 AKT 인산화에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 western blot 실험을 진행하였다. Western blot 실험결과, pratol은 농도 의존적으로 AKT의 인산화를 저해하는 것을 확인할 수 있고, 특히 50  $\mu$ M의 고농도에서는 명확하게 AKT의 인산화를 저해하는 것을 볼 수 있다(Figure 21). 이러한 결과를 토대로 pratol은 AKT의 인산화를 저해하여 멜라닌생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있다.



(a)



(b)

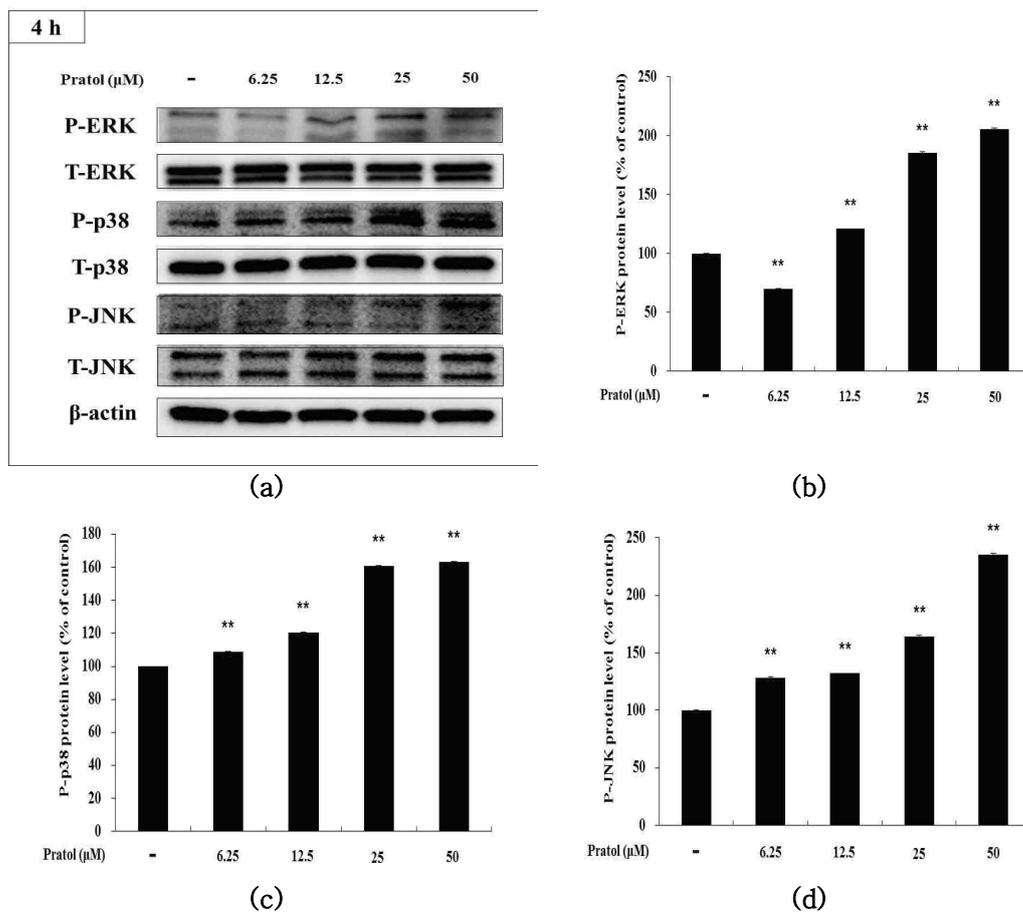
**Figure 21. Effects of pratol on AKT phosphorylation.** B16F10 cells were treated with various concentrations of pratol (6.25, 12.5, 25, or 50  $\mu\text{M}$ ) for 4 h. (a) Protein expression levels were investigated by western blotting; (b) Results are expressed as a percentage of the control. The data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \* indicates  $p < 0.05$ , whereas \*\* indicates  $p < 0.01$ . P: Phosphorylated, T: Total.

### 3) MAPK에서 pratol에 의한 p-ERK, p-p38 그리고 p-JNK의 증가

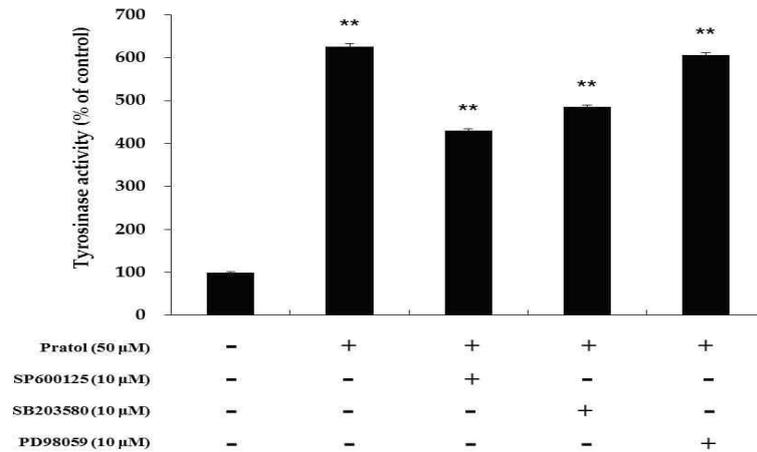
최근 연구에 따르면 MAPK 신호전달경로는 멜라닌생성과정과 관련 있다고 보고되고 있다 (9-11). 따라서 pratol이 B16F10 세포에서 p38 MAPK, ERK 및 JNK의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 western blot 실험을 통해 인산화정도를 확인해 보았다. Figure 22에 보이는 것과 같이, pratol은 p38 MAPK, ERK 및 JNK의 인산화를 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 MAPKs들이 B16F10 세포에서 tyrosinase 활성증가와 연관이 있는지 확인하기 위해 p38, JNK, ERK 억제제인 SB203580, SP600125, PD98059를 각각 10  $\mu$ M 씩 처리하여 tyrosinase 활성실험을 수행하였다. Figure 23a의 결과를 보면, pratol 50  $\mu$ M로 자극시킨 B16F10 세포에 SB203580 (p38 억제제)와 SP600125 (JNK 억제제)를 처리했을 시 pratol을 단독으로 처리한 것보다 tyrosinase 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 pratol이 p38과 JNK의 활성과 연관되어 tyrosinase의 양성조절을 유도하고 있다는 것을 보여준다.

### 4) PKA 의존 신호 경로를 통한 pratol의 멜라닌생성 유도

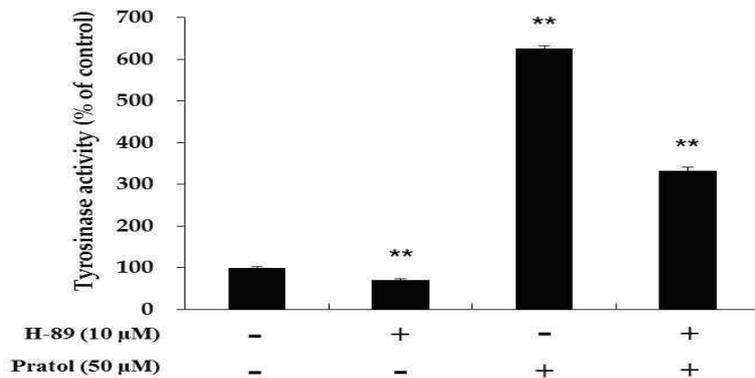
PKA 활성화에 의한 CREB의 인산화는 MITF의 전사를 유도하는 중요한 신호이다 (12,13). 따라서 pratol이 이러한 신호전달과정으로 인한 멜라닌생성에 영향을 주는지를 알아보기 위해 B16F10 세포에 pratol 50  $\mu$ M을 처리 또는 처리하지 않고 PKA 억제제인 H-89를 각각 처리해 보았다. 그 결과 figure 23b를 보면, pratol 과 H-89를 동시에 처리했을 시 tyrosinase 활성이 H-89를 처리하지 않았을 때 보다 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 pratol은 PKA 의존신호경로를 통해 직접적으로 tyrosinase 활성을 증진 시키고 멜라닌관련 단백질들의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있다.



**Figure 22.** Effects of pratol on the phosphorylation of p-ERK, p-p38, and p-JNK. B16F10 cells were treated with pratol at the indicated concentrations for 4 h. (a) Result of western blotting, and protein level of (b) p-ERK, (c) p-p38 and (d) p-JNK. The data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \*\* indicates  $p < 0.01$ . P: Phosphorylated, T: Total.



(a)



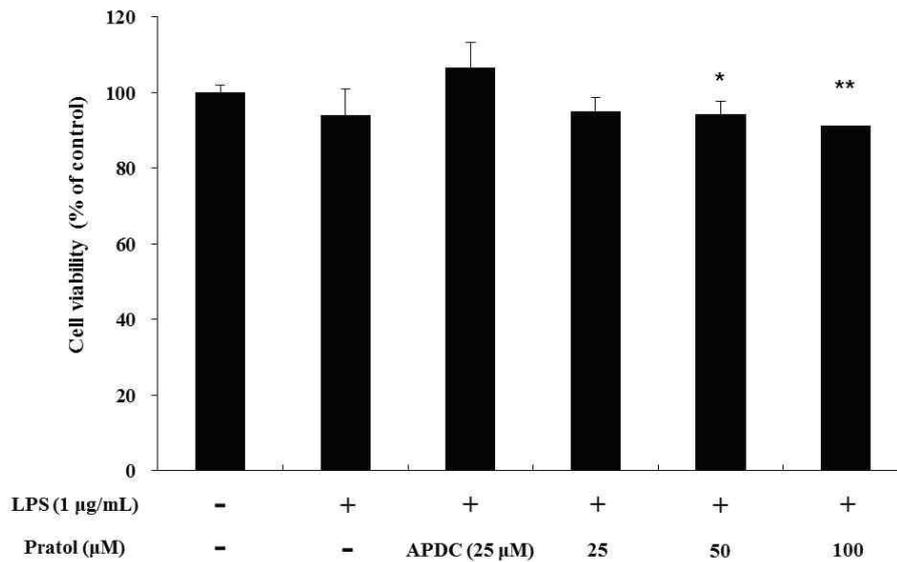
(b)

**Figure 23. Effect of MAPK inhibitors on pratol-induced tyrosinase activation in B16F10 cells.** To determine the involvement of MAPK enzymes in melanogenesis, a cellular tyrosinase activity assay was conducted using the following MAPK inhibitors: (a) SP600125 (JNK inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), and PD98059 (ERK inhibitor). To observe the involvement of the cAMP pathway in melanogenesis; (b) a H-89 (PKA inhibitor) was subjected to a cellular tyrosinase activity assay. The data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \*\* indicates  $p < 0.01$ .

### 3. RAW 264.7 세포내에서 pratol이 항염증 활성에 미치는 영향

#### 3.1. RAW 264.7 세포내에서 pratol의 세포 생존율

Pratol을 RAW 264.7 세포에 처리했을 시 세포생존이 가능한 농도를 찾기 위해 MTT 실험을 수행하였다. Pratol을 (25, 50, 100  $\mu$ M) 농도로 세포에 처리하였고 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지와 LPS (1  $\mu$ g/mL)만 처리한 것, 그리고 LPS와 25  $\mu$ M APDC를 동시에 처리한 배지를 써서 48시간동안 배양하였다. MTT 실험 결과, pratol의 세포생존율은 처리한 농도 내에서 큰 변화가 없었다(Figure 24). 따라서 이 농도 내에서는 세포독성이 실험결과에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주고 있다.



**Figure 24.** Effects of pratol on the viability of RAW 264.7 cells. The cells were treated with pratol (25, 50, or 100 µM) for 48 h. Cell viability is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. The data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least three independent experiments. \* indicates  $p < 0.05$ , whereas \*\* indicates  $p < 0.01$ .

### 3.2. RAW 264.7 세포내에서 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성억제에 대한 pratol의 영향

#### 1) Pratol의 NO 생성억제

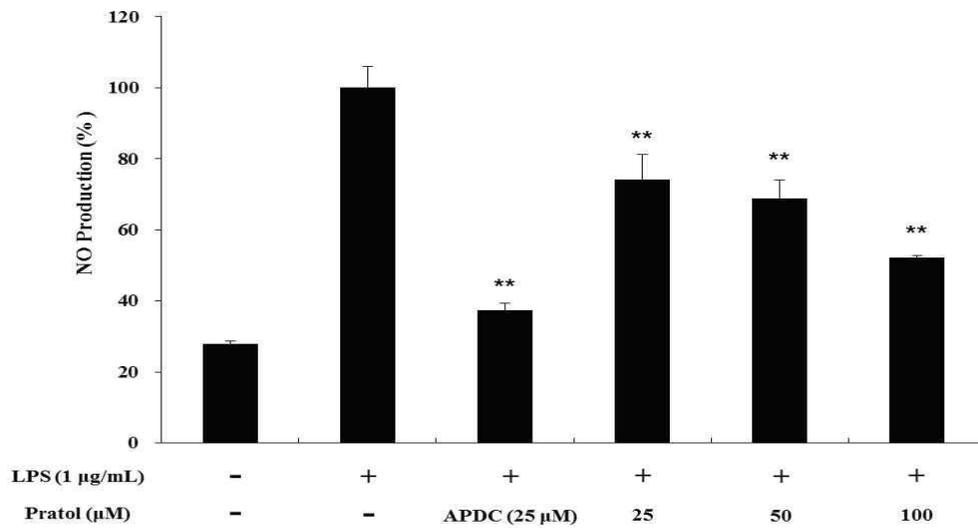
RAW 264.7 세포에 독성을 갖지 않는 범위의 pratol 농도 (25, 50, 100  $\mu$ M)을 처리하였고 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지와 LPS (1  $\mu$ g/mL)만 처리한 것, 그리고 LPS와 25  $\mu$ M APDC를 동시에 처리한 배지를 사용하여 24시간동안 배양하였다. 그 결과, LPS단독 처리했을 시 NO의 생성을 유도하였고, inhibitor인 APDC는 NO의 생성을 60 % 이상 억제함을 확인할 수 있었다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 pratol을 농도별 처리한 것과 LPS 단독 처리 했을 시를 비교해 보면, 고농도 (100  $\mu$ M)에서 NO의 생성을 45 % 이상 억제하는 것으로 나타나 높은 NO생성 억제를 보였다(Figure 25a).

#### 2) Pratol의 PGE<sub>2</sub> 생성억제

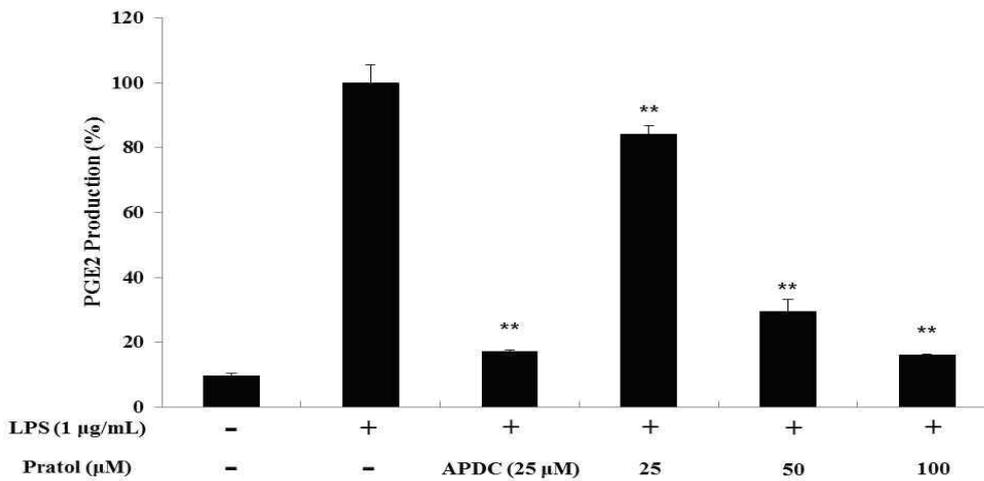
위와 동일한 조건에서 PGE<sub>2</sub> ELISA kit를 사용하여 Pratol의 PGE<sub>2</sub> 생성억제 실험을 수행한 결과, LPS를 단독처리 했을 때에 비해 LPS와 Pratol를 같이 처리한 군에서 농도 의존적으로 PGE<sub>2</sub> 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었고 특히 고농도의 pratol (100  $\mu$ M)에서는 85 % 감소하는 것으로 나타났다. 또한 inhibitor인 APDC를 처리 했을 때 보다 고농도에서 PGE<sub>2</sub> 생성량이 5 % 더 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 통해 pratol은 세포독성이 없는 범위 안에서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포의 PGE<sub>2</sub> 생성량을 효과적으로 감소시키는 것을 알 수 있다(Figure 25b).

### 3) iNOS와 COX-2 발현 억제

Pratol에 의한 NO, PGE<sub>2</sub> 생성 억제가 iNOS와 COX-2 발현 억제와 관계있는지 확인하기 위해 western blot assay를 통해 단백질 발현량을 측정해 보았다. LPS (1 µg/mL)로 자극시킨 RAW 264.7 세포에 Pratol을 (25, 50, 100 µM) 농도로 처리하였고 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 DMEM 배지, LPS만 처리한 것, 그리고 LPS와 25 µM APDC를 동시에 처리한 배지를 사용하여 24시간동안 배양하였다. 그 결과 LPS 단독 처리군에 비해 Pratol을 처리했을 시 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 크게 감소함을 확인할 수 있었다(figure 26).



(a)



(b)

Figure 25. Effect of pratalol on NO and PGE<sub>2</sub> production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with pratalol (25, 50, or 100 µM) for 24 h. (a) NO and (b) PGE<sub>2</sub> production were analyzed by ELISA kit. The data are presented as mean ± SD of at least three independent experiments. \*\* indicates  $p < 0.01$ .

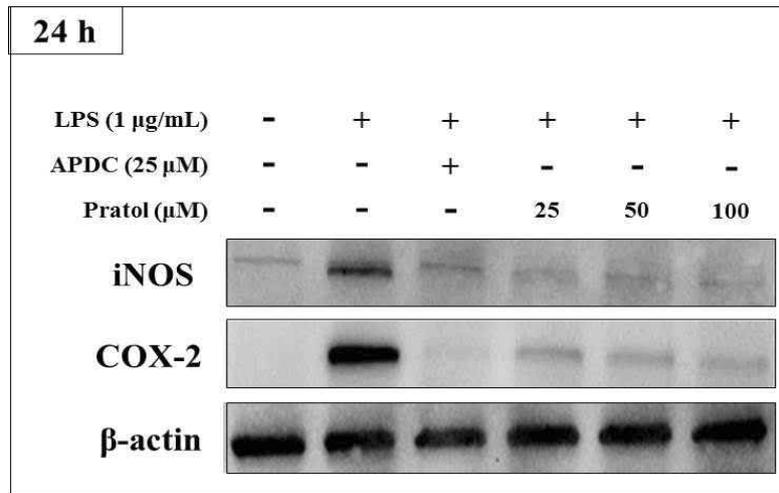
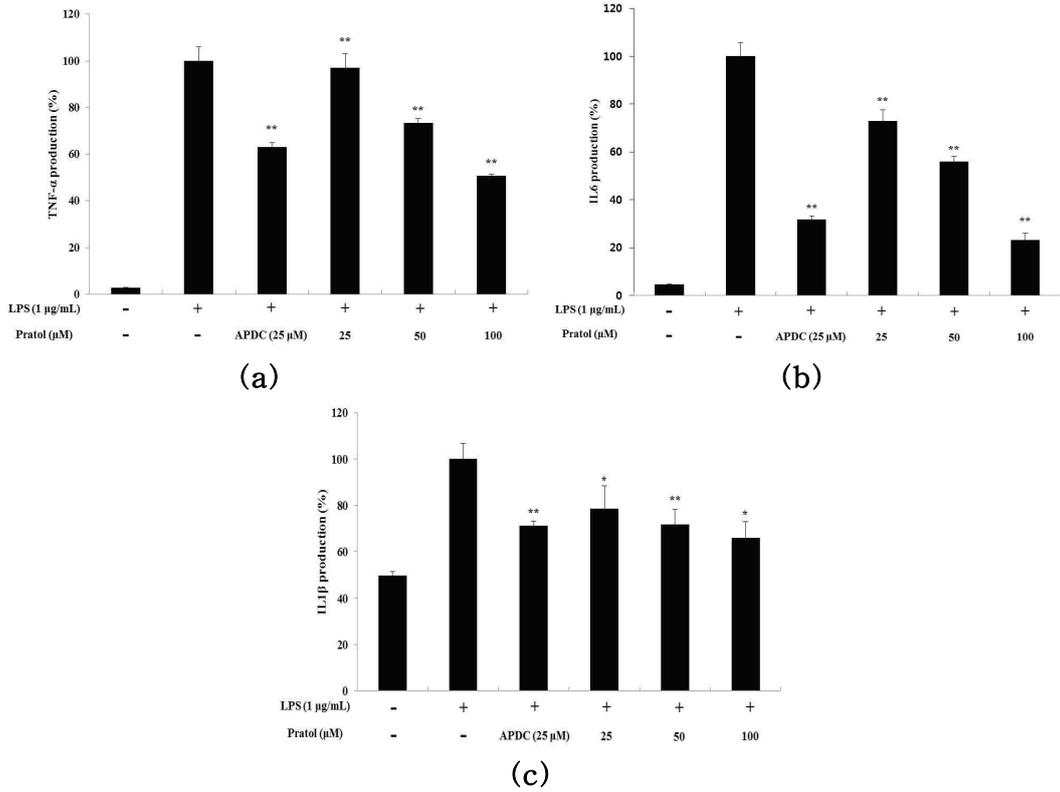


Figure 26. Effect of pratol on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells were treated with various concentrations of pratol (25, 50, or 100 µM) and APDC (25 µM) for 24 h. Protein levels were examined by western blotting.

### 3.3. 염증매개성 cytokine들의 생성 억제

RAW 264.7 세포에서 염증매개성 cytokine들인 TNF- $\alpha$ , IL-6, 및 IL-1 $\beta$ 의 발현에 pratol이 미치는 영향을 ELISA kit를 이용하여 조사하였다. LPS (1  $\mu$ g/mL)로 자극된 RAW 264.7 세포에 다양한 농도의 pratol (25, 50, 100  $\mu$ M)을 처리하여 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제를 확인하였다. 그 결과, Pratol은 LPS 단독 처리군과 비교했을 시 각각의 농도에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 발현을 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다(Figure 27).



**Figure 27.** Effect of pradol on TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with pradol (25, 50, or 100  $\mu$ M) for 24 h. (a) TNF- $\alpha$ , (b) IL-6 and (c) IL-1 $\beta$  production were analyzed by ELISA kit. The data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments. \* indicates  $p < 0.05$ , whereas \*\* indicates  $p < 0.01$ .

## IV. 고찰

멜라닌은 우리 몸의 자유라디칼을 흡수하거나 들어오는 자외선을 분산시켜 광손상으로부터 피부를 보호하고 머리카락이나 피부의 색을 결정하는 중요한 역할을 한다(22). 그러나 비정상적인 색소생성작용으로 인한 멜라닌 결핍은 백반증, 색소결핍증, 피부암 및 새치와 같은 색소결핍으로 인한 병적 질환의 원인이 된다(2). 따라서 이러한 원인들을 치료할 수 있는 멜라닌생성 증가를 위한 안전한 물질을 찾기 위해 최근 많은 연구가 이루어지고 있다(23-27). 본 연구에서도 멜라닌생성 활성제를 찾기 위해 천연물로부터 분리된 여러 가지 물질을 스크린해 보았다(Table 1). 그 결과 pratol의 멜라닌생성 경향이 가장 좋게 나타났고 이에 따른 추가실험을 통해 B16F10 세포에서 pratol의 영향을 확인해 보았다.

추가실험에서는 멜라닌함량과 tyrosinase 활성을 평가함으로써 멜라닌 합성에 대한 pratol의 효과를 조사하였고 멜라닌 생성 관련 효소들 (Tyrosinase, TRP-1, TRP-2)의 발현뿐만 아니라 세포내 멜라닌 생성 조절 인자인 (MITF, AKT, MAPK)의 인산화가 조사되었다. 결과들은 Pratol이 B16F10 세포에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 유도한다는 것을 보여주었다.

먼저 MTT 실험을 통해 100  $\mu$ M의 농도에서는 세포독성이 있다는 것을 확인하였고 따라서 세포독성이 없는 농도인 (6.25, 12.5, 25 및 50  $\mu$ M)을 사용하여 실험을 진행하였다. 멜라닌함량 실험과 tyrosinase 활성 실험은 pratol이 농도 의존적으로 멜라닌함량과 tyrosinase 활성을 증가시키는 것을 보여주었고 그 결과를 통해 pratol은 멜라닌생성을 유도할 것이라고 알 수 있었다(Figure 17,18). Western blot 실험결과는 pratol의 멜라닌생성 유도가 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현 증가를 통해 일어난다는 것을 보여주었다(Figure 19).

위에 언급한 tyrosinase 및 TRP-1,2는 멜라닌합성에 중추적 역할을 하는 전사인자인 MITF에 의해 전사조절 된다. 따라서 멜라닌생성 관련 효소 조절에 관여하는 MITF의 신호 전달 경로를 차단하거나 활성화시키는 것은 피부미백제 또는 태닝제 개발에 유익할 수 있다. 이와 같은 이유로 pratol이 MITF 발현에 영향을 미치는지를 확인하기위해 western blot 실험을 수행하였다. 실험 결과는 MITF

발현은 pratol 처리 24시간 후 최대로 증가함을 보여주었다(Figure 20a). 또한 농도별로 24시간 동안 pratol (6.25, 12.5, 25 및 50  $\mu$ M)을 처리했을 시 MITF의 발현은 농도 의존적으로 증가함을 보여주었다(Figure 20b). 이러한 결과는 pratol이 MITF의 발현을 증가시킴으로써 B16F10 세포의 멜라닌생성을 자극시킨다는 것을 의미한다.

cAMP 경로는 멜라닌생성에 중요한 역할을 한다. 이전 연구들에 따르면, cAMP 활성화는 PI3K 및 AKT의 인산화를 억제하여 MITF의 degradation을 막고 MITF가 tyrosinase 프로모터의 M-box에 결합함으로써 멜라닌생성을 촉진시킨다고 보고되었다(14,44). 따라서 cAMP 신호경로에 pratol이 영향을 미치는지를 알아보기 위해 western blot 실험을 통해 AKT의 인산화 상태를 평가하였다. Figure 21에서와 같이, pratol은 AKT의 인산화를 유의적으로 억제하였으며 이러한 결과는 pratol이 p-AKT 억제를 통해 멜라닌생성을 유도한다는 것을 보여주고 있다(Figure 23b).

MAPK 경로에서 p38 및 JNK의 인산화는 MITF 발현을 증가시킴으로써 멜라닌생성과 연관된다(45-47). 그러나 ERK의 활성화는 B16F10 세포에서 tyrosinase 활성화 및 멜라닌생성을 감소시킨다(48,49). 본 연구의 western blot 결과는 pratol이 p-p38 및 p-JNK 뿐만 아니라 p-ERK의 발현을 증가시킨다는 것을 보여주고 있다(Figure 22). 따라서 어떤 효소 경로가 멜라닌생성에 관여하는지를 확인하기 위해 억제제인 SB203580 (p38 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor) 및 PD98059 (ERK inhibitor)를 사용하여 tyrosinase 활성화 실험을 수행하였다(19,50). 그 결과, pratol 단독 처리군과 비교하여 pratol에 PD98059를 같이 처리하여도 tyrosinase 활성이 크게 변하지 않았음을 알 수 있었다(Figure 23a). 따라서 ERK 경로는 멜라닌생성에 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다.

B16F10 흑색종 세포에서 멜라닌생성을 증가시키는 pratol의 다른 효과를 확인하기 위하여 LPS로 활성화된 RAW 264.7 대식세포에 pratol을 처리하여 염증억제반응을 확인해 보았다. 염증반응을 연구하는데 많이 쓰이는 세포로 알려진 RAW 264.7 세포는 LPS로 자극하면 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 경로와 같은 신호전달경로를 활성화시켜 TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  및 IL-6와 같은 염증매개성 cytokine들의 분비와 NO 및 PGE<sub>2</sub> 염증반응인자들의 발현을 촉진시켜 염증반응을 일으킨다(32,33).

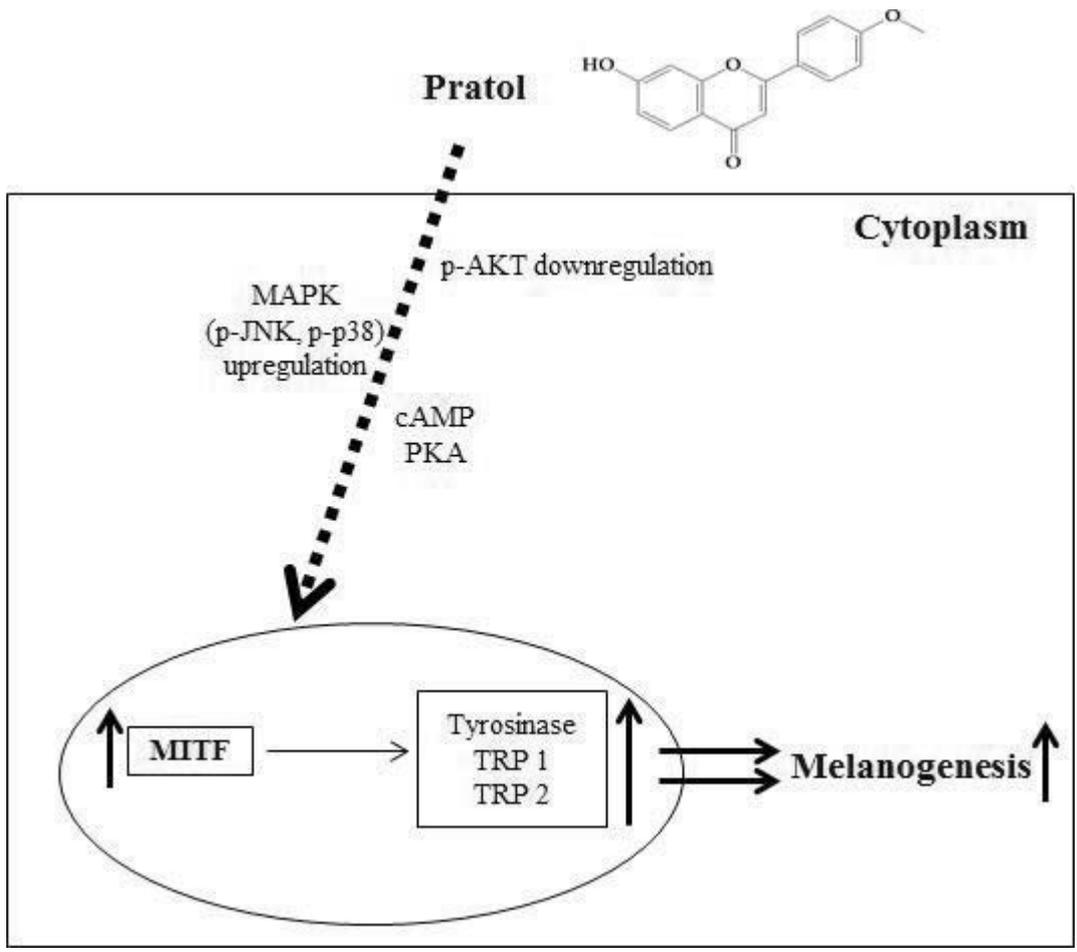
본 연구에서는 MTT 실험법을 사용하여 세포독성이 없는 농도 범위를 찾아냈다. 그런 다음 그 범위 안에서 pratol을 처리했을 시 염증이 억제되는지를 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 실험과 염증매개성 cytokine들인 TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  및 IL-6의 발현 억제 실험을 통해 확인하였고 염증반응인자인 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성에 관여하는 iNOS 및 COX-2의 발현은 western blot 실험을 통해 확인하였다.

MTT 실험결과 200  $\mu$ M 이상의 pratol 처리 시 세포독성이 나타났고, 따라서 (25, 50 및 100  $\mu$ M)의 농도를 사용하여 실험을 진행하였다(Figure 24). 다음과 같은 농도에서 pratol이 염증을 억제하는지 확인하기 위하여 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 pratol을 처리하여 NO 생성량을 확인하였다. 그 결과 LPS 단독 처리 군에 비해 pratol을 농도별로 처리했을 시 농도 의존적으로 NO 생성량을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 25a). 다른 염증반응인자인 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 실험결과 NO 생성 억제 실험결과와 같이 pratol을 처리했을 시 LPS 단독 처리 군에 비해 농도별로 PGE<sub>2</sub> 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 25b). NO와 PGE<sub>2</sub> 생성은 iNOS 및 COX-2로부터 생성되어지기 때문에 NO와 PGE<sub>2</sub>의 감소가 iNOS와 COX-2의 감소로 인한 것인지를 확인하기 위해 western blot 실험을 수행하여 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 확인해 보았다. 그 결과 iNOS와 COX-2의 단백질 발현이 LPS 단독 처리 군에 비해 확실히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 26). 따라서 pratol은 iNOS와 COX-2의 발현을 효과적으로 억제함으로써 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하는 것을 알 수 있다.

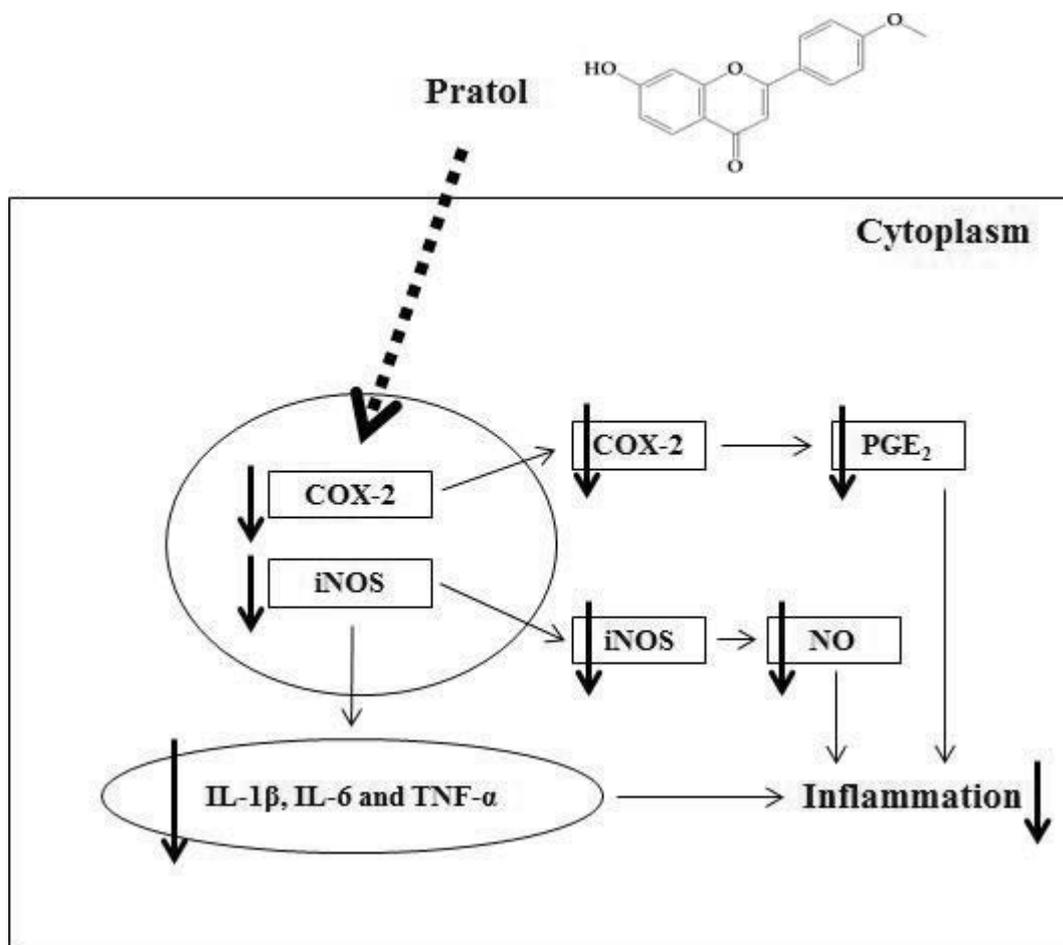
염증매개성 cytokine들인 TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  및 IL-6의 생성 억제를 확인하기 위해 ELISA kit를 사용하여 cytokine들의 생성 억제 실험을 수행하였다. 그 결과 TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  및 IL-6 모두 LPS 단독 처리 군에 비해 pratol을 농도별로 처리했을 시 농도 의존적으로 생성량이 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 27).

본 연구를 통해 얻은 실험 결과들은 pratol이 B16F10 흑색종 세포에서 세포독성 없이 멜라닌생성을 유도한다는 것을 보여주고 있다. 또한 pratol이 MAPK 경로에서 p-p38 및 p-JNK의 발현을 증가시키는 것을 발견할 수 있었고 cAMP를 활성화 하여 MITF 발현을 증가시키고 마침내 멜라닌생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 또한 이러한 결과를 통해, pratol은 저색소침착증 치료에 유용할 수 있고 피부 태닝제 및 anti-white hair 제품에 사용될 수 있는 소재라고 사료

된다. 또한 pratol은 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현을 효과적으로 억제함으로써 염증반응인자인 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 감소시키고, 염증매개성 cytokine들의 생성을 억제시킴으로써 염증억제에 효과가 있다고 확인되었다. 그러나 향후 MAPK 및 NF-κB 신호전달경로를 확인하여 어떠한 경로에 의한 염증억제효과인지를 알아보는 추가연구가 필요하다고 사료된다.



**Figure 28.** Pradol enhances melanogenesis by p-p38 and p-JNK upregulation and p-AKT downregulation in B16F10 melanoma cells.



**Figure 29.** Pratol induces anti-inflammation by inhibiting the expression of COX-2, iNOS and cytokines such as NO, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

## V. 참고 문헌

1. Hearing, V. J. Biogenesis of pigment granules: A sensitive way to regulate melanocyte function, *J. Dermatol. Sci* **2005**, *37*, 3 - 14.
2. Brenner, M.; Hearing, V. J. The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem. Photobiol* **2008**, *84*, 539 - 549.
3. Slominski, A.; Tobin, D. J.; Shibahara, S.; Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiol. Rev* **2004**, *84*, 1155 - 1228.
4. Slominski, A. Neuroendocrine activity of the melanocyte, *Exp. Dermatol* **2009**, *18*, 760 - 763.
5. Hearing, V. J.; Jimenez, M. Mammalian tyrosinase—The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem* **1987**, *19*, 1141 - 1147.
6. Sun, M.; Xie, H. F.; Tang, Y.; Lin, S. Q.; Li, J. M.; Sun, S. M.; Hu, X. L.; Huang, Y. X.; Shi, W.; Jian, D. G protein-coupled estrogen receptor enhances melanogenesis via cAMP-protein kinase (PKA) by upregulating microphthalmia-related transcription factor-tyrosinase in melanoma, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* **2017**, *165*, 236 - 246.
7. Bentley, N. J.; Eisen, T.; Goding, C. R. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: Activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator, *Mol. Cell. Biol* **1994**, *14*, 7996 - 8006.

8. Vachtenheim, J.; Borovansky, J. “Transcriptionphysiology” of pigment formation in melanocytes: Central role of MITF, *Exp. Dermatol* **2010**, *19*, 617 - 627.
9. Ahn, J. H.; Jin, S. H.; Kang, H. Y. LPS induces melanogenesis through p38 MAPK activation in human melanocytes, *Arch. Dermatol. Res* **2008**, *300*, 325 - 329.
10. Widlude, H. R.; Fisher, D. E. Microphthalmia-associated transcription factor: A critical regulator of pigment cell development and survival, *Oncogene* **2003**, *22*, 3035 - 3041.
11. Saha, B.; Singh, S. K.; Sarkar, C.; Bera, R.; Ratha, J.; Tobin, D. J.; Bhadra, R. Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB, *Pigment Cell Res* **2006**, *19*, 595 - 605.
12. Kang, Y. G.; Choi, E. J.; Choi, Y.; Hwang, J. K. 5,7-Dimethoxyflavone induces melanogenesis in B16F10 melanoma cells through cAMP-dependent signalling, *Exp. Dermatol* **2011**, *20*, 445 - 447.
13. Jian, D.; Jiang, D.; Su, J.; Chen, W.; Hu, X.; Kuang, Y.; Xie, H.; Li, J.; Chen, X. Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediating up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells, *Steroids* **2011**, *76*, 1297 - 1304.
14. Oka, M.; Nagai, H.; Ando, H.; Fukunaga, M.; Matsumura, M.; Araki, K.; Ogawa, W.; Miki, T.; Sakaue, M.; Tsukamoto, K.; et al. Regulation of Melanogenesis through Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT Pathway in Human G361 Melanoma Cells, *J. Investig. Dermatol* **2000**, *115*, 699 - 703.

15. Kim, D. S.; Kim, S. Y.; Chung, J. H.; Kim, K. H.; Eun, H. C.; Park, K. C. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes, *Cell Signal* **2002**, *14*, 779 - 785.
16. Liu, F.; Singh, A.; Yang, Z.; Garcia, A.; Kong, Y.; Meyskens, F. L. Mitf links Erk1/2 kinase and p21CIP1/WAF1 activation after UVC radiation in normal human melanocytes and melanoma cells, *Mol Cancer* **2010**, *9*, 214.
17. Jang, J. Y.; Kim, H. N.; Kim, Y. R.; Choi, W. Y.; Choi, Y. H.; Shin, H. K.; Choi, B. T. Partially purified components of *Nardostachys chinensis* suppress melanin synthesis through ERK and AKT signaling pathway with cAMP down-regulation in B16F10 cells, *J Ethnopharmacol* **2011**, *137*, 1207-1214.
18. Yao, C.; Jin, C. L.; Oh, J. H.; Oh, I. G.; Park, C. H.; Chung, J. H. *Ardisia crenata* extract stimulates melanogenesis in B16F10 melanoma cells through inhibition ERK1/2 and AKT activation, *Mol. Med. Rep* **2015**, *11*, 653 - 657.
19. Kim, H. J.; Kim, I. S.; Dong, Y.; Lee, I. S.; Kim, J. S.; Kim, J. S.; Woo, J. T.; Cha, B. Y. Melanogenesis-inducing Effect to Cirsimaritin through Increases in Microphthalmia-Associated Transcription Factor and Tyrosinase Expression, *Int. J. Mol. Sci* **2015**, *16*, 8772 - 8788.
20. Ye, Y.; Wang, H.; Chu, J. H.; Chou, G. X.; Yu, Z. L. Activation of p38 MAPK pathway contributes to the melanogenic property of apigenin in B16 cells, *Exp Dermatol* **2011**, *20*, 755-757.
21. Peng, H. Y.; Lin, C. C.; Wang, H. Y.; Shih, Y.; Chou, S. T. The

melanogenesis alteration effects of *Achillea millefolium* L. essential oil and linalyl acetate: involvement of oxidative stress and the JNK and ERK signaling pathways in melanoma cells, *PLoS One* **2014**, *9*, e95186.

22. Grimes, P. E. New insights and new therapies in vitiligo, *JAMA* **2005**, *293*, 730-735.
23. Yoon, H. S.; Ko, H. C.; Kim, S. S.; Park, K. J.; An, H. J.; Choi, Y. H.; Kim, S. J.; Lee, N. H.; Hyun, C. G. Tangeretin Triggers Melanogenesis through the Activation of Melanogenesis Signaling Proteins and Sustained Extracellular Signal Regulated Kinase in B16F10 Murine Melanoma Cells, *Nat. Prod. Commun* **2015**, *10*, 389 - 392.
24. Yoon, H. S.; Ko, H. C.; Kim, S. J.; Kim, S. S.; Choi, Y. H.; An, H. J.; Lee, N. H.; Hyun, C. G. Stimulatory Effects of a 5,6,7,3',4'-Pentamethoxyflavone, Sinensetin on Melanogenesis in B16/F10 Murine Melanoma Cells, *Lat. Am. J. Pharm* **2015**, *34*, 1087 - 1092.
25. Yoon, H. S.; Lee, S. R.; Ko, H. C.; Choi, S. Y.; Park, J. G.; Kim, J. K.; Kim, S. J. Involvement of extracellular signal-regulated kinase in nobiletin-induced melanogenesis in murine B16/F10 melanoma cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem* **2007**, *71*, 1781 - 1784.
26. Yoon, H. S.; Lee, N. H.; Hyun, C. G.; Shin, D. B. Differential Effects of Methoxylated p-Coumaric Acids on Melanoma in B16F10 Cells, *Prev. Nutr. Food Sci* **2015**, *20*, 73 - 77.
27. Yang, J. Y.; Koo, J. H.; Song, Y. G.; Kwon, K. B.; Lee, J. H.; Sohn, H. S.; Park, B. H.; Jhee, E. C.; Park, J. W. Stimulation of melanogenesis by

scoparone in B16 melanoma cells, *Acta Pharm. Sin* **2006**, *27*, 1467 - 1473.

28. Gerlier, D.; Thomasser, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J. Immunol Methods* **1986**, *94*, 57-63.
29. Tuerxuntayi, A.; Liu, Y. Q.; Tulake, A.; Kabas, M.; Eblimit, A.; Aisa, H. A. Kaliziri extract upregulated tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in murine B16 melanoma cells, *BMC Complement. Altern. Med* **2014**, *14*, 166.
30. Choi, H. J.; Eun, J. S.; Park, Y. R.; Kim, D. K.; Li, R.; Moon, W. S.; Park, J. M.; Kim, H. S.; Cho, N. P.; Cho, S. D.; Soh, Y. Ikarisoside A inhibits inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via p38 kinase and nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathways, *Eur J Pharmacol* **2008**, *601*, 171-178.
31. Hofseth, L. J.; Ying, L. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis, *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1765*, 74-84.
32. Jeong, J. B.; Hong, S. C.; Jeong, H. J.; Koo, J. S. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells, *Korean J. Plant Res* **2012**, *25*, 299-307.
33. Guha, M.; Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes, *Cell Signal* **2001**, *13*, 85 - 94.
34. Manzi, S.; Wasko, M. C. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis, *Ann Rheum Dis* **2000**, *59*, 321-325.

35. Sinha, P.; Clements, V. K.; Fulton, A. M.; Ostrand-Rosenberg, S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells, *Cancer Res* **2007**, *67*, 4507-4513.
36. Bishop-Bailey, D.; Calatayud, S.; Warner, T. D.; Hla, T.; Mitchell, J. A. Prostaglandins and the regulation of tumor growth, *J. Environ. Pathol. Tox. Oncol* **2002**, *21*, 93-101.
37. Ghosh, S.; Hayden, H. S.; New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation, *Nat. Rev. Immunol* **2008**, *8*, 837-848.
38. Majdalawieh, A.; Ro, H. S. Regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  function and NF- $\kappa$ B signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages, *Mediators Inflamm* **2010**, *2010*, 823-821.
39. Yokota, T.; Nishio, H.; Kubota, Y.; Mizoguchi, M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, *Pigment Cell Res* **1998**, *6*, 355-361.
40. Won, J. H.; Shin, J. S.; Park, H. J.; Jung, H. J.; Koh, D. J.; Jo, B. G.; Lee, J. Y.; Yun, K.; Lee, K. T. Anti-inflammatory effects of madecassic acid via the suppression of NF-kappaB pathway in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells, *Planta Med* **2010**, *76*, 251-257.
41. Harborne, J. B. *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*, 1st ed.; Chapman and Hall: London, UK, **1988**; pp. 235-237, ISBN 978-1-4899-2913-6.
42. Nissan, H. P.; Lu, J.; Booth, N. L.; Yamamura, H. I.; Farnsworth, N. R.;

Wang, Z. J. A red clover (*Trifolium pratense*) phase II clinical extract possesses opiate activity, *J Ethnopharmacol* **2007**, *112*, 207-210.

43. Booth, N. L.; Pierson, C. E.; Banuvar, S.; Geller, S. E.; Shulman, L. P.; Farnsworth, N. R. Clinical studies of red clover (*Trifolium pratense*) dietary supplements in menopause: a literature review, *Menopause* **2006**, *13*, 251-64.
44. Lee, C. S.; Jang, W. H.; Park, M.; Jung, K.; Baek, H. S.; Joo, Y. H.; Park, Y. H.; Lim, K. M. A novel adamantyl benzylbenzamide derivative, AP736, suppresses melanogenesis through the inhibition of cAMP-PKA-CREB-activated microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase expression, *Exp. Dermatol* **2013**, *22*, 762 - 764.
45. Kang, S. J.; Choi, B. R.; Lee, E. K.; Kim, S. H.; Yi, H. Y.; Park, H. R.; Song, C. H.; Lee, Y. J.; Ku, S. K. Inhibitory effect of dried pomegranate concentration powder on melanogenesis in B16F10 melanoma cells; involvement of p38 and PKA signaling pathways, *Int. J. Mol. Sci* **2015**, *16*, 24219 - 24242.
46. Kim, D. S.; Hwang, E. S.; Lee, J. E.; Kim, S. Y.; Kwon, S. B.; Park, K. C. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent mitf degradation, *J. Cell Sci* **2003**, *116*, 1699 - 1705.
47. Lee, Y.; Ku, B.; Kim, D.; Choi, E. M. Umbelliferone stimulated melanogenesis and increased glutathione level in B16F10 cells, *Toxicol. Environ. Health Sci* **2017**, *9*, 152 - 160.

48. Wu, L. C.; Lin, Y. Y.; Yang, S. Y.; Weng, Y. T.; Tsai, Y. T. Antimelanogenic effect of c-phycoyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways, *J. Biomed. Sci* **2011**, *18*, 74.
49. Bae, J. S.; Han, M. R.; Yao, C.; Chung, J. H. Chatocin inhibits IBMX-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells through activation of ERK, *Chem. Biol. Interact* **2016**, *245*, 66-71.
50. Huang, H. C.; Chou, Y. C.; Wu, C. Y.; Chang, T. M. [8]-Gingerol inhibits melanogenesis in murine melanoma cells through down-regulation of the MAPK and PKA signal pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2013**, *438*, 375 - 381.