



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](#)

碩士學位論文

7, 8-dimethoxycoumarin의 피부  
염증과 멜라닌 생성에 미치는 영향

濟州大學校 大學院

化 學 科

李 나 리

2019年 2月

7, 8-dimethoxycoumarin의 피부 염증과  
멜라닌 생성에 미치는 영향

指導教授 玄 昌 久

李 나 리

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2019年 2月

李나리의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長	李南昊	
委 員	尹景燮	
委 員	玄昌久	

濟州大學校 大學院

2019年 2月

# Effects of 7, 8-dimethoxycoumarin on skin inflammation and melanogenesis

Nari Lee

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

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

2019. 2.

This thesis has been examined and approved by

Nam Ho Lee

Kyung-Sup Yoon

CHANG-GU HYUN

12/24

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

7, 8-dimethoxycoumarin (DMC,  $C_{11}H_{10}O_4$ ), a natural coumarin compound, is present in *Citrus* plants including *Citrus decumana* and grapefruit. According to previous studies have shown a protective effect against Cisplatin (CP) and ischemia-reperfusion (I/R) damage in rat kidneys. However, the mechanism of its inhibitory effects on skin inflammation in the human keratinocyte HaCaT cell and also underlying mechanisms of melanin production in B16F10 melanoma cells have not yet been investigated. In this study, the HaCaT and B16F10 cells were treated with various concentrations of DMC respectively to observe its effects. We investigated the inhibitory effects of DMC on the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines in TNF- $\alpha$  treated HaCaT cells. We found that pretreatment with DMC inhibited TNF- $\alpha$ -induced cytokines (Interleukin 6; IL-6) and chemokines (Interleukin 8; IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1). In addition, DMC significantly inhibited TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and phosphorylation of MAPKs, such as c-Jun N-terminal kinases (JNK) and extracellular-signal-regulated kinase (ERK). We also found that the results showed that DMC significantly increased melanin contents and tyrosinase activity without being cytotoxic in B16F10 cells. In addition, DMC stimulated the expressions of tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), tyrosinase-related protein-2 (TRP-2), and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) thereby activating melanin production. Furthermore, to test the potential application for DMC as a cosmetic material, we also performed a primary skin irritation test on human skin. In this assay, DMC did not induce any adverse reactions at the treatment dose. Based on these results, we suggest that DMC may be considered a potential candidate for a therapeutic drug for the treatment of skin inflammatory diseases and anti-gray hair applications.

Key words: 7, 8-dimethoxycoumarin, HaCaT, B16F10, Inflammation, Melanogenesis

# 목 차

ABSTRACT .....	I
목 차 .....	II
LIST OF FIGURES .....	III
I. 서 론 .....	6
II. 재료 및 방법 .....	13
1. 시료 및 시약 .....	13
2. 실험 방법 .....	14
2.1. HaCaT 세포 내에서 7, 8-dimethoxycoumarin의 항염증 효과 .....	14
2.1.1 세포 배양 .....	14
2.1.2 세포 생존율 평가 .....	14
2.1.3 Pro-inflammatory cytokines/chemokines 측정 .....	15
2.1.4 Western Blot 분석 .....	17
2.2. B16F10 세포 내에서 7, 8-dimethoxycoumarin의 멜라닌 생성 효과 .....	18
2.2.1 세포 배양 .....	18
2.2.2 세포 생존율 평가 .....	18
2.2.3 Melanin contents 측정 .....	18
2.2.4 Tyrosinase activity 측정 .....	19
2.2.5 Western Blot 분석 .....	19
3. 통계처리 .....	20

III. 결 과 .....	21
1. HaCaT 세포 내에서 7, 8-dimethoxycoumarin의 항염증 효과 .....	21
1.1. HaCaT 세포에서 세포 생존율에 미치는 DMC의 영향 .....	21
1.2. Pro-inflammatory cytokines/chemokines 발현에 미치는 DMC의 영향 .....	23
1.3. Western blot 분석 .....	24
1) TNF- $\alpha$ 가 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로에 미치는 영향 .....	24
2) MAPKs 신호전달 경로에 대한 DMC의 영향 .....	28
3) NF- $\kappa$ B 신호전달 경로에 대한 DMC의 영향 .....	30
2. B16F10 세포 내에서 7, 8-dimethoxycoumarin의 멜라닌 생성 효과 .....	32
2.1. B16F10 세포에서 세포 생존율에 미치는 DMC의 영향 .....	32
2.2. Melanin contents에 대한 DMC의 영향 .....	34
2.3. Tyrosinase activity에 대한 DMC의 영향 .....	36
2.4. Western blot 분석 .....	38
1) 멜라닌생성 관련 효소 발현에 미치는 DMC의 영향 .....	38
2) MITF 발현에 미치는 DMC의 영향 .....	40
3) AKT 신호전달 경로에 대한 DMC의 영향 .....	42
3) MAPKs 신호전달 경로에 대한 DMC의 영향 .....	44
4) MAPKs 신호전달 경로에 대한 inhibitor 및 DMC의 영향 .....	46
IV. 고 찰 .....	48
V. 참고문헌 .....	53

## LIST OF FIGURES

<b>Figure 1.</b> The mechanism of pro-inflammatory cytokines/chemokines in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells .....	8
<b>Figure 2.</b> The mechanism of melanogenesis in $\alpha$ -MSH induced B16F10 cells .....	10
<b>Figure 3.</b> Structures of 7, 8-dimethoxycoumarin (DMC) .....	12
<b>Figure 4.</b> Principle of MTT assay .....	16
<b>Figure 5.</b> Principle of enzyme-linked immunosorbent assay .....	16
<b>Figure 6.</b> Principle of western blot .....	16
<b>Figure 7.</b> Effects of DMC on the viability of HaCaT cells .....	22
<b>Figure 8.</b> Effects of DMC on the pro-inflammatory cytokine production and cell viability in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells .....	24
<b>Figure 9.</b> Effects of TNF- $\alpha$ on MAPKs pathway in HaCaT cells .....	26
<b>Figure 10.</b> Effects of TNF- $\alpha$ on NF- $\kappa$ B pathway in HaCaT cells .....	27
<b>Figure 11.</b> Effects of DMC on the expression of p38, JNK, and ERK in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells .....	29
<b>Figure 12.</b> Effects of DMC on the p105, p65, and I $\kappa$ B- $\alpha$ expression in TNF-	

α-induced HaCaT cells .....	31
<b>Figure 13.</b> Effects of DMC on the viability of B16F10 cells .....	33
<b>Figure 14.</b> Effects of DMC on melanin production in B16F10 cells .....	35
<b>Figure 15.</b> Effects of DMC on tyrosinase activity in B16F10 cells .....	37
<b>Figure 16.</b> Effects of DMC on TRP-1, TRP-2, and Tyrosinase expression in B16F10 cells .....	39
<b>Figure 17.</b> Effects of DMC on MITF expression in B16F10 cells .....	41
<b>Figure 18.</b> Effects of DMC on AKT signaling pathway in B16F10 cells .....	43
<b>Figure 19.</b> Effects of DMC on MAPKs signaling pathway in B16F10 cells .....	45
<b>Figure 20.</b> Effects of DMC and MAPKs inhibitor on MAPKs pathway in B16F10 cells .....	47
<b>Figure 21.</b> Effects of DMC on HaCaT cells .....	52
<b>Figure 22.</b> Effect of DMC on B16F10 cells .....	52

## I. 서 론

면역은 감염, 질병, 상처와 같은 물리, 화학적 반응에 의해 신체 손상이 일어날 때 이에 대처하여 일련의 단계를 통해 신체를 보호한다.

면역계는 선천성 면역(Innate immunity) 또는 후천성 면역(Acquired immunity)으로 나뉘며, 자연 면역(Native immunity)이라고도 부르는 선천성 면역은 외부 자극이나 이전의 감염 없이 유전적 구성인 미생물 체질에 의해 모든 동·식물에 존재한다. 이것은 두 가지 유형으로 나뉘는데, [1] 획득 면역(Adaptive immunity)이라고도 부르는 후천성 면역은 초기 척추동물에서 진화되었으며, 강력한 병원성 면역뿐만 아니라 각 병원균이 항원에 의해 '기억'되는 면역이다. [2] 이러한 면역 반응은 면역 매개체의 유형으로 나눌 수 있으며, 체액성 면역(Humoral immunity)과 세포 매개성 면역(Cell-mediated immunity)으로 구분될 수 있다. 체액성 면역은 분비된 항체, 보체 단백질 및 특정 항원 펩타이드에 의해 매개 되는 면역이며, 세포 매개성 면역은 항체를 포함하지 않는 면역 반응이지만, 포식세포(Phagocytes), 항원 특이적 세포 독성 T-림프구(T-lymphocytes)의 활성화 및 항원에 대한 다양한 사이토카인에 의한 면역 반응이다. [3]

염증은 면역 체계의 대표적인 반응이다. 손상되거나 감염된 세포에서는 에이코사노이드(Eicosanoids) 및 사이토카인(Cytokines)과 같은 전 염증성 매개인자(Pro-inflammatory mediator)들이 생성되어 감염 부위에 면역 세포를 모집하고 병원체 제거 후 손상된 조직의 치유를 촉진하는 방어기작이 활성화된다. [4] 이처럼 사이토카인은 염증 신호전달에서 중요한 단백질이며 대식세포(Macrophage), B-림프구(B-lymphocyte), T-림프구(T-lymphocyte) 및 비만세포(Mast cell)뿐만 아니라 내피세포(Endothelial cells) 등 다양한 기질세포와 같은 면역세포를 비롯한 광범위한 세포에 의해 생성된다. 이러한 사이토카인에는 케모카인(Chemokines), 인터페론(Interferons), 인터루킨(Interleukins), 림포카인(Lymphokines), 그리고 종양괴사인자(Tumour necrosis factors) 등이 포함된다. [5] 염증의 증상은 열, 통증, 발적, 부종 등이 일반적이지만, 다양한 면역체계의 장애로 인해 비정상적인 염증이 유발된다. 특히 이러한 염증반응이 제대로 일어나지 않는다면 조직손상,

암, 자가면역질환, 류마티스 관절염 및 아토피, 건선 등 만성염증 질환이 발생한다. [6] 따라서 염증 조절 반응의 균형은 많은 면역 질환들을 조절하는 기초가 될 수 있다.

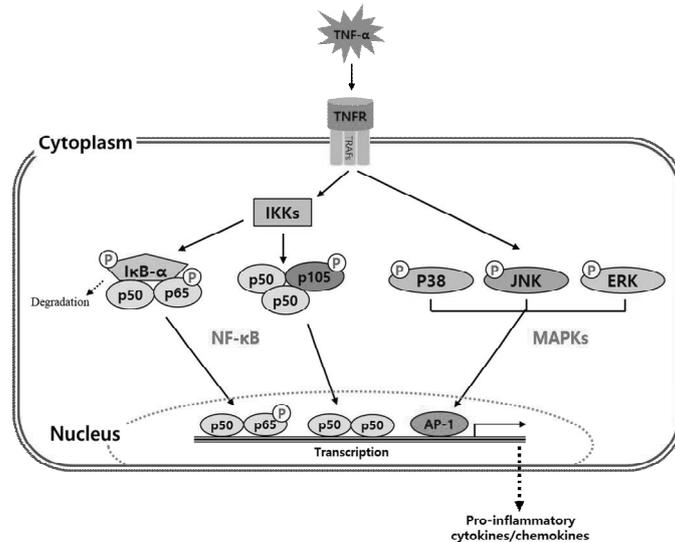
피부는 세 가지 구성 요소인 표피, 진피 및 피하 조직으로 구성된다. 이는 질병, 자외선 및 물리 화학적인 손상으로부터 신체를 보호하는 일차적인 방어기관이다.

[1] 피부 표피의 기저층에는 각질형성세포(Keratinocytes), 멜라닌세포(Melanocytes), 랑게르한스세포(Langerhans cell), 메르켈세포(Merkel cell) 등으로 이루어져 있다. [7] 각질형성세포의 주요 기능은 병원균에 대한 장벽을 제공하는 것이다. 위의 염증반응 내용과 관련하여 병원체가 표피의 상층을 관통하면 각질형성세포는 Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) 및 Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1)과 같은 다양한 사이토카인 및 케모카인을 생성하여 피부 염증반응에 중요한 역할을 한다. [8-12]

이전연구에 따르면, TNF- $\alpha$  또는 Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )에 의해 매개된 인간각질형성세포 (HaCaT)에서 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- $\kappa$ B) 및 Mitogen-activated protein kinase (MAPKs)와 같은 신호전달 경로를 통해 사이토카인 및 케모카인 생산에 결정적인 역할을 한다고 알려져 왔다. [13-15] MAPKs는 전 염증성 매개인자 및 분열촉진제, 스트레스와 같은 다양한 자극에 의해 세포 생존, 성장, 증식 및 사멸과 같은 세포 기능을 조절하는 신호전달경로이다. 구성인자로는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK), p38 MAPK kinase (p38) 등이 있으며 단계적인 인산화를 통해 세포질에서 핵 내로 전위되어 전 염증성 매개인자 유전자 발현이 활성화된다. [16] NF- $\kappa$ B 또한 대표적인 염증조절 신호전달 경로이며 p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1), p52/p100 (NF- $\kappa$ B2) 등 5종으로 조합되어 heterodimer 형태로 세포질에 존재한다. p50과 p65는 평소에는 저해단백질인 inhibitor kappa B (I $\kappa$ B)와 복합체를 이루며 heterodimer 형태로 비활성 상태로 존재하지만, TNF- $\alpha$ 와 같은 외부자극이 주어지면 I $\kappa$ B kinase (IKKs)에 의해 I $\kappa$ B는 인산화 되어 분해되고, NF- $\kappa$ B 단백질은 핵 내로 전위 된다. 또

한 NF- $\kappa$ B1 및 NF- $\kappa$ B2는 큰 전구체 (각각 p105 및 p100)로부터 유비퀴틴-프로테아좀(ubiquitin-proteasome) 경로에 의해 매개되고 p50 및 p52 서브 유닛의 형태로 핵 내로 전위되어 전 염증성 매개인자 유전자 발현이 활성화된다. [17] 그러므로 각질형성세포에서의 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 같은 신호전달 경로의 인산화 저해는 전 염증성 사이토카인과 케모카인 생산을 하향 조절하여 염증성 피부 질환의 효과적인 방안이 될 수 있다.

현재 스테로이드와 비 스테로이드성 소염 진통제 (NSAIDs)는 아토피성 피부염과 건선과 같은 피부 염증을 줄이기 위해 임상적으로 처방되고 있으며, 이러한 제제는 NF- $\kappa$ B 또는 MAPK 경로의 활성을 억제함으로써 사이토카인 및 케모카인의 생산을 감소시키는 연구 결과가 있다. 그러나 스테로이드와 NSAIDs의 면역 억제제의 장기 투여는 면역 세포 기능을 억제할 수 있으며 알레르기 반응이나 약물 내성과 같은 부작용과 관련이 있다. [18-19] 따라서 염증성 피부 질환을 개선할 수 있는 보완적이며 대체적인 약물의 개발은 연구자에게 특히 중요하다.



**Figure 1.** The mechanism of pro-inflammatory cytokines/chemokines in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells.

멜라닌은 인간의 피부, 머리카락, 눈의 색을 결정하고 세포질에서 자유 라디칼을 흡수하고 자외선 (UV)을 차폐하는데 광 보호 역할을 합니다. 이러한 멜라닌은 표피 기저층에 위치한 멜라닌세포 내 멜라노솜(melanosome)이라는 소기관에서 합성되고 생성된 멜라닌은 인접한 각질세포로 전달된다. [20-21]

멜라닌 합성은 주로 멜라닌생성효소인 Tyrosinase, Tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) 및 Tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)에 의해 생성된다.

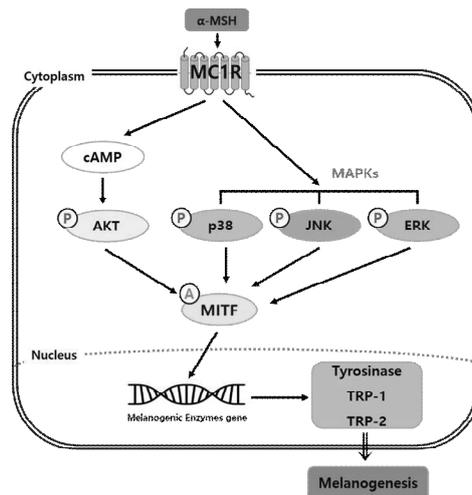
Tyrosinase는 경로의 초기 단계에서 멜라닌 생성 효소뿐만 아니라 속도제한효소로서 중요한 역할을 한다. 멜라노솜 안에서 tyrosinase는 L-tyrosine과 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)를 DOPAquinone으로의 산화를 촉매 하는 매우 중요한 효소로서 작용한다. 이와 같이 형성된 DOPAquinone은 분자 내 고리 화를 거쳐 leucoDOPACHROME을 형성하며, 이는 또한 DOPACHROME으로 산화된다. 특히, tyrosinase에 의해서 tyrosine에서 dopaquinone으로의 전환은 이후의 단계가 생리적 pH에서 자발적으로 발생하기 때문에 멜라닌 합성에서 속도 제한 단계(rate-limiting step)로 볼 수 있다. DOPAquinone은 반응성 중간체로서 티올 화합물이 없을 경우 자발적으로 고리 화를 거쳐 DOPACHROME을 생성한다. DOPACHROME tautomerase라고 불리는 TRP-2는 불안정한 중간체인 DOPACHROME을 keto-enol tautomerization (케토-엔올 호변이성)에 의해 보다 안정한 중간체 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)으로 촉매 하거나, 또는, DOPACHROME의 자발적 탈 카복실화 반응으로 5,6-dihydroxyindole (DHI)이 생성된다. [22-23] 전사 수준에서 멜라닌 생성 효소의 발현은 멜라닌 세포의 색소 침착, 생존에 관여하는 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 결합에 의해 상, 하향 조절된다. 이는 tyrosinase 유전자 발현의 상향 조절 후 tyrosinase promoter 내의 M-box에 결합하여 tyrosinase의 발현을 증가 시키며, 또한 그 외 멜라닌 생성 효소들 또한 유전자 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. [24-25] MITF의 상위 기전으로는 일반적으로 Protein kinase (PKA), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), 및 MAPKs 등과 같은 신호전달 경로를 통해 멜라닌 합성에 관여하는 것으로 알려져 있다.

cAMP 경로를 통해 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)의 활성화는 Protein kinase B (AKT)의 인산화를 거쳐 Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ )의

핵 내로의 전사에 영향을 준다. 또한 멜라닌 세포에서의 MAPKs 신호전달경로인 ERK는 인산화의 조절에 따라 멜라닌 생성을 양성 또는 음성조절 하는 것으로 알려져 왔다. 인산화된 ERK는 MITF을 인산화하여 MITF를 degradation 시키며 반대로 인산화가 억제된 ERK와 인산화가 증가된 JNK와 p38는 MITF의 인산화 대신 MITF의 활성을 증가시켜 결국 멜라닌 생성 효소들의 발현을 증가시키는 양성신호전달경로 역할을 하는 것으로 알려져 있다. [26-28]

비정상적인 색소 침착 상태는 멜라닌과다증(hypermelanosis) 또는 멜라닌저하증(hypomelanosis)의 두 가지 유형으로 나눌 수 있다. 멜라닌 과다증은 피부의 멜라닌 과다 상태를 말하며, 이러한 과 색소 침착은 기미, 주근깨, 재색피부염 및 흑색종 암과 같은 질환으로 이어질 수 있다. 반대로 멜라닌 저하증은 피부의 멜라닌 함량이 충분하지 않은 상태를 의미하며, 저 색소 침착은 백반증, 백색증, 백모증 또는 새치 등과 같은 질환의 원인이 된다. [29-31]

특히 멜라닌은 자외선으로 인한 DNA 손상으로부터 피부를 보호하는 역할을 하기 때문에 비정상적인 멜라닌 저하는 자외선에 대한 방어기능이 떨어지게 되어 화상, 피부 각화증, 피부염, 암 등 피부 손상 및 다양한 질환에 노출될 수 있다. 그러므로 멜라닌 생성 활성화제로서의 가능성 여부는 저 색소침착에 의한 병적 질환의 치료를 위한 기능성 소재로도 사용될 수 있다.

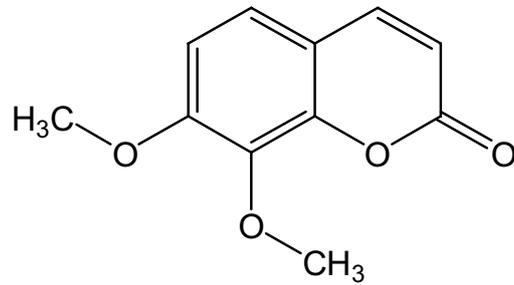


**Figure 2.** The mechanism of melanogenesis in  $\alpha$ -MSH induced B16F10 cells.

쿠마린(Coumarin)은 피론고리와 벤젠고리가 결합된 구조로 벤조피론(benzopyrones) 계열에 속하며 *ortho*-coumarin acid가 분자 내 에스테르화하여 만들어진 락톤 화합물이다. 트랜스(*trans*)배열을 하고있는 2-coumarin acid이 빛이나 산성 조건에서 시스(*cis*) 이성질체로 변환이 되며, 이러한 시스(*cis*) 화합물이 에스테르화 반응을 하면 쿠마린이 얻어진다. [32] 쿠마린은 천연에서 1,000 종류 이상 얻어지며 특히 고등식물계에 널리 분포하고 있다. 특히 운향과(Rutaceae), 미나리과(Umbelliferae)에서 배당체 등으로 존재한다. 천연 쿠마린은 90% 이상이 7번 위치가 산소로 치환되어 있으며, 자외선 하에서 형광을 띠고 있다. 이처럼 쿠마린 구조의 골격은 많은 생물학적 활성제에 존재하기 때문에 식물, 박테리아, 진균 및 화학 합성으로부터 수천 개의 천연 쿠마린의 분리, 구조적 특성, 생합성 경로 및 생물학적 활성에 대해 많이 연구되어 왔다. 특히 항염, 항응고제, 정균제 항종양, 항노화제 및 심장 보호효과 등 다양한 약리학적 효과를 가진 것으로 기술되어 왔다. 이러한 이유로 쿠마린 화합물은 오늘날 천연물과 유기 화학의 중요한 물질 중 하나를 차지하고 있다. [33-34]

화합물 7, 8-dimethoxycoumarin (7, 8-Dimethoxychromen-2-one, DMC) (Fig. 3)은 *Daphne koreane*, *Astianthus viminalis*, *Zanthoxylum leprieurii* 및 *Citrus decumana*를 포함하여 여러 약용 식물에 존재하는 천연 쿠마린이다. DMC는 이전 연구에서 항산화, 항염증 활성 및 미토콘드리아의 투과성 전이 기공 열림을 통해 cisplatin 및 허혈-재관류(ischemia-reperfusion) 손상으로부터 쥐의 신장을 보호하는 것으로 나타났다. 그리고 쥐에서 유문 결찰로 인해 유발된 위염에 대해 항염증 작용을 보였다. [35-39] 최근 연구에 따르면, methoxy 구조를 갖는 플라보노이드로 대표되는 benzo-gamma-pyrones은 hydroxy 구조를 갖는 플라보노이드보다 기능 및 산업 측면에서 더 두드러지고 있다. 우리 실험실은 이전에 tangeretin과 sinensetin 같은 polymethoxy flavonoids (PMFs)가 MAPKs 신호 경로를 통해 멜라닌을 효과적으로 생성할 수 있다고 보고 했다. [40-42] Hydroxy나 Methoxy구조의 coumarin화합물 모두 항염증 활성이 뛰어난 반면, 멜라닌 생성 활성평가 시 hydroxy 구조를 갖는 coumarin 화합물은 멜라닌 저해 활성을 나타내는 반면 methoxy 구조를 가진 coumarin 화합물은 멜라닌 생성효

소를 통해 멜라닌 합성을 증가시키는 것으로 알려졌다. [43-44]



**Figure 3.** Structures of 7, 8-dimethoxycoumarin (DMC).

그러나 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포에서의 피부 염증에 대한 억제 효과와 B16F10 흑색 종 세포에서의 멜라닌 생성 메커니즘에 대한 기본 메커니즘은 아직 조사되지 않았다. 따라서 이 연구에서 TNF- $\alpha$  처리된 HaCaT 세포에서 전 염증성 매개인자인 사이토카인 및 케모카인의 발현에 대한 DMC의 억제 효과와 염증관련 기전에 대해 조사했으며, 또한 DMC가 멜라닌 생성 및 멜라닌 생성 효소 발현에 미치는 영향을 조사하고 멜라닌 생성 관련 기전연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 7,8-dimethoxycoumarin (DMC, C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, U.S.A)에서 구입하였다. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDTC),  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), sodium hydroxide (NaOH), 및 protease inhibitor cocktail은 Merck (Darmstadt, Hesse, Germany)에서 구입하였다. 그 다음 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, BCA protein assay kit 그리고 PD98059 (ERK 억제제)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)은 VWR (Radnor, Pennsylvania, U.S.A)에서 구입하였으며, IL-6, IL-8, CCL2/MCP-1의 효소결합면역흡착분석(enzyme-linked immunosorbent assay)용 ELISA 키트는 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다. Western blot 실험용 항체 P-p38, T-p38, P-JNK, T-JNK, P-ERK, T-ERK, P-p105, T-p105, P-p65, T-p65, T-I $\kappa$ B- $\alpha$ ,  $\beta$ -actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 그리고 TRP-1, TRP-2, Tyrosinase, MITF, and SP600125 (JNK inhibitor)는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, U.S.A)에서 구입하였다. 또한 SP600125 (JNK 억제제) 및 SB203580 (p38 억제제)은 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)과 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 각각 구입했다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), radio-immunoprecipitation (RIPA) buffer, enhanced chemiluminescence (ECL) kit, 그리고 2X Laemmli sample buffer는 Biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)과 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)로부터 각각 구입하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. HaCaT 세포 내에서 7, 8-dimethoxycoumarin의 항염증 효과

#### 2.1.1. 세포 배양

Human keratinocyte (HaCaT)는 CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Baden-Württemberg, Germany)에서 구입했다. 세포는 10% FBS와 1% penicillin-Streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 조건에서 2일 간격으로 계대하면서 배양 되었다.

#### 2.1.1. 세포 생존을 평가

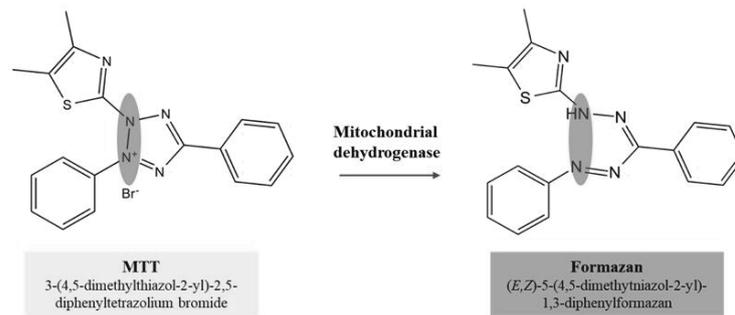
DMC의 세포 생존력은 MTT 분석에 의해 측정되었다. 노란색의 수용성 기질(Soluble substrate)인 MTT가 살아 있는 세포 안에 침투하여 미토콘드리아 안에서 탈수소효소작용에 의하여 보라색의 불용성(insoluble)의 formazan product로 환원시키는 특성을 활용한 검사법이다.

HaCaT 세포를 24-well plate에  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 분주하여 24시간 동안 전 배양하였다. 이후 상등액을 제거하고 DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.4 mM)를 FBS free 배지와 함께 각각의 농도로 첨가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 모두 제거 하고 400  $\mu$ L의 0.4 mg/mL MTT 용액을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 반응 종료 후, MTT 용액을 모두 제거하고 DMSO를 첨가하여 포르마잔 결정을 용해시키고 microplate reader(SUNRISE, TECAN Austria GmbH)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

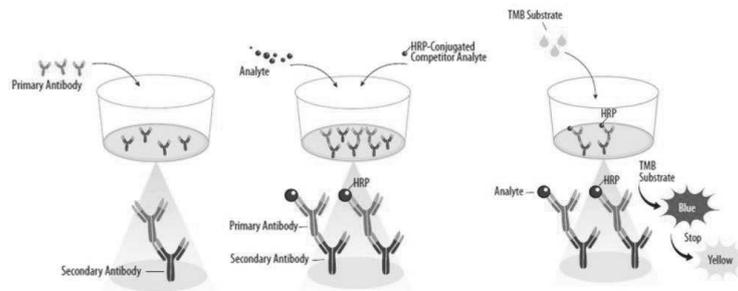
### 2.1.3. Pro-inflammatory cytokines/chemokines 측정

효소결합면역정량법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)는 간단히 말해 항체에 효소를 결합시켜 항원-항체 반응을 확인하는 방법으로 여러 가지 ELISA 종류 중에 높은 민감도를 갖으며 일반적으로 사용되는 Sandwich ELISA를 사용하였다. 기본 원리는 항원이 plate에 잘 결합하도록, 항원에 대한 항체를 먼저 플레이트에 결합시키고, 그 항체에 항원을 결합시킨 다음, 직접법이나 간접법으로 조사하는 방법이다. 주로 항원의 양이 적을 때 또는 미지의 샘플에 들어 있는 항원을 조사할 때 사용한다.

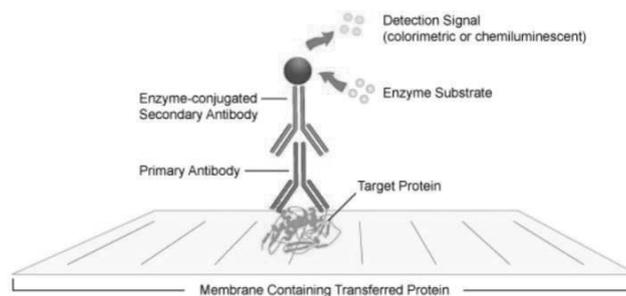
HaCaT 세포에서 IL-6, IL-8 및 CCL2/MCP-1과 같은 사이토카인 및 케모카인의 생성에 대한 DMC의 영향을 조사하기 위해 HaCaT 세포를 24-well plate에  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 분주하여 24시간 동안 전 배양하였다. 그 다음 상등액을 제거하고 FBS free 배지와 함께 DMC (0.025, 0.05, 0.1 및 0.2 mM) 및 TNF- $\alpha$  (50 ng/mL)를 각각의 농도로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 세포 배양 상등액을 수집하고, 각각의 사이토카인 및 케모카인의 생성량을 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다.



**Figure 4.** Principle of MTT assay.



**Figure 5.** Principle of enzyme-linked immunosorbent assay. (Copyright © 2018 R&D Systems, Inc. All Rights Reserved.)



**Figure 6.** Principle of western blot. (Copyright © 2018 Bio-Rad Laboratories, Inc. All rights reserved)

#### 2.1.4. Western Blot 분석

Western blot 분석법은 여러 단백질 혼합물로부터 특정 단백질을 찾아내는 기법으로 찾고자 하는 단백질에 대한 항체를 사용하여 항원 항체 반응을 일으킴으로써 특정단백질의 존재 여부를 밝혀내는 실험이다.

HaCaT 세포를  $3 \times 10^5$  cells/well의 60-mm culture dish로 분주하여 24 시간 동안 전 배양하였다. 그 다음 상등액을 제거하고 FBS free 배지와 함께 다양한 농도의 DMC (0.05, 0.1, 및 0.2 mM)와 TNF- $\alpha$  (50 ng/mL)를 처리하였다. 배양된 세포를 1×PBS (phosphate-buffered saline)로 2회 세척하고, lysis buffer (RIPA buffer)와 protease inhibitor cocktail (1.0%)을 처리하여 4°C에서 20 분간 용해시킨 후, harvest하여 e-tube로 옮긴 뒤 15,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심분리하였다. 분리한 단백질의 양은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 사용하여 BCA 단백질 분석법으로 측정하였다. 단백질을 정량하고 20  $\mu$ g의 각 단백질을 SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 단백질 크기별로 분리한 후, PVDF (polyvinylidene difluoride) 막으로 전이하였다. Membrane을 실온에서 0.1% Tween 20이 함유된 Tris-buffered saline (TBS-T)으로 녹인 5% Skim milk (blocking buffer)로 2 시간 동안 blocking 한 다음 TBS-T로 3 회 세척하였다. 그런 다음, 1 : 1000의 비율로 희석된 1 차 항체(primary antibody)를 첨가하고 over night 하였다. 반응 완료 후, TBS-T로 10 분 간격으로 5 회 세척한 다음 HRP가 결합된 2차 항체(secondary antibody)를 1 : 3000의 비율로 희석하고 2시간 동안 반응 하였다. 그 다음 TBS-T를 이용하여 10 분 간격으로 5회 세척하였다. 이 후 ECL solution 과 반응하고 Chemidoc (Fusion solo 6S.WL, VILBER LOURMAT, France)을 사용하여 단백질밴드를 현상하고 분석하였다.

## 2.2. B16F10 세포 내에서 7, 8-dimethoxycoumarin의 멜라닌 생성 효과

### 2.2.1. 세포 배양

Murine melanoma cells(B16F10)은 10% FBS와 1% penicillin-Streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 조건에서 3일 간격으로 계대하면서 배양하였다.

### 2.2.2. 세포 생존을 평가

B16F10 세포를 24-well plate에  $2 \times 10^4$  cells/mL로 분주하여 24 시간 동안 전 배양하였다. 이후 상등액을 제거하고 DMC (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8 mM)를 새로운 배지와 함께 각각의 농도로 첨가하여 다시 72시간 동안 배양 하였다. 그 후, 배지를 모두 제거하고 400  $\mu$ L의 0.2 mg/mL MTT 용액을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 반응 종료 후, MTT 용액을 모두 제거하고 DMSO를 첨가하여 포르마잔 결정을 용해시키고 microplate reader (SUNRISE, TECAN Austria GmbH)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.2.3. Melanin contents 측정

세포에서의 멜라닌 함량은 이전에 기술된 방법을 일부 수정하여 측정하였다. [41] B16F10 세포를 60-mm culture dish에  $1 \times 10^5$  cells/mL로 분주하여 24 시간 동안 전 배양하였다. 그 다음 상등액을 제거하고 DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 및 0.4 mM) 또는  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 새로운 배지와 함께 각각의 농도로 첨가하여 다시 72 시간 동안 배양하였다.  $\alpha$ -MSH는 양성 대조군으로 사용되었다. 배양 후 1×PBS로 2회 세척하고 harvest하여 e-tube로 옮긴 뒤 15,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심분리하였다. pellet만 남겨 둔 상태에서 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH를 200  $\mu$ L 씩 넣고 70°C에서 1 시간 동안 용해시켰다. 그 다음 각 sample의 용액을 50  $\mu$ L 씩 96 well plate에 옮겨 담고 microplate

reader(SUNRISE, TECAN Austria GmbH)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 양은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 사용하여 BCA 단백질 분석법으로 측정하였다.

#### 2.2.4. Tyrosinase activity 측정

세포 내 tyrosinase 활성 측정 실험은 이전에 기술된 방법을 일부 수정하여 측정하였다. [41] B16F10 세포를 60-mm culture dish에  $1 \times 10^5$  cells/mL로 분주하여 24 시간 동안 전 배양하였다. 그 다음 상등액을 제거하고 DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 및 0.4 mM) 또는  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 새로운 배지와 함께 각각의 농도로 첨가하여 다시 72 시간 동안 배양하였다.  $\alpha$ -MSH는 양성 대조군으로 사용되었다. 배양 후  $1 \times$ PBS로 2회 세척하고 lysis buffer (RIPA buffer)와 protease inhibitor cocktail (1.0%)을 처리하여 4°C에서 20 분간 용해시킨 후, harvest하여 e-tube로 옮긴 뒤 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하였다. 분리한 단백질의 양은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 사용하여 BCA 단백질 분석법으로 측정 후 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)을 이용하여 정량 하였다. 그 다음 각각의 샘플 20  $\mu$ L에 L-DOPA (2 mg/mL) 80  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 2시간동안 배양한 후, microplate reader (SUNRISE, TECAN Austria GmbH)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

#### 2.2.5. Western Blot 분석

B16F10 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well의 60-mm culture dish로 분주하여 24 시간 동안 전 배양하였다. 그 다음 상등액을 제거하고 새로운 배지와 함께 다양한 농도의 DMC (0.05, 0.1, 0.2 및 0.4 mM) 또는  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 처리 하였다. 배양된 세포를  $1 \times$ PBS (phosphate-buffered saline)로 2회 세척하고, lysis buffer (RIPA buffer)와 protease inhibitor cocktail (1.0%)을 처리하여 4°C에서 20분간 용해시킨 후, harvest하여 e-tube로 옮긴 뒤 15,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하였다. 분리한 단백질의 양은 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로

사용하여 BCA 단백질 분석법으로 측정하였다. 단백질을 정량하고 20  $\mu\text{g}$ 의 각 단백질을 SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 단백질 크기별로 분리한 후, PVDF (polyvinylidene difluoride) 막으로 전이하였다. Membrane을 실온에서 0.1% Tween 20이 함유된 Tris-buffered saline(TBS-T)으로 녹인 5% Skim milk (blocking buffer)로 2 시간 동안 blocking 한 다음 TBS-T로 3 회 세척 하였다. 그런 다음, 1 : 1000의 비율로 희석된 1차 항체(primary antibody)를 첨가하고 over night 하였다. 반응 완료 후, TBS-T로 10 분 간격으로 5 회 세척 한 다음 HRP가 결합된 2차 항체(secondary antibody)를 1 : 3000의 비율로 희석하고 2시간 동안 반응하였다. 그 다음 TBS-T를 이용하여 10 분 간격으로 5회 세척하였다. 이 후 ECL solution 과 반응하고 Chemidoc (Fusion solo 6S.WL, VILBER LOURMAT, France)을 사용하여 단백질밴드를 현상하고 분석하였다.

### 3. 통계처리

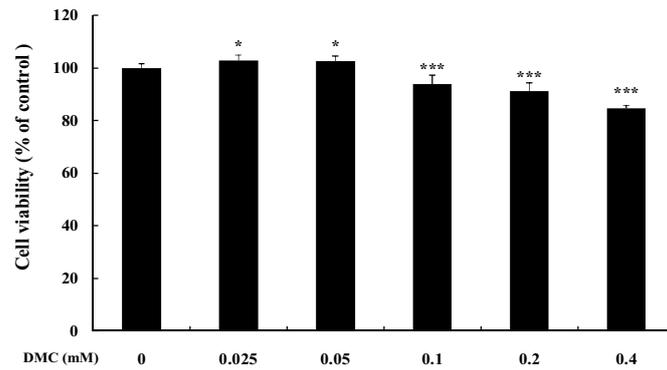
모든 실험의 결과는 평균  $\pm$  표준 편차 (SD; n = 3 or 4)로 표현된다. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . 통계적 유의성 및  $p$  값은 Student's t-test을 사용하여 계산하였다.

### III. 결 과

#### 1. HaCaT 세포 내에서 7, 8-dimethoxycoumarin의 항염증 효과

##### 1.1. HaCaT 세포에서 세포 생존율에 미치는 DMC의 영향

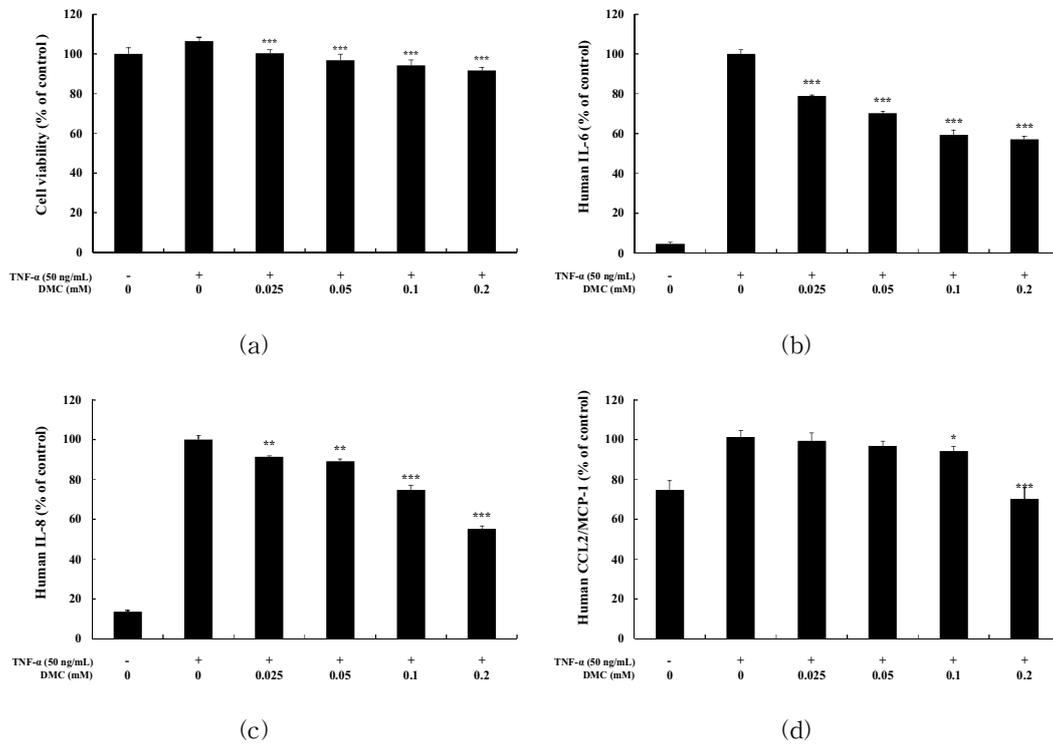
DMC의 항염증 효과가 세포 사멸로 인해 영향을 받을 수 있기 때문에, 먼저 MTT 분석법을 사용하여 HaCaT 세포에서 DMC의 세포 생존율을 평가하였다. HaCaT 세포를 20시간 동안 상이한 농도의 DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.4 mM)로 처리하였다. DMC 처리 시 세포의 생존율은 처리되지 않은 세포(대조군)에 비해 0.4 mM 농도일 때 85%로 나타났다. 따라서 세포독성이 없는 0.2 mM 농도 이하의 DMC를 사용하여 후속 실험을 진행하였다. DMC는 0.2 mM 농도까지 세포 생존 능력에 어떠한 독성 효과도 나타내지 않았다(Fig. 7).



**Figure 7.** Effects of DMC on the viability of HaCaT cells. The cells were treated with DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 mM) for 20 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

## 1.2. Pro-inflammatory cytokines/chemokines 발현에 미치는 DMC의 영향

각질형성세포는 TNF- $\alpha$ 에 노출되면 사이토카인 및 케모카인의 비정상적인 발현이 유도되어 T-세포 또는 백혈구가 피부의 염증성 병변에 침투하고 염증을 유발한다. 따라서 HaCaT 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 유발된 전 염증성 매개인자인 사이토킨과 케모카인 생산에 대한 DMC의 억제 효과를 조사하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 TNF- $\alpha$  단독 처리 대조군은 세포독성을 나타내지 않는 범위 내에 IL-6, IL-8 및 CCL2/MCP-1의 생산을 유의하게 증가시키는 반면 DMC 처리 시 이러한 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 IL-6, IL-8 및 CCL2/MCP-1의 생산을 용량 의존적으로 억제하였다 (Fig. 8).

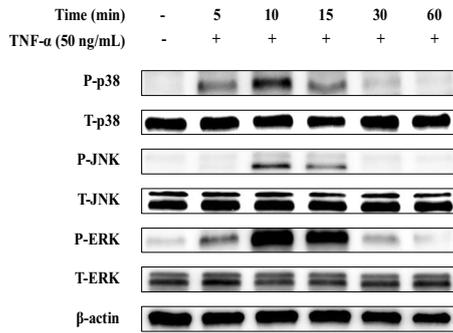


**Figure 8.** Effects of DMC on the pro-inflammatory cytokine production and cell viability in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells. The cells were treated with DMC (0.025, 0.05, 0.1, and 0.2 mM) and TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) for 20 h. TNF- $\alpha$ -treated cells were used as a positive control. (a) Cell viability was determined by MTT assay. (b), (c), and (d) Production of IL-6, IL-8, and CCL2/MCP-1, respectively, was measured using the culture supernatant of HaCaT cells treated as mentioned above by ELISA. The results are expressed as percentage values compared to that of the control cells. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n=4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. TNF- $\alpha$ -treated control.

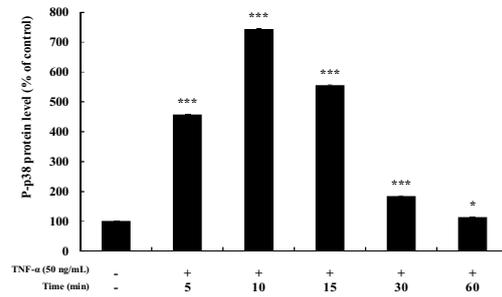
### 1.3. Western blot 분석

#### 1) TNF- $\alpha$ 가 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로에 미치는 영향

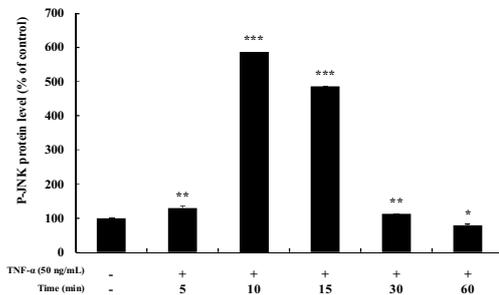
HaCaT 세포에서 DMC의 항염증 효과를 매개하는 신호전달 경로를 확인하기 전에 먼저 세포에 TNF- $\alpha$  (50 ng/mL)를 5, 10, 15, 30 및 60분 동안 각각 처리하여 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로 인자들의 최대 발현 시간을 조사하였다. 실험 결과 MAPKs 신호전달 경로에서 P-p38, P-JNK 및 P-ERK의 발현은 TNF- $\alpha$  처리 후 10 분에 가장 높았다(Fig. 9). 또한 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로에서 P-p105와 P-p65의 발현은 10 분에 가장 높았으며, I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 높은 인산화의 영향으로 10 분에 가장 많이 분해되는 것으로 나타났다(Fig 10.). 따라서 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로에 대한 DMC의 항염증 효과를 측정하기 위해 TNF- $\alpha$  처리시간을 10 분 기준으로 세포에 처리하였다.



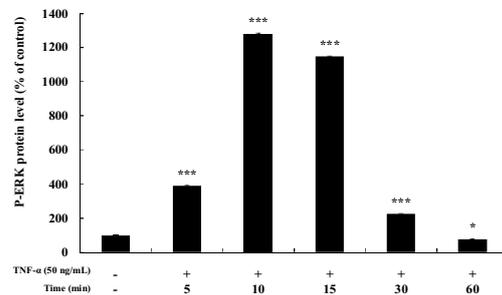
(a)



(b)

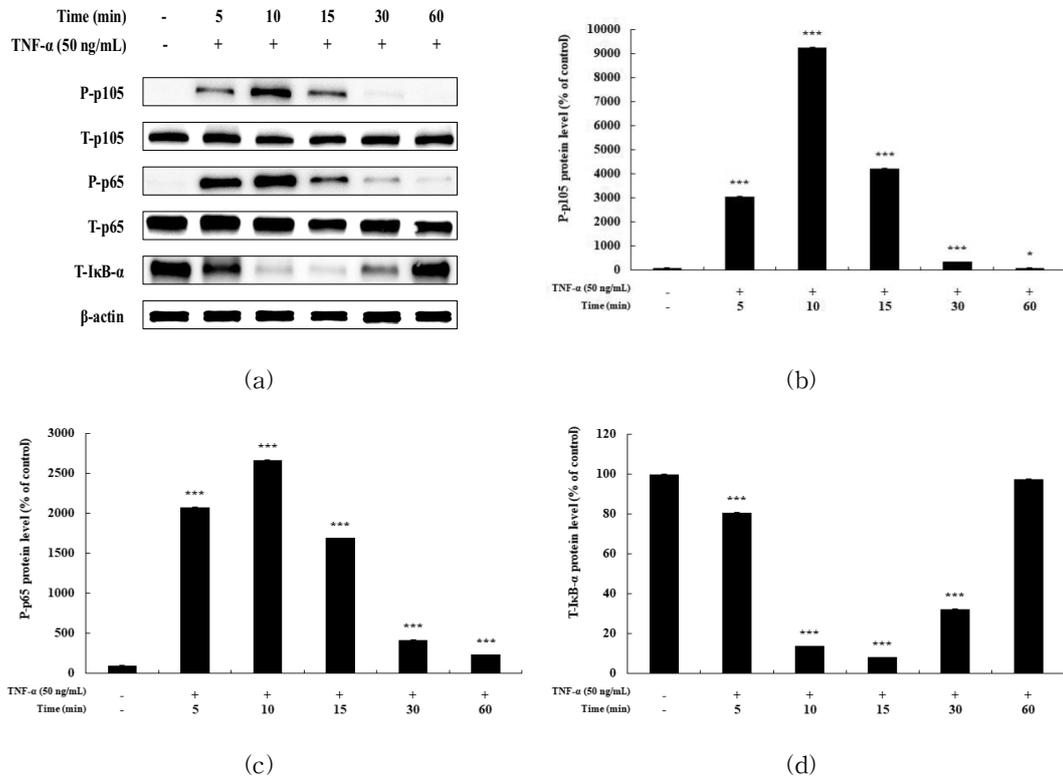


(c)



(d)

**Figure 9.** Effects of TNF- $\alpha$  on MAPKs pathway in HaCaT cells. The cells were treated with TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) for 5, 10, 15, 30, and 60 min and cell lysates were prepared for western blot analysis. Data are presented as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.



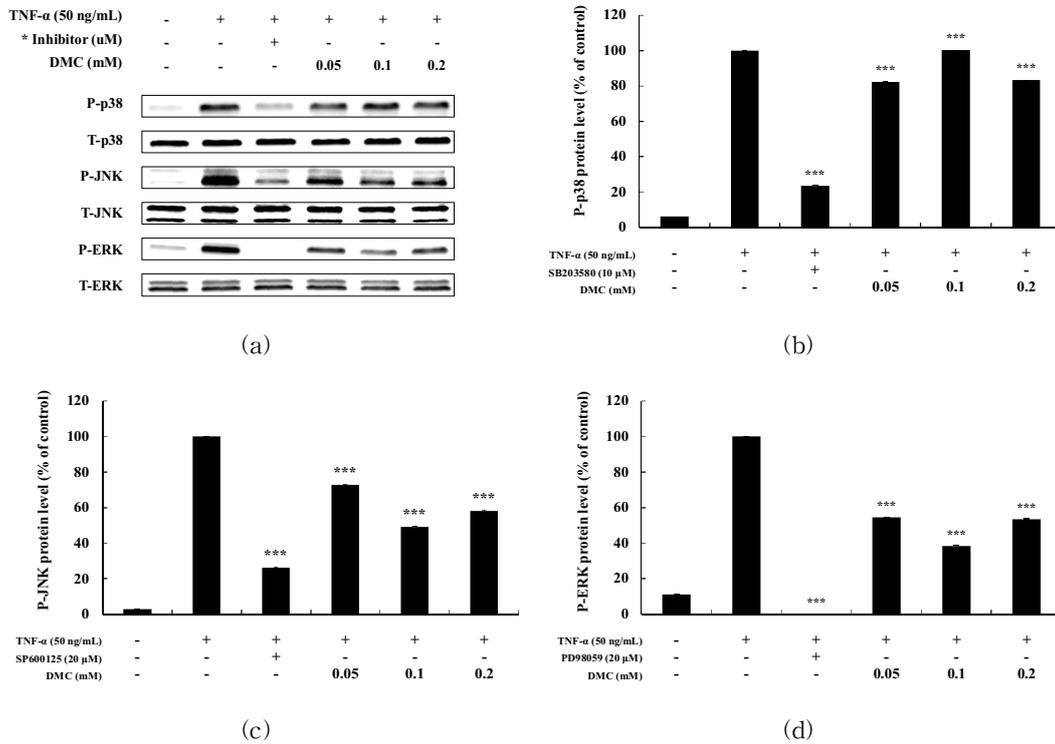
**Figure 10.** Effects of TNF- $\alpha$  on NF- $\kappa$ B pathway in HaCaT cells. The cells were treated with TNF- $\alpha$  (50 ng/mL) for 5, 10, 15, 30, and 60 min and cell lysates were prepared for western blot analysis. Data are presented as the mean  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

## 2) MAPKs 신호전달 경로에 대한 DMC의 영향

이전 실험에서 TNF- $\alpha$ 는 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B의 신호전달 경로에서 10 분대에 최대 인산화 활성을 나타냈다. 따라서 phospho-specific 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 MAPKs 신호전달 경로의 ERK, p38 및 JNK 인산화에 대한 DMC의 조절 효과를 조사하였다.

HaCaT 세포에서 DMC와 SB203580 (p38 억제제, 10  $\mu$ M), SP600125 (JNK 억제제, 20  $\mu$ M) 및 PD98059 (ERK 억제제, 20  $\mu$ M)는 각각 1 시간 동안 전 처리 후 TNF- $\alpha$  (50 ng/mL)을 10 분 동안 처리하였다.

각각의 inhibitor가 MAPKs 신호전달 경로에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 인산화를 대조군에 비해 억제한다는 것을 확인하였다. 또한, DMC는 P-ERK와 P-JNK에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 인산화를 총 단백질 수준에 영향을 미치지 않으면서 단백질의 발현을 저해 시켰지만, P-p38 수준에는 최소한의 영향을 나타내었다. 특히 JNK 및 ERK의 인산화는 0.1 mM DMC 농도에서 대조군에 비해 각각 49% 및 38% 억제되었다(Fig. 11). 이러한 결과는 P-p38, P-JNK 및 P-ERK의 활성화가 전 염증 매개인자 TNF- $\alpha$ 에 의한 자극에 관여하고 DMC가 MAPKs 신호전달 경로를 통해 염증 억제 활성을 나타냄을 확인하였다.

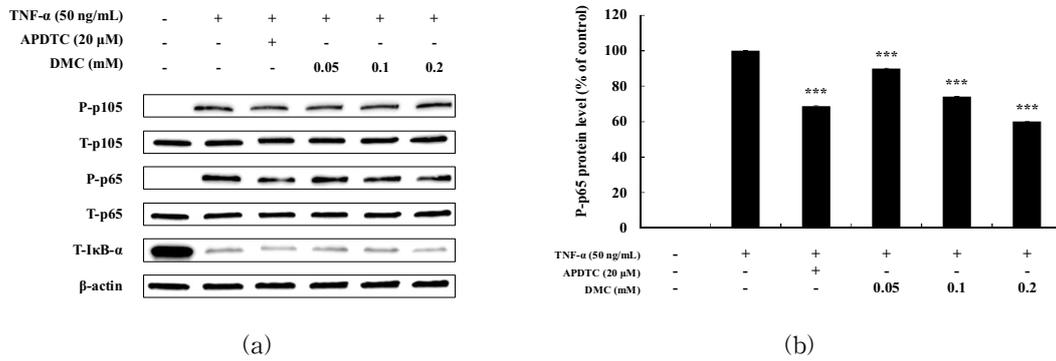


**Figure 11.** Effects of DMC on the expression of p38, JNK, and ERK in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells. (a) Cells were pretreated with various concentrations of DMC (0.05, 0.1, and 0.2 mM) for 1 h and then stimulated with TNF- $\alpha$  for 10 min followed by western blotting of the cell lysates with the indicated antibodies. (b), (c), and (d) Quantitation of the protein levels of P-p38 (b), P-JNK (c), and P-ERK (d) are presented as mean  $\pm$  SD (n=3). \*\*\*  $p < 0.001$  vs. TNF- $\alpha$ -treated control.

### 3) NF- $\kappa$ B 신호전달 경로에 대한 DMC의 영향

MAPKs 경로와 마찬가지로 NF- $\kappa$ B 신호 조절 또한 염증성 질환 조절에 기여하기 때문에 염증 질환의 중요한 치료 표적이다. 따라서 DMC가 TNF- $\alpha$ 에 의해 유발된 HaCaT 세포에서 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해와 NF- $\kappa$ B 활성화에 영향을 주는지 여부를 조사했다. 예상대로, I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 자극받지 않은 HaCaT 세포에서 높은 수준으로 발현되지만 TNF- $\alpha$ 로 자극된 세포에서는 10 분에 가장 높은 분해 활성이 나타났다. 또한 NF- $\kappa$ B 억제제 인 APDTC (20  $\mu$ M)로 처리한 결과, TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 P-p105 및 P-p65의 수준이 유의하게 감소하였다.

TNF- $\alpha$ 로 처리한 대조군과 비교하여 DMC는 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해 및 P-p105 활성화에 유의한 영향을 미치지 않았지만, p65의 인산화는 대조군에 비해 용량 의존적으로 유의하게 억제되었으며 0.2 mM 농도에서 40 % 저해 활성을 나타내었다. 이는 DMC가 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로를 조절함으로써 항염증 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 12).

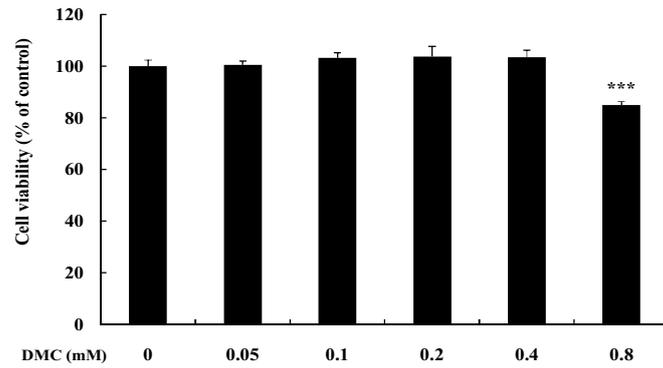


**Figure 12.** Effects of DMC on the p105, p65, and I $\kappa$ B- $\alpha$  expression in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells. (a) Cells were pretreated with various concentrations of DMC (0.05, 0.1, and 0.2 mM) for 1 h and then stimulated with TNF- $\alpha$  for 10 min followed by western blotting of the cell lysates with the indicated antibodies. (b) Quantitation of protein level of P-p65 presented as mean  $\pm$  SD (n=3). \*\*\*  $p < 0.001$  vs. TNF- $\alpha$ -treated control.

## 2. B16F10 세포 내에서 7, 8-dimethoxycoumarin의 멜라닌 생성 효과

### 2.1. B16F10 세포에서 세포 생존율에 미치는 DMC의 영향

B16F10 세포에서 DMC의 세포 생존율 영향을 조사하기 위해 MTT 분석법을 사용하여 평가하였다. B16F10 세포를 72 시간 동안 DMC를 농도별 (0.05, 0.1, 0.2, 0.4 및 0.8 mM)로 처리한 결과, 세포의 생존율은 처리되지 않은 세포(대조군)에 비해 0.8 mM 농도일 때 85%로 나타났다. 따라서 세포독성이 없는 0.4 mM 이하의 농도인 DMC를 사용하여 후속 실험을 진행하였다(Fig. 13).

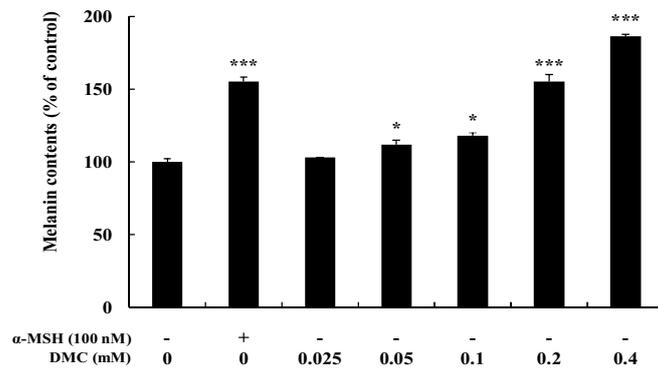


**Figure 13.** Effects of DMC on the viability of B16F10 cells. The cells were treated with DMC (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, and 0.8 mM) for 72 h. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

## 2.2. Melanin contents에 대한 DMC의 영향

멜라닌 합성에 미치는 DMC의 영향을 평가하기 위해 농도별 DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.4 mM)와  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 72 시간 동안 B16F10 세포에 처리하여 melanin contents 실험을 진행하였다.

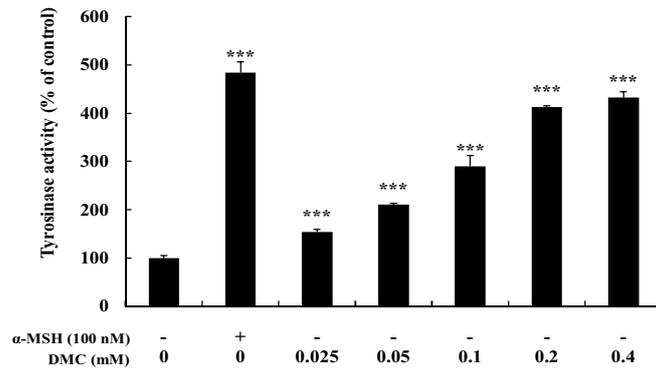
실험 결과 양성대조군  $\alpha$ -MSH는 음성대조군에 비해 55 % 증가하였고, DMC를 처리한 세포는 대조군과 비교하여 멜라닌 생산량이 농도 의존적으로 증가되는 것을 알 수 있었다. 특히 0.4 mM 농도에서는 음성대조군에 비해 86% 증가 하였다. 따라서 DMC는 B16F10 세포에서 멜라닌 합성을 증가시킨다는 것을 보여 주었다(Fig, 14).



**Figure 14.** Effects of DMC on melanin production in B16F10 cells. The cells were treated with DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 mM) for 72 h.  $\alpha$ -MSH (100 nM) was used as the positive control. melanin content is expressed as percentages compared to the respective values obtained for the untreated cells. The data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

### 2.3. Tyrosinase activity에 대한 DMC의 영향

Tyrosinase는 멜라닌 합성에 관련된 주요 효소이며, 따라서 이 실험을 통해 DMC가 B16F10 세포에서 tyrosinase 발현과 활성화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. B16F10 세포에  $\alpha$ -MSH (100 nM) 양성대조군 또는 DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 및 0.4 mM)을 농도별로 각각 처리한 결과 DMC는 세포 내 tyrosinase 활성을 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰다(Fig. 15). 이를 통해, DMC는 멜라닌합성에 필요한 효소인 tyrosinase의 활성을 증가시켜 멜라닌 생성을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

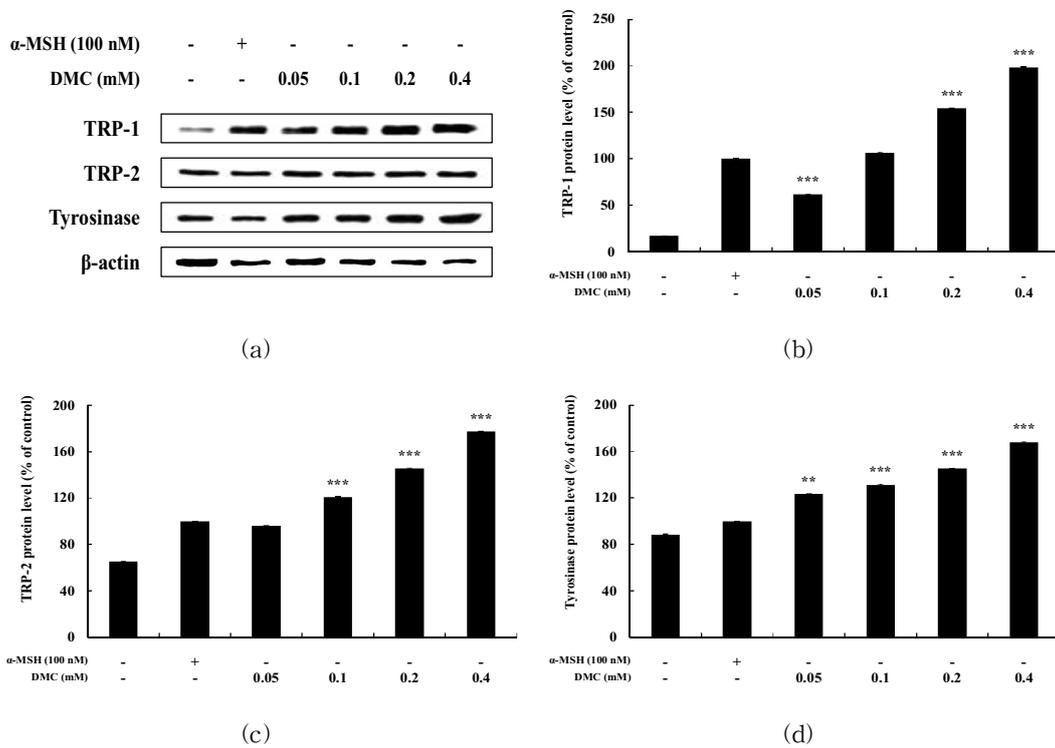


**Figure 15.** Effects of DMC on tyrosinase activity in B16F10 cells. The cells were treated with DMC (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 mM) for 72 h.  $\alpha$ -MSH (100 nM) was used as the positive control. The results are expressed as percentages of the untreated cells. The data are presented as mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments (n=3). \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control.

## 2.4. Western blot 분석

### 1) 멜라닌생성 관련 효소 발현에 미치는 DMC의 영향

Tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2는 멜라닌 생성 관련 효소로서 MITF의 활성화에 의해 유전자 전사가 활성화되어 멜라닌을 생성한다. DMC가 이러한 관련 효소 발현에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위해, 농도별 DMC가 처리된 B16F10 세포에서 western blot 실험을 수행하였다. 결과적으로, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질의 발현 모두 유의하게 증가하였다. 특히 0.4 mM 농도에서 TRP-1은  $\alpha$ -MSH 양성대조군에 비해 98%, TRP-2는 77%, 그리고 tyrosinase는 68% 증가하였다(Fig. 16).

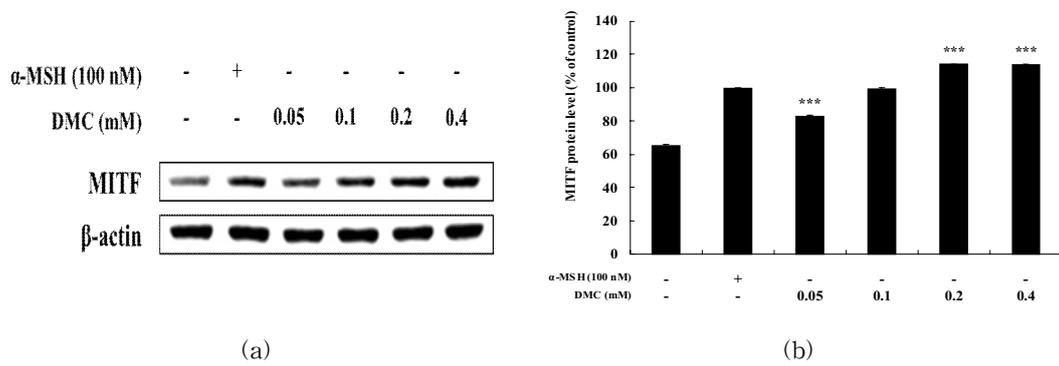


**Figure 16.** Effects of DMC on TRP-1, TRP-2, and Tyrosinase expression in B16F10 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of DMC for 40 h.  $\alpha$ -MSH (100 nM) was used as the positive control. Protein levels were determined by western blotting. (a) Western blotting results and protein levels of (b) TRP-1, (c) TRP-2, and (d) Tyrosinase. Results are expressed as percentages of the positive control. The data are presented as the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments (n=3). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . vs. positive control.

## 2) MITF 발현에 미치는 DMC의 영향

이전 내용과 마찬가지로 멜라닌 생성 효소의 증가는 MITF 활성화 증가에 기인하는 것으로 볼 수 있다.

따라서  $\alpha$ -MSH (100 nM) 및 농도별 DMC 처리 후 MITF 단백질의 발현을 확인 해 보았다. 결과적으로 DMC는 농도 의존적으로 MITF의 발현을 활성화시켰다. 그러므로, DMC는 MITF 발현에 의하여 멜라닌 생성 단백질을 활성화시키는 것을 알 수 있다(Fig. 17).



**Figure 17.** Effects of DMC on MITF expression in B16F10 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of DMC for 24 h.  $\alpha$ -MSH (100 nM) was used as the positive control. Protein levels were determined by western blotting. (a) Western blotting results and protein levels of (b) MITF. Results are expressed as percentages of the positive control. The data are presented as the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments (n=3). \*\*\*  $p < 0.001$ . vs. positive control.

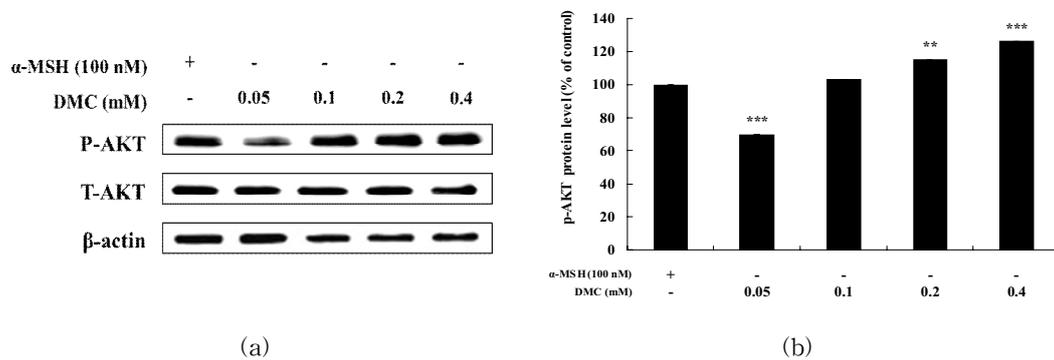
### 3) AKT 신호전달 경로에 대한 DMC의 영향

이전 연구에 의하면 cAMP 경로에서 AKT의 인산화 조절에 의해 MITF의 전사가 조절될 수 있음을 나타냈다. AKT 인산화 증가는 GSK-3 $\beta$ 가 ser21/9에 인산화를 통해  $\beta$ -catenin의 축적을 유도하고 세포질에 축적된  $\beta$ -catenin은 핵으로 전위되어 MITF의 발현을 증가시킨다. 또한 GSK-3 $\beta$ 는 Tyr216의 인산화를 통해  $\beta$ -catenin의 인산화를 유도하고 이는 유비퀴틴화 되어 분해시킨다. [45-46]

따라서 B16F10 세포에서 DMC가 AKT 인산화에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 western blot 실험을 진행하였다.

이전 실험 결과 DMC는 MITF의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 이와 관련하여 DMC 처리는 양성대조군인  $\alpha$ -MSH에 비해 농도 의존적으로 AKT의 인산화를 증가시켰으며, 특히 0.4 mM의 고농도에서는 26% 더 증가되었다(Fig 18).

그러나 이러한 결과는 AKT 하위 기전인 GSK-3 $\beta$ 의 인산화 조절에 의해 MITF의 발현이 증가되는지에 대한 경로 확인을 위해 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다.

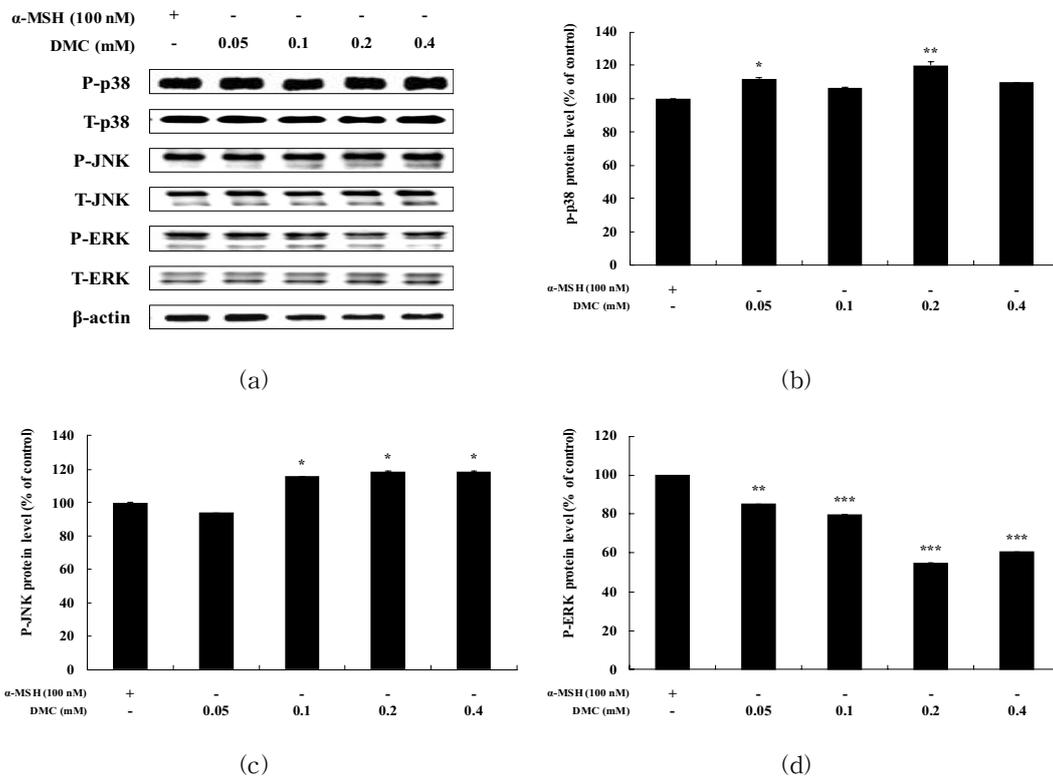


**Figure 18.** Effects of DMC on AKT signaling pathway in B16F10 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of DMC for 4 h. α-MSH (100 nM) was used as the positive control. Protein levels were determined by western blotting. (a) Western blotting results and protein levels of (b) AKT. Results are expressed as percentages of the positive control. The data are presented as the mean ± SD of at least three independent experiments (n=3). \*\*\*  $p < 0.001$ . vs. positive control.

#### 4) MAPKs 신호전달 경로에 대한 DMC의 영향

이전 연구 결과에 따르면, MAPKs 경로에서 p38과 JNK의 인산화는 멜라닌 생성을 증가시키는 대표적인 양성신호전달 경로이지만, ERK의 인산화는 멜라닌 생성을 저해하는 음성신호전달 경로로 알려져 있다. 따라서 DMC가 B16F10세포에서 p38, JNK, 및 ERK의 인산화에 어떠한 영향을 나타내는지 알아보기 위하여 western blot 실험을 수행하였다.

실험 결과 DMC는 MAPKs 신호전달 경로에서 p38과 JNK의 인산화를  $\alpha$ -MSH 처리 대조군에 비해 증가시키는 것을 확인하였고, ERK의 인산화는 농도 의존적으로 저해시키는 것을 나타내었다. 이는 DMC가 MAPKs 신호전달 경로를 통하여 멜라닌 생성을 유도하고 있다는 것을 나타내었다(Fig. 19).

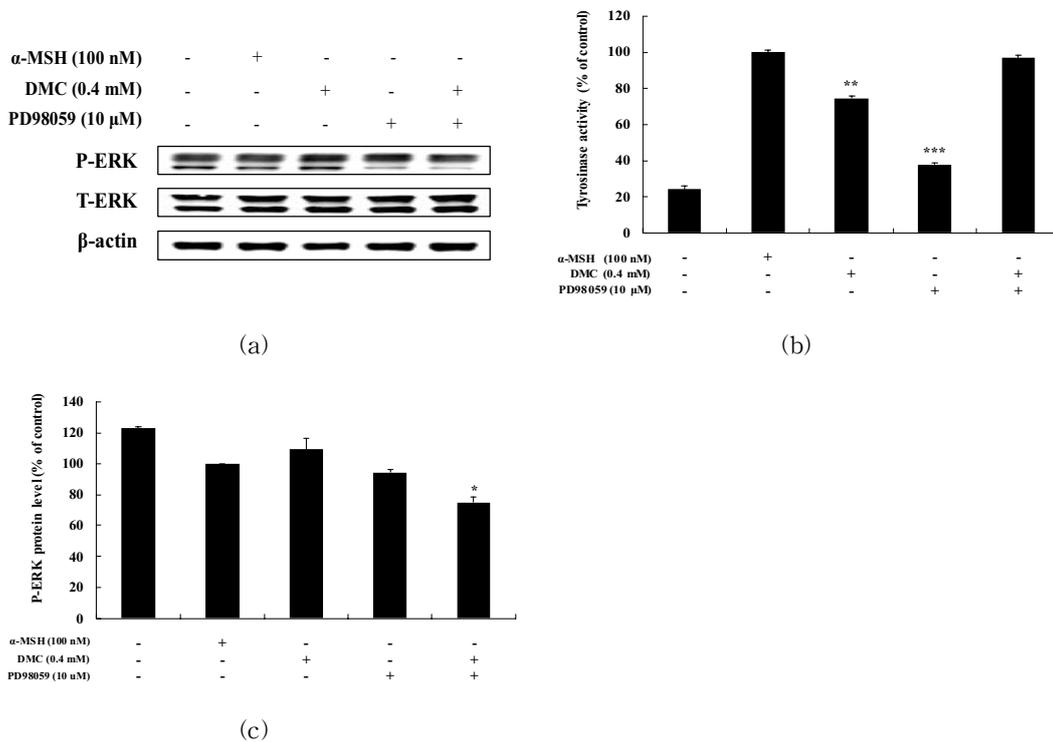


**Figure 19.** Effects of DMC on MAPKs signaling pathway in B16F10 cells. The cells were treated with the indicated concentrations of DMC for 4 h.  $\alpha$ -MSH (100 nM) was used as the positive control. Protein levels were determined by western blotting. (a) Western blotting results and protein levels of (b) P-p38, (c) P-JNK, and (d) P-ERK. Results are expressed as percentages of the positive control. The data are presented as the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments ( $n=3$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. positive control.

#### 5) MAPKs 신호전달 경로에 대한 inhibitor 및 DMC의 영향

이러한 MAPKs 신호전달 경로에서 ERK의 인산화가 tyrosinase의 활성 증가와 연관이 있는지 확인하기 위해 ERK 저해제를 처리하여 ERK 신호전달 경로와 Tyrosinase activity 실험을 추가로 수행하였다.

그 결과 ERK 신호전달 경로에서 ERK 저해제를 단독으로 처리하였을 때 보다 DMC를 동시에 처리하였을 때 인산화가 더욱 감소하는 것을 알 수 있었다. 그리고 tyrosinase activity 실험 결과 ERK 저해제를 단독으로 처리하였을 때 음성 대조군보다 활성이 증가하는 것을 나타내었으며, 특히 ERK 저해제를 DMC와 동시에 처리하였을 때  $\alpha$ -MSH 처리 대조군만큼 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 DMC는 MAPKs 경로 중 ERK의 인산화를 저해하여 멜라닌 생성 효과를 나타내는 것을 재확인하였다(Fig. 20).



**Figure 20.** Effects of DMC and MAPKs inhibitor on MAPKs pathway in B16F10 cells. The cells were treated with p38 inhibitor SP600125(10 μM), JNK inhibitor SB203580 (5 μM), and ERK inhibitor PD98059 (10 μM) alone or in combination with DMC (0.4 mM). α-MSH (100 nM) was used as the positive control. Protein levels were determined by western blotting. (a) Western blotting results and protein levels of (b) P-p38, (c) P-JNK, and (d) P-ERK. Results are expressed as percentages of the positive control. The data are presented as the mean ± SD of at least three independent experiments (n=3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. positive control.

#### IV. 고 찰

화합물 7,8-dimethoxycoumarin (7,8-Dimethoxychromen-2-one, DMC) (Fig. 3)은 여러 약용 식물에 존재하는 천연 쿠마린으로서 이전 연구에서 DMC는 항산화, 항염증 작용을 통해 쥐의 위염 개선과 신장을 보호하는 것으로 나타났다. 또한 최근 연구에 따르면, methoxy 구조를 갖는 플라보노이드가 hydroxy 구조를 갖는 플라보노이드보다 기능 및 산업 측면에서 더 두드러질 뿐만 아니라, 멜라닌 생성 활성평가 시 hydroxy 구조를 갖는 coumarin 화합물은 멜라닌 저해 활성을 나타내는 반면 methoxy 구조를 가진 coumarin 화합물은 멜라닌 생성효소를 통해 멜라닌 합성을 증가시키는 것으로 알려졌다.

그러나 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포에서의 피부 염증에 대한 억제 효과와 B16F10 흑색 종 세포에서의 멜라닌 생성 메커니즘에 대한 기본 메커니즘은 아직 조사되지 않았다. 따라서 이 연구에서 TNF- $\alpha$  처리된 HaCaT 세포에서 전 염증성 매개 인자인 사이토카인 및 케모카인의 발현에 대한 DMC의 억제 효과와 염증관련 기전에 대해 조사했으며, 또한 DMC가 멜라닌 생성 및 멜라닌 생성 효소 발현에 미치는 영향을 조사하고 멜라닌 생성 관련 기전연구를 수행하였다

결론적으로, 본 연구 결과는 TNF- $\alpha$ 로 유도된 HaCaT 세포에서 DMC가 세포 독성을 나타내지 않으면서 전 염증성 매개인자인 IL-6, IL-8 및 CCL2/MCP-1의 발현을 억제한다는 것을 확인하였고, 또한 이러한 cytokine과 chemokines의 발현 억제는 MAPKs (P-JNK와 P-ERK)와 NF- $\kappa$ B (P-P65) 신호전달 경로의 전사 인자 억제를 통해 일어난다는 것을 처음으로 입증하였다.

먼저 HaCaT 세포에서 DMC가 세포 생존율에 미치는 영향에 대해 평가하였다. 실험결과 DMC로 처리되지 않은 세포(대조군)에 비해 0.4 mM 농도 일 때 세포 생존율이 85%로 나타났으며 이 후 실험은 모두 0.2 mM 이하 농도에서 수행하였다(Fig. 7). 다음으로 DMC가 전 염증성 매개인자들의 생성에 미치는 영향에 대해 평가 하였다. TNF- $\alpha$  단독 처리 대조군은 세포독성을 나타내지 않는 범위 내에 IL-6, IL-8 및 CCL2/MCP-1의 생산을 유의하게 증가시키는 반면 DMC 처리 시 이러한 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 IL-6, IL-8 및 CCL2/MCP-1의 생산을 농

도 의존적으로 억제하였다(Fig 8).

이러한 전 염증성 매개인자들의 생성 억제는 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로를 통해 발생한다. 따라서 DMC의 항염증 효과를 나타내는 신호전달 경로를 확인하기 위해 먼저 대표적인 MAPKs 및 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로에서 염증 반응을 매개하는 전 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  (50 ng/mL)를 단독으로 처리하고 시간 별 인산화의 최대 발현시간을 확인하였다. MAPKs 신호전달경로에서 P-38, P-JNK, 및 P-ERK의 발현은 TNF- $\alpha$  처리 후 10분에 가장 높은 발현을 보였다(Fig. 9). 또한 NF- $\kappa$ B 신호전달경로에서 P-p105, P-p65 발현 또한 10분에 가장 높은 발현을 보였으며, I $\kappa$ B- $\alpha$ 는 10분에서 가장 degradation이 일어나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10). 이를 통해 phospho-specific 항체를 이용하여 MAPKs 신호전달 경로의 p38, JNK 및 ERK 인산화에 대한 DMC의 조절 효과를 조사하였다. HaCaT 세포에서 DMC와 SB203580 (p38 억제제, 10  $\mu$ M), SP600125 (JNK 억제제, 20  $\mu$ M) 및 PD98059 (ERK 억제제, 20  $\mu$ M)는 각각 1 시간 동안 전 처리 후 TNF- $\alpha$  (50 ng/mL)을 10분 동안 처리하였다. 각각의 inhibitor가 MAPKs 신호전달 경로에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 인산화를 대조군에 비해 억제한다는 것을 확인하였다. 또한, DMC는 0.1 mM 농도에서 P-ERK와 P-JNK에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 인산화를 총 단백질 수준에 영향을 미치지 않으면서 대조군에 비해 각각 49% 및 38% 저해시켰지만, P-p38 수준에서는 최소한의 영향을 나타내었다(Fig. 11). 그리고 DMC가 TNF- $\alpha$ 에 의해 유발된 HaCaT 세포에서 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해와 NF- $\kappa$ B 활성화에 영향을 주는지 여부를 조사했다. NF- $\kappa$ B 억제제인 APDTC (20  $\mu$ M)로 처리한 결과, TNF- $\alpha$ 에 의해 유도된 P-p105 및 P-p65의 수준은 유의하게 감소했다. 그러나 TNF- $\alpha$ 로 처리한 대조군과 비교하여 DMC는 I $\kappa$ B- $\alpha$  분해 및 P-p105 활성화에는 유의한 영향을 미치지 않았지만, p65의 인산화는 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 억제되어 DMC가 NF- $\kappa$ B 신호 전달 경로를 조절함으로써 항염증 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 12).

또한, B16F10 흑색 종 세포에서 멜라닌 생성에 대한 DMC의 영향을 평가하기 위해 추가적인 실험을 진행하였다. B16F10 세포에서 DMC는 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에 세포 내 tyrosinase activity와 멜라닌 함량을 농도 의존적으로 증가시켰다. 그리고 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2를 포함하는 멜라닌 생성 효소의 발현뿐만 아니라 이를 매개하는 MITF의 단백질 발현을 증가시켰다. 이러한 MITF의 발현의 상위 기전인 MAPKs 신호 전달 경로에서는 DMC가 ERK의 인산화를 저해함으로써 멜라닌 생성을 유도하는 것을 확인하였다.

먼저, B16F10 세포에서 DMC의 세포 생존을 영향을 조사하기 위해 MTT 분석법을 사용하여 평가하였으며, 세포의 생존율은 처리되지 않은 세포(대조군)에 비해 0.8 mM 농도일 때 85%로 나타났다. 따라서 세포독성이 없는 0.4 mM 이하의 농도인 DMC를 사용하여 후속 실험을 진행하였다(Fig. 13).

그 다음 멜라닌 합성에 미치는 DMC의 영향을 평가하기 위해 농도별 DMC와 양성 대조군인  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 72시간 동안 B16F10 세포에 처리하여 melanin contents 실험을 진행하였다. 실험 결과 양성대조군  $\alpha$ -MSH는 음성대조군에 비해 55% 증가하였고, DMC를 처리한 세포는 대조군과 비교하여 멜라닌 생산량이 농도 의존적으로 증가되는 것을 알 수 있었다. 특히 0.4 mM 농도에서는 음성대조군에 비해 86 % 증가하였다 (Fig. 14). 또한 DMC가 멜라닌 합성에 관련된 주요 효소인 tyrosinase 발현과 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였으며, 그 결과 DMC는 세포 내 tyrosinase 활성을 음성 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰다(Fig. 15). Tyrosinase, TRP-1, 그리고 TRP-2 는 멜라닌 생성 관련 효소로서 MITF의 활성화에 의해 이러한 효소의 유전자 전사를 활성화시키고 멜라닌을 생성한다. 따라서 DMC가 이러한 관련 효소 발현에 어떠한 영향을 미치는지 western blot 실험을 수행하였다. 결과적으로, tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질의 발현 모두 유의하게 증가 하였다. 특히 0.4 mM 농도에서 TRP-1은  $\alpha$ -MSH 양성대조군에 비해 98%, TRP-2는 77%, 그리고 tyrosinase는 68% 증가하였다(Fig. 16). 이처럼 멜라닌 생성 효소의 증가는 MITF 활성화 증가에 기인하기 때문에  $\alpha$ -MSH (100 nM) 및 농도별 DMC 처리 후 MITF 단백질의 발현을 확인해 보았다. 결과적으로 DMC는 농도 의존적으로 MITF의 발현을 활성화시켰다. 특히 0.4 mM에서  $\alpha$ -MSH 양성대조군에 비해 14% 증가하는

것을 나타내었다(Fig. 17). 그 다음으로 B16F10 세포에서 DMC가 AKT 신호전달 경로에서 AKT 인산화에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 결과적으로 DMC 처리는 양성대조군인  $\alpha$ -MSH에 비해 농도 의존적으로 AKT의 인산화를 증가시켰으며, 특히 0.4 mM의 고농도에서는 26% 더 증가 되었다(Fig. 18). 그러나 이러한 결과가 GSK-3 $\beta$ 의 인산화 조절에 의해 MITF의 발현이 증가되는지에 대한 경로 확인을 위해 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다. 이전 연구 결과에 따르면, MAPKs 경로에서 p38과 JNK의 인산화는 멜라닌 생성을 증가시키는 대표적인 양성신호전달 경로이지만, ERK의 인산화는 멜라닌생성을 저해하는 음성신호전달경로로 알려져 있다. 따라서 DMC가 B16F10세포에서 p38, JNK, 및 ERK의 인산화에 어떠한 영향을 나타내는지 알아보기 위하여 western blot 실험을 수행하였다. 실험 결과 DMC는 MAPKs 신호전달 경로에서 p38과 JNK의 인산화를  $\alpha$ -MSH 처리 대조군에 비해 증가시키는 것을 확인하였고, ERK의 인산화는 농도 의존적으로 저해 되었으며, 특히 0.4 mM 농도에서 61% 저해되었다. 이는 DMC가 MAPKs 신호전달 경로를 통하여 멜라닌 생성을 유도하고 있다는 것을 보여준다(Fig 19.).

이러한 MAPKs 신호전달 경로에서 ERK의 인산화가 tyrosinase의 활성 증가와 연관이 있는지 확인하기 위해 ERK 저해제를 처리하여 ERK 신호전달 경로와 Tyrosinase activity 실험을 추가로 수행하였다. 그 결과 ERK 신호전달 경로에서 ERK 저해제를 단독으로 처리하였을 때 보다 DMC를 동시에 처리하였을 때  $\alpha$ -MSH 처리 대조군에 비해 인산화가 감소하는 것을 알 수 있었다. 그리고 tyrosinase activity 실험 결과 ERK 저해제를 단독으로 처리하였을 때 음성 대조군보다 활성이 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 ERK 저해제를 DMC와 동시에 처리하였을 때  $\alpha$ -MSH 처리 대조군만큼 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 20).

본 연구를 통해 DMC는 아토피 및 건선과 같은 염증성 피부 질환 및 백반증 및 백모증과 같은 저 색소침착 질환의 치료를 위한 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다. 추가적으로 DMC의 피부자극 테스트와 같은 안전성 평가는 잠재적인 피부 질환 치료 소재로서의 효과를 평가하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

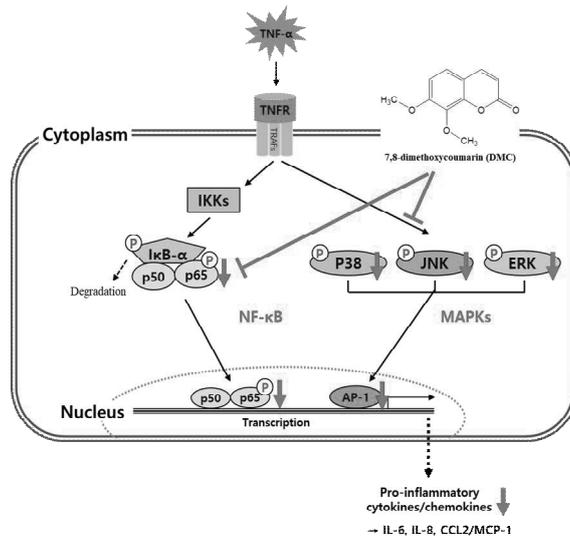


Figure 21. Effects of DMC on HaCaT cells

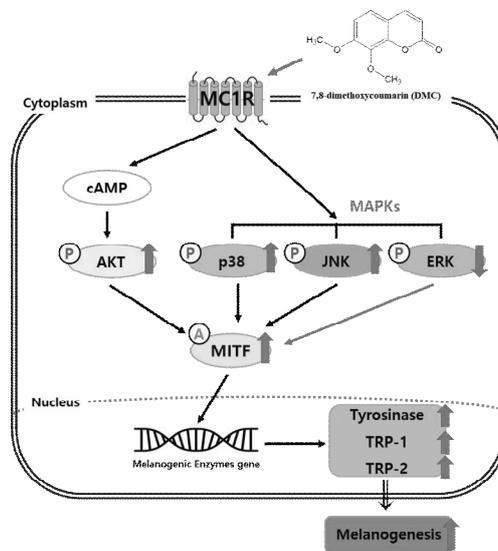


Figure 22. Effect of DMC on B16F10 cells

## V. 참고 문헌

1. Ronald, B, Herberman, Howard, T.H, Natural Cell-Mediated Immunity, *Advances in cancer research*, **1978**, *27*, 305-377.
2. Pancer, Z, Cooper, M.D. The evolution of adaptive immunity, *Annual Review of Immunology*, **2006**, *24(1)*, 497 - 518.
3. Smith, A.D. Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology, **1997**, *Oxford University Press*. ISBN; 0-19-854768-4.
4. Kawai. T, Akira. S. Innate immune recognition of viral infection, *Nat Immunol*, **2006**, *7(2)*, 131-7.
5. Wolters Kluwer, Health, Cytokine in Stedman's Medical Dictionary, *Lippincott Williams & Wilkins*, **2006**, *28th ed.*
6. O'Byrne, K.J, Dalgleish, A.G, Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy, *British Journal of Cancer*, **2001**, *85(4)*, 473 - 83.
7. 홍란희, 김윤정, 송다해, 석은경, 피부과학, *광문각*, **2012**, ISBN : 9788970937038
8. Kong, L, Liu, J, Wang, J, Luo, Q, Zhang, H, Liu, B, Xu, F, Pang, Q, Liu, Y, Dong, J, Icarin inhibits TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  induced inflammatory response via inhibition of the substance P and p38-MAPK signaling pathway in human keratinocytes. *Int Immunopharmacol*, **2015**, *29(2)*, 401-407.

9. Yang, J.H, Hwang, Y.H, Gu, M.J, Cho, W.K, Ma, J.Y, Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells. *Phytomedicine*, **2015**, *22(14)*, 1262-8.
10. Zhang, J.; Yang, X.; Wang, H.; Zhao, B.; Wu, X.; Su, L.; Xie, S.; Wang, Y.; Li, J.; Liu, J.; Liu, M.; Han, F.; He, T.; Zhang, W.; Tao, K.; Hu, D. PKC $\zeta$  as a promising therapeutic target for TNF $\alpha$ -induced inflammatory disorders in chronic cutaneous wounds. *Int J Mol Med*, **2017**, *40(5)*, 1335-1346.
11. Cho, J.W.; Lee, K.S.; Kim, C.W. Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med*, **2007**, *19(3)*, 469-74.
12. Choi, H.J.; Lee, J.H.; Jung, Y.S. (+)-Nootkatone inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$ /interferon  $\gamma$ -induced production of chemokines in HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2014**, *447(2)*, 278-84.
13. Jung, T.D.; Choi, S.I.; Choi, S.H.; Cho, B.Y.; Sim, W.S.; Han-Xionggao, Lee, S.J.; Park, S.J.; Kim, D.B.; Kim YC, Lee JH, Lee OH. Changes in the Anti-Allergic Activities of Sesame by Bioconversion. *Nutrients*, **2018**, *10(2)*, 210.
14. Jeong, S.J.; Lim, H.S.; Seo, C.S.; Kim, J.H.; Jin, S.E.; Yoo, S.R.; Shin, H.K. Traditional herbal formula Jakyakgamcho-tang (*Paeonia lactiflora* and *Glycyrrhiza uralensis*) impairs inflammatory chemokine production by inhibiting activation of STAT1 and NF- $\kappa$ B in HaCaT cells. *Phytomedicine*, **2015**, *22(2)*, 326-32.

15. Huang, W.C.; Dai, Y.W.; Peng, H.L.; Kang, C.W.; Kuo, C.Y.; Liou, C.J. Phloretin ameliorates chemokines and ICAM-1 expression via blocking of the NF- $\kappa$ B pathway in the TNF- $\alpha$ -induced HaCaT human keratinocytes. *Int Immunopharmacol*, **2015**, *27(1)*, 32-37.
16. Peti, W.1, Page, R, Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci*, **2013**, *22(12)*, 1698-710.
17. Napetschnig J1, Wu H. Molecular basis of NF- $\kappa$ B signaling, *Annu Rev Biophys*, **2013**, *42*, 443-68.
18. Tan H.Y, Zhang A.L, Chen D. Xue C.C, Lenon G.B, Chinese herbal medicine for atopic dermatitis: a systematic review. *J Am Acad Dermatol*, **2013**, *69(2)*, 295-304.
19. Kudo K, Hasegawa S, Suzuki Y, Hirano R, Wakiguchi W, Kittaka S, 1  $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits vascular cellular adhesion molecule-1 expression and interleukin-8 production in human coronary arterial endothelial cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol*, **2012**, *132(3-5)*, 290-294.
20. Michaela B, Vincent J.H, The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochem Photobiol*, **2008**, *84(3)*, 539-549.
21. Miyamura Y.I, Coelho S.G, Wolber R, Miller S.A, Wakamatsu, K, Zmudzka B.Z, Ito S, Smuda C, Passeron T, Choi W, Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*, **2007**, *20*, 2-13.

22. Kishida R, Saputro A.G, Kasai H, Mechanism of dopachrome tautomerization into 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid catalyzed by Cu(II) based on quantum chemical calculations, *Biochim Biophys Acta*. **2015**, *1850(2)*, 281-6.
23. Francisco Solano, On the Metal Cofactor in the Tyrosinase Family, *Int J Mol Sci*, **2018**, *19(2)*, 633.
24. Vachtenheim J, Ondrusova L, A Critical Transcription Factor in Melanoma Transcriptional Regulatory Network. *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*, **2013**, *4*, 71 - 73.
25. Vachtenheim, J.; Borovansky, J. “Transcriptionphysiology” of pigment formation in melanocytes: Central role of MITF, *Exp. Dermatol*, **2010**, *19*, 617 - 627.
26. Lee A, Kim J.Y, Heo J, Cho D.H, Kim H.S, An I.S, An. S, Bae. S. The inhibition of melanogenesis via the PKA and ERK signaling pathways by *Chlamydomonas reinhardtii* extract in B16F10 melanoma cells and artificial human skin equivalents. *J. Microbiol. Biotechnol*, **2018**, *28(1)*.
27. 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.
28. Kang Y.G, Choi E. J, Choi Y. Hwang J.K, 5,7-Dimethoxyflavone induces melanogenesis in B16F10 melanoma cells through cAMPdependent signalling, *Exp. Dermatol*, **2007**, *20*, 445 - 447.

29. J. Bauer, C. Garbe, Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res*, **2003**, *16*, 279–306.
30. Mottet N, Cabrol C, Metz J.P, Toubin C, Arbez-Gindre F, Valduga M, McElreavey K, Riethmuller D, Van Maldergem L, Piard J. Acquired disorders with hypopigmentation: A clinical approach to diagnosis and treatment, *Journal of the American Academy of Dermatology*, **2018**, *18*, 32508–8.
31. Slominski A, Tobin D.J, Shibahara S, Wortsman J, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol*, **2004**, *84*, 1155 - 1228.
32. Lee N.H, Natural products chemistry, *신일서적(주)*, **2014**, 120–121.
33. Fylaktakidou K.C, Hadjipavlou-Litina D.J, Litinas K.E, Nicolaidis D.N, Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory/Antioxidant Activities, *Curr Pharm Des*, **2004**, *10(30)*, 3813–33.
34. Kaur M, Kohli M, Sandhu S, Bansal Y, Bansal G, Coumarin: A Promising Scaffold for Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2015**, *15*, 1032–1048.
35. Choi J.K, Jang Y.H, Lee S, Lee S.R, Choi Y.A, Jin M, Choi J.H, Park J.H, Park P.H, Choi H, Kwon T.K, Khang D, Kim S.H, Chrysin attenuates atopic dermatitis by suppressing inflammation of keratinocytes, *Food Chem Toxicol*, **2017**, *110*, 142–150.

36. Li Z, Hu J, Sun M, Song X, Li G, Liu Y, Li G, Ji H, Liu G, Chen N, In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of IMMLG5521, a coumarin derivative, *IntImmunopharmacol*, **2013**, *17(2)*, 400-403.
37. Pérez Gutiérrez R.M, Vargas Solis R, Garcia Baez E, Gallardo Navarro Y, Hypoglycemic activity of constituents from *Astianthus viminalis* in normal and streptozotocin-induced diabetic mice, *J Nat Med*, **2009**, *63(4)*, 393-401.
38. Sood S, Muthuraman A, Gill N.S, Bali M, Sharma P.D, Role of 7,8-dimethoxycoumarin in anti-secretory and anti-inflammatory action on pyloric ligation-induced gastritis in rats, *J Asian Nat Prod Res*, **2010**, *12(7)*, 593-9.
39. Muthuraman A, Sood S, Ramesh M, Puri K.D, Peters A, Chauhan A, Arora P.K, Rana A, Therapeutic potential of 7,8-dimethoxycoumarin on cisplatin and ischemia/reperfusion injury-induced acute renal failure in rats, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **2012**, *385(7)*, 739-48.
40. 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 melanogenic signaling proteins and sustained extracellular signal-regulated kinase in B16/F10 murine melanoma cells, *Nat. prod. communications*, **2015**, *10*, 389-92.
41. 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. *Latin American*

*Journal of Pharmacy*, **2015**, *34(6)*, 1087-92.

42. Chung Y.C, Kim S.Y, Kim J.H, Geun Soo Lee G.S, Lee J.N, Lee N.H, Hyun C.G, Pradol, an O-Methylated Flavone, Induces Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells via p-p38 and p-JNK Upregulation, *Molecules*. **2017**, *22(10)*, 1704.
43. Shiming Li, Min-Hsiung Pan, Chih-Yu Lo, Di Tan, Yu Wang, Fereidoon Shahidi, Chi-Tang Ho, Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones, *Journal of Functional Foods*, **2009**, *1(1)*, 2-12.
44. 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 Pharmacol Sin*. **2006**, *27(11)*, 1467-73.
45. Jang E.J, Shin Y, Park H.J, Kim D, Jung C, Hong J.Y, Kim S, Lee S.K, Anti-melanogenic activity of phytosphingosine via the modulation of the microphthalmia-associated transcription factor signaling pathway. *J Dermatol Sci*, **2017**, *87(1)*, 19-28.
46. Ko G.A, Shrestha S, Cho S.K, Sageretia thea fruit extracts rich in methyl linoleate and methyl linolenate downregulate melanogenesis via the Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway, *Nutr Res Pract*, **2018**, *12(1)*, 3 - 12.