



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 psoralen 계열
화합물의 항염증 및 멜라닌 생성
효과 규명

제주대학교 대학원

화학과

이예지

2022년 2월



마우스 세포에서 psoralen 계열
화합물의 항염증 및 멜라닌 생성
효과 규명




지도교수 현 창 구

이 예 지

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2022년 2월

이예지의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u> 任 堯 貞 </u>	
위 원	<u> 朴 慶 淳 </u>	
위 원	<u> 玄 昌 久 </u>	

제주대학교 대학원

2022년 2월

Effect of anti-inflammation and melanogenesis
on psoralen related compounds

Ye Ji Lee

(Supervised by professor Chang-Gu Hyun)

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

2021. 12.

This thesis has been examined and approved.

Hee-Jung Im

Kyungsoon Park

CHANG-GU HYUN

12/17

Date

Department of Chemistry

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

In this study, we investigated the biological activity according to the structural difference of Psoralen derivatives in RAW 264.7 cells and B16F10 melanoma cells. We also investigated the mechanism of Xanthotoxol in RAW 264.7 cells and of Bergapten in B16F10 melanoma cells. The RAW 264.7 cells were treated with Xanthotoxol (62.5, 125, 250 and 500 μM) respectively to observe its effects. As a result, Xanthotoxol significantly decreased on the production of inflammatory mediators (NO, PGE_2) and pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α). Western blot results showed that the protein expression of iNOS and COX-2 were decreased by Xanthotoxol. Xanthotoxol reduced the phosphorylation of the mitogen activated protein kinase (MAPK). Xanthotoxol also reduced the phosphorylation of I κ B α in the nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway. These results suggest that Xanthotoxol is a potential treatment for inflammation. The B16F10 melanoma cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) respectively to observe its effects. As a result, Bergapten increased melanin contents and tyrosinase activity in B16F10 cells. Western blot results showed that the protein expression of Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and (microphthalmia associated transcription factor) MITF were increased by Bergapten. Bergapten increased the phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) at Ser 9 and the expression of β -catenin. Bergapten increased the phosphorylation of protein kinase A (PKA) and MAPKs. On the other hand, Bergapten increased the expression of MITF by inhibiting the phosphorylation of AKT. These results suggest that Bergapten is a potential treatment for hypopigmentation.

Key word: Psoralen derivatives, RAW 264.7, B16F10, Inflammation, Hypopigmentation.

목 차

ABSTRACT	1
목 차	2
LIST OF FIGURES	4
I. 서 론	6
II. 재료 및 방법	14
1. 시료 및 시약	14
2. 실험방법	15
2.1. 세포배양	15
2.2. 세포생존율	16
2.3. NO 생성량 측정	17
2.4. Prostaglandin E ₂ 및 전염증성 cytokine 생성량 측정	18
2.5. Melanin contents 측정	19
2.6. Tyrosinase activity 측정	20
2.7. Western blot	21
3. 통계처리	22
III. 결 과	23
1. RAW 264.7 세포에서 Psoralen 계열 화합물들의 염증 영향	23
1.1. 세포생존율 측정	23
1.2. NO 생성량 측정	25
2. RAW 264.7 세포에서 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)의 항염증 효과	28
2.1. Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 측정	28
2.2. 전염증성 cytokine 생성량 측정	30
2.3. Western blot	32
1) iNOS, COX-2 발현량 측정	32

2) MAPKs 신호전달경로	34
3) NF- κ B 신호전달경로	36
3. B16F10 세포에서 멜라닌 생성에 대한 Psoralen 계열 화합물들의 영향	39
3.1. 세포생존율	39
3.2. 멜라닌 함량 측정	41
4. B16F10 세포에서 5-Methoxypsoralen (Bergapten)의 멜라닌 생성 효과	44
4.1. Tyrosinase 활성 측정	44
4.2. Western blot	46
1) 멜라닌 합성 효소 발현량 측정	46
2) MITF 발현량 측정	48
3) Wnt/ β -catenin 신호전달경로	50
4) PKA 신호전달경로	52
5) PI3K/AKT 신호전달경로	54
6) MAPKs 신호전달경로	56
IV. 고찰	58
V. 참고문헌	66

LIST OF FIGURES

Figure 1. Signaling pathways to regulate inflammatory	10
Figure 2. Melanin synthesis pathway	11
Figure 3. Signaling pathways to regulate melanogenesis	11
Figure 4. Structure of Psoralen derivatives	13
Figure 5. Effect of Psoralen derivatives on the cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells	24
Figure 6. Effect of Psoralen derivatives on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells	26
Figure 7. Effects of Xanthotoxol on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells	27
Figure 8. Effects of Xanthotoxol on the production of PGE ₂ in LPS-induced RAW 264.7 cells	29
Figure 9. Effects of Xanthotoxol on the production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 cells	31
Figure 10. Effects of Xanthotoxol on the protein expression of iNOS and COX-2 in LPS-induced RAW 264.7 cells	33
Figure 11. Effects of Xanthotoxol on phosphorylation level of MAPK in LPS-induced RAW 264.7 cells	35
Figure 12. Effects of Xanthotoxol on protein expression level of P-IκBa and IκBa in LPS-induced RAW 264.7 cells	37
Figure 13. Effects of Xanthotoxol on protein expression level of NF-κB(p65)	

in LPS-induced RAW 264.7 cells	38
Figure 14. Effect of Psoralen derivatives on the cell viability in B16F10 melanoma cells	40
Figure 15. Effect of Psoralen derivatives on the melanin contents in B16F10 melanoma cells	42
Figure 16. Effects of Bergapten on the melanin contents in B16F10 melanoma cells	43
Figure 17. Effects of Bergapten on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells	45
Figure 18. Effects of Bergapten on protein expression level of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16F10 melanoma cells	47
Figure 19. Effects of Bergapten on protein expressoin level of MITF in B16F10 melanoma cells	49
Figure 20. Effects of Bergapten on protein expression level of P-GSK3 β , P- β -catenin and β -catenin in B16F10 melanoma cells	51
Figure 21. Effects of Bergapten on phosphorylation level of PKA in B16F10 melanoma cells	53
Figure 22. Effects of Bergapten on phosphorylation level of AKT in B16F10 melanoma cells	55
Figure 23. Effects of Bergapten on phosphorylation level of MAPKs in B16F10 melanoma cells	57
Figure 24. Effects of Xanthotoxol on inflammatory	65
Figure 25. Effects of Bergapten on melanogenesis	65

I. 서 론

염증은 다양한 유해 요인으로부터 인체를 보호하는 면역 체계의 핵심 메커니즘이다[1-2]. 염증 반응은 인체 내에 침투한 외부의 항원 및 내부의 불필요한 요소를 제거하고 회복작용을 돕는다[3]. 일반적으로 급성염증은 자발적으로 해결되는 짧은 과정이지만, 만성염증은 전염증성 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α) 및 NO, COX-2 염증 인자의 과잉 생산을 유도하여 만성위염, 통풍성 관절염, 염증성 장 질환 및 기타 염증성 질환을 유발한다[4-5]. 따라서 염증 반응을 조절함으로써 만성염증으로의 유도를 예방해야 한다.

대식세포는 인체 모든 조직내에 분포하고 있어, 외부 감염에 대해 즉각적으로 방어함으로써 면역 체계에서 중요한 역할을 한다. 대식세포는 세포 표면의 toll-like receptors (TLRs)를 통해 병원체를 검출하고, 염증 인자를 방출한다[6-7]. 대식세포에서 TLRs류 중 하나인 toll-like receptor 4 (TLR4)는 그람 음성균의 세포 외막 구성 요소인 lipopolysaccharide (LPS)와 반응하여 염증성 사이토카인 (IL-6, IL-1 β , TNF- α) 및 NO, PGE₂와 같은 염증 매개체의 발현을 활성화시켜 염증반응을 일으킨다[8-9]. 이러한 염증 인자들은 보다 상위 신호전달경로에 속하는 인자들에 의해 조절된다. 주요 신호전달경로로 nuclear factor kappa B (NF- κ B)와 mitogen activated protein kinase (MAPKs) 경로가 있다. 이러한 신호전달경로의 활성화는 염증 반응을 조절하는데 있어 중요한 이점이며, 많은 항염증 연구에서 실험적 지표로 여겨지고 있다[10-12].

염증 과정에서 PGE₂와 NO는 염증 매개체로서 염증 반응에 중요한 역할을 한다[13]. PGE₂는 arachidonic acid에서 Cyclooxygenase-2 (COX-2) 효소의 촉진에 의해 합성되며, 염증에서 가장 강력한 염증 매개체 중 하나로 간주된다[14-18]. NO는 염증반응의 지표물질로 L-arginine에서 inducible NOS (iNOS)에 의해 생성된다[19-20]. NO는 손상된 조직 부근의 혈관을 확장시켜 혈류량을 증가시킴으로써 면역 세포들이 동원되는 것을 돕지만, 과도한 NO의 생성은 염증 반응을 심

화시켜 신경 손상, 유전자 변이 및 조직의 손상 등을 일으킨다[21-24].

MAPKs 신호전달경로는 세포의 생존, 성장, 사멸 및 염증 관련 면역 반응 등과 같은 여러 생물학적 과정을 조절하는 데 관여한다[25]. MAPKs는 ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-jun N-terminal kinase), p38 단백질로 구성되어 있다. MAPKs가 LPS 자극에 의해 인산화되면 신호전달경로가 활성화 되어 전염증성 cytokine과 염증 매개체들의 생성을 증가시킨다[26-27].

NF- κ B 신호전달경로에서 NF- κ B는 전염증성 사이토카인과 iNOS 및 COX-2 유전자 발현을 조절하는 전사인자로, p50과 p65 두개의 subunit으로 구성되어 있다[28]. 자극받지 않은 상태에서 NF- κ B는 세포질에서 I κ Ba (inhibitor- κ Ba)와 결합되어 비활성화 상태로 존재한다[29]. 이때 LPS에 의해 자극을 받으면 I κ B kinase (IKK)에 의해 I κ Ba 단백질은 인산화되고, I κ Ba 형태는 유비퀴틴화되어 최종적으로 분해된다. 결국 자유가 된 NF- κ B (p50 및 p65)는 세포질에서 핵으로 전위되어 염증매개 물질들의 유전자 발현을 유도한다[30-34](Fig. 1).

Melanin은 대부분 동물의 피부, 모발, 눈 등에 분포되어 피부 색과 모발 색을 결정하는 물질로[35] 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 세포 (Melanocyte)의 Melanosome에서 생성된다[36-37]. 멜라닌 세포는 외부 신호 전달 물질 및 호르몬 수용체를 가지고 있어, 자외선과 같은 외부 환경이나 호르몬 등에 의해서 melanin을 형성한다[38-40]. 이렇게 Melanin이 합성되는 일련의 과정을 melanogenesis 라고 하며, 생성된 Melanin은 주변의 각질세포 (keratinocyte)로 전달되어 인체의 피부색으로 나타나게 된다[41-42]. Melanin은 자외선으로부터 피부를 보호하고, 활성산소를 제거하는 역할을 하기 때문에[43-45] 멜라닌 생성이 감소하면 저색소 침착 (Hypopigmentation)과 관련된 백색증 (Albinism), 백반증 (Vitiligo)과 같은 색소 질환을 초래하며 표피의 멜라닌 부족은 피부암과 피부 노화에 대한 민감성을 갖게 한다[46-49].

Tyrosinase는 초기 멜라닌 생성의 속도 결정 단계를 조절하는 효소로 멜라닌 생성에 있어서 가장 중요한 역할을 한다. Tyrosinase는 melanosome에서 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)으로 수산화 시키고, DOPA를 DOPAquinone으로 산화시킨다. 이후 DOPAquinone은 자동 산화 반응에 의해 DOPochrome으로 전환되고, DOPochrome은 TRP-1과 TRP-2 단백질에 의해 최종적으로 흑갈색을 띠는 유멜라닌(Eumelanin)을 생성하게 된다[50-53](Fig. 2).

합성과정에서 멜라닌생성 조절인자로 잘 알려진 MITF (microphthalmia associated transcription factor)는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 promoter의 M-box에 결합하여 단백질의 발현을 유도하고 멜라닌 생성을 조절하는데, 이러한 MITF의 멜라닌 생성 조절은 여러 신호전달경로에 의해서 조절된다[54-56].

대표적인 멜라닌 신호전달 경로로 알려진 Wnt/ β -catenin 신호전달 경로는 MITF 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다. Frizzled(Fz) 수용체가 자극을 받으면, serine 9번 잔기에서 인산화된 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)는 비활성화된다[57]. 이때 β -catenin은 비활성화된 P-GSK3 β 로 인해 분해되지 않고, 세포질에 축적된다[58]. 축적된 β -catenin은 핵으로 운반되어 T-cell

factor-lymphoid-enhancing(TCF-LEF) 전사인자와 복합체를 형성하여 MITF 발현을 증가시킨다[59]. 반면 tyrosine 216번 잔기에서 인산화된 GSK3 β 는 활성화되고, β -catenin의 인산화를 유도하여 유비퀴틴화 및 분해함으로써 MITF의 발현을 감소시킨다[60-62].

PKA 신호전달 경로에서 melanocortin 1 receptor (MC1R)이 자극을 받으면, adenylate cyclase (AC)를 활성화시킨다. 이는 세포 내의 cAMP를 증가시키고, protein kinase A (PKA)를 인산화시킨다. 인산화된 PKA는 핵 안으로 이동하여 CREB를 인산화 시켜, 멜라닌 형성 효소들을 조절하는 핵심 전사인자인 MITF의 발현을 촉진한다[63-66].

한편 또 다른 멜라닌생성 관련 신호로써 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT 신호전달경로가 있다[67]. 자극받은 MC1R은 PI3K를 활성화하고 PI3K는 세포막의 인지질인 PIP₂를 PIP₃로 인산화한다[68]. 이때 PIP₃는 AKT를 세포막으로 모집하여 인산화할 수 있도록 돕는다[69]. AKT 신호전달경로의 활성화는 멜라닌 생성 억제 기작과 연관되어 있다[70-71]. 즉, AKT의 인산화는 MITF의 분해를 촉진시켜 멜라닌 생성을 억제하므로 AKT의 인산화 저해는 멜라닌 생성을 유도하게 된다[72].

MAPKs 신호전달경로 또한 MITF 발현 및 활성화의 조절에 관여하기 때문에 멜라닌 생합성의 주요 조절자 중 하나이다[73-74]. MAPK 경로에 속하는 ERK 신호는 음성신호전달경로로, ERK의 인산화는 serine 73에서 MITF의 인산화를 유도하고, MITF 분해를 촉진하여 궁극적으로 멜라닌 생성을 억제한다[75-76]. 반면 JNK 및 p38 신호는 양성신호전달 경로로, JNK 및 p38경로의 인산화는 MITF 발현을 상향 조절하고 tyrosinase의 전사를 촉진하여 멜라닌 생성을 증가시킨다[77-81](Fig. 3).

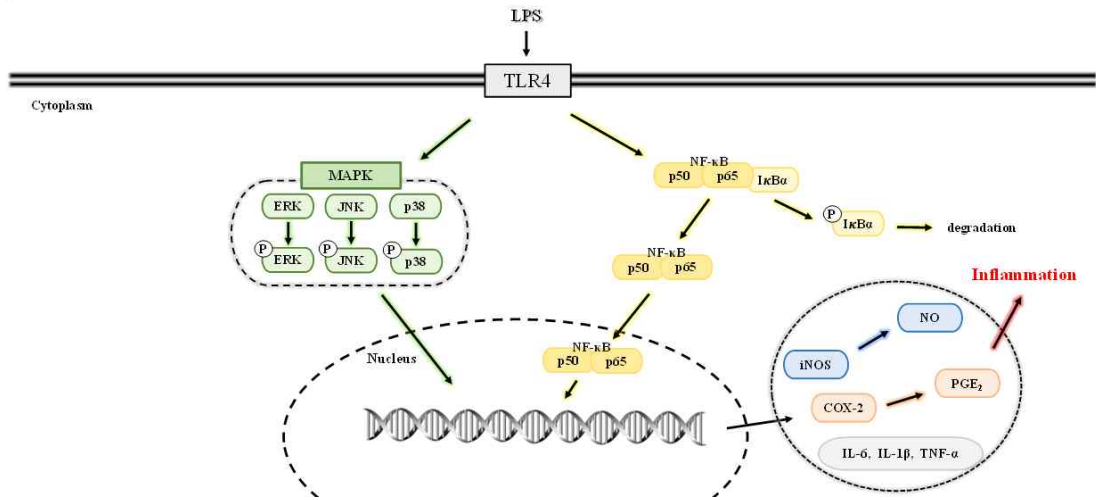


Figure 1. Signaling pathways to regulate inflammatory.

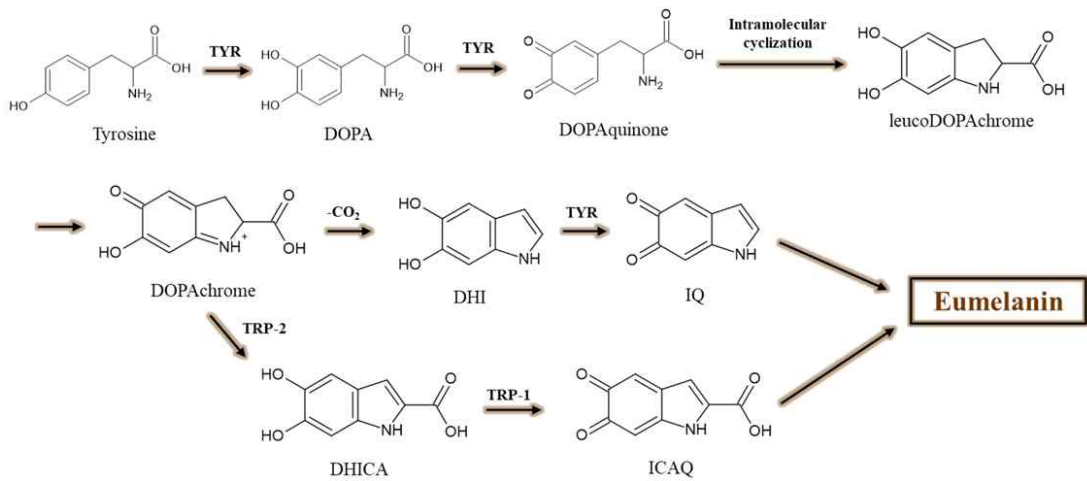


Figure 2. Melanin synthesis pathway.

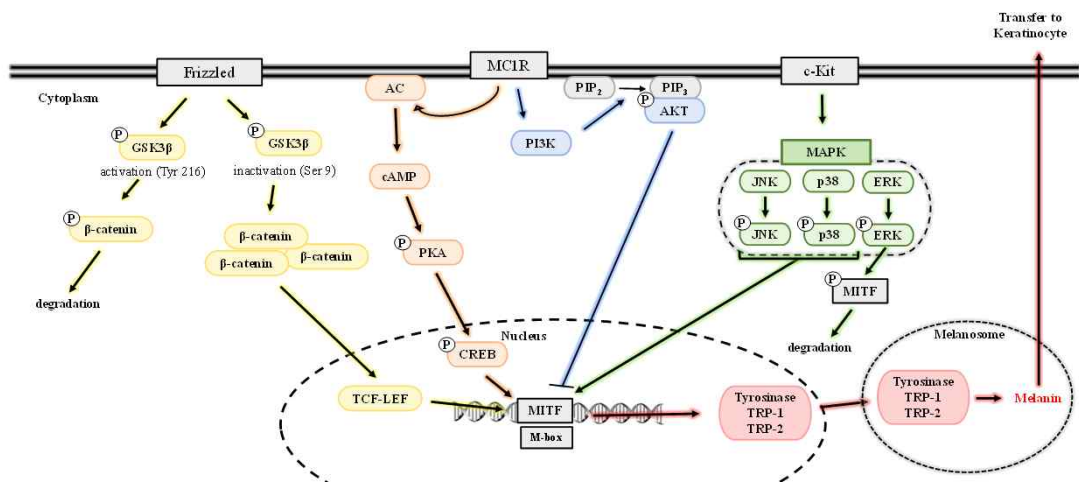


Figure 3. Signaling pathways to regulate melanogenesis.

Psoralen은 Furanocoumarin의 기본골격을 이루는 물질로, coumarin에 furan 고리가 선형으로 결합한 구조이다. Psoralen은 *Psoralea corylifolia* L. 의 건조된 열매에 있는 주요 생리 활성 성분으로[82], 다양한 생리 활성 특성을 가지는데 건선, 습진, 골다공증, 종양, 염증 등의 치료에 유익하다고 보고되어 있다[83-86].

본 연구에서는 Psoralen 계열 화합물 중 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol), 5-Methoxypsoralen (Bergapten), 8-Hydroxypsoralen (xanthotoxol), 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin) 그리고 5,8-Dimethoxypsoralen (Isopimpinellin) 을 가지고 실험에 사용하였다. 각 화합물은 기본골격인 Psoralen 구조에서 5번 또는 8번 위치에 Hydroxy기 (-OH) 또는 Methoxy기 (-OCH₃)가 붙은 구조를 갖고 있다. 이러한 구조적 차이를 기반으로 Psoralen 유도체들의 구조에 따른 항염증 및 멜라닌 생성 효과를 비교 및 분석 실험하였다.

RAW 264.7 세포에서 Nitric oxide (NO) 생성량 측정 실험을 통해 4개의 시료 중 NO 생성량을 가장 억제하는 8-Hydroxypsoralen (xanthotoxol)을 가지고 추가 실험을 진행하였다. Xanthotoxol은 *Cnidium Fruit* [87], *Angelica dahurica* [88]에서 추출되는 화합물로 항산화, 항암에 대한 효능이 있다고 보고되어 있지만[89], 항염증 효과에 대한 연구는 미흡하므로 RAW 264.7 세포에서 Xanthotoxol의 염증 매개 인자 및 염증 신호전달경로에 미치는 영향을 알아보하고자 하였다.

또한 B16F10 세포에서 Melanin contents 실험을 통해 5개의 시료 중 멜라닌 생성 효과가 가장 우수한 5-methoxypsoralen (Bergapten)으로 추가 실험을 진행하였다. Bergapten 은 여러 종의 감귤류와 베르가못 오일에서 추출한 화합물로[90] 항산화, 항염, 항암에 대해 보고되어 있지만[91-93], 멜라닌 생성 신호전달경로에 관한 연구는 미흡한 실정이므로 B16F10 세포에서 Bergapten의 멜라닌 합성 효소 및 생성 신호전달경로에 미치는 영향을 알아보하고자 하였다.

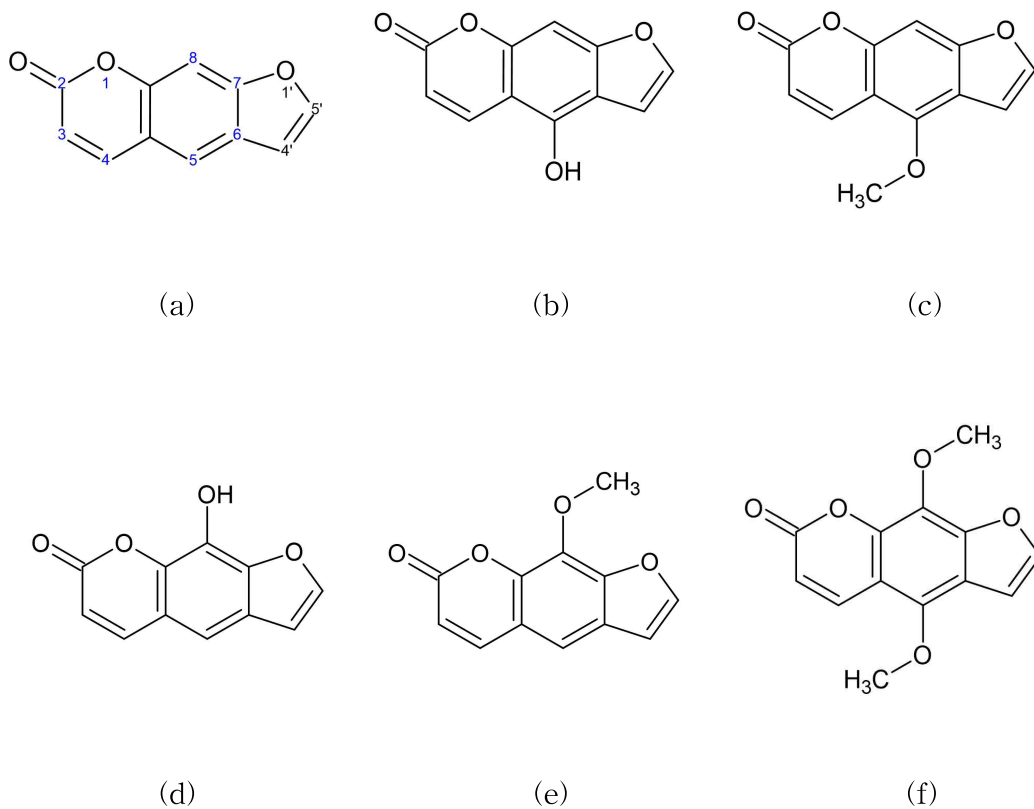


Figure 4. Structure of Psoralen derivatives. (a) Psoralen, (b) 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol), (c) 5-Methoxypsoralen (Bergapten), (d) 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol), (e) 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin), (f) 5,8-Dimethoxypsoralen (Isopimpinellin).

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 Bergaptol (5-Hydroxypsoralen), Bergapten (5-Methoxypsoralen), Xanthotoxol (8-Hydroxypsoralen), Isopimpinellin (5,8-Methoxypsoralen)은 ChemFaces (Wuhan, China) 에서 구매하였으며, Xanthotoxin (8-Methoxypsoralen) 은 TCI (Tokyo, Japan)에서 구매하였다.

세포 실험을 위해 사용된 lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS), Griess reagent, protease inhibitor cocktail, α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), sodium hydroxide (NaOH), L-dopa는 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Biosesang (Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구매하였다. 세포 배양을 위한 배지로 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)과 penicillin-streptomycin을 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 Fetal bovine serum (FBS)는 Merck Millipore (Burlington, MA, USA)에서 구매하였다. ELISA kit 중 PGE₂은 abcam (Cambridge, EN, UK)에서, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 은 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) 에서 구매하였다. Western blot을 위해 사용된 1차 항체 p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-I κ B- α , I κ B- α , p-AKT, AKT, p-GSK-3 β , GSK-3 β , p- β -catenin, β -catenin, p-PKA, PKA, β -actin, p65, lamin B 와 2차 항체 anti-rabbit, anti-mouse는 Cell signaling technology (Danvers, MA, USA)에서 구매하였고, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구매하였다. 이외에 Anti-iNOS 항체는 Merck Millipore (Burlington, MA, USA), Anti-COX-2 항체는 BD Biosciences (Franklin Lakes, CA, USA)에서 구매하였다.

2. 실험방법

2.1. 세포배양

RAW 264.7 murine macrophage cell은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank)에서 B16F10 mouse melanoma cell은 ATCC (The Global Bioresource Center)에서 구매하였다. 세포 배양은 10% Fetal Bovin Serum (FBS)와 1% Penicillin-Streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 각각 2일, 3일 간격으로 계대배양 하였다.

2.2. 세포생존율

시료의 세포 독성 범위를 측정하기 위해서 MTT 법을 수행하였다. RAW 264.7 세포는 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 다양한 농도의 시료들을 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. MTT 시약을 0.4 mg/mL 농도로 처리하여 3시간 반응시켰다. 이후 배지를 제거하고 DMSO를 800 μ L씩 넣어 보라색 formazan 결정을 용해하고 Spectrophotometric microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

B16F10 세포는 24 well plate에 8.0×10^3 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 다양한 농도의 시료들을 처리하여 72시간 동안 반응시켰다. MTT 시약을 0.4 mg/mL 농도로 처리하여 3시간 반응시켰다. 이후 배지를 제거하고 DMSO를 500 μ L씩 넣어 보라색 formazan 결정을 용해하고 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. NO (Nitric oxide) 생성량 측정

시료가 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO를 저해하는지 확인하기 위해 NO 생성량을 측정하였다. NO 생성량 측정은 세포 배양액에 있는 NO의 양을 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), L-NIL ($40 \mu\text{M}$)를 처리한 후 24시간 동안 반응시켰다. 이후, 각 well의 상층액 $100 \mu\text{L}$ 와 Griess reagent $100 \mu\text{L}$ 를 96 well plate 에 혼합하고 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

RAW 264.7 세포에서 시료가 LPS에 의해 유도된 염증반응 매개체들을 저해하는지 확인하기 위해 ELISA Kit 를 사용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 LPS (1 μ g/mL)를 처리한 후 24시간 동안 반응시켰다. 이후, 각 well의 배양액 100 μ L를 얻고 15,000 rpm 에서 원심분리한 후 상층액을 걸었다. 이 상층액은 ELISA kit에 따라 각 농도별 PGE₂, IL-6, IL-1 β 그리고 TNF- α 의 함량을 측정하였다.

2.5. Melanin contents 측정

시료가 B16F10 세포에서 Melanin 생성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 Melanin contents를 측정하였다. B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 8.0×10^4 cells/dish로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 α -MSH (100 nM)을 처리하여 72시간 동안 반응하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 1 x PBS buffer 로 세척하고 lysis buffer (RIPA buffer, 1% protease inhibitor cocktail)를 넣어주어 10분간 4°C에서 lysis 하였다. 그런 다음 cell scraper로 cell 을 긁어 1.5 mL e-tube에 옮겨 담고, 5분 간격으로 3회 vortexing 하였다. 15,000 rpm, -8°C 조건에서 20분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 pellet을 얻었다. pellet에 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH을 500 μ L씩 넣어 80°C에서 10분간 처리하였다. 96 well plate에 각각 100 μ L씩 옮겨 담고 microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. Tyrosinase activity 측정

B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 8.0×10^4 cells/dish로 분주하여 24 시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 α -MSH (100 nM)을 처리하여 72 시간 동안 반응하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 1 x PBS buffer 로 세척하고 lysis buffer (RIPA buffer, 1 % protease inhibitor cocktail)를 넣어주어 4°C에서 10분간 lysis 하였다. 이후 cell scraper로 cell을 긁어 1.5 mL e-tube에 옮겨 담고, 5분 간격으로 3회 vortexing 하였다. 15,000 rpm, -8°C 조건에서 20분간 원심 분리하고 상층액을 얻었다. BCA protein assay kit를 사용하여 단백질 정량하여 96 well plate에 20 μ L씩 넣고, L-dopa (2 mg/mL)를 제조하여 80 μ L씩 넣어서 37°C 에서 1시간 처리하였다. Microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. Western blot

RAW 264.7 세포는 60 mm cell culture dish에 6.0×10^5 cells/dish로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 처리하여 각 단백질 발현 시간에 따라 배양하였다. B16F10 세포는 60mm cell culture dish에 8.0×10^4 cells/dish로 분주하여 24시간동안 배양하였다. 다양한 농도의 시료를 처리하여 각 단백질 발현 시간에 따라 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 1 x PBS buffer 로 세척하고 lysis buffer (RIPA buffer, 1 % protease inhibitor cocktail)를 넣어주어 4°C에서 10분간 lysis 하였다. 이후 cell scraper로 cell을 긁어 1.5 mL e-tube에 옮겨 담고, 10분 간격으로 3회 vortexing 하였다. 15,000 rpm, -8°C 조건에서 20분간 원심분리하고 상층액을 얻었다. BCA protein assay kit를 사용하여 단백질 정량하고, 2 x Laemmli sample buffer와 1:1 비율로 혼합한 후 100°C에서 5분간 가열하였다. 가열한 단백질을 식힌 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel로 loading 함으로써 전기영동으로 단백질을 크기별로 분리하였다. 크기별로 분리된 단백질을 PVDF membrane으로 transfer 하고, 1X TBS-T (Tris-buffered saline containing 1% Tween 20)로 녹인 5% skim milk 로 1시간 blocking 하였다. 1X TBS-T로 10분씩 총 6회 세척하고 1X TBS-T에 1:1000 비율로 희석된 1차 항체를 사용하여 4°C에서 overnight 반응하였다. 그런 다음 1X TBS-T로 10분씩 총 6회 세척하고 1:2000 비율로 희석된 2차 항체를 사용하여 상온에서 2시간 반응하였다. 1X TBS-T로 5분간 총 6회 세척한 후 ECL kit를 사용하여 특정 단백질을 발현시키고 Chemidoc (WL, VILBER LOURMAT, France)으로 현상하였다.

3. 통계처리

모든 실험 결과들은 세 번의 독립적인 실험을 평균 \pm SD (표준편차)로 표시하였다. Student's T-test를 사용하여 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 표시하였다.

III. 결 과

1. RAW 264.7 세포에서 Psoralen 계열 화합물들의 염증 영향

1.1. 세포 생존을 측정

RAW 264.7 세포에서 Psoralen 계열 화합물이 세포에 독성을 나타내지 않는 농도를 조사하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도 (62.5, 125, 250, 500 and 1000 μ M)와 양성대조군으로 iNOS 특이적 억제제인 L-NIL (40 μ M)을 24시간 동안 처리하였다. 세포 생존 기준은 미처리 대조군 대비 90% 이상일 경우 세포 독성이 나타나지 않았다고 판단하였다. 실험결과 Bergaptol, Bergapten 그리고 Xanthotoxin은 250 μ M 이하의 농도에서, Xanthothoxol은 500 μ M 이하의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다 (Fig. 5).

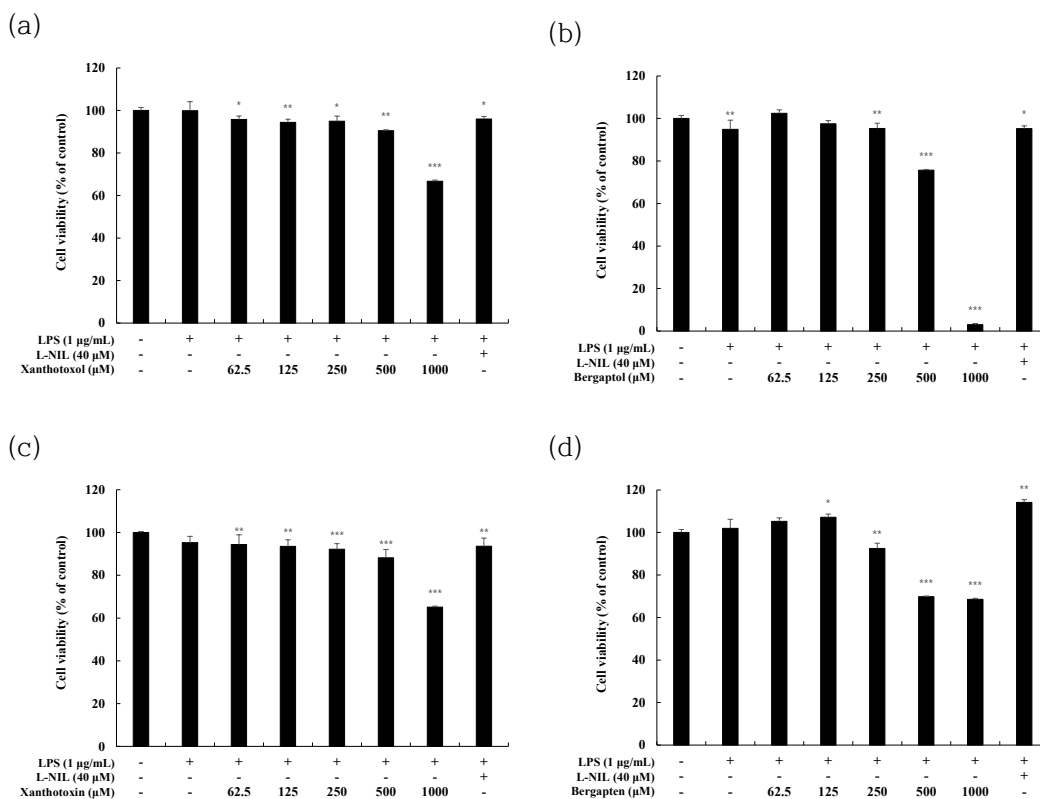


Figure 5. Effect of Psoralen derivatives on the cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Psoralen derivatives (62.5, 125, 250, 500 and 1000 μM) and L-NIL (40 μM) for 24 h with LPS (1 μg/mL). L-NIL was used as a positive control. Cell viability of LPS-induced RAW 264.7 cells subjected to (a) 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol), (b) 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol), (c) 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin) and (d) 5-Methoxypsoralen (Bergapten) were measured by MTT assay. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated control group.

1.2. NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포에서 Psoralen 계열 화합물들의 공통적으로 세포독성이 나타나지 않는 범위인 250 μ M 이하의 농도에서 NO 생성에 미치는 영향을 비교 조사하기 위해 NO 생성량 측정 실험을 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도 (15.6, 31.3, 62.5, 125 and 250 μ M)와 양성대조군으로 L-NIL (40 μ M)을 24시간 동안 처리하였다. NO 생성량은 LPS 단독 처리 군을 100%로, 대비해서 얼마나 억제하였는지 조사하였다. (Fig. 6) 와 같이 Psoralen 화합물 중에서 Xanthotoxol의 NO 억제 효과가 가장 우수했다. 특히 고농도인 250 μ M에서 NO의 생성을 Xanthotoxol은 약 40.5%, Bergaptol은 약 36.47%, Xanthotoxin은 약 29.77% 억제하였고, Bergapten은 약 12.52% 증가시켰다. 따라서 활성이 가장 우수한 Xanthotoxol으로 세포독성이 나타나지 않은 500 μ M 이하의 농도에서 NO 생성량을 조사하고 (Fig. 7), Xanthotoxol에 대한 추가실험을 진행하였다.

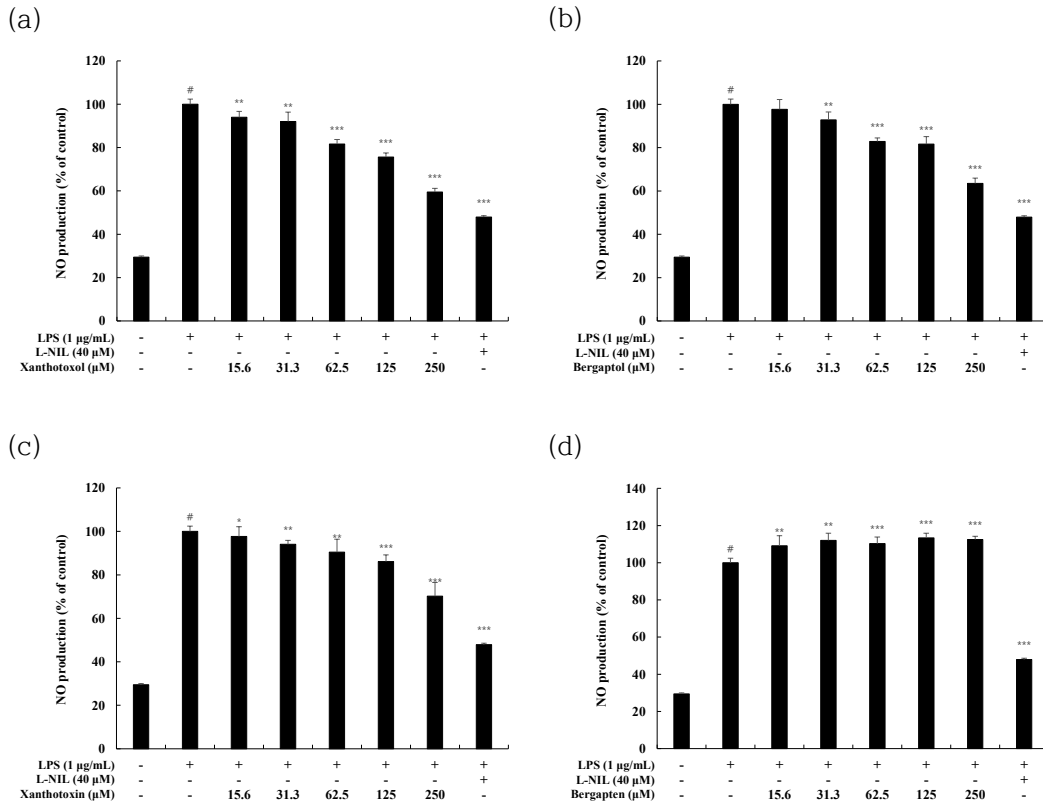


Figure 6. Effect of Psoralen derivatives on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Psoralen derivatives (15.6, 31.3, 62.5, 125 and 250 μM) and L-NIL (40 μM) for 24 h with LPS (1 μg/mL). L-NIL was used as a positive control. NO production of LPS-induced RAW 264.7 cells subjected to (a) 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol), (b) 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol), (c) 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin) and (d) 5-Methoxypsoralen (Bergapten) treatment were measured using a Griess reagents. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiment. # $p < 0.01$ vs untreated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

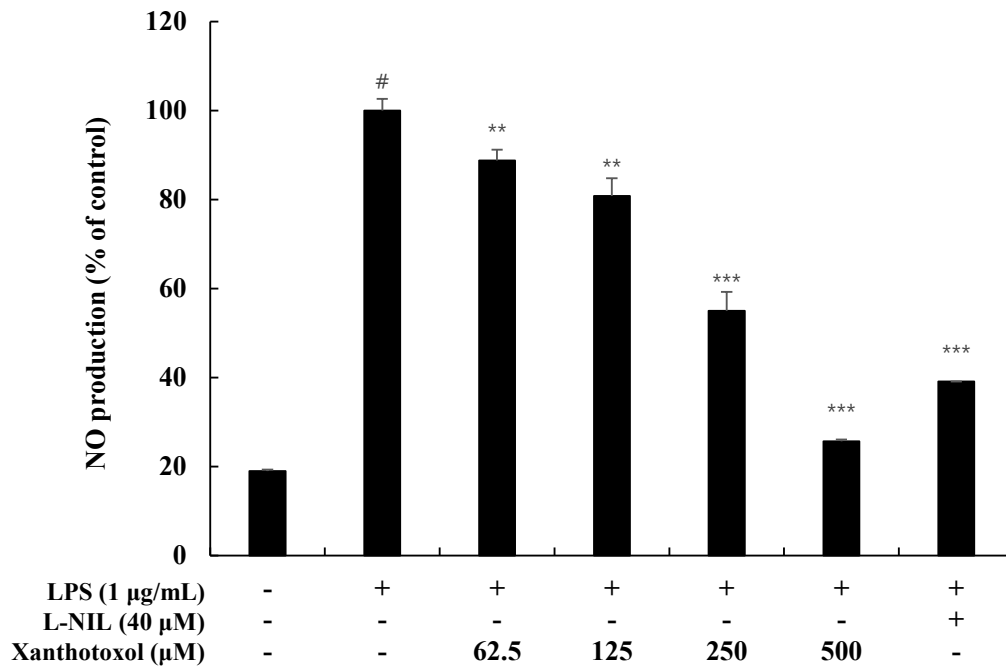


Figure 7. Effects of Xanthotoxol on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Xanthotoxol (62.5, 125, 250 and 500 µM) and L-NIL (40 µM) for 24 h with LPS (1 µg/mL). L-NIL was used as a positive control. NO production of LPS-induced RAW 264.7 cells was measured using a Griess reagents. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiment. # $p < 0.01$ vs untreated control group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

2. RAW 264.7 세포에서 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)의 항염증 효과

2.1. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성량 측정

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 Xanthotoxol이 PGE₂ 생성을 억제하는지 조사하기 위해 ELISA kit를 사용하여 PGE₂ 생성량을 확인하였다. RAW 264.7 세포는 Xanthotoxol의 다양한 농도 (62.5, 125, 250 and 500 µM)와 양성대조군으로 COX-2 특이적 억제제인 NS-398 (100 nM)을 24시간 동안 처리하였다. 그 결과 Xanthotoxol은 LPS로 유도된 PGE₂의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 특히 500 µM에서 LPS 단독처리군과 비교하였을 때, PGE₂ 생성량을 약 93.24% 감소시켰으며 양성대조군인 NS-398과 비교하였을 때, 약 16% 더 감소하였다 (Fig. 8).

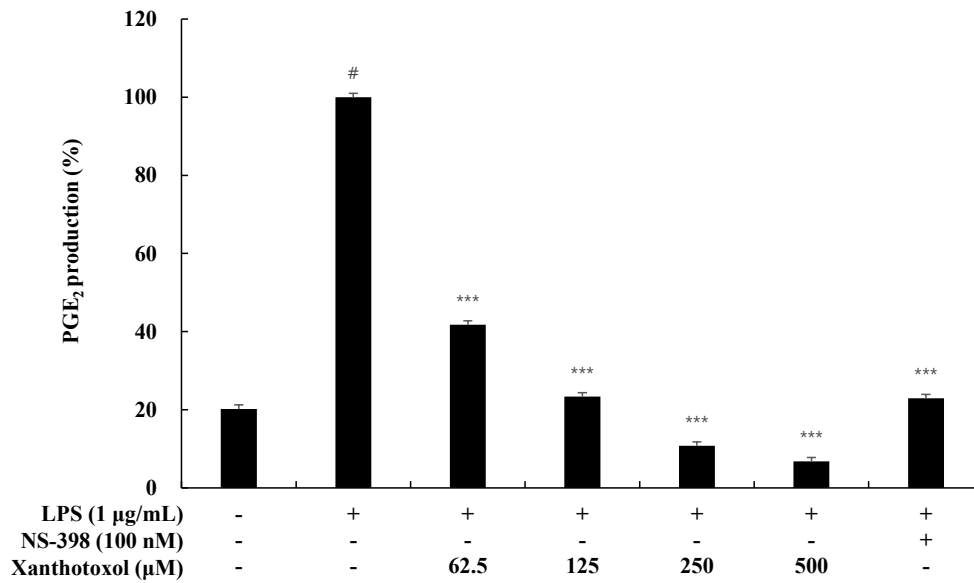


Figure 8. Effects of Xanthotoxol on the production of PGE₂ in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Xanthotoxol (62.5, 125, 250 and 500 µM) and NS-398 (100 nM) for 24 h with LPS (1 µg/mL). NS-398 was used as a positive control. Production of PGE₂ was measured by ELISA kit. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiment. # $p < 0.001$ vs untreated control group. *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

2.2. 전염증성 cytokine 생성량 측정

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 Xanthotoxol이 전염증성 cytokine (IL-6, IL-1 β and TNF- α) 생성을 억제하는지 조사하기 위해 ELISA kit를 사용하여 전염증성 cytokine의 생성량을 확인하였다. 그 결과 Xanthotoxol은 LPS에 의해 유도된 IL-6, IL-1 β 그리고 TNF- α 의 생성을 유의하게 감소시켰다. 특히 500 μ M 농도에서 IL-6, IL-1 β 그리고 TNF- α 의 생성을 각각 약 74.99%, 63.33% 그리고 38.12% 감소시켰다(Fig.9).

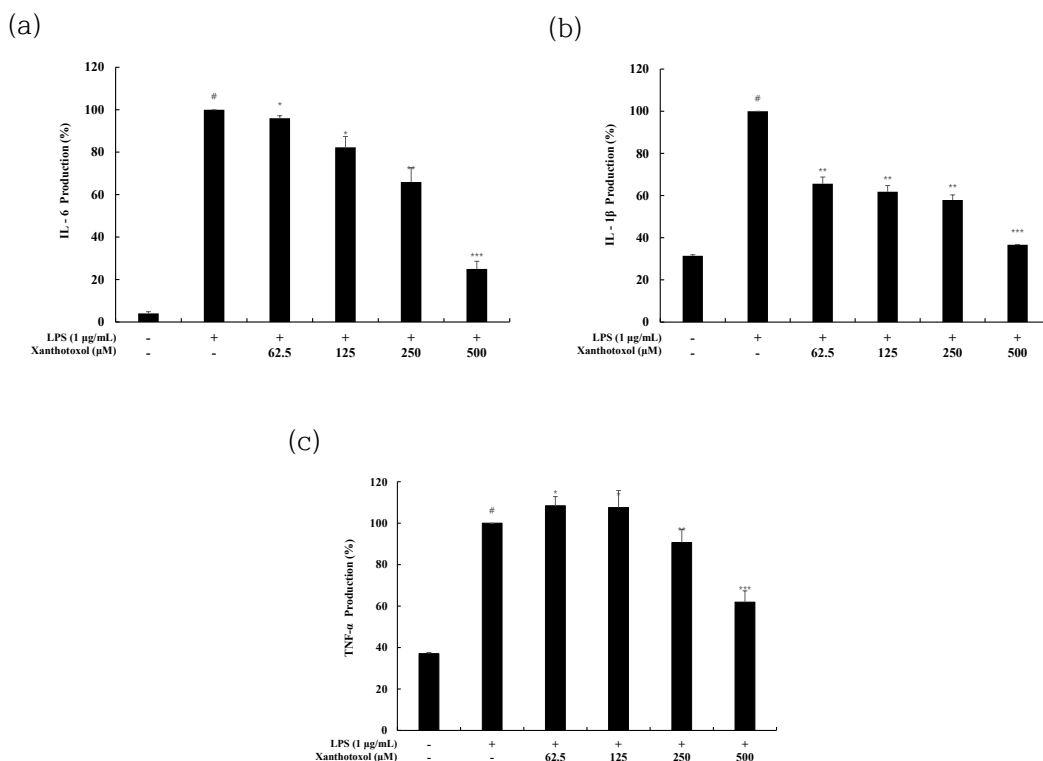


Figure 9. Effects of Xanthotoxol on the production of pro-inflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Xanthotoxol (62.5, 125, 250 and 500 μM) and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. (a) IL-6, (b) IL-1 β and (c) TNF- α production were determined by ELISA kit. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiment. # $p < 0.001$ vs untreated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

2.3. Western blot

1) iNOS, COX-2 발현량 측정

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 Xanthotoxol의 NO, PGE₂ 생성 억제가 iNOS, COX-2의 생성 억제의 하향조절에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 그 결과 Xanthotoxol은 LPS로 유도된 iNOS, COX-2의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 특히 500 μM의 농도에서 iNOS, COX-2 생성량은 각각 약 76.16%, 97.35% 감소하였다. 따라서 Xanthotoxol은 iNOS, COX-2의 발현을 억제함으로써 LPS로 유도된 NO, PGE₂를 감소시켰음을 알 수 있다(Fig. 10).

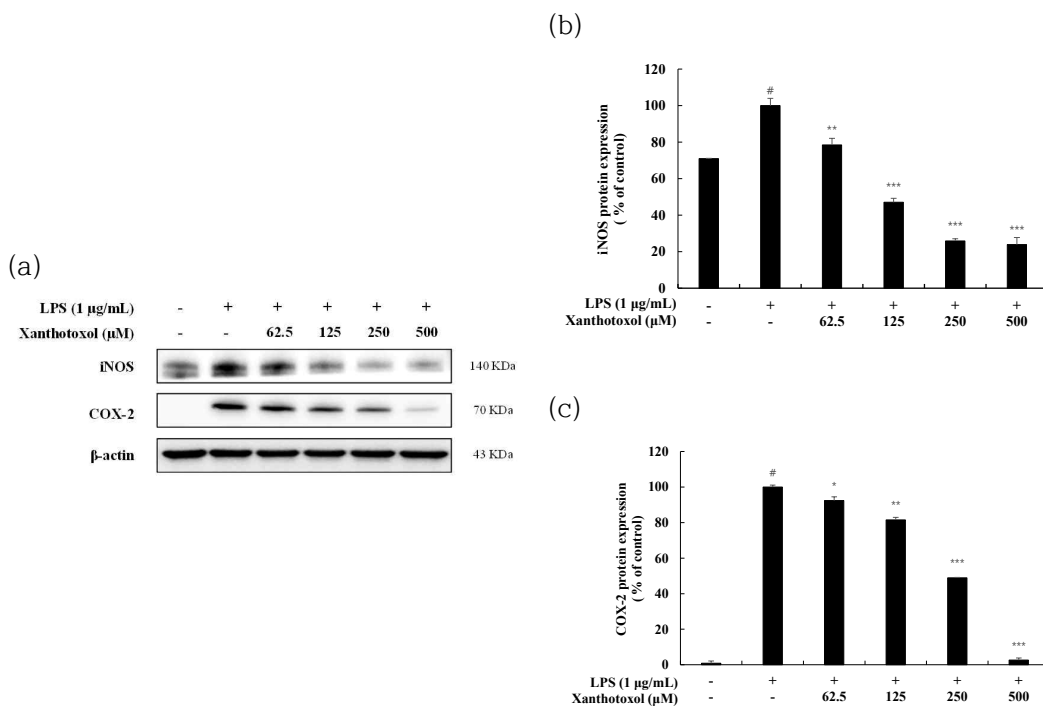


Figure 10. Effects of Xanthotoxol on the protein expression of iNOS and COX-2 in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Xanthotoxol (62.5, 125, 250 and 500 µM) and LPS (1 µg/mL) for 24 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) iNOS and (c) COX-2. β-actin was used as a loading control. The results are presented as the mean ± SD from three independent measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs untreated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

2) MAPKs 신호전달경로

MAPK가 인산화되면 신호전달경로가 활성화되어 다양한 염증성 cytokine의 생성을 증가시킨다고 보고되었다[26]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 Xanthotoxol이 MAPK 신호전달경로를 통해 NO 및 전염증성 cytokine의 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot 실험을 진행하여 확인하였다. 그 결과 Xanthotoxol은 LPS에 의해 유도된 JNK, p38의 인산화를 억제시켰다. 특히 500 μ M 농도에서 인산화된 JNK와 p38는 각각 약 46.01%, 49.93% 감소하였다. 이는 Xanthotoxol이 JNK, p38 신호전달경로를 통해 염증 조절한다는 것을 알 수 있다(Fig. 11).

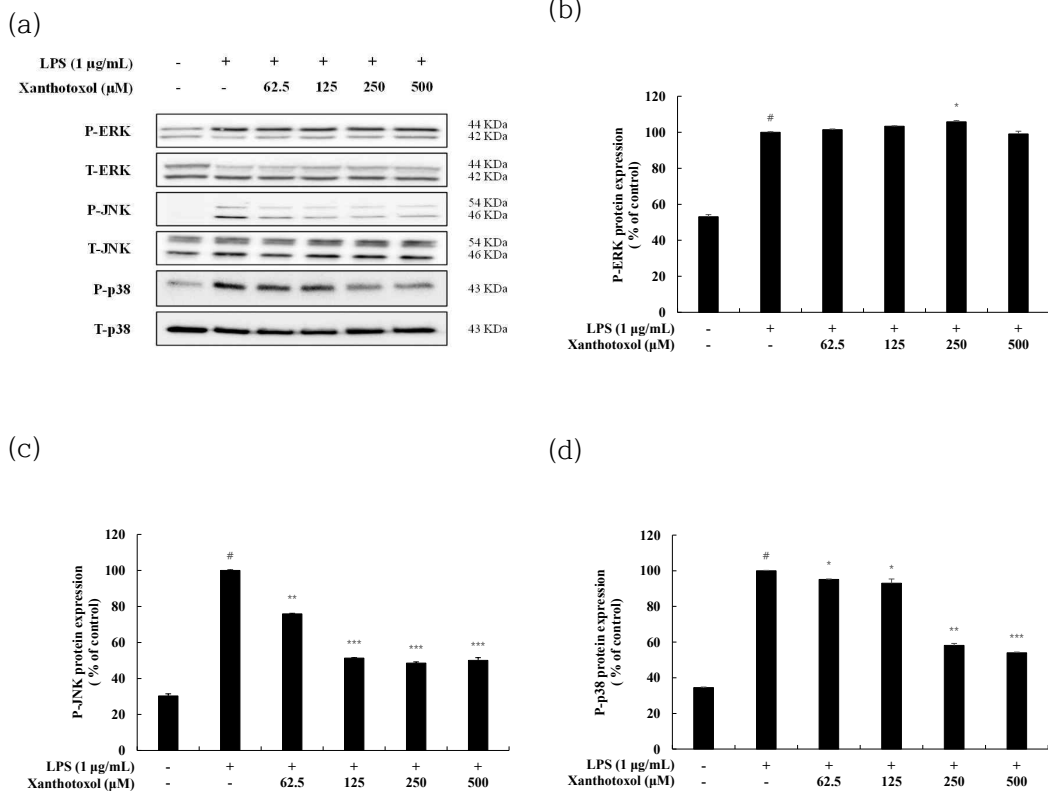


Figure 11. Effects of Xanthotoxol on phosphorylation level of MAPK in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Xanthotoxol (62.5, 125, 250 and 500 µM) and LPS (1 µg/mL) for 20 min. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) P-ERK/T-ERK, (c) P-JNK/T-JNK and (d) P-p38/T-p38. β-actin was used as a loading control. The results are presented as the mean ± SD from three independent measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs untreated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

3) NF- κ B 신호전달경로

NF- κ B가 자극 받으면 I κ B α 는 인산화되어 분해되고, NF- κ B는 세포질에서 핵으로 전위되어 전염증성 cytokine을 증가시킨다고 보고되었다[30]. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 Xanthotoxol이 NF- κ B 신호전달경로를 통해 전염증성 cytokine의 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 그 결과 Xanthotoxol은 I κ B α 를 LPS 단독 처리군에 비해 증가시켰고, 인산화된 I κ B α 는 LPS 단독 처리군에 비해 감소시켰다. 특히 500 μ M 농도에서 LPS 단독 처리군 대비 I κ B α 의 생성은 약 39.94% 증가하였고, P-I κ B α 의 생성은 약 75% 감소하였다(Fig. 12).

다음으로, 세포질에서 핵으로의 p65 전위를 확인하였다. 세포질에서 Xanthotoxol은 p65의 발현을 농도의존적으로 증가시켰으며, 500 μ M 농도에서 p65의 생성이 LPS 단독 처리군 대비 약 58.43% 증가하였다. 핵에서 Xanthotoxol은 p65의 발현을 농도의존적으로 감소시켰으며, 500 μ M 농도에서 p65의 생성이 LPS 단독 처리군 대비 약 53.79% 감소하였다(Fig. 13). 이러한 결과는 Xanthotoxol이 I κ B α 분해 및 NF- κ B의 핵 전위를 방지하여 염증을 억제함을 알 수 있다.

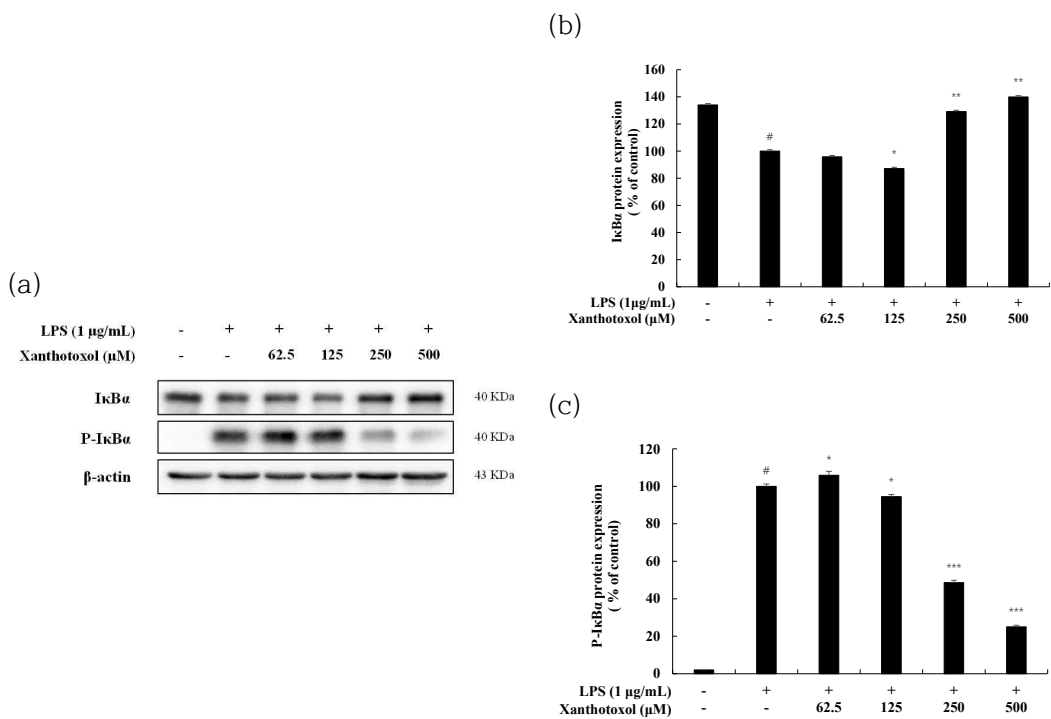


Figure 12. Effects of Xanthotoxol on protein expression level of P-IκBα and IκBα in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Xanthotoxol (62.5, 125, 250 and 500 µM) and LPS (1 µg/mL) for 20 min. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) IκBα and (c) P-IκBα. β-actin was used as a loading control. The results are presented as the mean ± SD from three independent measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs untreated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

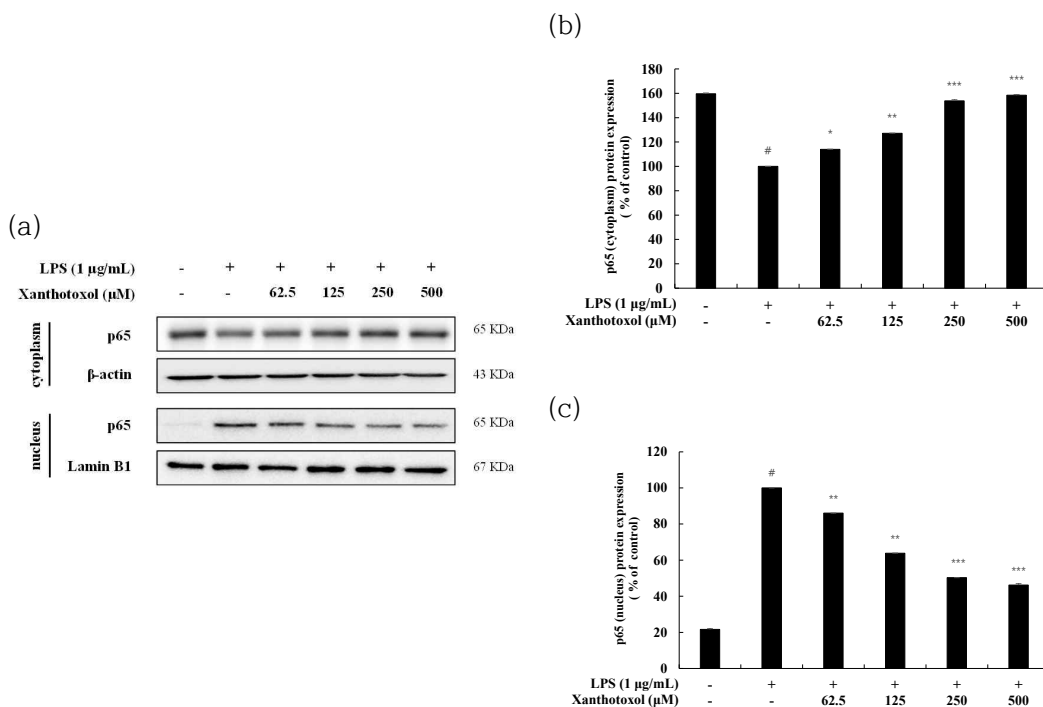


Figure 13. Effect of Xanthotoxol on protein expression level of NF- κ B(p65) in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with Xanthotoxol (62.5, 125, 250 and 500 μM) and LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 15 min. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p65 (cytoplasm) and (c) p65 (nuclear). β -actin and Lamin B1 were used as a loading control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the Image J. # $p < 0.001$ vs untreated control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs LPS alone.

3. B16F10 세포에서 멜라닌 생성에 대한 Psoralen 계열 화합물들의 영향

3.1. 세포 생존율

B16F10 세포에서 Psoralen 계열 화합물이 세포에 독성을 나타내지 않는 농도를 조사하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. B16F10 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도 (12.5, 25, 50, 100, 200 and 400 μ M)와 양성대조군으로 α -MSH (100 nM)을 72시간 동안 처리하였다. 실험 결과 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol)은 25 μ M 이하의 농도에서, 5-Methoxypsoralen (Bergapten), 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin), 8-Hydroxypsoralen (Xanthothoxol)은 50 μ M 이하의 농도에서, 5,8-Dimethoxypsoralen (Isopimpinellin)은 100 μ M 이하의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 14).

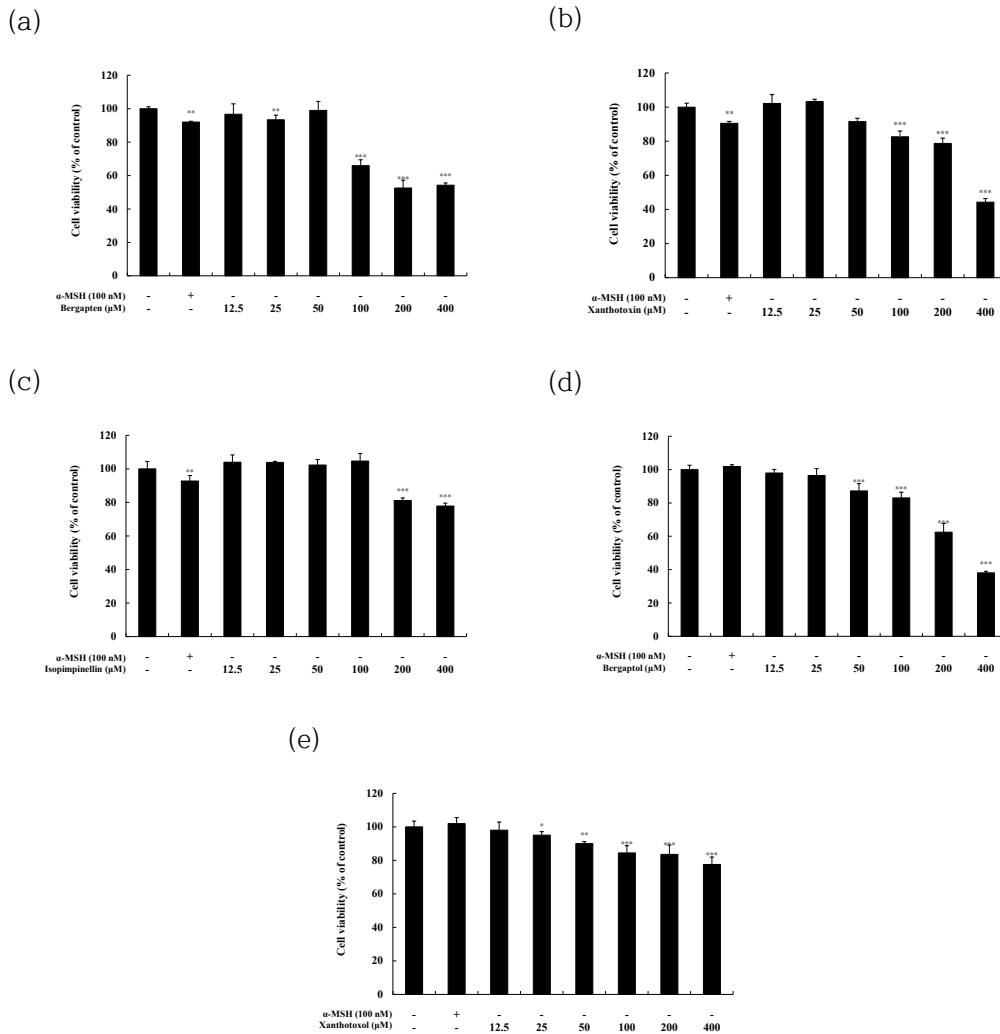


Figure 14. Effect of Psoralen derivatives on the cell viability in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Psoralen derivatives (12.5, 25, 50, 100, 200 and 400 μM) and α-MSH (100 nM) for 72 h. Cell viability of B16F10 cells subjected to (a) 5-Methoxypsoralen (Bergapten), (b) 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin), (c) 5,8-Dimethoxypsoralen (Isopimpinellin), (d) 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol) and (e) 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol) were measured by MTT assay. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

3.2. 멜라닌 합량 측정

B16F10 세포에서 Psoralen 화합물들의 공통적으로 세포독성이 나타나지 않는 범위인 25 μM 이하의 농도에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 멜라닌 합량 측정 실험을 진행하였다. B16F10 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도 (3.13, 6.25, 12.5 and 25 μM)와 양성대조군으로 α -MSH (100 nM)을 처리하였다. 그 결과 Psoralen 화합물 중에서 Bergapten이 멜라닌 생성 효과가 가장 우수했다. 특히 고농도인 25 μM 에서 멜라닌 생성을 미처리군 대비 Bergapten은 약 147.04%, Xanthotoxin은 약 115.8%, Isopimpinellin은 약 82.59%, Bergaptol은 약 22.59%, Xanthotoxol은 약 3.33% 증가시켰다(Fig. 15). 따라서 활성이 가장 좋은 Bergapten의 세포독성이 나타나지 않은 50 μM 이하의 농도에서 멜라닌 생성량을 조사하고(Fig. 16), Bergapten에 대한 추가실험을 진행하였다.

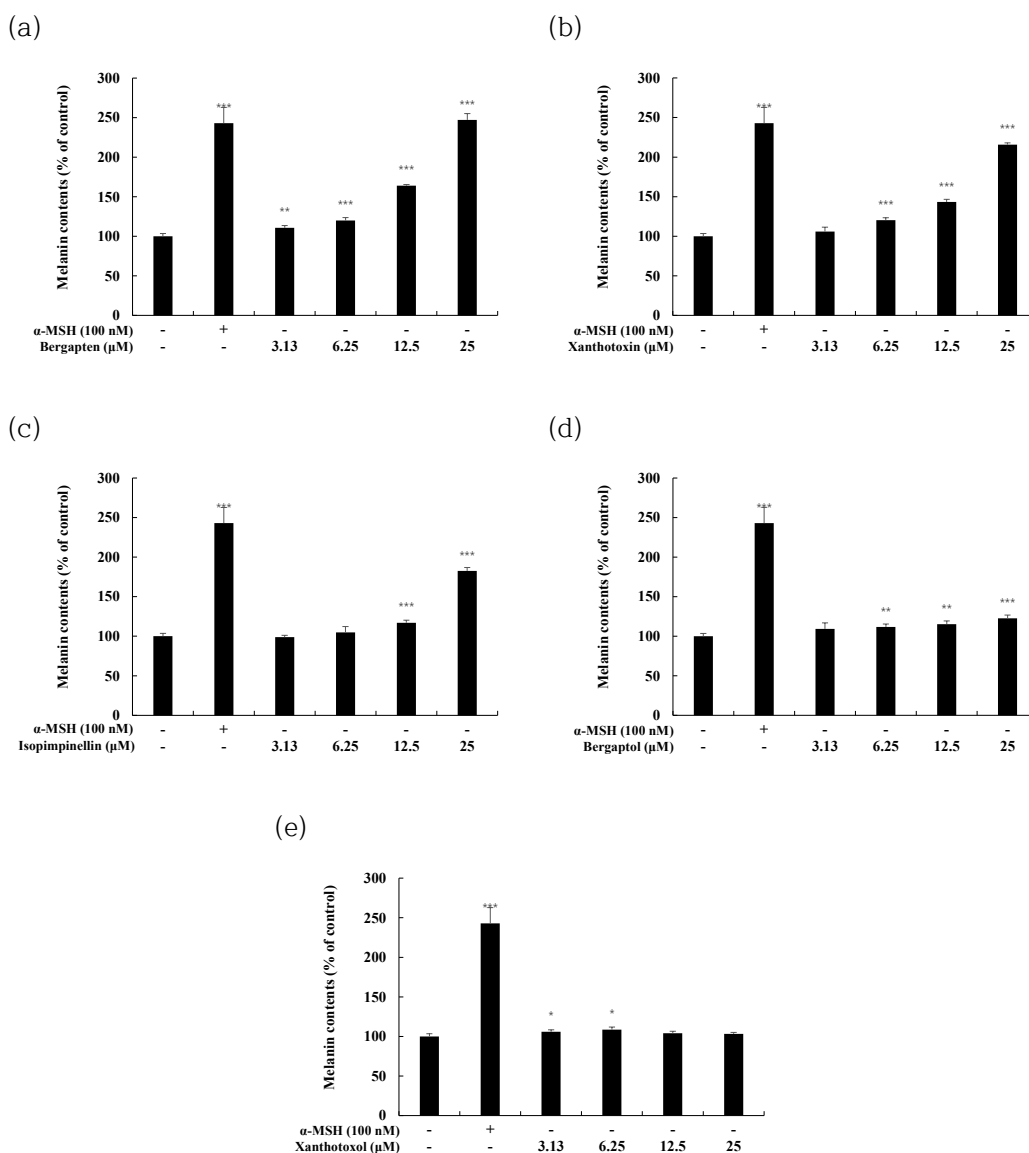


Figure 15. Effect of Psoralen derivatives on the melanin contents in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Psoralen derivatives (3.13, 6.25, 12.5 and 25 μ M) and α -MSH (100 nM) for 72 h. Melanin contents of B16F10 cells subjected to (a) 5-Methoxypsoralen (Bergapten), (b) 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin), (c) 5,8-Methoxypsoralen (Isopimpinellin), (d) 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol) and (e) 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol). The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

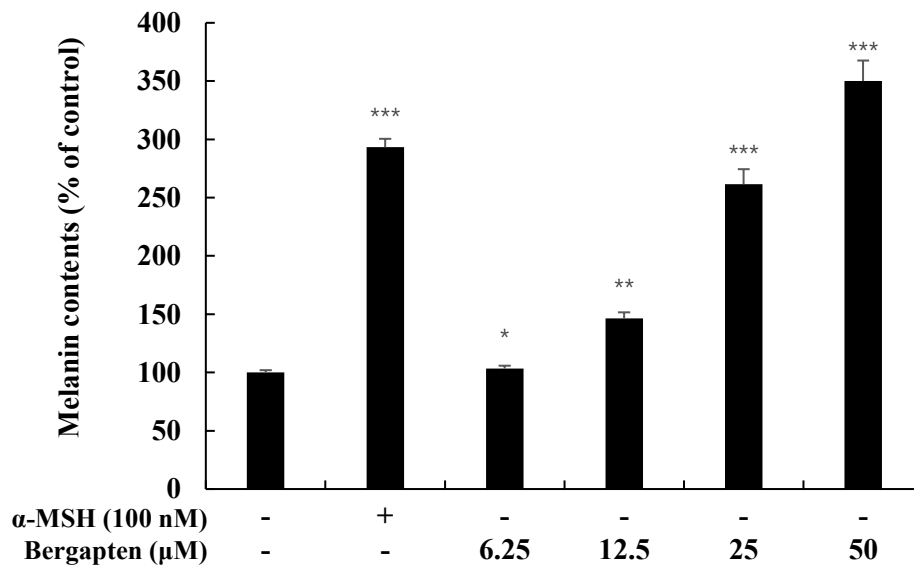


Figure 16. Effects of Bergapten on the melanin contents in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μ M) and α -MSH (100 nM) for 72 h. α -MSH was used as a positive control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent experiment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

4. B16F10 세포에서 5-Methoxypsoralen (Bergapten)의 멜라닌 생성 효과

4.1. Tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포에서 Bergapten이 Tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Tyrosinase activity 실험을 진행하였다. B16F10 세포는 Bergapten의 세포독성이 나타나지 않는 농도 (6.25, 12.5, 25 and 50 μ M) 와 양성대조군인 α -MSH (100 nM)을 처리하였다. 그 결과 Bergapten은 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 고농도 50 μ M의 경우 미처리군 대비 약 311.98% 증가하였고, 양성대조군 α -MSH 대비 약 124.11% 더 증가하였다(Fig. 17).

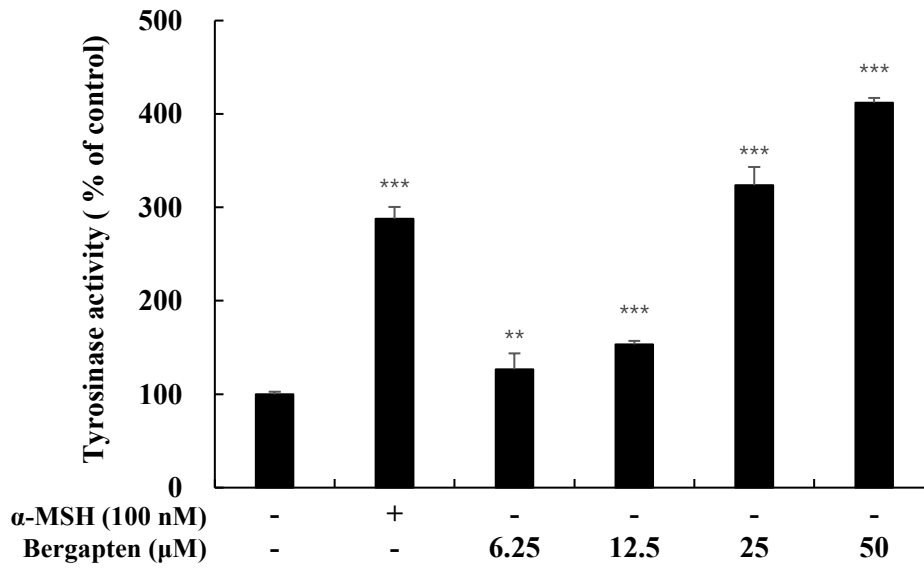


Figure 17. Effects of Bergapten on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) and α-MSH (100 nM) for 72 h. α-MSH was used as a positive control. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiment. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

4.2. Western blot

1) 멜라닌 합성 효소 발현량 측정

Tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2는 멜라닌 합성을 촉진하는 효소로 보고되어 있다[53]. 따라서 B16F10 세포에서 Bergapten이 Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2에 미치는 영향을 조사하기 위해 실험을 진행하였다. 그 결과 Bergapten이 Tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2의 활성을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 50 μ M 농도에서 Tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2의 생성을 미처리군 대비 약 723.78%, 45.19%, 526.62% 증가하였다(Fig. 18).

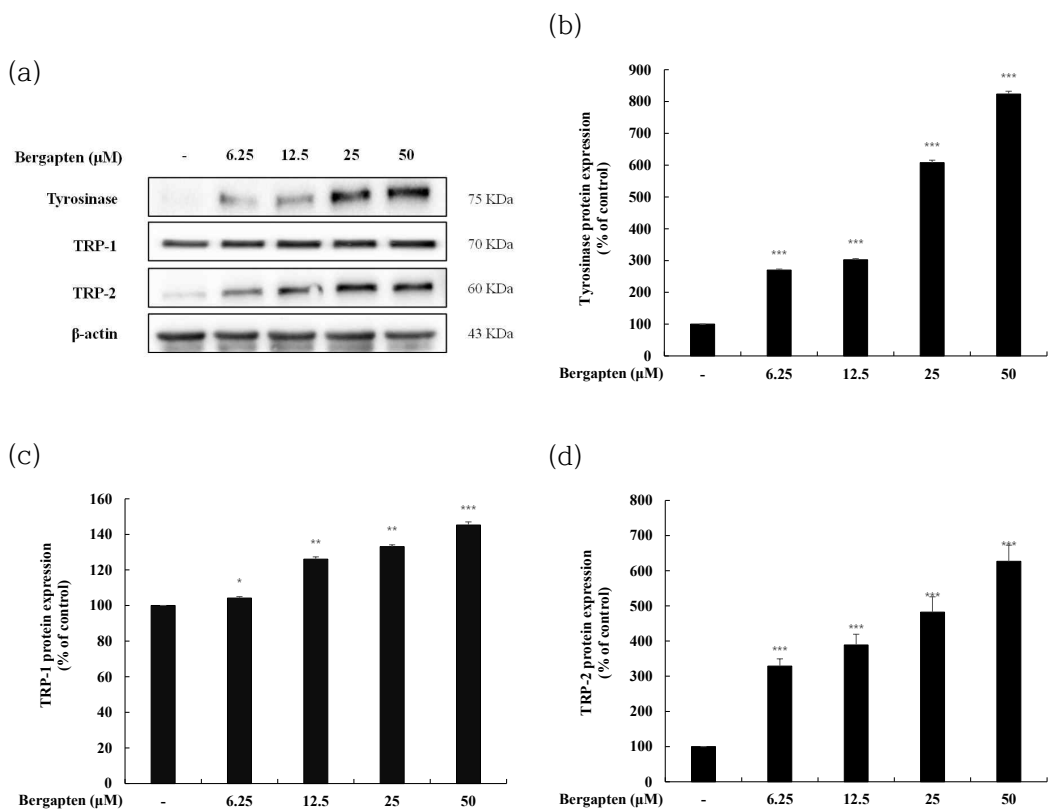


Figure 18. Effects of Bergapten on protein expression of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) for 48 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) Tyrosinase, (c) TRP-1 and (d) TRP-2. β-actin was used as a loading control. The results are presented as the mean ± SD from three independent measurements using the Image J. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

2) MITF 발현량 측정

멜라닌생성 조절인자 MITF는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 promoter의 M-box에 결합하여 멜라닌 생성을 조절한다고 보고되어 있다[54]. 따라서 B16F10 세포에서 Bergapten이 MITF 에 미치는 영향을 조사하기 위해 실험을 진행하였다. 실험 결과 Bergapten은 MITF의 활성을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 50 μ M에서 MITF 생성이 미처리군 대비 약 65.3% 증가하였다. 이를 통해 Bergapten이 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 유도하는 것을 알 수 있다(Fig. 19).

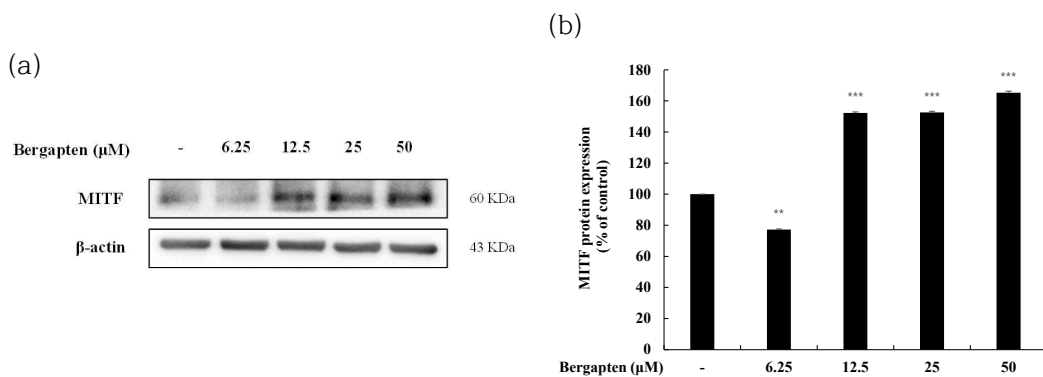


Figure 19. Effects of Bergapten on protein expression of MITF in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) for 48 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) MITF. β -actin was used as loading control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the Image J. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

3) Wnt/ β -catenin 신호전달경로

Wnt/ β -catenin 경로에서 인산화된 GSK3 β (Ser 9)는 세포질에서 β -catenin의 축적을 유도하고, 축적된 β -catenin은 핵으로 운반되어 MITF 발현을 증가시킨다[57-59]. B16F10 세포에서 Bergapten이 Wnt/ β -catenin 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 유도하는지 조사하기 위해 실험을 진행하였다. 실험 결과 Bergapten은 P-GSK3 β (Ser 9)와 β -catenin을 증가시켰다. 특히 50 μ M에서 P-GSK3 β (Ser 9)와 β -catenin의 생성을 미처리군 대비 약 83.92%, 123.56% 증가시켰다. 반면 Bergapten은 P- β -catenin의 생성을 저해하였고, 특히 50 μ M에서 P- β -catenin의 생성은 미처리군 대비 약 123.55% 감소하였다. 이를 통해 Bergapten이 Wnt/ β -catenin 신호전달경로를 통해 MITF를 유도하고, 멜라닌 생성을 증가시키는 것을 알 수 있다(Fig. 20).

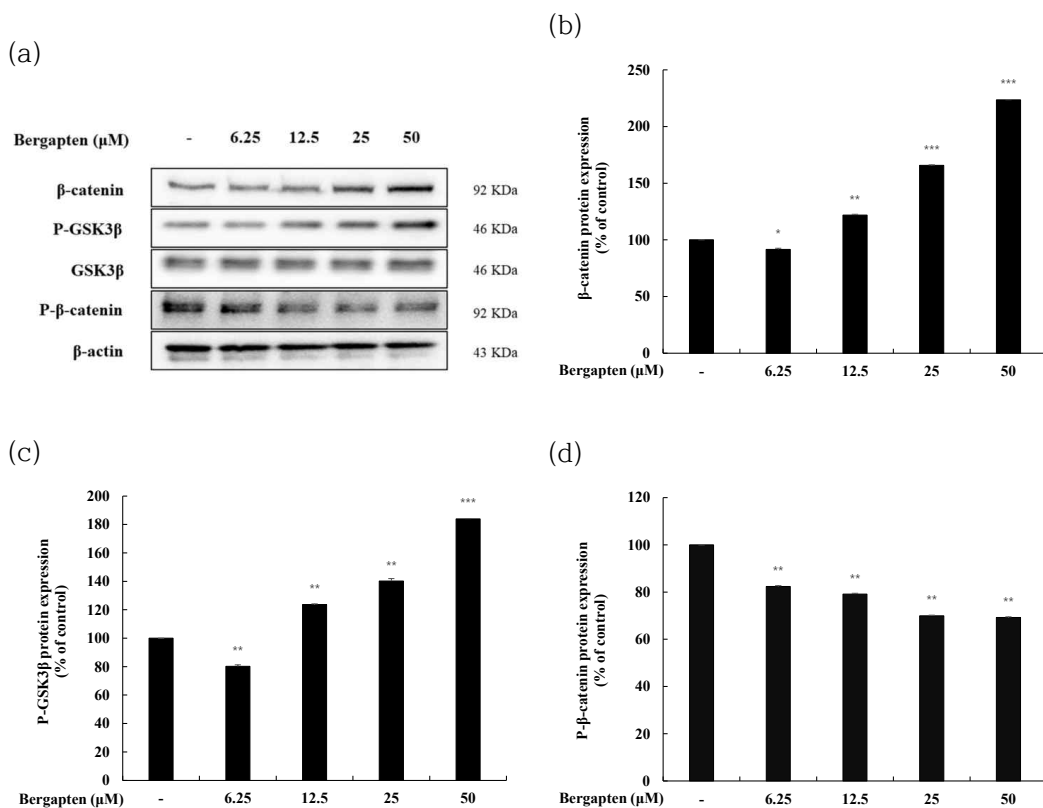


Figure 20. Effects of Bergapten on protein expression of β -catenin, P-GSK3 β and P- β -catenin in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μ M) for 24 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) β -catenin, (c) P-GSK3 β /T-GSK3 β and (d) P- β -catenin. β -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the Image J. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

4) PKA 신호전달경로

자극받은 MC1R은 AC를 활성화시키고, 이는 세포 내의 cAMP를 증가시키게 된다. cAMP에 의해 PKA가 인산화되고, 핵 안으로 이동하여 CREB를 인산화시키고, MITF의 발현을 촉진한다[63-64]. 따라서 B16F10 세포에서 Bergapten이 PKA 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 유도하는지 조사하기 위해 실험을 진행하였다. 실험 결과 Bergapten은 PKA의 인산화를 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 50 μ M에서 인산화된 PKA 생성을 약 332.69% 증가하였다. 이를 통해 Bergapten이 PKA의 인산화를 증가시켜 MITF 발현을 유도하고, 멜라닌 생성을 증가시키는 것을 알 수 있다(Fig. 21).

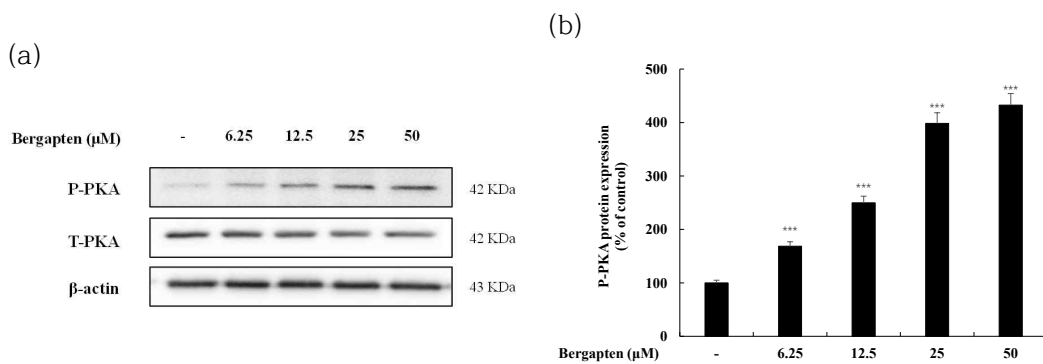


Figure 21. Effects of Bergapten on phosphorylation level of PKA in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) for 20 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) P-PKA/T-PKA. β-actin was used as a loading control. The results are presented as the mean ± SD from three independent measurements using the Image J. *** $p < 0.001$ vs untreated group.

5) PI3K/AKT 신호전달경로

PI3K/AKT 신호전달경로에서 인산화된 AKT는 멜라닌 생성 억제와 관련있다고 보고되어 있다[70-71]. 즉, AKT의 인산화 저해는 멜라닌 생성을 유도하게 된다. 따라서 B16F10 세포에서 Bergapten이 AKT 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 유도하는지 조사하였다. 실험 결과 Bergapten은 AKT의 인산화를 농도의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 50 μ M에서 인산화된 AKT가 약 54.55% 감소하였다. 이를 통해 Bergapten이 PI3K/AKT 신호전달경로에서 AKT의 인산화를 감소시켜 멜라닌 생성을 유도하는 것을 알 수 있다(Fig. 22).

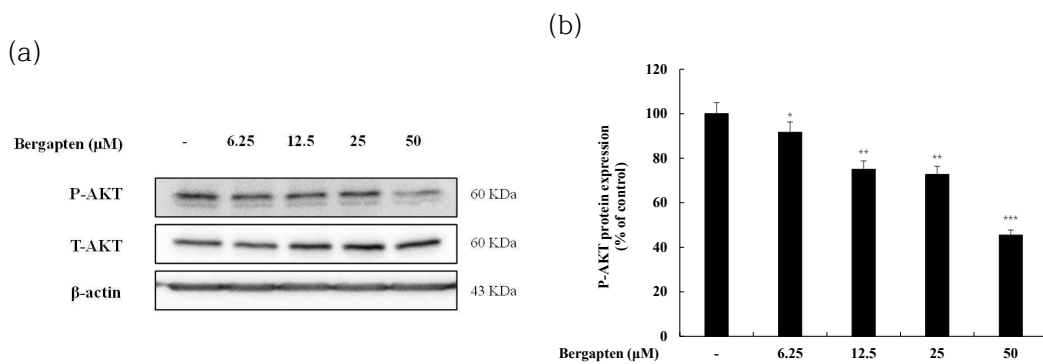


Figure 22. Effects of Bergapten on phosphorylation level of AKT in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) for 4 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) P-AKT/T-AKT. β -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the Image J. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

6) MAPKs 신호전달 경로

MAPK 경로에 속하는 ERK 신호는 음성 신호전달경로로, 인산화된 ERK는 MITF의 인산화를 유도하고, 멜라닌 생성을 억제한다[75]. 반면 JNK 및 p38 신호는 양성 신호전달경로로, 인산화된 JNK 및 p38은 MITF 발현을 상향 조절하고 멜라닌 생성을 자극한다[77]. 따라서 B16F10 세포에서 Bergapten이 MAPK 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 유도하는지 조사하기 위해 실험을 진행하였다. 실험 결과 Bergapten은 인산화된 ERK, JNK, p38를 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 50 μ M에서 P-JNK 와 P-p38의 생성이 각각 약 88.26%, 115.23% 증가하였다. 이를 통해 Bergapten이 JNK와 p38의 인산화를 상향조절하여 MITF의 발현을 유도하고, 멜라닌 생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있다(Fig. 23).

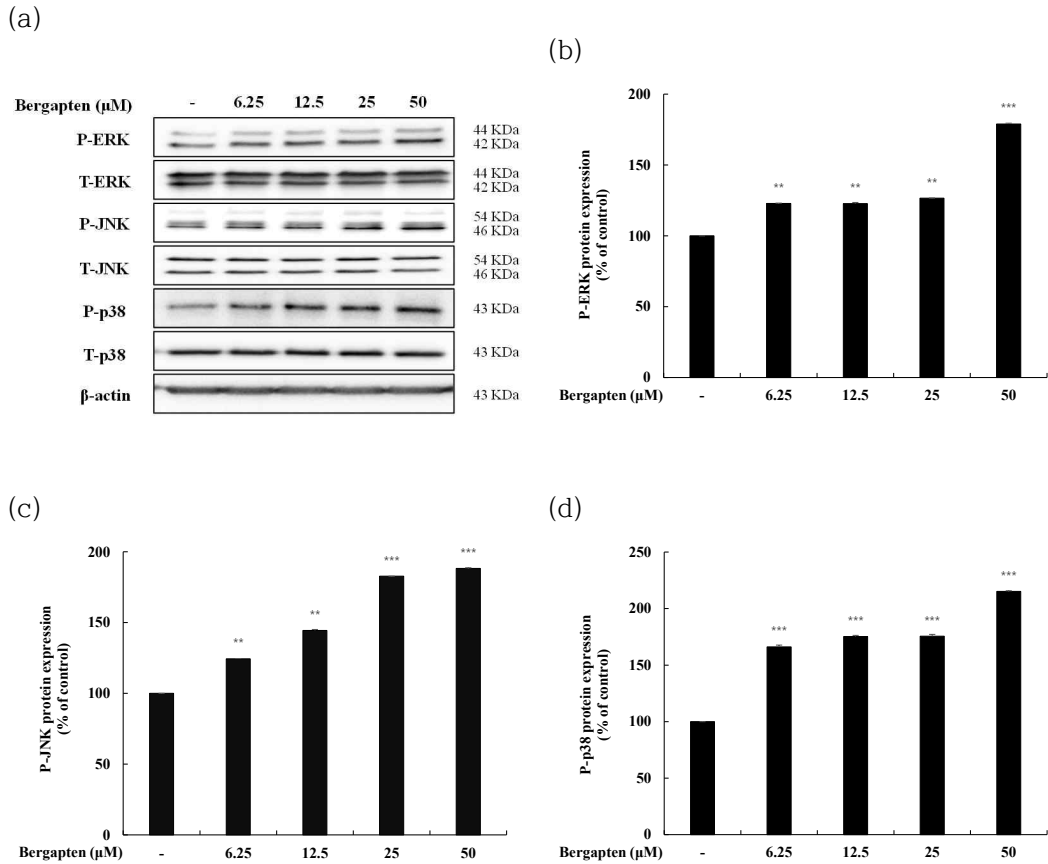


Figure 23. Effects of Bergapten on phosphorylation level of MAPKs in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with Bergapten (6.25, 12.5, 25 and 50 μM) for 4 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) P-ERK/T-ERK, (c) P-JNK/T-JNK, (d) P-p38/T-p38. β -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean \pm SD from three independent measurements using the Image J. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated group.

IV. 고 찰

Psoralen과 그 유도체들은 천연물에 존재하며 여러 생물학적 활성이 있다고 연구되어 왔다[83-93]. Psoralen 유도체의 생물학적 활성은 기본골격에 결합된 치환기의 유형, 위치 및 수 등에 의해 달라지며, 분자구조의 변함에 따른 분자의 소수성, 인체적 배열, 인체 내 용해도 등의 차이가 여러 생물학적 활성에 영향을 준다는 연구가 있다[94-95]. 따라서 RAW 264.7 및 B16F10 melanoma 세포에서 Psoralen 유도체들의 구조적 차이에 따른 생물학적 활성을 알아보하고자 하였다.

염증은 병원균의 침입을 받았을 때 인체를 보호하기 위한 자연스러운 방어 반응이다[96]. 그러나 과도하고 지속적인 염증은 조직 손상이나 간염, 폐렴, 류마티스 관절염, 천식 등 일련의 질병을 유발할 수 있다[97]. 현재 염증성 질환에 대한 치료제는 대표적으로 비스테로이드성 소염제(NSAIDs)등이 있다. 이러한 약물은 COX-2를 공격하여 prostaglandin의 합성을 억제함으로써 염증을 억제한다. 하지만 비스테로이드성 소염제의 장기사용은 위장장애, 심혈관 장애와 같은 부작용을 일으킨다[98]. 이에 안전하고 효과적인 천연 물질을 이용한 치료제의 개발을 찾기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다[99]. 따라서 천연물질인 Psoralen의 유도체가 항염증제로서 역할을 할 수 있는지 알아보하고자 실험을 진행하였다.

Psoralen 유도체들의 염증 활성을 비교하기 위해 먼저 MTT 분석을 통해 세포 생존 농도를 조사하였다. 실험 결과 모든 시료에서 세포독성이 나타나지 않은 250 μ M 농도를 사용하여 NO 생성량 측정 실험을 진행하였다. 실험 결과 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)의 NO 억제 활성이 가장 우수했는데, 흥미롭게도 Methoxy기 보다 Hydroxy기가 붙은 Psoralen 화합물의 NO 억제 활성이 더 우수하다는 것을 확인하였다. 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)과 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)을 비교해 보았을 때 Psoralen의 8번 위치에 Hydroxy기가 붙은 Xanthotoxol이 NO 억제 활성이 더 우수했다. 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol)과 5-Methoxypsoralen (Bergapten)을 비교해 보

았을 때 마찬가지로 Psoralen의 5번 위치에 Hydroxy기가 붙은 Bergaptol이 NO 억제 활성이 더 우수했다. 최고 농도인 250 μ M을 비교해 보았을 때 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)은 약 40.5%, 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)은 약 29.77% 억제하였다. 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol)은 약 36.47% 억제하였고, 5-Methoxypsoralen (Bergapten)은 오히려 약 12.52% 증가하였다.

또한 5번 위치에 작용기가 붙을 때보다 8번 위치에 작용기가 붙었을 때 NO 억제 활성이 더 우수하다는 것을 확인하였다. 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)은 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol)보다 NO 억제 활성이 더 우수했고, 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)은 5-Methoxypsoralen (Bergapten)보다 활성이 더 우수했다.

따라서 항염증 활성이 가장 우수한 Psoralen 구조는 Methoxy기 보다 Hydroxy기가 붙고, 5번 위치 보다 8번 위치에 작용기가 붙어야 더 활성이 우수하다는 것을 확인하였다. 그 결과 4개의 Psoralen 화합물 중 활성이 가장 우수한 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)로 세포독성이 나타내지 않은 농도인 500 μ M 이하의 농도를 사용하여 추가 실험을 진행하였다. 500 μ M 이하의 농도를 사용하여 NO 생성량 측정한 결과, 500 μ M에서 LPS 단독처리군 대비 약 74.36% 감소시켰으며 이는 양성대조군 L-NIL보다 NO 억제활성이 우수했다.

Xanthotoxol이 염증 매개체인 PGE₂의 생성량을 저해하는지 확인하기 위해 ELISA kit를 사용하여 실험을 진행하였다. 그 결과 LPS로 유도된 PGE₂의 생성량이 Xanthotoxol에 의해 농도의존적으로 저해된 것을 확인할 수 있었다. 다음으로 Xanthotoxol이 LPS로 유도된 전염증성 cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 생성량을 저해하는지 조사하였다. 그 결과 Xanthotoxol은 전염증성 사이토카인들을 하향조절한 것을 확인하였다.

염증반응 지표물질인 NO는 L-arginine에서 iNOS에 의해 생성되고, 염증매개체인 PGE₂는 arachidonic acid에서 COX-2에 의해 생성된다[18-19]. Xanthotoxol에 의한 NO, PGE₂의 감소가 iNOS, COX-2의 감소로 인한 것인지 알아보기 위

해 Western blot을 진행하였다. 실험 결과 Xanthotoxol은 iNOS, COX-2의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 따라서 Xanthotoxol은 iNOS, COX-2 생성을 저해함으로써 NO, PGE₂의 생성을 저해한 것을 알 수 있다.

MAPKs (ERK, JNK, p38)이 인산화되면 전염증성 cytokine들의 생성을 증가시킨다고 보고되었다[26]. 실험 결과 Xanthotoxol은 인산화된 ERK의 생성 억제 활성을 나타내지 않았지만, 인산화된 JNK, p38의 생성을 억제하였다. 이를 통해 Xanthotoxol은 JNK, p38의 인산화를 저해함으로써 JNK, p38 신호전달경로를 통해 염증 매개체들의 생성을 저해하는 것을 알 수 있다.

NF- κ B가 LPS에 의해 자극받으면 결합하고 있던 I κ B α 와 분해되고, NF- κ B는 세포질에서 핵으로 전위되어 염증 매개체의 유전자 발현을 유도한다. 이때 분해된 I κ B α 는 인산화되어 유비퀴틴화 및 분해된다[34]. Xanthotoxol은 LPS에 자극으로 인산화된 I κ B α 를 감소시킨 반면 I κ B α 는 증가시켰다. 또한, Xanthotoxol은 세포질에서 LPS의 자극으로 감소된 p65의 생성을 증가시켰고, 핵에서 LPS에 의해 증가된 p65 생성을 억제하였다. 이는 Xanthotoxol이 LPS의 자극으로 인산화된 I κ B α 를 억제하고, 세포질에서 핵으로 가는 p65를 방어함으로써 염증을 억제하였다는 것을 알 수 있다.

멜라닌은 자외선에 의해 생성된 자유라디칼을 제거하여 피부를 보호하는 역할을 한다[43-45]. 그러나 멜라닌 생성의 감소로 인한 멜라닌 결핍은 저색소 침착(Hypopigmentation)과 관련된 백색증(Albinism), 백반증(Vitiligo)과 같은 색소 질환을 초래하며[46-49] 이는 심각한 정신적 스트레스를 유발하고 삶의 질을 현저히 저하시킬 수 있다[100]. 현재 많은 멜라닌 생성 유도제가 개발되었지만 알레르기, 접촉 피부염, 습진 및 세포 독성과 같은 심각한 부작용을 일으킬 수 있다[101]. 따라서 천연물질인 Psoralen의 유도체가 저색소 침착증 치료제의 소재로서 역할을 할 수 있는지 알아보려고 실험을 진행하였다.

Psoralen 유도체들의 멜라닌 활성을 비교하기 위해 먼저 MTT 분석을 통해 세

포 생존 농도를 조사하였다. 실험 결과 모든 시료에서 세포독성을 나타내지 않은 25 μ M 농도를 사용하여 멜라닌 생성량 측정 실험 진행하였다. 실험 결과 5-Methoxypsoralen (Bergapten)의 멜라닌 생성이 가장 우수했는데, 흥미롭게도 Hydroxy기 보다 Methoxy기가 붙은 Psoralen 화합물의 멜라닌 생성 활성이 더 우수하다는 것을 확인하였다. 5-Methoxypsoralen (Bergapten)과 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol)을 비교해 보았을 때 Psoralen의 5번 위치에 Methoxy기가 붙은 Bergapten이 멜라닌 생성 활성이 더 우수했다. 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)과 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)을 비교해 보았을 때 마찬가지로 Psoralen의 8번 위치에 Methoxy기가 붙은 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)이 멜라닌 생성 활성이 더 우수했다. 최고 농도인 25 μ M을 비교해 보았을 때 미처리군 대비 5-Methoxypsoralen (Bergapten)은 약 147.04 %, 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol)은 약 22.59% 으로 멜라닌 생성이 증가하였고, 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)은 약 115.8%, 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)은 약 3.33% 증가하였다.

또한 8번 위치에 작용기가 붙을 때보다 5번 위치에 작용기가 붙을 때 활성이 더 우수하다는 것을 확인하였다. 5-Methoxypsoralen (Bergapten)은 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)보다 멜라닌 생성 활성이 더 우수했고, 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol)은 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol) 보다 멜라닌 생성 활성이 더 우수했다.

추가로, 멜라닌 생성 활성이 우수한 5-Methoxypsoralen (Bergapten) 과 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin) 화합물의 구조를 참고하여 5,8-Dimethoxypsoralen (Isopimpinellin)의 멜라닌 생성량을 측정하였다. Isopimpinellin은 최고 농도인 25 μ M에서 약 82.59%로 오히려 Bergapten과 Xanthotoxin보다 멜라닌 생성량이 감소했다는 것을 알 수 있다. 이는 Methoxy기가 5번과 8번 위치에 동시에 붙는 것보다 각각 붙어야 멜라닌 생성 활성이 더 우수하다는 것을 알 수 있다.

따라서 멜라닌 생성에 더 활성이 높은 Psoralen 구조는 Hydroxy기 보다 Methoxy기가 붙은 화합물이며, 8번 위치 보다 5번 위치에 작용기가 붙어야 더 활성이 우수하다는 것을 확인하였다. 따라서 5개의 Psoralen 화합물 중에 활성이

가장 우수한 5-Methoxypsoralen (Bergapten)로 세포독성이 나타내지 않은 농도인 50 μ M 이하의 농도를 사용하여 추가 실험을 진행하였다.

Bergapten의 세포독성이 나타내지 않은 농도 50 μ M 이하의 농도로 Melanin contents 실험을 해본 결과, 최고농도인 50 μ M에서 미처리군 대비 250.21% 증가하였고 양성대조군인 α -MSH 와 비교하였을 때 56.9% 더 증가하였다. 이어서 Tyrosinase activity 실험을 해본결과 50 μ M에서 미처리군 대비 311.98% 증가하였으며, 양성대조군인 α -MSH와 비교하였을 때 124.11% 더 증가하였다.

이후 Western blot으로 멜라닌 촉매 효소인 Tyrosinase, TRP-1, TRP-1의 발현을 확인해보았다. 실험 결과 Bergapten에 의해 농도 의존적으로 증가한 것을 볼 수 있었다. 이는 Bergapten의 멜라닌 생성 증가가 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2를 통해 일어난다는 것을 알 수 있다.

이어서 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 증가가 MITF를 통해서 일어나는지 확인하였다. MITF는 멜라닌 생성 조절 인자로 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 promotor의 M-box에 결합하여 멜라닌 생성을 조절한다[56]. 실험 결과 Bergapten을 처리했을 때 MITF의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다. 이를 통해 MITF의 증가로 인해 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 의 생성이 증가하여 멜라닌 생성 증가가 일어난다는 것을 알 수 있다.

MITF의 멜라닌 생성 조절은 여러 신호전달경로를 통해 조절되는데 먼저 Wnt/ β -catenin 신호전달경로에서 tyr 216에서 인산화된 GSK3 β 는 활성화되고, 활성화된 P-GSK3 β 는 β -catenin의 인산화를 유도하여 유비퀴틴화 및 분해한다. 반대로 ser 9에서 인산화된 GSK3 β 는 비활성화되고, 비활성화된 P-GSK3 β 는 β -catenin의 인산화를 억제하므로, β -catenin은 세포질에서 축적된다. 축적된 β -catenin은 핵으로 운반되어 MITF 발현을 증가시킨다[57-62]. 실험 결과 ser9에서 인산화된 GSK3 β 는 Bergapten에 의해서 농도 의존적으로 증가되었으며, 이에 따른 β -catenin도 증가되었다. 반대로 Bergapten은 인산화된 β -catenin을 감소시

켰고, 이는 Bergapten이 인산화된 GSK3 β (ser9)를 증가시켜서 β -catenin의 생성을 증가시키고 인산화된 β -catenin의 생성을 저해함으로써 MITF의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있다.

PKA 신호전달 경로에서 활성화된 cAMP는 PKA를 인산화시키고, 인산화된 PKA는 CREB를 인산화시켜 MITF의 발현을 증가시킨다[63]. 실험결과 Bergapten은 농도의존적으로 PKA를 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 Bergapten이 인산화된 PKA를 증가시킴으로써 MITF를 증가시키고, 멜라닌 생성을 유도한다는 것을 알 수 있다.

PI3K/AKT 신호전달 경로는 음성신호전달경로로, 인산화된 AKT는 MITF의 분해를 촉진하여 멜라닌 생성을 억제한다[71-72]. 따라서 Bergapten이 인산화된 AKT를 감소시켜 MITF의 발현을 증가시키는지 조사하였다. 그 결과 Bergapten은 인산화된 AKT를 농도의존적으로 감소시켰다. 이는 Bergapten이 인산화된 AKT의 억제를 통해 MITF의 분해를 억제시키고, 멜라닌 생성을 유도한다는 것을 알 수 있다.

MAPK 신호전달 경로에서 인산화된 JNK, p38의 증가는 MITF의 발현을 증가시키고 멜라닌 생성을 유도한다. 반대로 인산화된 ERK의 증가는 MITF의 분해를 촉진시켜 멜라닌 생성을 억제한다[76-77]. 실험결과 Bergapten은 인산화된 JNK, p38의 발현을 증가시켰으며, 이는 Bergapten이 JNK와 p38 신호전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있다.

본 연구를 통해 Psoralen 유도체의 구조적 차이에 따른 생물학적 차이에 대해서 알아보았다. Psoralen 구조에 Hydroxy기, Methoxy기가 붙는지 또는 작용기가 5번 위치에 붙는지 8번 위치에 붙는지에 따라서 생물학적인 특성이 달라졌다. NO 억제 활성 실험에서는 Psoralen의 8번 위치에 Hydroxy기가 붙은 8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)의 활성이 가장 우수했다. Xanthotoxol은 MAPKs와 NF- κ B의 신호전달 경로를 통해 염증 매개체와 전염증성 사이토카

인의 생성을 저해하였다. 이는 천연 염증치료제의 소재로 사용될 수 있다고 사료된다.

또한 멜라닌 활성 실험에서 Psoralen의 5번 위치에 Methoxy기가 붙은 5-Methoxypsoralen (Bergapten)의 멜라닌 생성 활성이 가장 좋았다. Bergapten은 Wnt/ β -catenin, PKA, PI3K/AKT 그리고 MAPKs 신호전달경로를 통해 MITF의 발현을 증가시키고, 이는 Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 유도하였다. 이는 천연 저색소 침착증 치료의 소재로 사용될 수 있다고 사료된다.

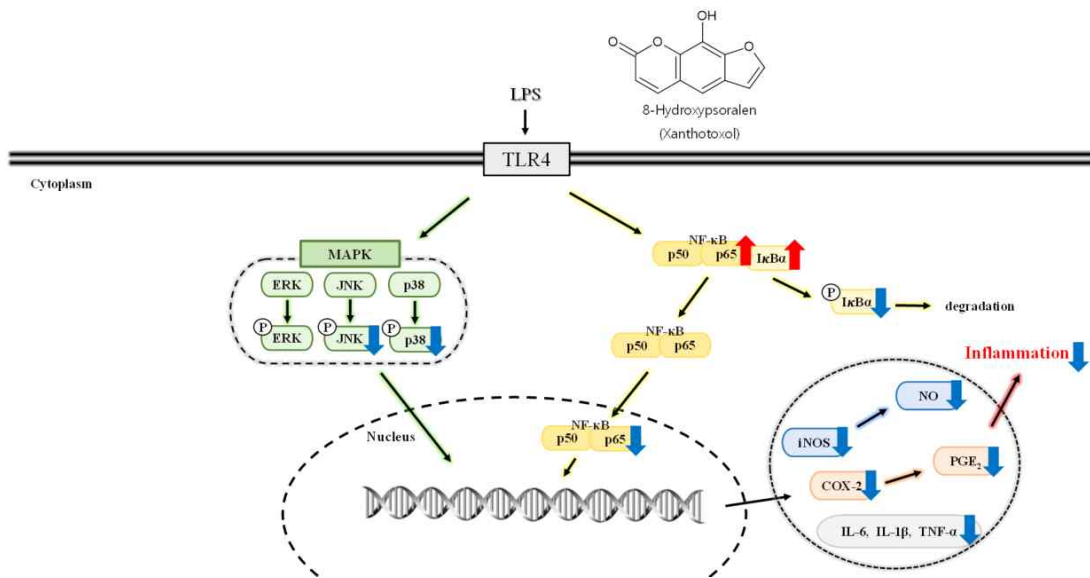


Figure 24. Effects of Xanthotoxol on inflammatory.

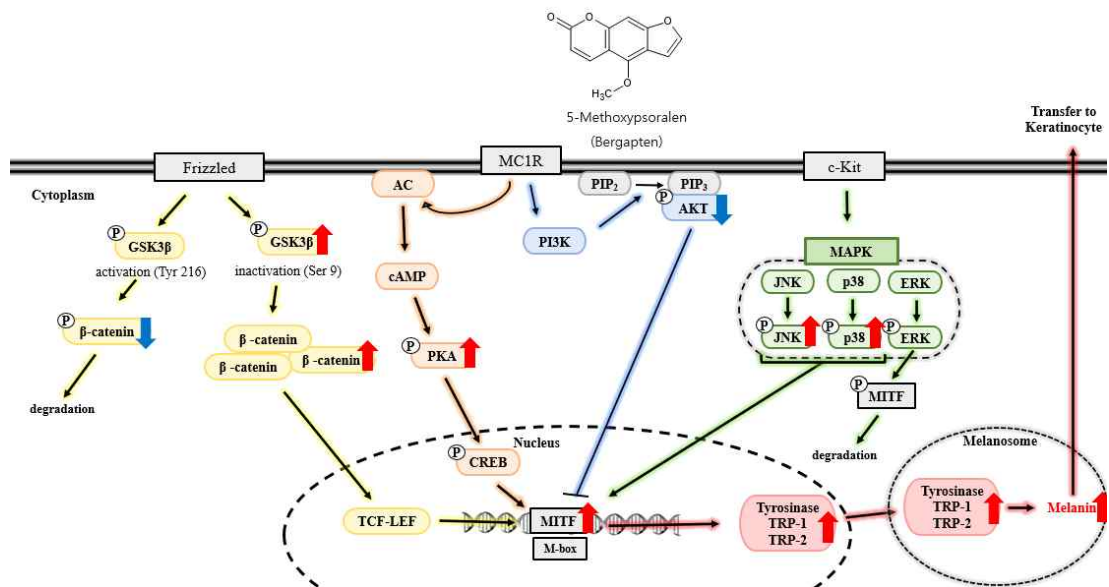


Figure 25. Effects of Bergapten on Melanogenesis.

V. 참고문헌

1. Gasparri M, Afrin S, Forbes-Hernández TY, Cianciosi D, Reboledo-Rodríguez P, Amici A, Battino M, Giampieri F. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. *Food and Chemical Toxicology* 2018, 120, 578-587
2. Lu Q, Li R, Yang Y, Zhang Y, Zhao Q, Li J. Ingredients with anti-inflammatory effect from medicine food homology plants. *Food Chemistry* 2022, 368, 130610
3. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual Review of Physiology* 2010, 72, 219-246
4. Muszyńska B, Grzywacz-Kisielewska A, Kała K, Gdula-Argasińska J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry* 2018, 243, 373 - 381.
5. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2016, 444, 860-867.
6. Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol* 1983, 3(4), 295-315.
7. Li X, Xu W. TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *Polyporus umbellatus* (pers.) Fries. *J Ethnopharmacol* 2011, 135(1), 1-6.
8. Rampa KM, Van De Venter M, Koekemoer TC, Swanepoel B, Venables L, Hattingh AC, Viljoen AM, Kamatou GP. Exploring four South African *Croton* species for potential anti-inflammatory properties: in vitro activity and toxicity risk assessment. *J Ethnopharmacol* 2022, 282, 114596.
9. Xie C, Kang J, Li Z, Schauss AG, Badger TM, Nagarajan S, Wu T, Wu X. The acaiflavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent :

- blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2012, 23, 1184-1191.
10. Paik, Y. H, R. F. Schwabe, R. Bataller, M. P. Russo, C. Jobin, and D. Brenner. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003, 37(5), 1043-55.
 11. Ghosh, S, and H. S. Hayden. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2008, 8(11), 837-48.
 12. Park, S. M, S. H. Byun, Y. W. Kim, I. J. Cho, and S. C. Kim. Inhibitory effect of Mori Folium ethanol extract on proinflammatory mediator in lipopolysaccharide activated RAW 264.7 cells. *The Korea Journal of Herbology* 2012, 27: 31-38.
 13. Luo G, Cheng BC, Zhao H, Fu XQ, Xie R, Zhang SF, Pan SY, Zhang Y. Schisandra Chinensis Lignans Suppresses the Production of Inflammatory Mediators Regulated by NF- κ B, AP-1, and IRF3 in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Cells. *Molecules* 2018, 23(12), 3319.
 14. He J, Li J, Liu H, Yang Z, Zhou F, Wei T, Dong Y, Xue H, Tang L, Liu M. Scandoside Exerts Anti-Inflammatory Effect Via Suppressing NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages. *International Journal of molecular Sciences* 2018, 19(2), 457.
 15. Bishop-Bailey D, Calatayud S, Warner TD, Hla T, Mitchell JA. Prostaglandins and the regulation of tumor growth. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002, 21(2), 93-101.
 16. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(25), 12013-7.

17. Levy GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J* 1997, 11(4), 234-47.
18. Takahashi M, Mutoh M, Shoji Y, Sato H, Kamanaka Y, Naka M, Maruyama T, Sugimura T, Wakabayashi K. Suppressive effect of an inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, on AOM-induced rat colon carcinogenesis. *Nitric Oxide* 2006, 14(2), 130-6.
19. F. S. Laroux, K. P. Pavlick, I. N. Hines, S. Kawachi, H. Harada, S. Bharwani, J. M. Hoffman, M. B. Grisham, Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiologica Scandinavica* 2001, 173(1), 113-8.
20. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992, 6(12), 3051-64.
21. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 1996, 10(3-4), 291-316.
22. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(17), 7773-7.
23. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine* 1993, 178, 749-754.
24. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide, and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochemical Journal* 1996, 316, 209-15.
25. Ren GD, -Y Cui Y, Li WL, Li FF, Han XY. Research on cardioprotective effect of irbesartan in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury through MAPK-ERK signaling pathway. *European Review Medical and Pharmacological Sciences* 2019, 23(12), 5487-5494.
26. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for

- anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2005, 1754(1-2), 253-62.
27. Rao KM. MAP kinase activation in macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2001, 69(1), 3-10.
28. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. *Cell Metabolism* 2011, 13(1), 11-22.
29. Zhang Z, Chen X, Chen H, Wang L, Liang J, Luo D, Liu Y, Yang H, Li Y, Xie J, Su Z. Anti-inflammatory activity of β -patchoulene isolated from patchouli oil in mice. *European Journal of Pharmacology* 2016, 781, 229-38.
30. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2001, 480-481, 243-68.
31. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogenactivated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007, 26(22), 3291-310.
32. Reber L, Vermeulen L, Haegeman G, Frossard N. Ser276 phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS one* 2009, 4(2), e4393.
33. Yoon CS, Kim DC, Quang TH, Seo J, Kang DG, Lee HS, Oh H, Kim YC. A Prenylated Xanthone, Cudraticusxanthone A, Isolated from *Cudrania tricuspidata* Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation through Inhibition of NF- κ B and p38 MAPK Pathways in BV2 Microglia. *Molecules* 2016, 21(9), 1240.
34. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B Activity. *Annual Review of Immunology* 2000, 18, 621-63.
35. Alaluf S, Atkins D, Barrett K, Blount M, Carter N, Heath A. The impact

- of epidermal melanin on objective measurements of human skin colour. *Pigment Cell & Melanoma Research* 2002, 15(2), 119-26.
35. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2016, 17(7), 1144.
36. Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. *Journal of Investigative Dermatology* 2011, 131(E1), E8-E11.
37. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J* 2007, 21(4), 976-94.
38. Fuller BB, Lunsford JB, Iman DS. Alpha-melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in Cloudman S-91 mouse melanoma cell cultures. *The journal of biological chemistry* 1987, 262(9), 4024-33.
39. Funasaka Y, Chakraborty AK, Hayashi Y, Komoto M, Ohashi A, Nagahama M, Inoue Y, Pawelek J, Ichihashi M. Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1 α , interleukin-1 β , endothelin-1 and tumour necrosis factor- α . *British Journal of Dermatology* 1998, 139(2), 216-24.
40. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 2007, 445(7130), 843-50.
41. Delevoye C. Melanin transfer: The keratinocytes are more than gluttons. *Journal of Investigative Dermatology* 2014, 134(4), 877 - 879.
42. Virador VM, Kobayashi N, Matsunaga J, Hearing VJ. A Standardized Protocol for Assessing Regulators of Pigmentation. 1999. 270(2), 207-19.
43. Brożyna AA, Jóźwicki W, Roszkowski K, Filipiak J, Słominski AT. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. *Oncotarget* 2016, 7(14), 17844-53.
44. Herrling T, Jung K, Fuchs J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2008, 69(5), 1429-35.

45. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282(38), 27557-61.
46. Yao C, Jin CL, Oh IG, Park CH, Chung JH. Melia azedarach extract stimulates melanogenesis through increase of tyrosinase-related protein 1 expression in B16F10 mouse melanoma cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2015, 35, 1761 - 1766.
47. Namazi, M.R. Neurogenic dysregulation, oxidative stress, autoimmunity, and melanocytorrhagy in vitiligo: Can they be interconnected? *Pigment Cell Research* 2007, 20(5), 360 - 363.
48. Niu C, Aisa HA. Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. *Molecules* 2017, 22(8), 1303.
49. Passeron, T. Melasma pathogenesis and influencing factors - an overview of the latest research. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2013, 27 Suppl 1, 5-6.
50. Maeda, K, and M. Fukuda. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *Journal of the society of cosmetic chemists* 1991, 42, 361-368.
51. Baliña LM, Graupe K. The treatment of melasma. 20% azelaic acid vs 4% hydroquinone cream. *International Journal of Dermatology* 1991, 30(12), 893-5.
52. Olivares C, Solano F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins *Pigment Cell & Melanoma Research* 2009 Dec, 22(6), 750-60.
53. Bentley NJ, Eisen T, Goding CR. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Molecular and Cellular Biology* 1994, 14(12), 7996-8006.

54. Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y, Shibahara S. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *The Journal of Biological Chemistry* 1997, 272(1), 503-9.
55. Bertolotto, C., R. Buscà, P. Abbe, K. Bille, E. Aberdam, J. P. Ortonne, and R. Ballotti. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Molecular and Cellular Biology* 1998 18(2), 694-702.
56. Yokoyama, K., H. Suzuki, K. Yasumoto, Y. Tomita, and S. Shibahara. 1994. Molecular cloning and functional analysis of a cDNA coding for human DOPACHrome tautomerase/tyrosinase-related protein-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1994, 1217(3), 317-21.
57. Molagoda IMN, Karunarathne WAHM, Park SR, Choi YH, Park EK, Jin CY, Yu H, Jo WS, Lee KT, Kim GY. GSK-3 β -Targeting Fisetin Promotes Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells and Zebrafish Larvae through β -Catenin Activation. *International Journal of Molecular sciences* 2020, 21(1), 312.
58. Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC Jr, Woodgett JR, Mills GB. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97(22), 11960-5.
59. Wu J, Saint-Jeannet JP, Klein PS. Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. *Trends in Neurosciences* 2003, 26(1), 40-5.
60. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Development* 2002, 16(9), 1066-76.

61. Latres E, Chiaur DS, Pagano M. The human F box protein beta-Trcp associates with the Cull1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 1999, 18(4), 849-54.
62. Lee E, Salic A, Krüger R, Heinrich R, Kirschner MW. The roles of APC and axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway, *PLoS Biol* 2003, 1(1), E10.
63. Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP, Ballotti R. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *Journal of Cell Biology*. 1998, 142(3), 827-35.
64. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, Ichihashi M. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1996, 1313(2), 130-8.
65. Cheli, Y, F. Luciani, M. Khaled, L. Beuret, K. Bille, P. Gounon, J. P. Ortonne, C. Bertolotto, R. Ballotti. Alpha-MSH and Cyclic AMP elevating agents control melanosome pH through a protein kinase A-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 2009, 284(28), 18699-706.
66. Tsang TF, Chan B, Tai WC, Huang G, Wang J, Li X, Jiang ZH, Hsiao WLW. Gynostemma pentaphyllum saponins induce melanogenesis and activate cAMP/PKA and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *Phytomedicine* 2019, 60, 153008.
67. Mosca S, Cardinali G, Flori E, Briganti S, Bottillo I, Mileo AM, Maresca V. The PI3K pathway induced by α MSH exerts a negative feedback on melanogenesis and contributes to the release of pigment. *Pigment Cell Melanoma Research* 2021, 34(1), 72-88.
68. Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*

- 1996, 1288(1), M11-6.
69. Cleary JM, Shapiro GI. Development of phosphoinos-itide-3 kinase pathway inhibitors for advanced cancer. *Current Oncology Report* 2010, 12(2), 87-94.
70. Jang JY, Kim HN, Kim YR, Choi WY, Choi YH, Shin HK, Choi BT. Partially purified components of *Nardostachys chinensis* suppress melanin synthesis through ERK and Akt signaling pathway with cAMP down-regulation in B16F10 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 137(3), 1207-14.
71. Lee J, Jung K, Kim YS, Park D. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. *Life Sciences* 2007, 81(3), 249-54.
72. Yao C, Jin CL, Oh JH, Oh IG, Park CH, Chung JH. *Ardisia crenata* extract stimulates melanogenesis in B16F10 melanoma cells through inhibiting ERK1/2 and Akt activation. *Molecular Medicine Reports* 2015, 11(1), 653-7.
73. Zhou J, Ren T, Li Y, Cheng A, Xie W, Xu L, Peng L, Lin J, Lian L, Diao Y, Jin X, Yang L. Oleoylethanolamide inhibits α -melanocyte stimulating hormone-stimulated melanogenesis via ERK, Akt and CREB signaling pathways in B16 melanoma cells. *Oncotarget* 2017, 8(34), 56868-56879.
74. Kim DS, Hwang ES, Lee JE, Kim SY, Kwon SB, Park KC. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *Journal of Cell Science* 2003, 116(Pt 9), 1699-706.
75. Xu W, Gong L, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Yeh ET, Medrano EE. Regulation of Microphthalmia-associated transcription factor MITF protein expressions by association with the ubiquitin-conjugation enzyme hUBC9. *Experimental Cell Research* 2000, 255(2), 135-43.

76. Selimovic D, Hassan M, Haikel Y, Hengge UR. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2. *Cellular Signalling* 2008, 20(2), 311-22.
77. Chang SP, Huang HM, Shen SC, Lee WR, Chen YC. Nilotinib induction of melanogenesis via reactive oxygen species-dependent JNK activation in B16F0 mouse melanoma cells. *Experimental Dermatology* 2018, 27(12), 1388-1394.
78. Jiang Z, Xu J, Long M, Tu Z, Yang G, He G. 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation. *Life Sciences* 2009, 85(9-10), 345-50.
79. Zhou J, Shang J, Ping F, Zhao G. Alcohol extract from *Vernonia anthelmintica* (L.) wild seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 2012, 143(2), 639-47.
80. Ahn JH, Jin SH, Kang HY. LPS induces melanogenesis through p38 MAPK activation in human melanocytes. *Archives of Dermatological Research* 2008, 300(6), 325-9.
81. Lee J, Jung K, Kim YS, Park D. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. *Life Sciences* 2007, 81(3), 249-54.
82. Li H, Xu J, Li X, Hu Y, Liao Y, Zhou W, Song Z. Anti-inflammatory activity of psoralen in human periodontal ligament cells via estrogen receptor signaling pathway. *Scientific Reports* 2021, 11(1), 8754.
83. Gao W, Jin Z, Zheng Y, Xu Y. Psoralen inhibits the inflammatory response and mucus production in allergic rhinitis by inhibiting the activator protein 1 pathway and the downstream expression of cystatin SN. *Molecular Medicine Reports* 2021, 24(3), 652.

84. Wang X, Cheng K, Han Y, Zhang G, Dong J, Cui Y, Yang Z. Effects of Psoralen as an Anti-tumor Agent in Human Breast Cancer MCF-7/ADR Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2016, 39(5), 815-22.
85. Grimes PE. Psoralen photochemotherapy for vitiligo. *Clinics in Dermatology* 1997, 15(6), 921-6.
86. Li X, Yu C, Hu Y, Xia X, Liao Y, Zhang J, Chen H, Lu W, Zhou W, Song Z. New Application of Psoralen and Angelicin on Periodontitis With Anti-bacterial, Anti-inflammatory, and Osteogenesis Effects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018, 8, 178.
87. Wei Y, Zhang T, Ito Y. Preparative isolation of osthol and xanthotoxol from Common Cnidium Fruit (Chinese traditional herb) using stepwise elution by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 2004, 1033(2), 373-7.
88. Shi B, Liu J, Zhang Q, Wang S, Jia P, Bian L, Zheng X. Effect of co-administration of Acori Tatarinowii Rhizoma volatile oil on pharmacokinetic fate of xanthotoxol, oxypeucedanin hydrate, and byakangelicin from Angelicae Dahuricae Radix in rat. *Journal of separation science* 2020, 43(12), 2349-2362.
89. K. Nagendra Prasad, Haihui Xie, Jing Hao, Bao Yang, Shengxiang Qiu, Xiaoyi Wei, Fang Chen b, Yueming Jiang. Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from wampee [Clausena lansium (Lour.) Skeels] peel. *Food Chemistry* 2010, 118, 62 - 66.
90. Adakudugu EA, Ameyaw EO, Obese E, Biney RP, Henneh IT, Aidoo DB, Oge EN, Attah IY, Obiri DD. Protective effect of bergapten in acetic acid-induced colitis in rats. *Heliyon* 2020, 6(8), e04710.
91. Bose SK, Dewanjee S, Sahu R, Dey SP. Effect of bergapten from Heracleum nepalense root on production of proinflammatory cytokines. *Natural Product Research* 2011, 25(15), 1444-9
92. Chiang SR, Lin CS, Lin HH, Shieh PC, Kao SH. Bergapten induces G1

- arrest of non small cell lung cancer cells, associated with the p53 mediated cascade *Molecular Medicine Reports* 2019 Mar, 19(3), 1972-1978.
93. Yu J, Wang L, Walzem RL, Miller EG, Pike LM, Patil BS. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and food chemistry* 2005, 53(6), 2009-14.
94. Ahmed S, Khan H, Aschner M, Mirzae H, Küpeli Akkol E, Capasso R. Anticancer Potential of Furanocoumarins: Mechanistic and Therapeutic Aspects. *International of Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(16), 5622.
95. d'Ischia M, Napolitano A, Prota G. Psoralens sensitize glutathione photooxidation in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1989, 993(2-3), 143-7.
96. Tall AR, Yvan-Charvet L, Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2015 Feb, 15(2), 104-16.
97. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 2001, 344(12), 907-16.
98. Ren J, Li L, Wang Y, Zhai J, Chen G, Hu K. Gambogic acid induces heme oxygenase-1 through Nrf2 signaling pathway and inhibits NF- κ B and MAPK activation to reduce inflammation in LPS-activated RAW264.7 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019, 109, 555-562.
99. Nguyen TQC, Duy Binh T, Pham TLA, Nguyen YDH, Thi Xuan Trang D, Nguyen TT, Kanaori K, Kamei K. Anti-Inflammatory Effects of *Lasia spinosa* Leaf Extract in Lipopolysaccharide-Induced RAW 264.7 Macrophages. *International of Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(10), 3439.
100. Maymone MBC, Neamah HH, Secemsky EA, Vashi NA. Correlating the Dermatology Life Quality Index and Skin Discoloration Impact Evaluation Questionnaire tools in disorders of hyperpigmentation. *The Journal of*

Dermatology 2018, 45(3), 361-362.

101. Niu C, Yin L, Aisa HA. Novel Furocoumarin Derivatives Stimulate Melanogenesis in B16 Melanoma Cells by Up-Regulation of MITF and TYR Family via Akt/GSK3 β / β -Catenin Signaling Pathways. *International of Journal of Molecular Sciences* 2018, 19(3), 746.