



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 B16F10 세포에서
Voglibose와 Miglitol의
Melanogenesis 억제 효과

제주대학교대학원

화학과

김 현 미

2023년 2월

마우스 B16F10 세포에서 Voglibose와 Miglitol의 Melanogenesis 억제 효과

지도교수 현 창 구

김 현 미

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2022년 12월

김현미의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u>尹 景 变</u>	
위 원	<u>任 喜 貞</u>	
위 원	<u>玄 昌 久</u>	

제주대학교 대학원

2022년 12월

Inhibitory Effects on Melanogenesis by Voglibose and Miglitol in Mouse B16F10 Cells

Hyeon-mi Kim

(Supervised by professor Chang-Gu Hyun)

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

2022. 12.

This thesis has been examined and approved.

Kyung-Sup Yoon

Hee-Jung Im

CHANG-GU HYUN

Dec. 2022

Date

Department of Chemistry
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

In this study, the effects of Miglitol, Voglibose, and Validamycin A, which are used as α -glucosidase, on melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells were evaluated. In addition, it was confirmed that it can be used as a useful ingredient for external preparations and cosmetics for the treatment of hyperpigmentation due to the repurposing.

Miglitol reduced the protein expression of the melanin-producing enzymes TRP-1, TRP-2, TYR and their transcription factor MITF. It was confirmed that Miglitol reduced melanin content through down-regulation of MITF in the Wnt/ β -catenin, PKA, p38 MAPK, and MAPK/ERK signaling pathways.

Voglibose also confirmed that TRP-1 and TRP-2 and their transcription factor, MITF, decreased their activity as a result of examining the protein expression levels. Regulation of Wnt/ β -catenin, PKA/CREB, PI3K/Akt, and MAPKs signaling pathways reduces melanin synthesis through downregulation of MITF by phosphorylation and activation by Voglibose. In addition, it was confirmed that melanin contents increased when the treated with an ERK-specific inhibitor (PD98059) and an Akt-specific inhibitor (LY294002). However, it seems that additional confirmation is needed by increasing the expression of Tyrosinase in B16F10 melanoma cells induced with α -MSH of the alpha-glucosidase inhibitors.

Through human skin primary irritation test, Miglitol (125 μ M and 250 μ M) and Voglibose (50 μ M and 100 μ M) were tested for local use. Squalene was used as a negative control group, and the test substance was judged to be “non-irritating” in terms of its primary irritation potential to human skin.

Keywords : B16F10, Drug repurposing, Drug repositioning, α -glucosidase, Miglitol, Voglibose, Validamycin A, anti-melanogenesis, signal pathways

목 차

ABSTRACT	1
목 차	2
LIST OF FIGURES	5
LIST OF TABLES	7
I. 서 론	8
II. 재료 및 방법	
1. 시료 및 시약	17
2. 실험방법	
2.1. 세포 배양	19
2.2. 세포 생존율	20
2.3. 멜라닌 함량 측정	21
2.4. 세포 내 Tyrosinase activity 측정	22
2.5. Western blot Analysis	23
3. 인체피부 일차자극 시험	24
4. 통계처리	25

III. 결 과

1. B16F10 세포에서 멜라닌 생성에 대한 α -glucosidase inhibitor 화합물의 영향 평가	26
1.1. 세포 생존율 평가	26
1.2. Melanin contents	28
1.3. Tyrosinase activity 측정	30
2. B16F10 세포에서 Miglitol의 멜라닌 생성 영향 평가	32
2.1. Western blot	
1) 멜라닌 생성 효소 발현	32
2) MITF 발현량 측정	34
3) Wnt/ β -catenin 신호전달경로	36
4) PKA 신호전달경로	38
5) MAPKs 신호전달경로	40
3. B16F10 세포에서 Voglibose의 멜라닌 생성 영향 평가	42
3.1. Western blot	
1) 멜라닌 생성 효소 및 MITF 발현	42
2) Wnt/ β -catenin 신호전달경로	45
3) PKA 신호전달경로	47
4) PI3K/Akt 신호전달경로	49
5) MAPKs 신호전달경로	51

4. 메커니즘에 대한 특정 억제제의 효과	
4.1. Voglibose의 ERK 억제제에 대한 Melanin contents	53
4.2. Voglibose의 Akt 억제제에 대한 Melanin contents	55
5. 인체피부 일차자극 시험	
5.1. Miglitol의 인체피부 일차자극 시험	57
5.2. Voglibose의 인체피부 일차자극 시험	59
IV. 고 찰	61
V. 참고문헌	69

LIST OF FIGURES

Figure 1. Melanin production mechanism	12
Figure 2. Chemical reaction based melanin formation	12
Figure 3. The Chemical structure of (a) miglitol (b) voglibose (c) validamycin A	16
Figure 4. Evaluation of cell viability of alpha-glucosidase inhibitors in B16F10 melanoma cells.	27
Figure 5. Intracellular melanin contents in B16F10 melanoma cells induced with α -MSH of the alpha-glucosidase inhibitors.	29
Figure 6. Intracellular tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells induced with α -MSH of the alpha-glucosidase inhibitors.	31
Figure 7. Effects of miglitol on the expression of melanin synthesis-related enzymes in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	33
Figure 8. Effects of miglitol on the expression of MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	35
Figure 9. Effects of miglitol on the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	37
Figure 10. Effects of miglitol on the expression of PKA signaling pathways	

in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	39
Figure 11. Effects of miglitol on the expression of MAPKs signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	41
Figure 12. Effects of voglibose on the expression of melanin synthesis-related enzymes and MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells..	43
Figure 13. Effects of voglibose on the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	46
Figure 14. Effects of voglibose on the expression of PKA signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	48
Figure 15. Effects of voglibose on the expression of PI3K/Akt signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	50
Figure 16. Effects of voglibose on the expression of MAPKs signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	52
Figure 17. Effects of ERK inhibitor (PD98059) on cellular melanin contents in B16F10 melanoma cells.	54
Figure 18. Effects of AKT inhibitor (LY294002) on cellular melanin contents in B16F10 melanoma cells.	56
Figure 19. Regulation of miglitol melanogenesis signaling pathway.	67
Figure 20. Regulation of voglibose melanogenesis signaling pathway.	67

LIST OF TABLES

Table 1. Results of the primary human skin stimulation test for miglitol (n = 33).	58
Table 2. Results of the primary human skin stimulation test for voglibose (n = 33).	60

I. 서 론

인간의 피부와 머리카락의 색은 멜라노솜에서 생성되는 멜라닌의 함량과 화학적 조성과의 관련이 있다. [1-5] 피부 색소 침착은 멜라닌 합성과 표피층의 분포에 따라 달라진다. 멜라닌은 주로 멜라닌 세포의 핵 주위에서 생성되어 멜라노솜에 저장된다. [6,7] 성숙 후, 멜라노솜은 미세소관과 액틴 필라멘트를 따라 세포의 수송을 끝으로 이동하여 멜라닌을 각질세포로 전달한다. [8-10]

정상적인 생리적 상태에서 멜라닌은 자외선 손상으로부터 표피 세포 DNA를 보호하고 피부, 모발 및 눈 색깔을 결정하는 데 중요한 역할을 한다. 또한 피부 면역 반응을 조절할 수 있고 활성산소종, 세포 독소 및 기타 환경 요인으로부터 인간의 피부를 보호한다. [10,11] 그러나 과도한 생산과 축적은 반응성 산소종과 반응성 질소종이 생성되어 DNA 손상 표피 증식, 콜라겐 파괴, 염증 후 흑색피증, 기미 및 일광 흑색점과 같은 피부 발병을 일으킨다. 현재의 멜라닌의 과잉 생산은 병적 문제뿐만 아니라 미용상 문제로도 인식되고 있다. 따라서 멜라닌 산물 및 관련 신호 전달 경로의 조절은 비정상적인 멜라닌 침착을 예방하는데 중요한 부분이다. [12]

멜라닌 합성은 효소 및 화학반응을 포함하는 일련의 복잡한 과정으로 구성된다. TRP-1 (Tyrosinase-related protein-1) 및 TRP-2, Tyrosinase와 같은 Tyrosinase 계열 단백질은 멜라닌 생합성에 중요한 역할을 한다. 멜라닌 생성 억제를 위해 TRP-1 및 TRP-2, TYR의 하향 조절은 필수적이다. 따라서 티로시나제 및 관련 단백질 발현과 활성의 하향 조절이 멜라닌 생성 억제에 관여한다. [12-14]

멜라닌은 화학적 조성에 따라 두 가지 유형으로 분류할 수 있다. 멜라닌은 생합성 경로를 통해 생합성되어 페오멜라닌과 유멜라닌으로 알려진 두 가지 유형의 멜라닌을 형성한다. [13,15,16] 멜라닌 합성은 주요 효소인 티로시나아제에 의해

축매되어 기질로서 L-tyrosine으로부터 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)으로 전환되고 L-DOPA가 이후 tyrosinase에 의해 DOPA quinone으로 전환될 때 시작된다. L-tyrosine의 DOPA quinone으로의 전환은 멜라닌 생합성 및 그 이후를 결정하는 중요한 단계이다. [17,18] DOPA quinone은 DOPA chrome으로 변환하고 TRP-2, TRP-1의 효소에 의해 DHICA (dihydroxyindole-2-carboxylic acid) 및 DHI (dihydroxyindole)로 전환된다. 또한 DOPA chrome에서 변환되어 tyrosinase 효소에 의해 IQ (Indole-5,6-quinone)로 전환된다. 이러한 과정에 의해 피부의 갈색, 검정색을 띠는 유멜라닌이 생성된다. 한편, DOPA quinone은 glutathione 또는 cysteine에 의해 glutathionydopa 또는 cysteinylidopa로 전환될 수 있으며, 이들은 적황색의 페오멜라닌을 생성한다. [2,15,19-24]

멜라닌 합성은 티로신 키나제 수용체 KIT, 리간드 SCF 및 MITF를 포함한 많은 신호 시스템 및 전사 인자에 의해 시작되고 조절된다. [24-26] 유전적, 생화학적 및 약리학적 증거에 따르면 MC1R의 신호전달이 멜라닌 생성을 결정하는 주요 원인이라고 보고 되었다. [11,17,27]

자외선에 민감한 인간 표피 각질세포는 멜라닌 세포에서 α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone)을 포함하여 멜라닌 합성을 촉진하는 인자를 생성한다. 고리형 아데노신 모노포스페이트(cAMP) 의존경로를 통해 멜라닌 생성을 조절한다. 멜라노사이트의 막에서 수용체인 멜라노코르틴 수용체 1 (MC1R)에 결합할 때 호르몬은 아데닐산 사이클라제(AC)를 활성화하여 세포 내 cAMP를 생성한다. cAMP는 단백질 키나제 A (PKA)를 활성화한 다음, cAMP 반응효소 결합 단백질 (CREB)의 인산화로 MITF의 유전자 발현을 활성화한다. MITF는 멜라닌 생성 관련 효소를 효율적으로 활성화하고 멜라닌 생성을 자극한다. [16,28]

자극된 MC1R은 또 다른 멜라닌 생성 관련 신호인 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/ AKT 신호전달 경로를 활성화한다. 활성화된 PI3K는 세포막 인지질인 PIP₂로부터 PIP₃의 생성을 촉매한다. 이때 PIP₃로 인해 결합 단백질

serine/threonine kinase Akt (protein kinase B) 은 인산화되어 세포질로 이동한다. 따라서 PI3K/AKT 신호 경로의 활성화는 MITF의 발현을 억제한다. [29-36]

MITF의 유전자 발현을 표적으로 하는 또 다른 신호 경로인 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로이다. 이 신호전달 과정은 Wnt 리간드가 막 수용체 단백질인 Frizzled와 결합하여 상호작용한다. G-protein-coupled receptors에 결합하고 glycogen synthase kinase3 β (GSK3 β)는 인산화된다. GSK3 β (Ser 9) 의 비활성화는 cytoplasmic β -catenin의 축적을 유도하며, 이는 핵으로 전이되어 T-cell factor (TCF) 및 림프구 증강 인자-1 (LEF)와 복합체를 형성하여 β -catenin의 MITF 유전자 발현을 상향 조절한다. 따라서 Wnt 경로의 활성화는 MITF 활성을 상향 조절하여 멜라닌 생합성을 자극한다. 이와 대조적으로 Wnt 경로의 비활성화는 GSK3 β (Tyr 216)에 의해 순차적으로 인산화되고, 인산화된 β -catenin은 ubiquitin ligase complex에 의해 인식되어 β -catenin이 분해된다. [14,16,17,37-41]

또한 Stem cell factor (SCF)는 세포막의 c-kit에 결합하여 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 활성을 조절하여 멜라닌 생성 효소의 발현을 조절한다고 보고되었다. [42-45] MAPKs는 세포 활동의 다양성을 조절하는 serine/threonine 키나아제 계열이며 멜라닌 생성에 중요한 역할을 한다. [43-47] MAPKs는 세포의 반응성 키나제 (ERK), 스트레스 활성화 단백질 키나아제 (SAPK)로도 알려진 c-Jun N-terminal kinases (JNK) 및 p38이 있다. [42-47] p38 및 JNK MAPK의 인산화는 MITF 활성화를 안정화시켜 멜라닌 생성을 유발하는 것으로 나타났다. [47,48]

이에 반해 세포의 조절 키나아제 (ERK) 경로는 MITF 단백질의 분해를 통해 멜라닌 생성을 조절한다. c-Kit 자극에 의한 ERK 활성화가 ser73에서 MITF를 인산화하고 MITF ubiquitin-proteasome으로 이어지는 것으로 나타났다. [16,30,35,42] 따라서 ERK 경로의 활성화는 MITF 활성의 하향 조절로 인해 멜라닌 생성을 억제한다. [16,49-51]

멜라닌 생성의 속도를 제한하는 효소인 티로시나제를 조절하는 멜라닌 생성억제제 개발에 대한 관심이 많다. [4] 그러나 이러한 필수 구성요소는 피부 항상성과 정상적인 피부색을 유지하기 위한 생리학적 멜라닌 생성에도 관련되어 있으므로 이러한 분자를 표적으로 할 때는 잠재적 위험을 고려해야 한다. 현재 색소 과침착에 대한 멜라닌 생성억제제로 현재 Hydroquinone [52], Kojic acid [53-56], Arbutin [53,54,57,58] 등 기타 많은 천연 제품이 현재 상용화되어 화장품과 의약품에 사용되고 있다. [4] 코직산은 TYR 활성부위의 copper를 킬레이팅하여 tyrosine에서 DOPA, DOPA quinone으로의 전환을 저해하며 [59], 알부틴은 tyrosine과 경쟁적으로 저해하는 억제제이다. [56] 그러나 이러한 억제제는 세포독성이나 돌연변이 유발성과 같은 안전성 문제와 제형적 안정성으로 인해 제한적인 것으로 보인다. [4,56,60] 이러한 문제는 잠재적 위험과 부작용이 적은 보다 안전한 멜라닌 생성 방지제 개발이 필요하다는 것을 시사한다.

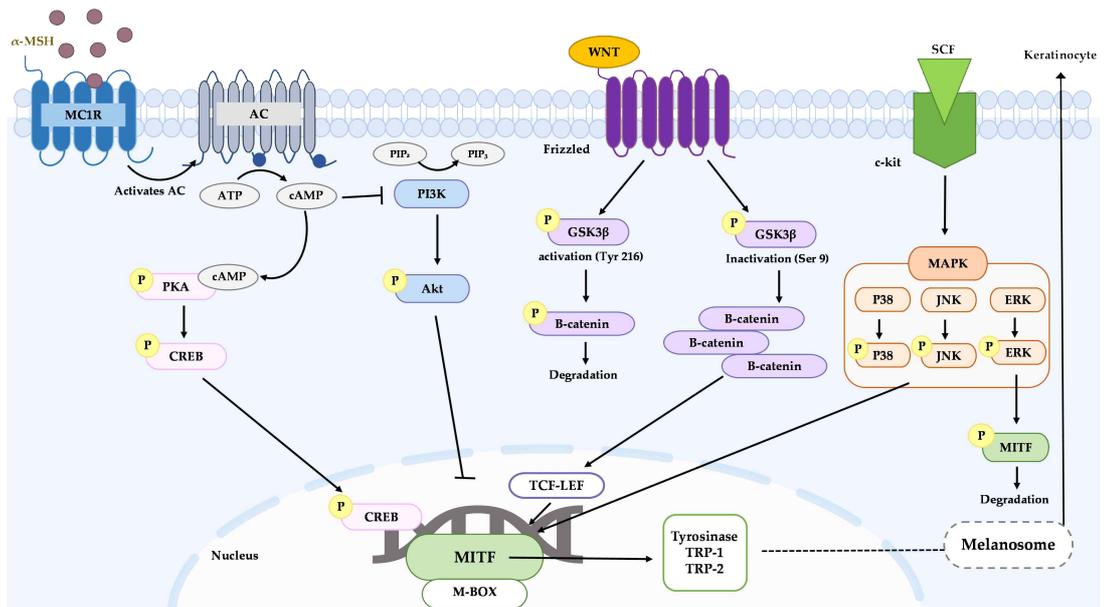


Figure 1. Melanin production mechanism

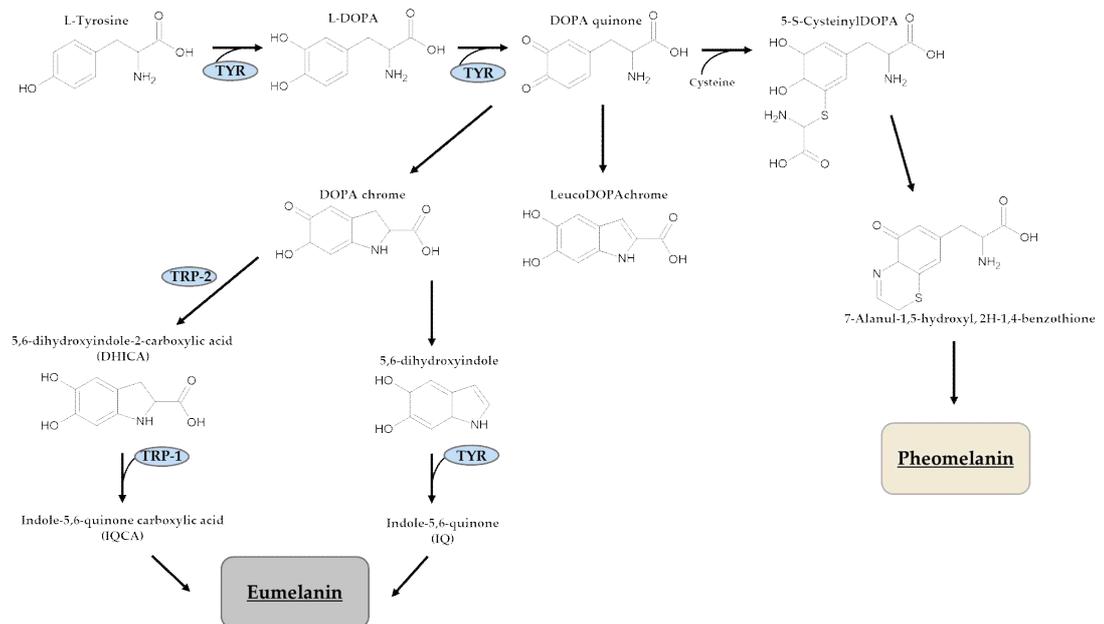


Figure 2. Chemical reaction based melanin formation

본래 특정 질병을 치료하기 위해 개발된 약물이 나중에 다른 질병의 치료제로 활용된 사례는 무수히 많다. 의약품 용도변경은 기존 의약품에 대한 새로운 적응성을 식별하는 과정으로 효과적이고 경제적인 접근방식으로 간주되며, 약물의 재발견(re-purposing), re-positioning이라고도 한다. 알려진 약물의 약 75%가 다양한 질병에 대해 용도변경 될 수 있는 것으로 보고되어있다. [61] 최근 문제가 되는 COVID-19와 같은 새로운 신종 감염의 잠재적인 치료제를 찾기 위해 엄청난 수의 임상시험은 진행되고 있지만 이런 대유행 가운데 수준 높은 증거를 확보해야 하는 문제를 가지고 있다. 또한 이를 비롯하여 모든 질병에 대한 신약 개발에는 시간이 걸리며, 제품으로 도입되기까지도 큰 비용과 시간이 소요된다. 그러한 점을 고려할 때 기존 약물을 조사하여 용도변경 하는 것이 효율적이다. [62,63] 첫째, 전임상 또는 1임상 연구에서 충분히 안전한 것으로 입증되었기 때문에 용도변경 약물의 독성은 새로 개발된 약물에 비해 최소화될 가능성이 크다. 따라서 안전성 평가, 용량 최적화 및 경로 결정과 같은 대부분의 내약성 연구는 우회하거나 최소화할 수 있다. 둘째, 확립된 대규모 생산 공정 및 품질 기준 또는 제조 공정 시험방법을 이용하여 재개발 투자를 줄일 수 있다는 장점이 있다. [64]

항 멜라닌에 관한 연구는 생약 추출물이나 약용 화합물로부터 신약을 생산하는 경우가 많으므로 개발 기간과 비용에 비해 실제 임상시험에 직접 적용하기는 어려울 것으로 판단된다. 신약 생산에 대한 상당한 관심과 투자에도 불구하고 일부는 전임상 또는 임상 단계에서 발생하는 효과나 부작용의 부족으로 인해 기존 적응증에 적절하게 사용되지 못하였다. 따라서 약물 재배치는 의약품 생산의 초기 단계에서 시작하는 것이 아니라 이미 승인된 의약품의 새로운 적응증을 재발견하는 새로운 접근방식으로 부상하고 있다. [65,66]

Miglitol은 nojirimycin (1-deoxynojirimycin 또는 N-OH-ethyl nojirimycin)에서 유래한 최초의 pseudo-monosaccharide α -glucosidase inhibitor이다. [67] Miglitol은 식후 고혈당을 억제하여 당뇨병 환자에게 일반적으로 처방된다. 특히 제 2형 당뇨병 치료에 사용되며 주요 작용 방식은 소장에서 α -glucosidase 효소를 억제한다. [68-72] Miglitol은 1996년에 당뇨병 치료제로 승인되었으며 이후 일본, 미국, 호주, 프랑스, 독일, 스페인, 스위스 등 여러 국가에서 판매되었을 뿐만 아니라 동물 및 인간 연구를 기반으로 Miglitol이 항비만 효과를 발휘한다는 연구가 보고되고 있다. [71-73] Miglitol은 5개의 하이드록실 그룹이 존재하는 항산화제 역할을 하는 분자의 중요한 구조적 특징을 가지고 있다. [71]

Voglibose는 Validamycin A의 부분 분해에 의해 생성된 Valiolamine의 N-치환된 유도체이다. [74-76] Voglibose는 Takeda Pharmaceutical CO., Ltd.에서 개발했으며 일본에서 가장 일반적으로 사용되는 경구용 당뇨병 치료제 중 하나이다. [74] 장내 이당류 분해효소인 α -glucosidase를 억제하여 장에서 포도당의 흡수를 지연시켜 식후 혈당을 감소시킨다. [74-76] 또한 지방간 질환 [77], 항비만 [78,79] 등의 약리학적 효능이 있다고 보고되고 있다.

Validamycin A은 *Streptomyces hygroscopicus* 5008의 발효로 인해 유래되었다. trehalose inhibitor이며 현재 작물보호제로 벼 잎마름병, 가검병 및 감퇴병 방제 등으로부터 보호하기 위한 항생제, 살충제와 살균제로 널리 사용되고 있다는 보고가 있으며, [80-83] 의약 분야에서는 당뇨병 치료제로 사용되고 있다. [83,84]

인간 질병에 대한 많은 억제제 및 활성제가 약물 용도변경을 통해 확인되었지만, 피부 질환, 특히 과색소침착은 여전히 효과적인 항 멜라닌 생성제의 개발에 관한 성공적인 사례를 확인하기 어려움이 있다. 또한 천연 또는 합성 기원의 많은 티로시나제 억제제가 확인되었지만, 임상 사용에 적합한 것은 거의 없었다. [65] 본 연구에서는 멜라닌 생성억제제에 대한 새로운 타겟으로 기존 의약품을 용도변경하여 부작용을 최소화할 수 있다고 시사하고 있다. Miglitol, Voglibose 및 Validamycin A는 α -glucosidase inhibitor로 사용되는 당뇨병 치료제이며 미백에

대하여 보고되었다. [29,84,85] 하지만 멜라닌 생성 억제에 관한 연구가 미흡한 실정으로 본 연구에서는 B16F10 세포에서 Miglitol, Voglibose 및 Validamycin A 의 멜라닌 생성 억제 효과와 신호전달경로에 미치는 영향을 조사해보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 Miglitol, Voglibose는 TCI (Tokyo, Japan)에서 구입하였으며, Validamycin A 은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포 배양을 위하여 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)과, penicillin/streptomycin (P/S) 을 구입하였으며, Merck Millipore (Burlington, MA, USA)에서 Fetal Bovine Serum (FBS)를 구입하였다.

세포 실험에는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 α -MSH (α -Melanocyte stimulating hormone), L-DOPA, Kojic acid, sodium hydroxide (NaOH), protease/phosphatase inhibitor cocktail 를 구입하였으며, Biosesang (Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 dimethyl sulfoxide (DMSO), phosphate buffered saline (PBS), enhanced chemiluminescence (ECL) kit, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, 10X Tris-Glycin (SDS) buffer 구입하였다. Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 BCA protein assay kit를 구입하여 실험에 사용되었다.

Western blot을 위해 사용된 Trans-blot turbo transfer pack, 10% Tween 20 은 Bio-rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였으며, BLUEstain Protein ladder, 11-245kDa은 Goldbio (Olivette, MO, USA)에서 구입하였다. β -Mercaptoethanol, 10X Tris-Glycine buffer (SDS), 20X TBS는 Biosesang (Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다. 1차 항체 MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, p-CREB은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였

고, β -actin, t-CREB, PKA, p-PKA, GSK-3 β , p-GSK-3 β , β -catenin, p- β -catenin, ERK, p-ERK, p38, p-p38, AKT, p-AKT, t-JNK, p-JNK와 anti-rabbit, anti-mouse인 2차항체는 Cell signaling technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

2. 실험방법

2.1. 세포배양

B16F10 mouse melanoma cell은 ATCC (The Global Bioresource Center, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포 배양은 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco BRL) 배지에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Merck Millipore) 및 1% penicillin streptomycin를 함유하여 100mm cell culture dish에 5% CO₂, 37℃의 조건에서 3일 간격으로 계대배양 하였다.

2.2. 세포 생존율

B16F10 세포에서 α -glycosidase inhibitor의 세포에 독성을 나타내지 않는 농도를 조사하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. B16F10 세포 (1.5×10^4 cells/well)를 24-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 시료를 세포에 농도별로 처리한 후 72시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 모두 제거하고 well 당 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액이 0.5 mg/mL 되도록 넣고 4시간 반응시켰다. 이때 형성된 비수용성 formazan crystals를 DMSO에 녹여 Spectrophotometric microplate reader을 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

B16F10 세포에서 α -glycosidase inhibitor 자체의 세포 독성을 나타내지 않는 농도를 조사하기 위해 MTT assay를 수행하였다. B16F10 세포 (1.0×10^5 cells/well)를 24-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 시료를 세포에 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 모두 제거하고 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

2.3. 멜라닌 함량 측정

B16F10 세포에서 세포 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 멜라닌 함량을 측정하였다. B16F10 세포 (8.0×10^4 cells/dish)를 60mm cell culture dish에 분주하고 24시간 배양하였다. 시료를 세포에 농도별로 전처리하였고, 양성대조군으로 Kojic acid (500 μ M)을 사용하였다. 이후 α -MSH (100 nM)를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 제거한 다음, 차가운 1 \times PBS로 2회 세척하고 1% Protease inhibitor cocktail을 함유하는 RIPA buffer를 넣어 4 $^{\circ}$ C, 20분 동안 Lysis 하였다. Cell scraper를 이용하여 cell을 모은 후 1.5 mL e-tube에 옮긴다. -8 $^{\circ}$ C, 1,500 rpm, 20 min 조건에서 원심분리하여 pellet을 얻어내었다. 얻어낸 pellet을 10% DMSO가 포함된 1N NaOH로 80 $^{\circ}$ C, 10 min간 용해시킨 후 96-well plate에 100 μ L 씩 넣어 Spectrophotometric microplate reader을 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 세포 내 Tyrosinase activity 측정

B16F10 세포 (8.0×10^4 cells/dish)를 60mm plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 시료를 세포에 농도별로 전처리하였고, 양성대조군으로 Kojic acid (500 μ M)을 사용하였다. 이후 α -MSH (100 nM) 를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거한 다음, 차가운 $1\times$ PBS로 2회 세척하고 1% Protease inhibitor cocktail을 함유하는 RIPA buffer에 4 $^{\circ}$ C, 20분 동안 Lysis 하였다. Cell scraper를 이용하여 cell을 모은 후 1.5 mL e-tube에 옮겼으며, 멜라닌 함량측정과 동일한 조건으로 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 얻어낸 상층액은 BCA 정량 kit (Thermo Fisher Scientific, Walham, MA, USA)를 사용하여 단백질 정량하였다. 96-well plate 각 well에 동일한 양의 단백질 (20 μ g/mL) 20 μ L와 L-DOPA (2 mg/mL) 80 μ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 Spectrophotometric microplate reader을 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Western blot Analysis

B16F10 세포 (8.0×10^4 cells/dish)를 60mm plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 각 단백질 발현 시간에 따라 시료를 세포에 농도별로 전처리하였고 이후 α -MSH (100 nM) 를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 차가운 $1\times$ PBS buffer로 2회 세척하여 1% Protease inhibitor cocktail을 함유하는 RIPA buffer에 완전히 용해했다. Cell scraper를 이용하여 cell을 모은 후 1.5 mL e-tube에 옮겨 용해물은 -8°C , 1,500 rpm, 20분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 얻어낸 상층액은 BCA assay kit를 사용하여 단백질 정량 ($30 \mu\text{g/mL}$) 하였다. Loading sample과 $2\times$ Laemmli sample buffer를 1:1 비율로 혼합하여 100°C , 5 min 간 heat 한 후 식혀 사용하였다. 제조한 Loading sample은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel로 loading 함으로써 단백질을 크기별로 전기영동하였다. 이때 BLUEstain Protein ladder, 11-245 kDa은 Goldbio (Olivette, MO, USA) 를 marker로 사용하였다. 크기별로 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transfer하고 5% skim milk (in $1\times$ TBS-T(Tris-Buffered Saline with 1% Tween 20))로 2시간 blocking 한 뒤 $1\times$ TBS-T buffer로 10분간 총 6회 세척하였다. 1:1000 비율의 1차 항체로 4°C , overnight shacking 하였다. 그런 다음 $1\times$ TBS-T buffer로 10분간 총 6회 세척하고 1:2000 비율의 2차 항체를 사용하여 25°C , 2시간 반응시켰다. $1\times$ TBS-T buffer로 이전과 동일한 방법으로 총 6회 세척 한 후 ECL kit를 사용하여 특정 단백질을 발현시키고 Chemidoc (WL. VILBER LOURMAT, France)으로 현상하였다. 현상한 단백질은 image J 프로그램을 사용하여 정량하였다.

3. 인체피부 일차자극 시험

피부질환이 없는 건강한 20세에서 60세 사이의 33명의 여성 피험자가 이 연구에 포함되었다. 시험자의 연령은 21세에서 54세 사이였으며 평균 연령은 43.58 ± 9.29 세였다. 시험물질은 스쿠알렌으로 희석하여 제조하였으며, 이때 사용된 용매를 음성대조군으로 하였다. 시험물질을 20 μ L을 시험부위에 24시간 동안 철폐하고, 제거 후 20분 후 1차 평가, 24시간 후 2차 평가를 시행하였다. 1차 피부 자극 반응은 식품의약품안전처(MFDS), 미국화장품협회(PCPC) 지침에 따라 평가되었습니다. 각 시험 물질의 반응 결과는 아래의 식에 따라 계산하였다. 본 연구는 (주)더마프로 산업검토위원회(IRB)의 승인받았으며, 각 피시험자의 서면 동의서를 받아 진행하였다. (IRB 번호 : 1-220777- A-N-01-DICN22080).

$$Response = \frac{\sum(Grade \times No. of Responders)}{4(Maximum Grade) \times n(Total_{ject})}$$

4. 통계처리

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

Ⅲ. 결 과

1. B16F10 세포에서 멜라닌 생성에 대한 α -glucosidase inhibitor 화합물의 영향 평가

1.1. 세포 생존율 평가

B16F10 세포에서 α -glucosidase inhibitor 화합물이 세포 생존에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. [86,87] α -glucosidase inhibitor 화합물은 다양한 농도에서 실험이 진행되었으며 (a) Miglitol (31.25 μ M to 1,000 μ M) (b) Voglibose (12.5 μ M to 400 μ M) (c) Validamycin A (125 μ M to 4,000 μ M)을 각각 처리하여 24시간과 72시간 동안 배양하였다. 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 기준은 미처리 세포 대조군 대비 90% 이상의 생존율을 갖는 것으로 72시간 배양 시 Miglitol은 250 μ M 이하의 농도에서 Voglibose는 200 μ M 이하, Validamycin A는 1,000 μ M 이하의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았으나, 시료 자체의 독성을 확인하기 위해 24시간 배양 시 Miglitol은 동일한 농도에서 Voglibose는 100 μ M 이하, Validamycin A는 250 μ M 이하에서 세포 독성이 나타나지 않았다. 따라서 이후 실험에서 Miglitol은 250 μ M 이하의 농도에서 Voglibose는 100 μ M 이하의 농도에서 Validamycin A는 250 μ M 이하의 농도에서 실험을 진행하였다(Fig. 4).

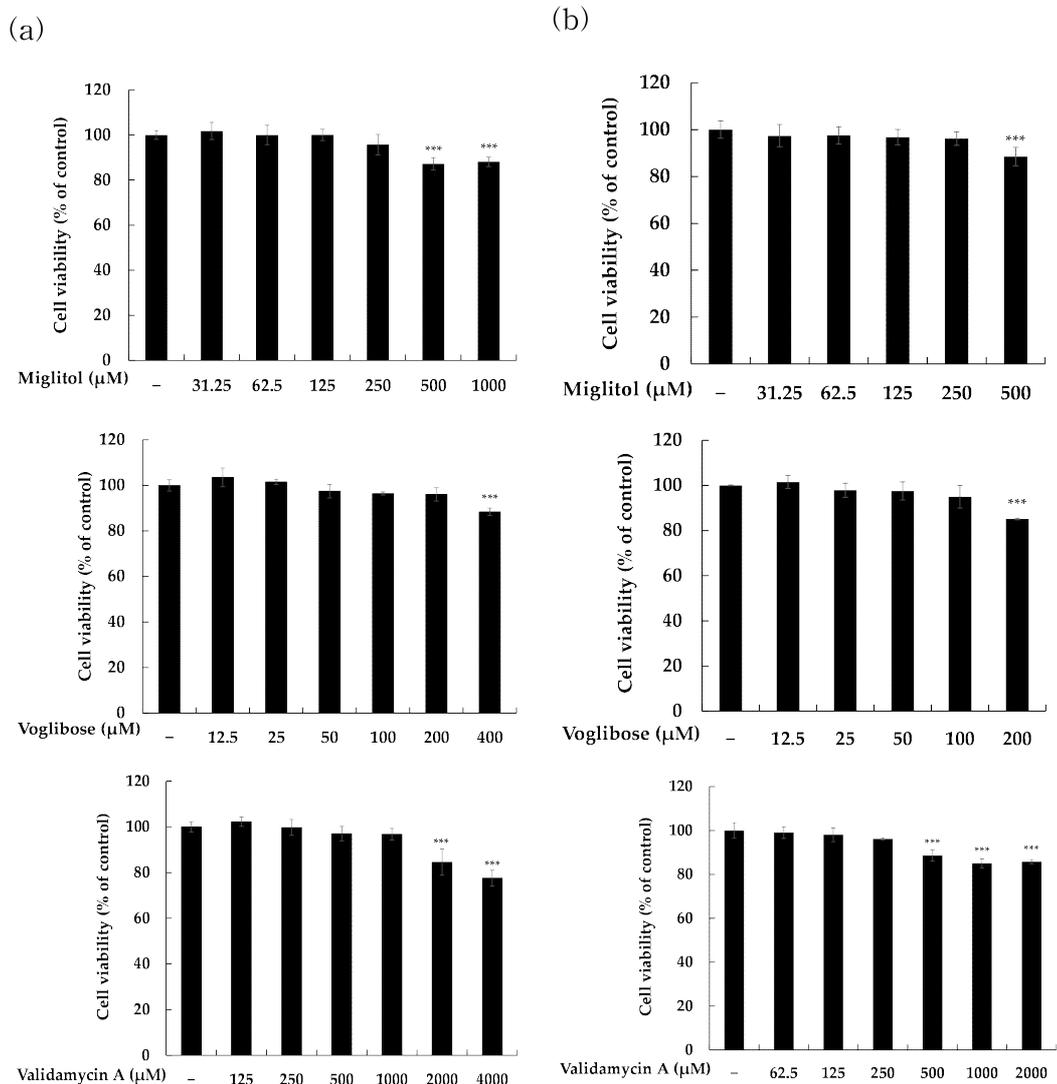


Figure 4. Evaluation of cell viability of alpha-glucosidase inhibitors in B16F10 melanoma cells. Cell viability of Miglitol (concentration within 1,000 μM), Voglibose (concentration within 400 μM), Validamycin A (concentration within 4,000 μM) was investigated by MTT assay. The cells were plated at (a) 1.5×10^4 cells/well, (b) 1.0×10^5 cells/well in 24-well plates for 24h, and each sample was treated at various concentrations for 72h/24h. Cell viability was expressed as percentages relative to untreated cells. Each bar represented as presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments ($n=3$). *** $p < 0.001$ vs un-treated control. (a) is the left graphs, (b) is the right graphs.

1.2. Melanin contents

B16F10 세포에서 α -glucosidase inhibitor 화합물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Melanin contents를 진행하였다. 세포 독성이 나타나지 않는 범위의 (a) Miglitol (62.5, 125 and 250 μ M) (b) Voglibose (25, 50 and 100 μ M) (c) Validamycin A (62.5, 125 and 250 μ M) 농도로 처리하였으며 α -MSH (100 nM)와 Kojic acid (500 μ M)은 각각 음성대조군과 양성대조군으로 사용되었다. 그 결과, 멜라닌 함량은 음성대조군과 비교하였을 때 Miglitol은 최고농도인 250 μ M에서 33.96%, Voglibose는 최고농도인 100 μ M에서 34.28% 멜라닌 생성이 억제되었음을 확인하였지만, Validamycin A는 활성을 보이지 않았다(Fig. 5).

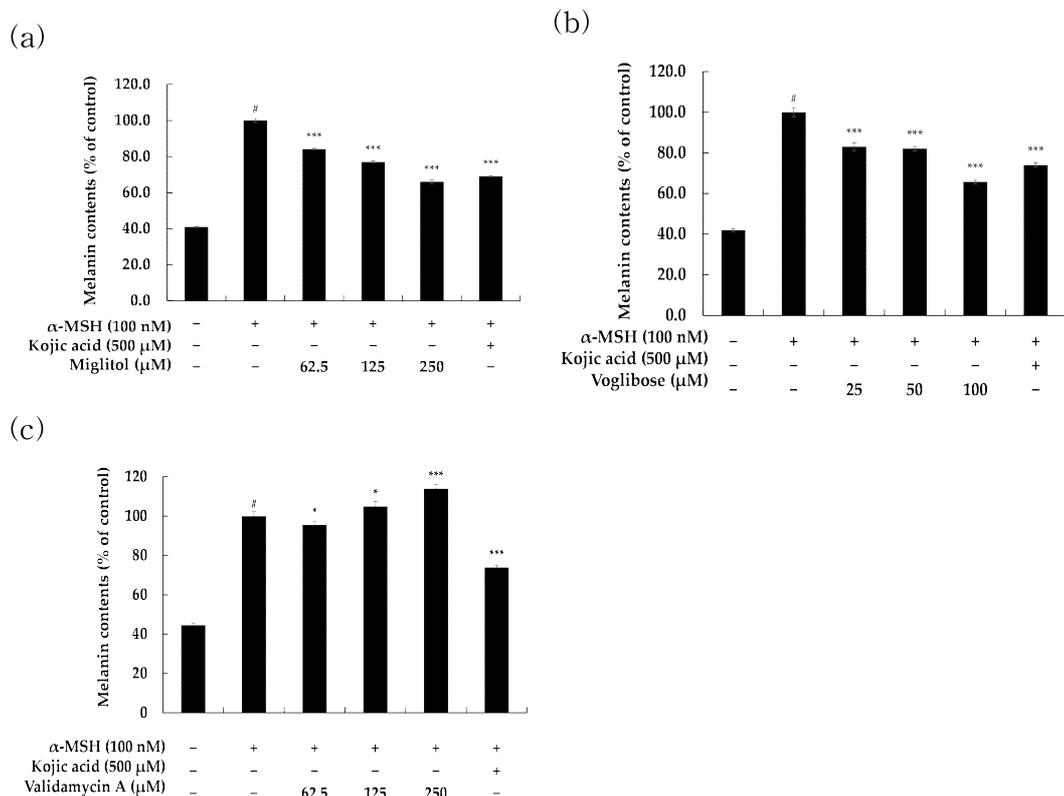


Figure 5. Intracellular melanin contents in B16F10 melanoma cells induced with α-MSH of the alpha-glucosidase inhibitors. The cells were plated in 60mm cell culture dish (8.0×10^4 cells/dish) and incubated for 24h, followed by (a) Miglitol (62.5, 125 and 250 μM), (b) Voglibose (25, 50 and 100 μM) (c) Validamycin A (62.5, 125 and 250 μM) was pre-treated for 1hr before, and then treated with α-MSH (100 nM) for 72h. The cells were then harvested and assay. α-MSH was used as the negative control and Kojic acid (500 μM) was used as the positive control. Melanin content Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments (n=3). # $p < 0.001$ compared to un-treated group, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs α-MSH only group.

1.3. Tyrosinase activity 측정

B16F10 세포에서 α -glucosidase inhibitor 화합물이 Tyrosinase 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Tyrosinase activity를 진행하였다. 세포 독성이 나타나지 않는 범위의 (a) Miglitol (62.5, 125 and 250 μ M) (b) Voglibose (25, 50 and 100 μ M) (c) Validamycin A (62.5, 125 and 250 μ M) 농도로 처리하였으며 α -MSH (100 nM)와 Tyrosinase 활성은 음성대조군과 비교하였을 때 Miglitol은 고농도인 250 μ M에서 13.60%, Voglibose는 고농도인 100 μ M에서 10.18% 감소함을 확인하였다. 하지만 Validamycin A는 Tyrosinase 활성이 저해됨을 확인하지 못하였다(Fig. 6). 따라서 이후 실험은 Miglitol, Voglibose의 추가 실험을 진행하였다.

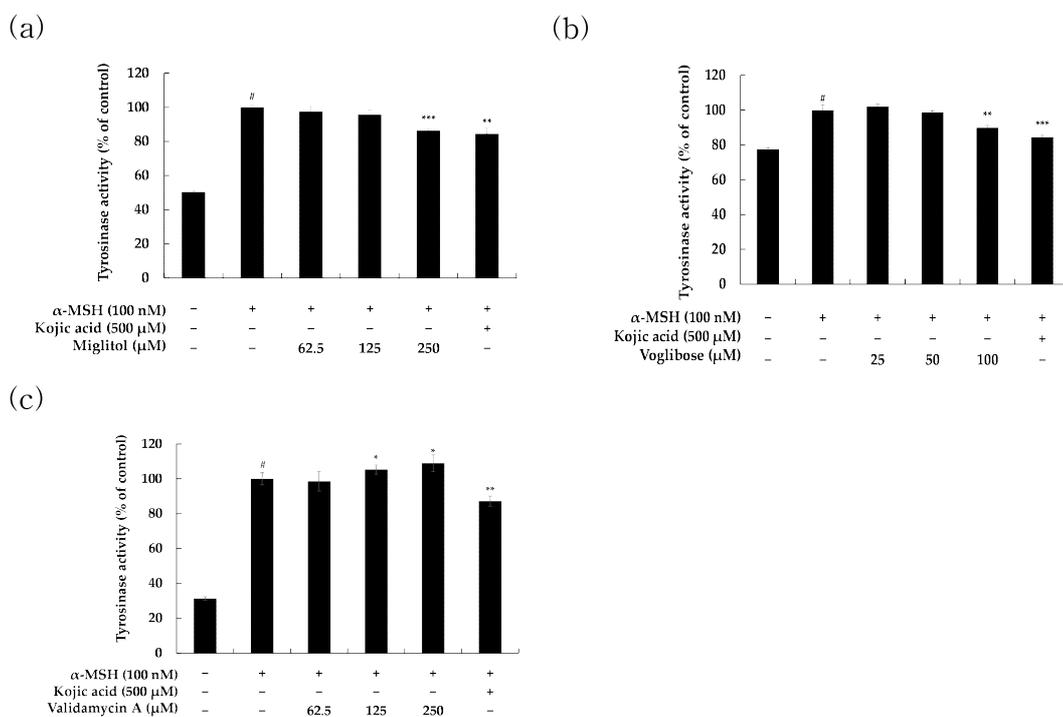


Figure 6. Intracellular tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells induced with α -MSH of the alpha-glucosidase inhibitors. The cells were plated in 60mm cell culture dish (8.0×10^4 cells/dish) and incubated for 24h, followed by (a) Miglitol (62.5, 125 and 250 μ M), (b) Voglibose (25, 50 and 100 μ M), (c) Validamycin A (62.5, 125 and 250 μ M) was pre-treated for 1hr before, and then treated with α -MSH (100 nM) for 72h. The cells were then harvested and assay. α -MSH was used as the negative control and Kojic acid (500 μ M) was used as the positive control. Tyrosinase activity Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments (n=3). # $p < 0.001$ compared to un-treated group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH only group.

2. B16F10 세포에서 Miglitol의 멜라닌 생성 영향 평가

2.1. Western blot

1) 멜라닌 생성 효소 발현

B16F10 세포에서 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현 수준에 영향을 미치는 Miglitol의 영향을 미치는 여부를 확인하기 위해 이러한 단백질을 Western blot을 진행하여 조사하였다. 그 결과 α -MSH로 자극된 B16F10 세포의 TYR, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현 수준은 α -MSH를 처리한 음성대조군과 비교하여 Miglitol의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 7). 특히 고농도인 250 μ M에서 TYR을 약 41.91%, TRP-1을 약 66.15%, TRP-2를 약 29.32% 감소시켰다. 따라서 멜라닌 생성에 대한 Miglitol의 억제 활성이 TYR, TRP-1, TRP-2의 단백질의 하향 조절과 관련이 있음을 나타내었다.

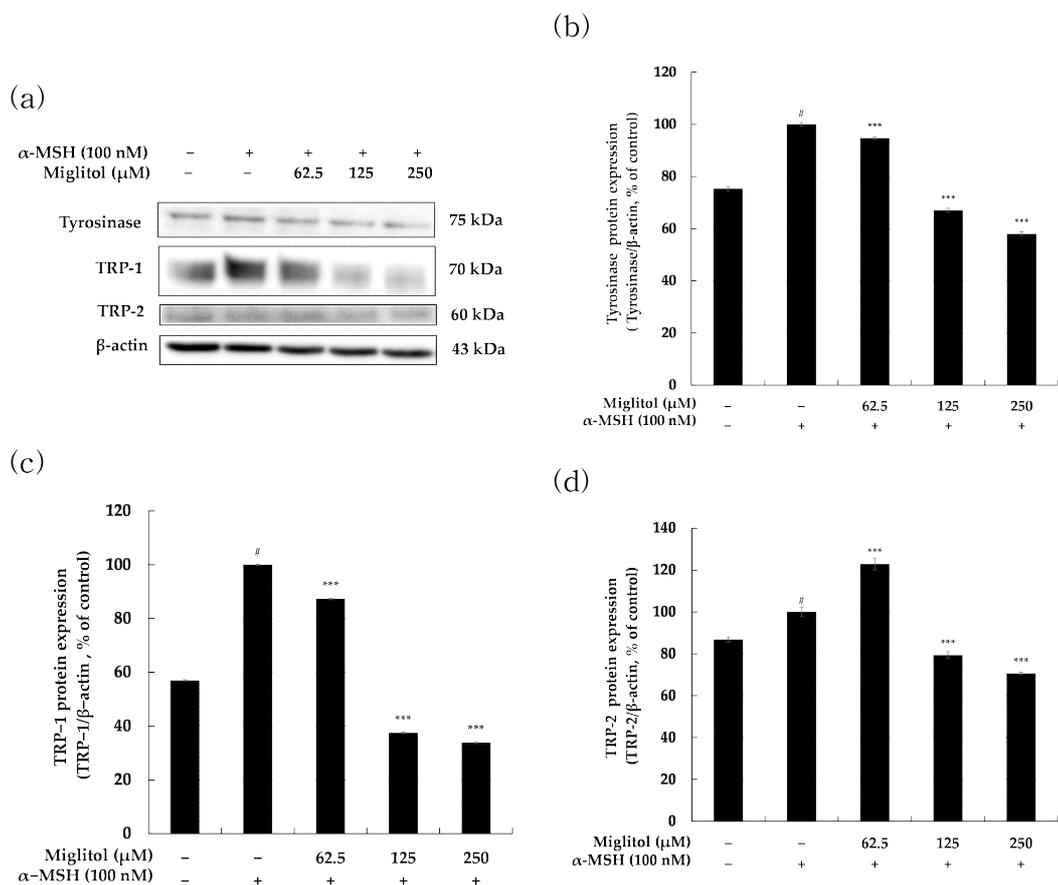


Figure 7. Effects of miglitol on the expression of melanin synthesis-related enzymes in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Miglitol (62.5, 125 and 250 μ M) on the expression levels of TYR, TRP-1 and TRP-2 in B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 48h. (b),(c),(d) The expression of TYR, TRP-1, TRP-2 was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs un-treated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

2) MITF 발현량 측정

멜라닌 생성 조절인자 MITF는 M-box에 결합하여 TYR, TRP-1, TRP-2 promoter와 같은 멜라닌 생성 핵심 단백질의 발현을 조절하는 중요한 인자이다. [12,13,26] 따라서 B16F10 세포에서 Miglitol이 MITF에 미치는 영향을 조사하기 위해 실험을 진행하였다. 그 결과, α -MSH로 자극된 음성대조군과 비교하였을 때 Miglitol은 MITF의 발현량을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있으며, 특히 고농도인 250 μ M에서 약 29.06% 감소하였다(Fig. 8). 따라서 멜라닌 생성 조절인자인 MITF를 하향조절하여 TYR, TRP-1, TRP-2의 발현을 감소시키는 것을 알 수 있다.

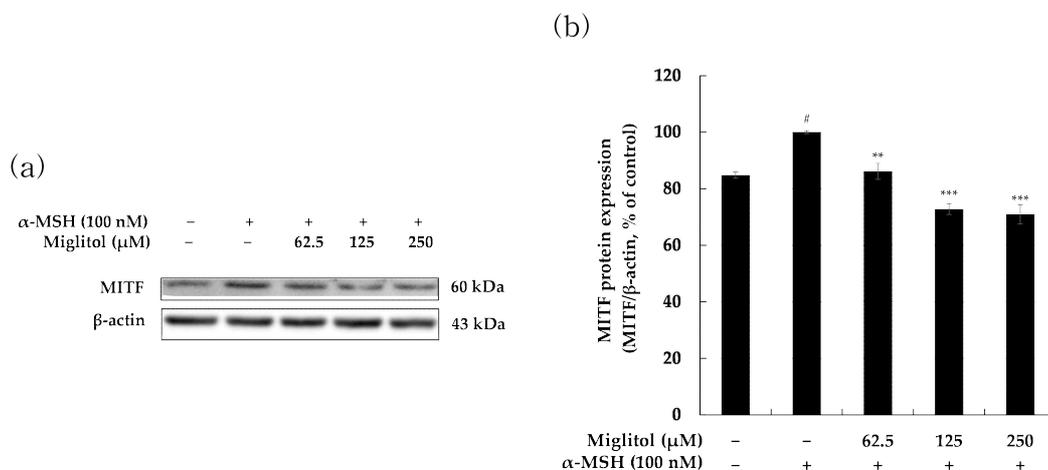


Figure 8. Effects of miglitol on the expression of MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Miglitol (62.5, 125 and 250 μ M) on the expression levels of MITF in B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 48h. (b) The expression of MITF was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs un-treated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

3) Wnt/ β -catenin 신호전달경로

Wnt/ β -catenin 경로에서 Wnt 리간드가 막 수용체 단백질인 Fizzled와 결합하여 상호작용한다. GSK3 β 는 Ser 9에서 인산화를 통해 β -catenin의 축적을 유도하며, 이는 핵으로 전이되어 TCF-LEF와 복합체를 형성하여 β -catenin의 MITF 유전자 발현을 상향 조절한다. Wnt 신호의 비활성화에서는 GSK3 β (Tyr 216)에 의해 순차적으로 인산화되고, 인산화된 β -catenin은 ubiquitin-proteasome에 의해 분해된다. [37-39] 따라서 B16F10 세포에서 Miglitol이 Wnt/ β -catenin 신호전달 경로를 통해 Miglitol이 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 실험 결과, Miglitol의 농도가 증가함에 따라 p-GSK3 β 와 β -catenin의 발현량을 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 β -catenin 과 p-GSK3 β 는 α -MSH를 처리한 음성대조군과 비교하여 고농도인 250 μ M에서 각 57.64%, 50.32% 활성을 감소시키는 것을 확인하였다. 반면에 p- β -catenin의 발현은 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. p- β -catenin은 음성대조군과 비교하였을 때 고농도에서 약 51.71% 증가하였다(Fig. 9). 이를 통해 Miglitol이 Wnt/ β -catenin 신호전달 경로를 통해 MITF의 발현을 억제하고, 멜라닌 생성에 관여하는 것을 알 수 있다.

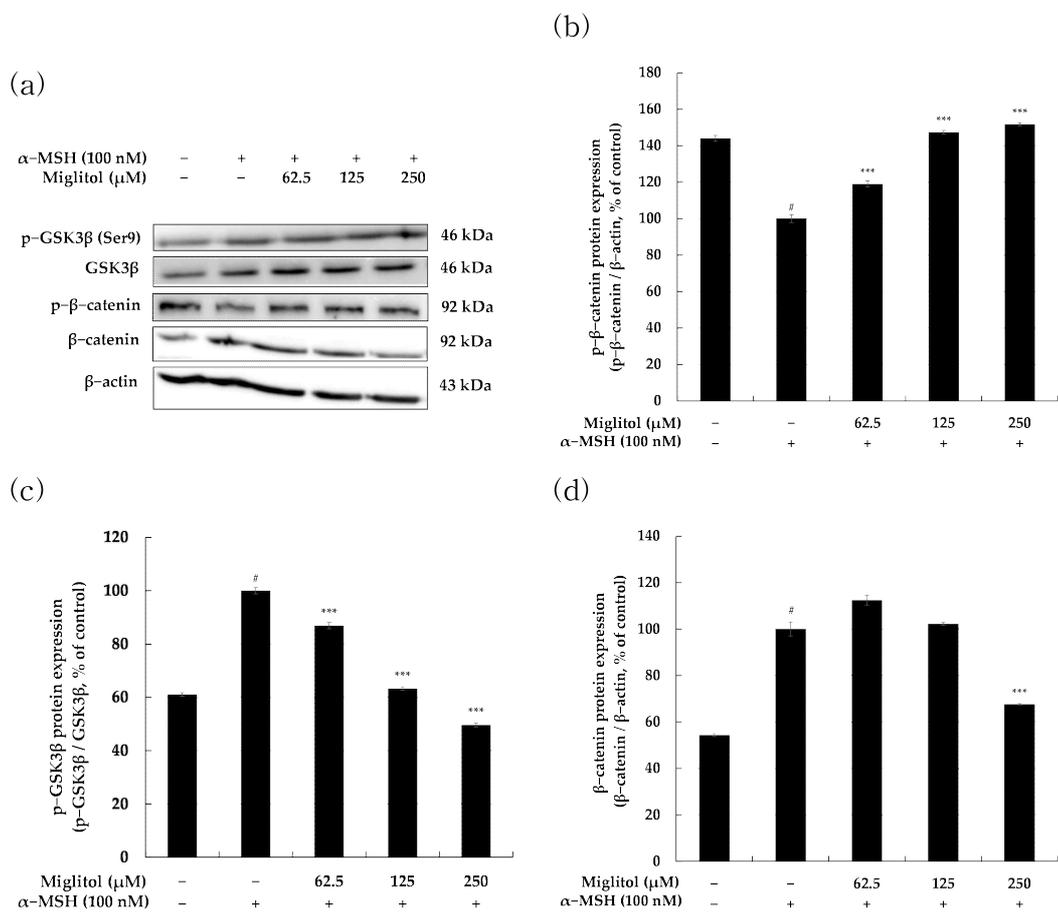


Figure 9. Effects of miglitol on the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Miglitol (62.5, 125 and 250 μ M) on the expression levels of GSK3 β , p- β -catenin, β -catenin B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 24h. (b),(c),(d) The expression of p- β -catenin, p-GSK3 β /GSK3 β and β -catenin was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] p < 0.001 vs un-treated control group. ^{***} p < 0.001 vs α -MSH alone group.

4) PKA 신호전달경로

α -MSH의 자극을 받은 MC1R은 AC를 활성화시키고, 세포 내 cAMP를 증가시킨다. cAMP에 의해 PKA가 인산화되고, 핵 안으로 이동하여 CREB의 인산화를 통해 MITF 전사를 활성화하는 것으로 밝혀졌다. [16,28] 따라서 B16F10 세포에서 Miglitol이 PKA 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 감소시키는지 조사하기 위해 Western blot 실험을 진행하였다. 그 결과, Miglitol은 PKA의 인산화를 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 α -MSH로 유도된 음성대조군과 비교하였을 때 고농도인 250 μ M에서 약 54.13% 감소하였다(Fig. 10). 이를 통해 Miglitol이 PKA의 인산화를 감소시켜 MITF의 발현을 억제하고, 멜라닌 생성을 감소시키는 것을 알 수 있다.

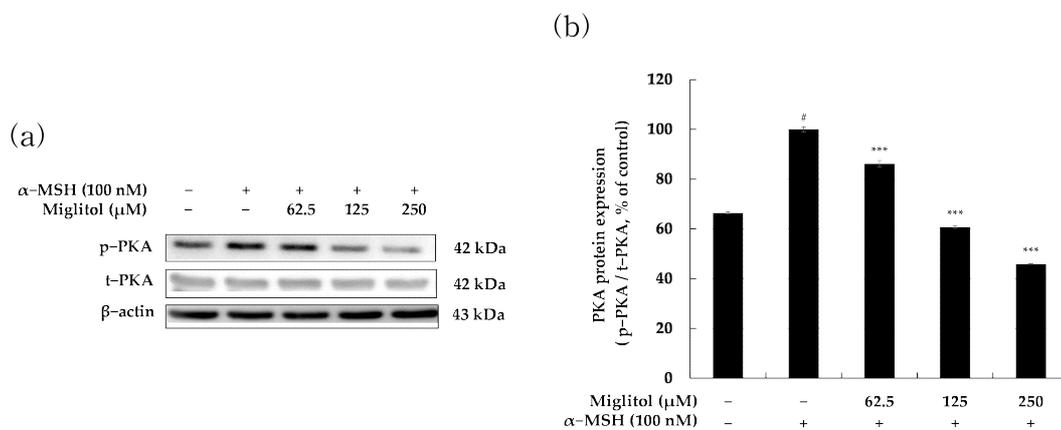


Figure 10. Effects of miglitol on the expression of PKA signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Miglitol (62.5, 125 and 250 μ M) on the expression levels of PKA in B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 24h. (b) The expression of p-pka/t-pka was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs un-treated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

5) MAPKs 신호전달경로

MAPKs 신호전달경로 중 ERK의 활성화는 MITF 발현의 하향 조절로 인해 멜라닌 생성을 억제한다. 또한 JNK 및 p38의 분해를 통해 멜라닌 생성을 조절한다. [42-48] B16F10 세포에서 Miglitol이 MAPK 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 MAPK 인산화를 조사하였다. 실험 결과 Miglitol은 농도 의존적으로 ERK의 인산화를 유의하게 증가시키고 p38은 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 α -MSH 처리한 음성대조군과 비교하여 p-ERK는 고농도인 250 μ M에서 약 80.21% 증가하였고, p-p38은 약 46.01% 감소하였다 (Fig. 11). 따라서 Miglitol은 B16F10 세포에서 ERK 및 p38 신호 전달 경로를 통해 MITF 발현을 감소시켜 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 확인하였다.

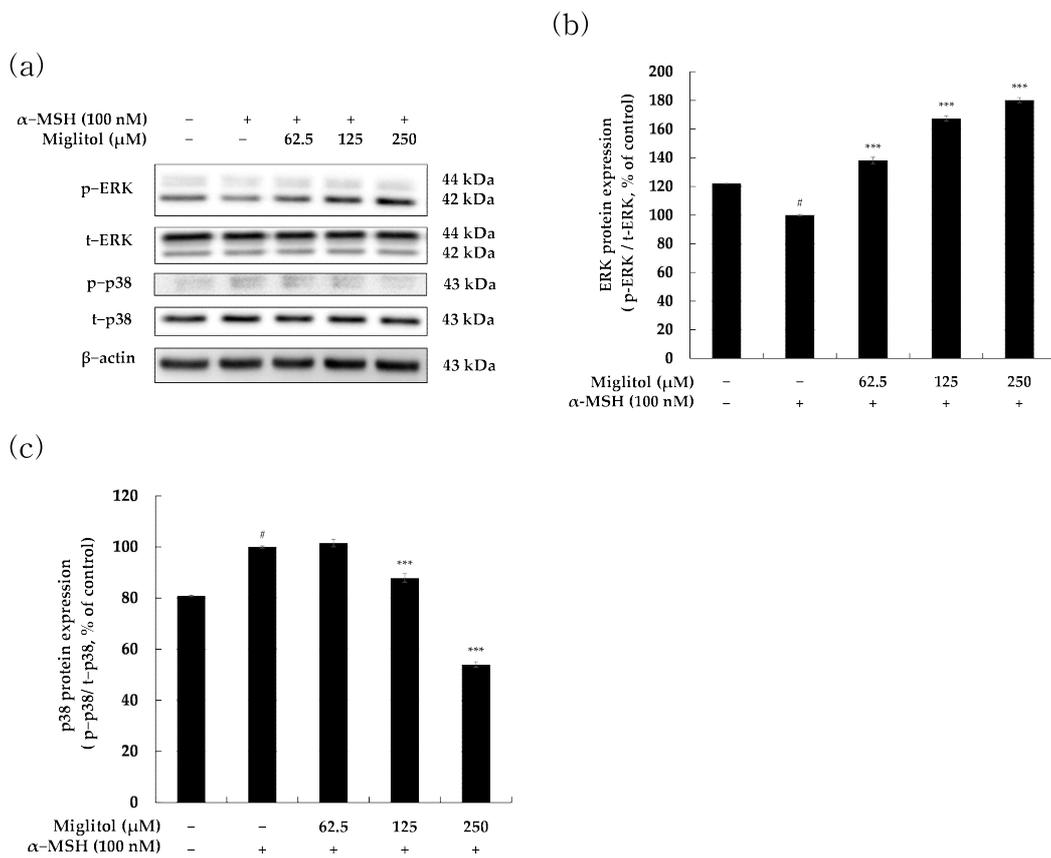


Figure 11. Effects of miglitol on the expression of MAPKs signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Miglitol (62.5, 125 and 250 μ M) on the expression levels of MAPKs in B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 3h. (b),(c) The expression of p-ERK/t-ERK, p-p38/t-p38 was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs un-treated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

3. B16F10 세포에서 Voglibose의 멜라닌 생성 영향 평가

3.1. Western blot

1) 멜라닌 생성 효소 및 MITF 발현

멜라닌 생성 조절 인자 MITF는 TYR, TRP-1, TRP-2 promoter와 같은 멜라닌 생성 핵심 단백질의 발현을 조절하는 중요한 인자이다. 이러한 단백질 발현과 활성의 하향 조절이 멜라닌 생성 억제에 관여한다. [12,13,26] 따라서 B16F10 세포에서 Voglibose의 이러한 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현에 영향을 주는지 알아보기 위해 Western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH로 자극된 음성대조군과 대비하여 Voglibose 농도가 증가함에 따라 MITF 발현량을 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 음성대조군과 비교하였을 때 고농도에서 약 12.46% 감소시켰다. 또한 TRP-1, TRP-2의 발현을 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 고농도인 100 μ M에서 TRP-1을 약 22.46%, TRP-2를 약 24.08% 감소시켰다. 하지만 TYR 발현은 증가한 것으로 보아 TYR에서 활성을 나타내지 않는 것으로 보인다(Fig. 12).

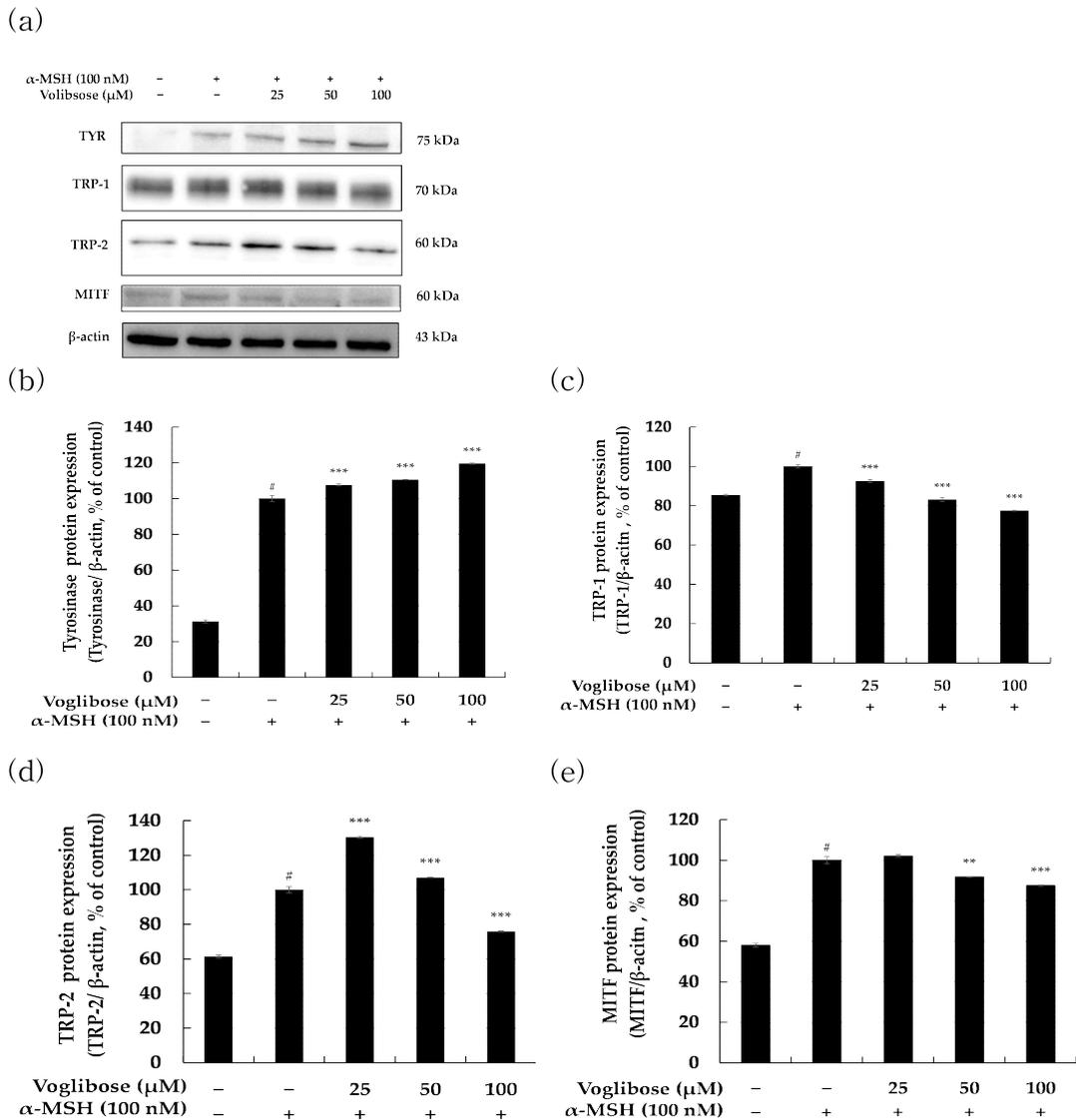


Figure 12. Effects of voglibose on the expression of melanin synthesis-related enzymes and MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Voglibose (25, 50 and 100 μ M) on the expression levels of TYR, TRP-1, TRP-2 and MITF in B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 48h. (b),(c),(d),(e) The expression of Melanin synthesis-related enzymes and MITF was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are

expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs α -MSH alone group.

2) Wnt/ β -catenin 신호전달경로

Wnt/ β -catenin 경로에서 Wnt 리간드가 막 수용체 단백질인 Fizzled와 결합하여 상호작용한다. GSK3 β 는 Ser 9에서 인산화를 통해 β -catenin의 축적을 유도하며, 이는 핵으로 전이되어 TCF-LEF와 복합체를 형성하여 β -catenin의 MITF 유전자 발현을 상향 조절한다. [40,41] Wnt 신호의 비활성화에서는 GSK3 β (Tyr 216)에 의해 순차적으로 인산화되고, 인산화된 β -catenin은 ubiquitin-proteasome에 의해 분해된다. [37-39] 따라서 B16F10 세포에서 Voglibose의 Wnt/ β -catenin 신호전달경로를 통해 Voglibose의 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 그 결과, 농도가 증가함에 따라 p-GSK3 β 와 β -catenin의 발현량을 감소시키는 것을 확인하였으며, α -MSH를 처리한 음성대조군과 비교하여 고농도인 100 μ M에서 각각 약 25.52%, 63.60% 활성을 감소시키는 것을 확인하였다. 반면에 p- β -catenin의 발현은 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. p- β -catenin은 음성대조군과 비교하였을 때 고농도에서 약 88.27% 증가하였다(Fig. 13). 이를 통해 Voglibose가 Wnt/ β -catenin 신호전달경로를 통해 MITF의 발현을 억제하고, 멜라닌 생성을 감소시키는 것을 알 수 있다.

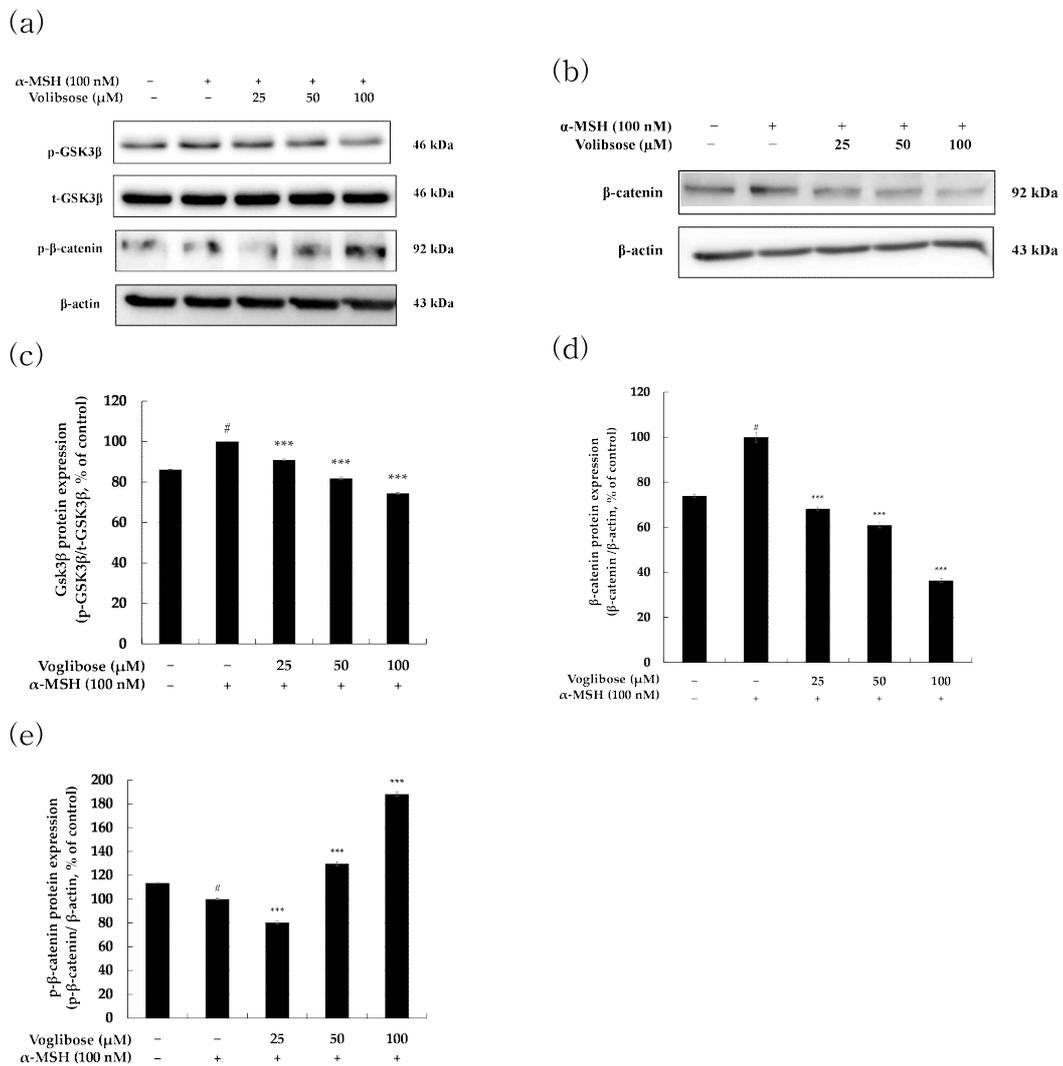


Figure 13. Effects of voglibose on the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a),(b) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Voglibose (25, 50 and 100 μ M) on the expression levels of GSK3 β , β -catenin, p- β -catenin B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 24h. (c),(d),(e) The expression of p-GSK3 β /t-GSK3 β , β -catenin and p- β -catenin was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs un-treated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

3) PKA 신호전달경로

α -MSH의 자극을 받은 MC1R은 AC를 활성화시키고, 세포 내 cAMP를 증가시킨다. cAMP에 의해 PKA가 인산화되고, 핵 안으로 이동하여 CREB의 인산화를 통해 MITF 전사를 활성화시키는 것으로 밝혀졌다. [16,28] 따라서 B16F10 세포에서 Voglibose가 PKA 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 감소시키는지 조사하기 위해 Western blot 실험을 진행하였다. 그 결과, Voglibose는 PKA, CREB의 인산화를 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 α -MSH로 유도된 음성대조군과 비교하였을 때 p-PKA와 p-CREB은 고농도인 100 μ M에서 각각 약 43.94%, 51.65% 감소하였다(Fig. 14). 이를 통해 Miglitol이 PKA, CREB의 인산화를 감소시켜 MITF의 발현을 억제하고, 멜라닌 생성을 감소시키는 것을 알 수 있다.

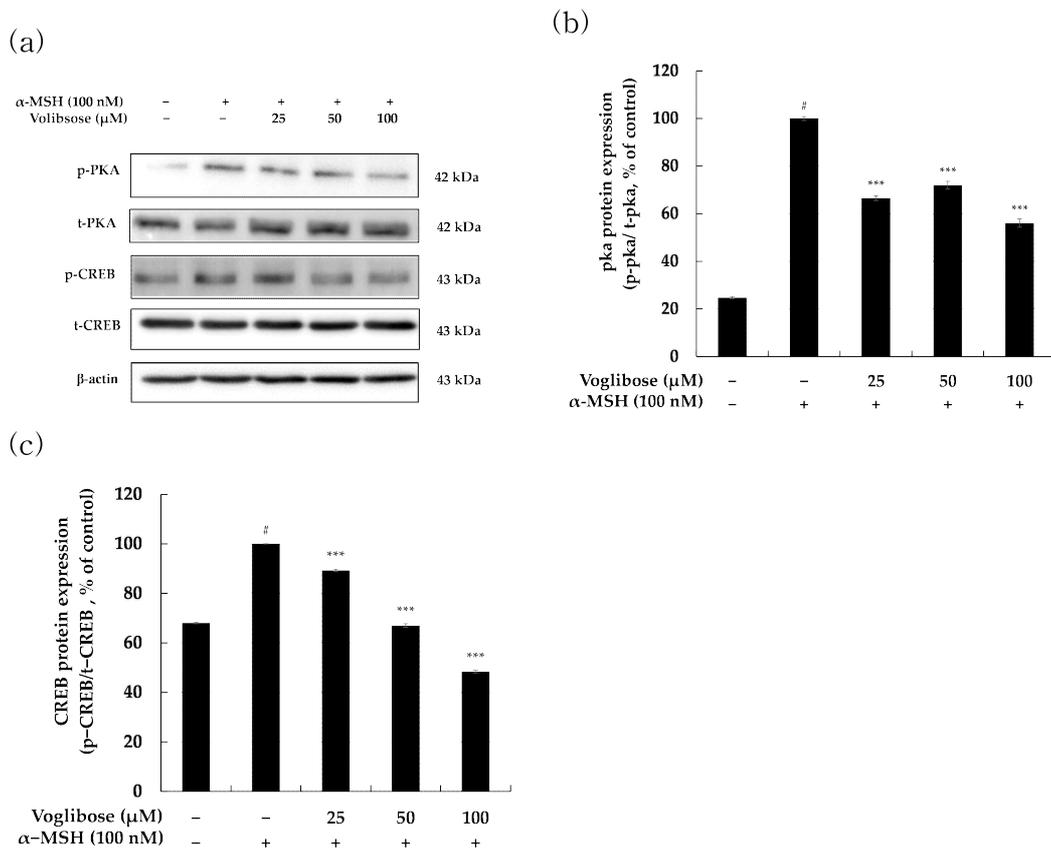


Figure 14. Effects of voglibose on the expression of PKA signaling pathways in α-MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Voglibose (25, 50 and 100 μM) on the expression levels of PKA signaling pathways in B16F10 cells treated with α-MSH (100 nM) for 24h. (b),(c) The expression of p-PKA/t-PKA, p-CREB/t-CREB was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs un-treated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α-MSH alone group.

4) PI3K/Akt 신호전달경로

MICR에 의해 활성화된 PI3K는 PIP₂로부터 PIP₃의 생성을 촉매하며 이때 PIP₃로 인해 Akt는 인산화되어 세포질로 이동한다. 따라서 PI3K/Akt 신호경로의 활성화는 MITF의 발현을 억제한다. [30-36] 이를 확인하기 위해 B16F10 세포에서 Voglibose의 Western blot 실험을 진행하였다. 그 결과, 농도가 증가함에 따라 단백질 발현이 증가함을 보였으며 α-MSH만 처리한 음성대조군과 대비하여 고농도인 100 μM에서 약 97.79% 증가함을 확인하였다(Fig. 15). 이를 통해 Voglibose가 PI3K/Akt 신호전달경로를 활성화하여 멜라닌 생성을 억제함을 보인다.

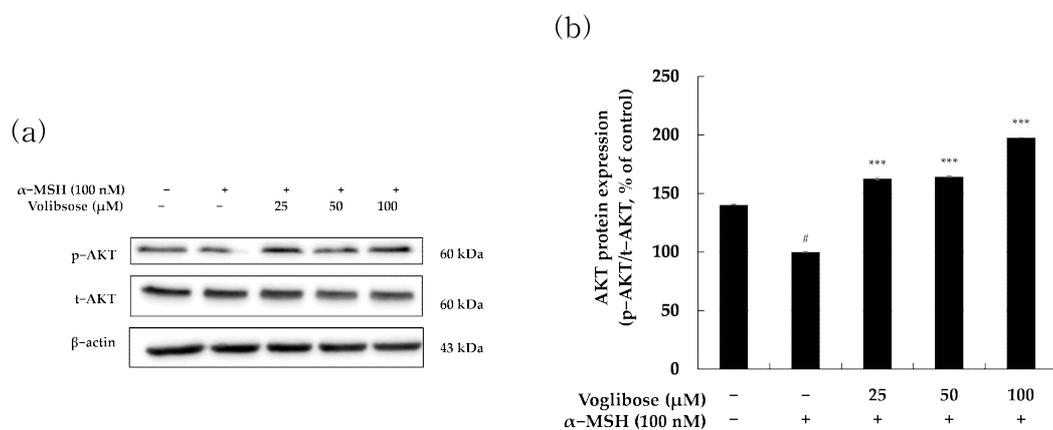


Figure 15. Effects of voglibose on the expression of PI3K/Akt signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Voglibose (25, 50 and 100 μ M) on the expression levels of PI3K/Akt signaling pathways in B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 3h. (b) The expression of p-AKT/t-AKT was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs un-treated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

5) MAPKs 신호전달경로

MAPKs 신호전달경로 중 ERK의 활성화는 MITF 발현의 하향 조절로 인해 멜라닌 생성을 억제한다. 또한 JNK 및 p38의 분해를 통해 멜라닌 생성을 조절한다. [42-48] B16F10 세포에서 Voglibose의 MAPK 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 MAPK 인산화를 조사했다. 실험 결과 Voglibose는 농도 의존적으로 p-ERK의 인산화를 유의하게 증가시키고 p-p38, p-JNK은 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 α -MSH 처리한 음성대조군과 비교하여 p-ERK는 고농도인 100 μ M에서 약 60.80% 증가하였고, p-p38와 p-JNK는 각각 약 46.10%, 38.11% 감소하였다(Fig. 16). 따라서 Voglibose는 B16F10 세포에서 ERK 및 JNK, p38 신호 전달 경로를 통해 MITF 발현을 감소시켜 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 확인했다.

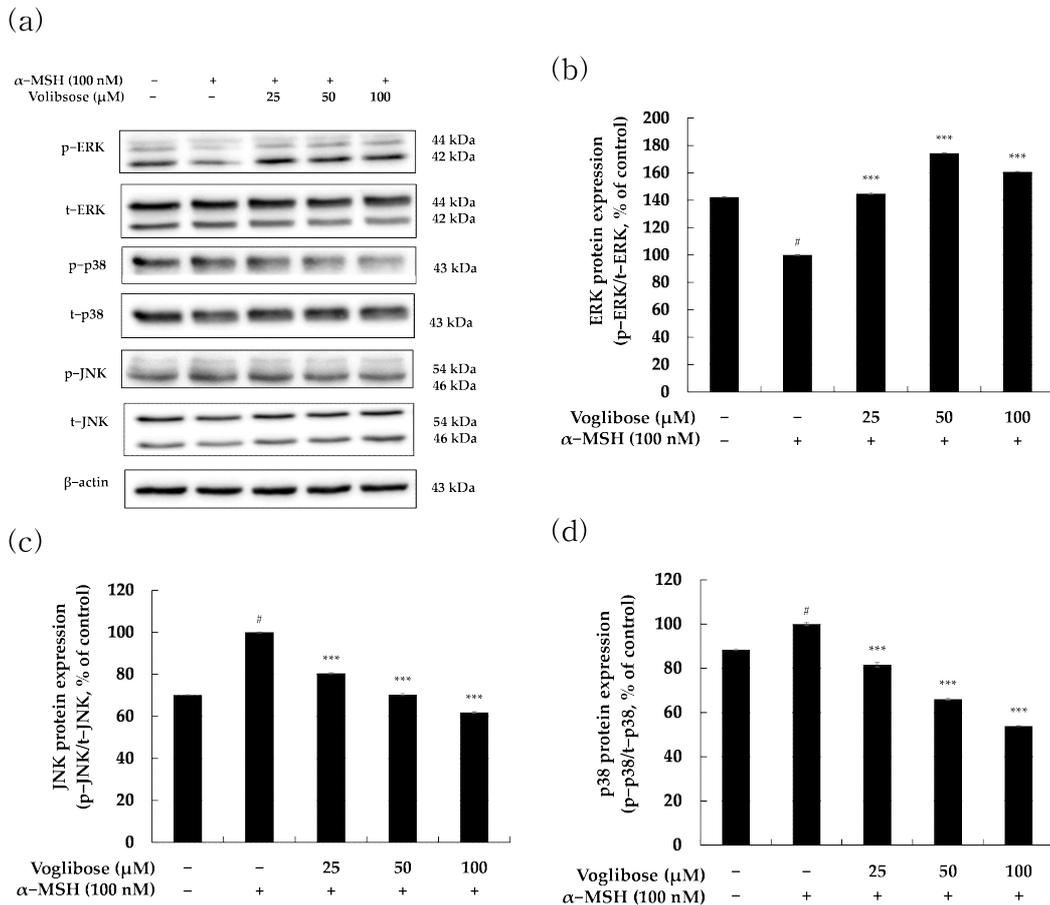


Figure 16. Effects of voglibose on the expression of MAPKs signaling pathways in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. (a) Western blot analyses of the dose-dependent effect of Voglibose (25, 50 and 100 μ M) on the expression levels of MAPKs in B16F10 cells treated with α -MSH (100 nM) for 3h. (b),(c),(d) The expression of p-ERK/t-ERK, p-JNK/t-JNK, p-p38/t-p38 was determined by Western blotting using the specific antibody. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs un-treated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

4. 메커니즘에 대한 특정 억제제의 효과

4.1. Voglibose의 ERK 억제제에 대한 Melanin contents

Voglibose가 B16F10 세포에서 ERK 신호를 활성화함에 따라 ERK의 선택적 억제제인 PD98059를 처리하여 멜라닌 생성에 대한 영향을 알아보려고 진행하였다. 그 결과, 멜라닌 함량은 α -MSH (100 nM)과 Voglibose를 함께 처리한 세포의 멜라닌 함량과 비교하여 α -MSH와 PD98059 (10 μ M)를 처리한 세포의 멜라닌이 더 증가하였다. 이러한 데이터는 Voglibose가 ERK를 인산화하여 멜라닌 함량이 감소한다는 것을 확인시켜준다. 또한 억제제를 처리함으로써 ERK의 활성화가 되지 않아 멜라닌이 증가함을 보였다(Fig. 17). 이러한 결과는 Voglibose에 의해 ERK 신호 전달 경로의 인산화가 Voglibose에 의해 멜라닌 생성 감소와 관련 있음을 보여준다. 따라서 이러한 결과는 Voglibose에 의한 멜라닌 생성 감소가 ERK 신호 경로의 인산화와 관련된 항 멜라닌 생성 신호 경로의 특정 억제제에 의해 조절됨을 시사한다.

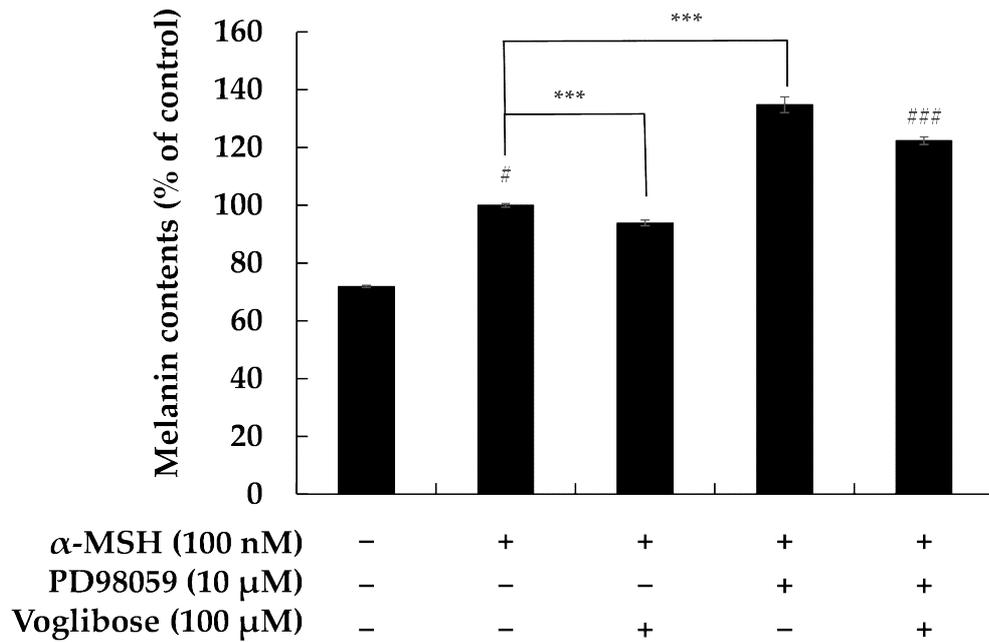


Figure 17. Effects of ERK inhibitor (PD98059) on cellular melanin contents in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with α -MSH (100 nM) in the presence of Voglibose (100 μ M) and PD98059 (10 μ M). Each treated cell percentage is reported relative to that in the control cells. Melanin contents Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments (n=3). #p < 0.001 vs untreated control group. *** p < 0.001 vs α -MSH alone group. ###p < 0.001 vs α -MSH and sample co-treated one.

4.2. Voglibose의 Akt 억제제에 대한 Melanin contents

Voglibose가 B16F10 세포에서 PI3K/Akt 신호를 활성화함에 따라 Akt의 선택적 억제제인 LY294002를 처리하여 멜라닌 생성에 대한 영향을 알아보고자 진행하였다. 그 결과, 멜라닌 함량은 α -MSH (100 nM)과 Voglibose를 함께 처리한 세포의 멜라닌 함량과 비교하여 α -MSH와 LY294002 (10 μ M)를 처리한 세포의 멜라닌이 더 증가하였다. 이러한 데이터는 Voglibose가 Akt를 인산화하여 멜라닌 함량이 감소한다는 것을 확인시켜준다. 또한 억제제를 처리함으로써 Akt 활성화가 되지 않아 멜라닌이 증가함을 보였다(Fig. 18). 이러한 결과는 Voglibose에 의해 Akt 신호 전달 경로의 인산화가 Voglibose에 의해 멜라닌 생성 감소와 관련 있음을 보여준다. 따라서 이러한 결과는 Voglibose에 의한 멜라닌 생성 감소가 PI3K/Akt 신호 경로의 인산화와 관련된 항 멜라닌 생성 신호 경로의 특정 억제제에 의해 조절됨을 시사한다.

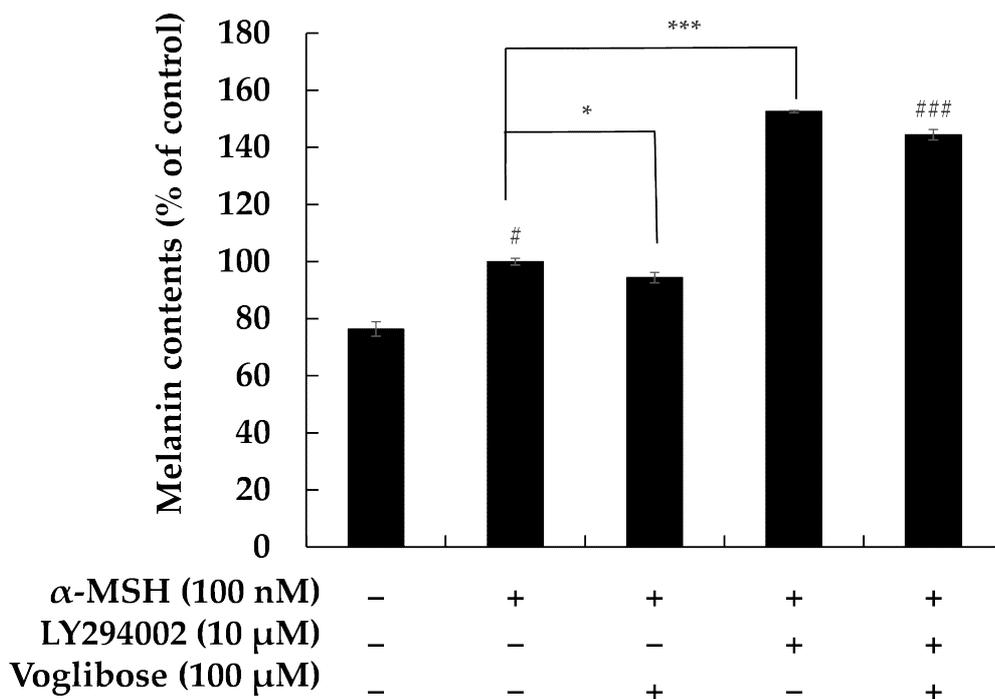


Figure 18. Effects of AKT inhibitor (LY294002) on cellular melanin contents in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with α -MSH (100 nM) in the presence of Voglibose (100 μ M) and LY294002 (10 μ M). Each treated cell percentage is reported relative to that in the control cells. Melanin contents Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n=3). # p < 0.001 vs untreated control group. *** p < 0.001, * p < 0.05 vs α -MSH alone group. ### p < 0.001 vs α -MSH and sample co-treated one.

5. 인체피부 일차자극 시험

5.1. Miglitol의 인체피부 일차자극 시험

본 시험은 인체피부 일차자극 시험을 통해 Miglitol이 국소부위에 사용가능한지 시험하였다. Miglitol은 125 μ M 및 250 μ M의 농도로 등 부위에 20 μ L씩 24시간 동안 첩포하였다. 그런 다음 패치를 제거하고 20분과 24시간 후에 피부 변화를 관찰하였습니다. 스쿠알렌은 음성대조군으로 사용되었으며, 시험물질은 인체 피부에 대한 1차 자극 가능성 측면에서 “저자극”으로 판단되었다(Table. 1).

(IRB 번호 : 1-220777- A-N-01-DICN22080).

No.	Test Sample	No. of Responder	20min after patch removal				24h after patch removal				Reaction Grade (R)*		
			+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4	20 min	24h	Mean
1	Miglitol (125 μ M)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
2	Miglitol (250 μ M)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
3	Squalene	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

Table 1. Results of the primary human skin stimulation test for miglitol (n=33). The sample was removed according to the PCPC guidelines (2014), and the reaction was confirmed after 20 min and 24 h. The range of irritation from "no stimulation" : $0.00 \leq R < 0.87$.

5.2. Voglibose의 인체피부 일차자극 시험

본 시험은 인체피부 일차자극 시험을 통해 Voglibose의 국소부위에 사용가능한 지 시험하였다. Voglibose는 50 μ M 및 100 μ M의 농도로 등 부위에 20 μ L씩 24시간 동안 첩포하였다. 그런 다음 패치를 제거하고 20분과 24시간 후에 피부 변화를 관찰하였다. 스쿠알렌은 음성대조군으로 사용되었으며, 시험물질은 인체 피부에 대한 1차 자극 가능성 측면에서 “저자극”으로 판단되었다(Table. 2).

(IRB 번호 : 1-220777- A-N-01-DICN22080).

No.	Test Sample	No. of Responder	20min after patch removal				24h after patch removal				Reaction Grade (R)*		
			+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4	20 min	24h	Mean
1	Voglibose (50 μ M)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
2	Voglibose (100 μ M)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
3	Squalene	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

Table 2. Results of the primary human skin stimulation test for Voglibose (n=33). The sample was removed according to the PCPC guidelines (2014), and the reaction was confirmed after 20 min and 24 h. The range of irritation from "no stimulation" : $0.00 \leq R < 0.87$.

IV. 고 찰

멜라닌은 멜라노솜에서 합성되어 피부와 머리카락, 눈의 색을 결정한다. 멜라닌 합성은 주요 효소인 티로시나아제에 의해 촉매되어 진행된다. 티로시나아제는 멜라노솜에서 멜라닌 생산의 초기 및 속도 제한 단계를 촉매하는 유형 1 막 결합 당단백질이다. 구조적 관점에서 두 개의 구리 이온은 티로시나제의 촉매활성을 담당하는 세 개의 히스티딘 잔기로 둘러싸여 있다. [88-91] 티로시나아제는 멜라닌 합성에 중요한 효소이기 때문에 멜라닌 생성을 통해 멜라닌 생성을 직접 억제하는 멜라닌 생성억제제 개발이 주를 이루고 있다. 이전에 개발되었던 Hydroquinone, Arbutin, Kojic acid 등은 색소 과침착에 대한 멜라닌 생성억제제로 사용되었다. Hydroquinone은 세포의 돌연변이를 일으킬 수 있으며 접촉성 피부염, 자극 등 여러 부작용을 일으킨다. 또 Arbutin은 하이드로퀴논의 전구약물로 티로시나제를 억제하여 멜라닌 합성을 감소시키거나 억제한다. 하지만 자연 형태의 알부틴은 화학적으로 불안정하여 골수에 잠재적인 독성이 있는 벤젠 대사산물로 분해되는 하이드로퀴논을 방출할 수 있다. Kojic acid는 발암성과 보관 중 불안정으로 인해 사용에 제한되었다. [52,53] 따라서 잠재적 위험과 부작용이 적은 보다 안전한 멜라닌 생성 방지제 개발이 필요하다는 것을 시사한다.

항 멜라닌에 관한 연구는 생약 추출물이나 약용 화합물로부터 신약을 생산하는 경우가 많으므로 개발 기간과 비용에 비해 실제 임상시험에 직접 적용하기는 어려울 것으로 판단된다. 신약 생산에 대한 상당한 관심과 투자에도 불구하고 일부는 전임상 또는 임상 단계에서 발생하는 효과나 부작용의 부족으로 인해 기존 적응증에 적절하게 사용되지 못하였다. [92] 따라서 약물 재배치는 의약품 생산의 초기 단계에서 시작하는 것이 아니라 이미 승인된 의약품의 새로운 적응증을 재발견하는 새로운 접근방식으로 α -glucosidase inhibitor로 사용되고 있는 miglitol, voglibose, validamycin A의 멜라닌 억제제로서의 활성을 확인하고, 이를 용도변경 할 수 있는지에 대해 연구를 진행하였다.

현재 멜라닌 세포의 성장 및 분화에 관한 여러 연구가 수행되었으며, 멜라닌 합성의 조절에는 다양한 분자 및 세포 내 신호 전달 경로가 포함되는 것으로 알려져 있다. [93-95] 따라서 α -glucosidase inhibitor로 사용되고 있는 Miglitol, Voglibose, Validamycin A 의 약물 용도변경으로 멜라닌 생성억제제로 활용될 수 있는지 조사하기 위해 B16F10 melanoma cell을 통해 연구를 진행하였다. 먼저 B16F10 세포에서 세포 생존율을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, Miglitol, Validamycin A 모두 500 μ M 미만의 농도에서 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않음을 나타내었다(Fig. 4). Voglibose는 200 μ M 농도 미만의 농도에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 따라서 이후 실험은 세포 독성이 나타나지 않는 농도인 250 μ M, 100 μ M 이하에서 실험을 진행하였다.

멜라닌 생성에 관여하는 많은 신호 경로가 있으며, 모든 신호는 결국 MITF를 상향 조절한다. 활성화된 MITF는 TYR, TRP-1, TRP-2 발현을 촉진하여 멜라닌을 형성한다. 그중 TYR는 멜라닌 생성을 조절하는 속도 제한효소로서 중요한 역할을 한다. 멜라닌 생성의 증가는 티로시나제 활성과 직접적인 상관관계가 있다. [12-14] 따라서 α -glucosidase inhibitor로 사용되고 있는 Miglitol, Voglibose, Validamycin A이 α -MSH로 유도된 흑색종 세포에 Tyrosinase 활성 억제를 통해 멜라닌 합성을 억제할 수 있는지 여부를 조사했습니다. 멜라닌 생성의 속도를 제한하는 효소인 Tyrosinase를 조절하는 방법에는 글루코실화를 변경하고 촉매 활성을 억제하며 분해를 가속화 하는 것이 포함된다. TYR는 기능과 적절한 글코실화를 위해 N-glycan 처리는 소포체 (ER)와 골지체에서 세포 내 α -glucosidase 및 아마노시다아제에 의해 수행된다. 이러한 효소가 억제되면 TYR가 비정상적으로 접혀 성숙하지 않아 저색소침착이 발생한다. [88-91,96-100] 따라서 Miglitol과 Voglibose의 세포 내 tyrosinase 활성은 고농도인 250 μ M, 100 μ M에서 각 13.60%, 10.18% 저해하였다. 이는 N-linked glycoprotein인 tyrosinase의 glycosylation을 억제하여 tyrosinase의 세포 내 이동이나 활성을 억제할 수 있음을 알 수 있다. 또한 α -MSH로 자극하였을 때 멜라닌 생성은 음성대조군 대비하여 고농도에서 각 33.96%, 34.28% 감소함을 보였고, 농도 의존적으로 멜라닌 생

성이 감소하는 것을 확인하였다. 하지만 Validamycin A는 Tyrosinase 활성과 멜라닌 생성에 대하여 모두 활성을 나타내지 않음을 확인하였다(Fig. 5, 6). 따라서 본 연구는 Miglitol과 Voglibose가 α -MSH로 유도된 흑색종 세포에서 티로시나제 활성을 효과적으로 하향 조절하여 세포 멜라닌 합성을 감소시킬 수 있음을 확인시켜준다. 하지만 Validamycin A는 멜라닌 생성억제제로서의 활용이 어려움이 있다고 판단하여 이후 실험은 Validamycin A를 제외하여 수행하였다.

MITF는 멜라닌 생성의 핵심 조절이며, MITF 발현의 하향 조절되는 것을 확인하는 것은 필수적이다. 본 연구에서 Miglitol이 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 생성 효소 및 이들의 전사 인자인 MITF의 단백질 발현을 확인하기 위해 Western blot 분석을 진행하였다. 그 결과 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 하향 조절되는 것이 확인되었고 (Fig. 7) 이러한 결과가 MITF 발현을 억제하고 궁극적으로 멜라닌 생성을 감소시킨다(Fig. 8).

또한 Voglibose의 멜라닌 생성 효소 및 MITF와 같은 멜라닌 생성 핵심 단백질의 발현을 조절에 관여하는지 확인한 결과, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현을 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 12). 하지만 멜라닌 생합성 경로에서 초기 속도결정단계에 관여하는 TYR의 활성을 보이지 않았으므로 추가적인 검증이 필요하다.

Wnt/ β -catenin 신호 경로는 Wnt 리간드가 막 수용체 단백질인 Frizzled와 결합하여 상호작용하며 GSK3 β 를 인산화 시킨다. GSK3 β (Ser 9)의 비활성화는 β -catenin의 축적을 유도하며, 이는 핵으로 전이되어 TCF 및 LEF와 복합체를 형성하여 β -catenin의 MITF 유전자 발현을 상향 조절한다. [37-39] Miglitol은 p-GSK3 β , β -catenin의 발현을 감소하였으며, 인산화된 β -catenin은 농도 의존적으로 증가함을 나타내었다. 이는 Miglitol이 Wnt/ β -catenin 신호전달경로를 통해 MITF 발현을 억제하는 것을 보여준다(Fig. 9).

Voglibose의 Wnt/ β -catenin 신호 경로에서의 단백질 발현 결과, p-GSK3 β , β -catenin의 발현을 감소하였으며, 인산화된 β -catenin은 농도 의존적으로 증가함을 나타내었다(Fig. 13).

자외선에 민감한 인간 표피 각질세포는 멜라닌 세포에서 α -MSH를 분비하여 멜라닌 합성을 촉진하는 인자를 생성한다. cAMP 의존경로를 통해 멜라닌 생성을 조절하는데 MC1R이 자극을 받게 되면 호르몬은 AC를 활성화하여 세포 내 cAMP를 생성한다. 증가한 cAMP는 PKA를 인산화 시키고 CREB의 인산화를 통해 MITF의 유전자 발현을 유도한다. [29-36] 그 결과 Miglitol의 발현량은 음성대조군과 비교하여 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였으며(Fig. 10), 이는 Miglitol이 PKA의 인산화를 억제하여 MITF 발현을 하향 조절을 나타냄을 보여준다.

Voglibose 또한 PKA, CREB의 인산화를 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였으므로 (Fig. 14) PKA 신호전달 경로에서 PKA, CREB의 인산화를 감소시켜 MITF의 발현을 억제하고 궁극적으로 멜라닌의 생성을 감소한다.

ERK, JNK, p38을 포함한 MAPKs 신호 전달 경로는 멜라닌 생성 조절에 관여하는 주요 신호분자이다. 연구에 따르면 ERK의 인산화가 하향 조절된 멜라닌 합성을 유도하는 것으로 나타났다. 대조적으로 JNK 및 p38의 인산화는 MITF를 활성화하여 궁극적으로 멜라닌 생성을 자극한다. [42-47] B16F10 세포에서 대부분의 멜라닌 생성억제제는 p38/MAPK 의 인산화 수준을 감소시켜 멜라닌 생성을 억제한다. Miglitol이 ERK를 활성화하고 p38 MAPK 신호 전달 경로를 억제한 다음 멜라닌 생성 단백질의 하향 조절을 억제함으로써 멜라닌 생성을 억제함을 나타낸다(Fig. 11). Voglibose 또한 ERK를 활성화하여 MITF 발현의 하향 조절로 멜라닌 생성을 억제하였으며, JNK 및 p38의 분해를 통해 멜라닌 생성을 조절하였다(Fig. 16).

추가적으로 Voglibose의 PI3K/Akt 신호전달경로를 확인하였다. MC1R에 의해 활성화된 PI3K는 Akt를 인산화하여 세포질로 이동한다. [30-36] 따라서 PI3K/Akt 신호경로의 활성화는 MITF의 발현을 억제하는데 실험 결과, 농도 의존적으로 Akt의 발현이 증가함을 보였다(Fig. 15).

특정 억제제를 처리하여 멜라닌 생성에 대한 Voglibose의 영향을 조사하였다. Voglibose가 B16F10 세포에서 ERK 신호를 활성화함에 따라 ERK의 선택적 억제제인 PD98059를 처리하였을 때, 음성대조군과 Voglibose를 함께 처리한 세포의 멜라닌 함량과 비교하여 음성대조군과 PD98059를 처리한 세포의 멜라닌이 더 증가함을 보였다. 이는 ERK가 음성 신호전달경로로서 ERK가 인산화되면 MITF를 인산화 및 분해해 최종적으로 멜라닌 합성을 감소시킨다(Fig. 17). 따라서 MITF 단백질 발현의 하향 조절을 통한 멜라닌 합성 억제와 관련이 있음을 시사한다. 또한 Akt의 선택적 억제제인 LY294002를 처리하였을 때, 음성대조군과 Voglibose를 함께 처리한 세포의 멜라닌 함량과 비교하여 음성대조군과 LY294002를 처리한 세포의 멜라닌이 더 증가함을 보였다(Fig. 18). 이는 Akt가 음성 신호 전달 경로로서 Akt가 인산화되면 MITF의 발현을 감소시키고 궁극적으로 멜라닌 생성을 억제한다. 따라서 MITF 단백질 발현의 하향 조절을 통해 멜라닌 합성 억제와 관련이 있음을 시사하는 바이다.

마지막으로 피부 1차 자극테스트를 사용하여 Miglitol, Voglibose가 잠재적으로 국소 성분으로 적용될 수 있는지 여부를 평가하였다. 자극 또는 감각 전위가 존재하는지 확인하기 위해 Miglitol(125 μ M 또는 250 μ M)과 Voglibose (50 μ M, 100 μ M)를 33명의 피시험자의 피부(등 상부)에서 시험하였다. 이 분석에서 시료는 “저자극”으로 판정되어 안전한 물질임을 확인하였다(Table. 1-2). 이러한 결과는 Miglitol과 Voglibose가 국소 제제로 사용될 때 색소 침착 장애의 발병을 예방할 수 있음을 보여준다.

요약하면 본 연구는 α -glucosidase inhibitor로 사용되고 있는 Miglitol, Voglibose의 멜라닌 생성 억제 메커니즘에 대한 영향을 B16F10 세포에서 조사하였으며, Miglitol, Voglibose 모두 다양한 신호전달경로를 통해 TYR, TRP-1 및 TRP-2를 포함한 다른 멜라닌 생성 단백질의 발현에 관여하는 전사 조절인자인 MITF의 발현을 억제함으로써 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 밝혔다. Miglitol은 PKA 또는 Wnt/ β -catenin 및 MAPK/ERK, p38 MAPK 인산화에 의해 매개되는 TYR, TRP-1 및 TRP-2, MITF의 발현을 억제하여 B16F10 세포에서 멜라닌 생

성을 감소시킨다. Voglibose 또한 PKA, Wnt/ β -catenin 및 PI3K/Akt, MAPKs의 인산화에 의해 TRP-1, TRP-2 및 MITF의 발현을 하향 조절함으로써 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 나타낸다. 따라서 Miglitol, Voglibose는 과색소침착을 치료하기 위한 국소치료제 및 화장품제제의 유용한 성분으로 사용될 수 있음을 제안한다.

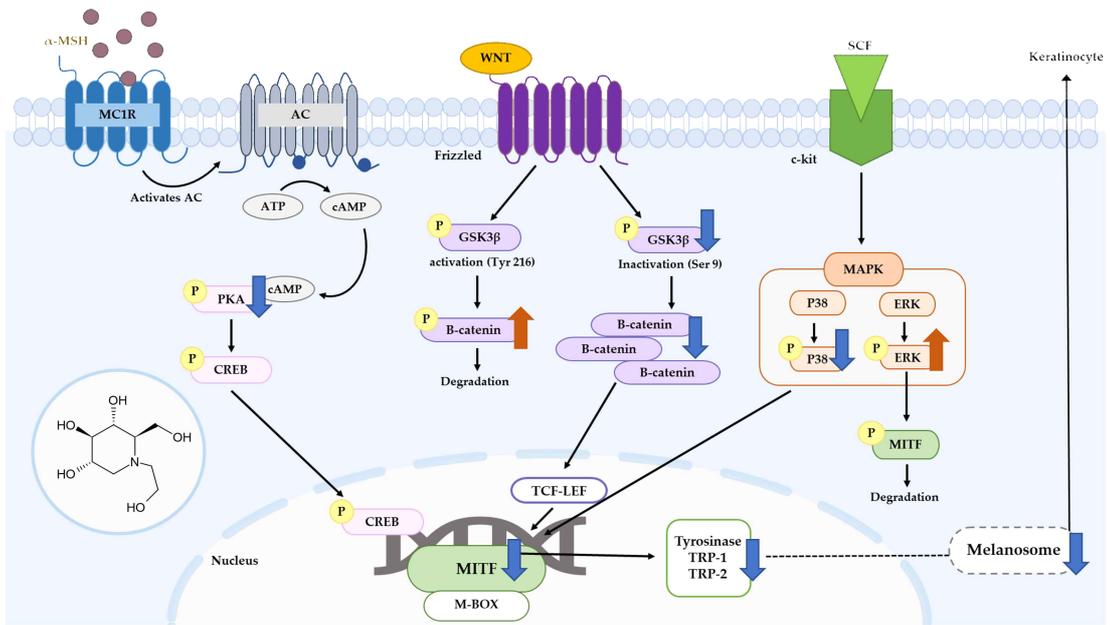


Figure 19. Regulation of miglitol melanogenesis signaling pathway.

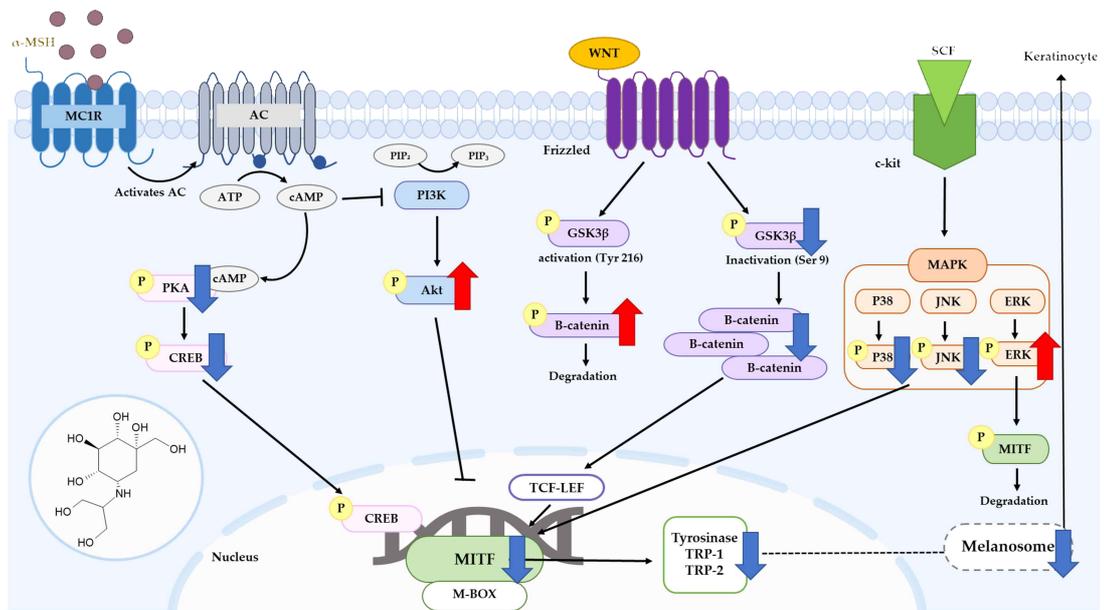


Figure 20. Regulation of voglibose melanogenesis signaling pathway.

Abbreviations

ER	Endoplasmic reticulum
KIT	stem cell growth factor receptor
α -MSH	α -melanocyte stimulating hormone
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
TYR	tyrosinase
TRP-1	tyrosinase-related protein-1
TRP-2	tyrosinase-related protein-2
MC1R	melanocortin 1 receptor
AP-1	activator protein 1
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
PIP ₂	phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate
PIP ₃	phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphate
PKA	protein kinase A
CREB	cAMP-response element binding
p-CREB	phosphorylated cAMP-response element binding
TCF-LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
GSK3 β	glycogen synthase kinase-3 beta
MAPK	matrix metalloproteinase
ERK1/2	Extracelluallar signal regulated kinease 1/2
JNK	c-Jun N-terminal kinase
DOPA	3,4-dihydroxy phenylalanine
DHICA	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide

V. 참고문헌

1. YAMAGUCHI, Yuji; BRENNER, Michaela; HEARING, Vincent J. The regulation of skin pigmentation. *Journal of biological chemistry*, 2007, 282.38: 27557-27561.
2. ITO, Shosuke; WAKAMATSU, Kazumasa. Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. *Pigment cell & melanoma research*, 2011, 24.1: 63-74.
3. AMBROSIO, Andrea L., et al. TPC2 controls pigmentation by regulating melanosome pH and size. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113.20: 5622-5627.
4. HWANG, Jung-Hee; LEE, Byung Mu. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2007, 70.5: 393-407.
5. TIAN, Xiaoyu, et al. Melanosome transport and regulation in development and disease. *Pharmacology & therapeutics*, 2021, 219: 107707.
6. SLOMINSKI, Andrzej, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews*, 2004, 84.4: 1155-1228.
7. CICHOREK, Mirosława, et al. Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 2013, 30.1: 30-41.

8. BASTONINI, Emanuela; KOVACS, Daniela; PICARDO, Mauro. Skin pigmentation and pigmentary disorders: focus on epidermal/dermal cross-talk. *Annals of dermatology*, 2016, 28.3: 279-289.
9. VIDEIRA, Inês Ferreira dos Santos; MOURA, Daniel Filipe Lima; MAGINA, Sofia. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 2013, 88: 76-83.
10. KONDO, Taisuke; HEARING, Vincent J. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert review of dermatology*, 2011, 6.1: 97-108.
11. MILLINGTON, G. W. M. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology*, 2006, 31.3: 407-412.
12. BRENNER, Michaela; HEARING, Vincent J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and photobiology*, 2008, 84.3: 539-549.
13. PILLAIYAR, Thanigaimalai; MANICKAM, Manoj; JUNG, Sang-Hun. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular signalling*, 2017, 40: 99-115.
14. SU, Tzu-Rong, et al. Inhibition of melanogenesis by gallic acid: Possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells. *International journal of molecular sciences*, 2013, 14.10: 20443-20458.

15. HIROBE, Tomohisa. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated?. *Pigment cell & melanoma research*, 2011, 24.3: 462-478.
16. ULLAH, Sultan, et al. Tyrosinase inhibitors: a patent review (2011-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2016, 26.3: 347-362.
17. D'MELLO, Stacey AN, et al. Signaling pathways in melanogenesis. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17.7: 1144.
18. WANG, Yuqiu, et al. Quantitative proteomic analysis uncovers inhibition of melanin synthesis by silk fibroin via MITF/tyrosinase axis in B16 melanoma cells. *Life Sciences*, 2021, 284: 119930.
19. KÖRNER, Ann; PAWELEK, John. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 1982, 217.4565: 1163-1165.
20. VINCENT, J.; HEARING, J. R. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed. *Method Enzymol*, 1987, 142: 154-165.
21. KONDO, Taisuke; HEARING, Vincent J. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert review of dermatology*, 2011, 6.1: 97-108.
22. KOBAYASHI, T., et al. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *The EMBO journal*, 1994, 13.24: 5818-5825.

23. TSUKAMOTO, Katsuhiko, et al. A second tyrosinase related protein, TRP 2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *The EMBO journal*, 1992, 11.2: 519-526.
24. COSTIN, Gertrude-E.; HEARING, Vincent J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB journal*, 2007, 21.4: 976-994.
25. HOU, Ling; PANTHIER, Jean-Jacques; ARNHEITER, Heinz. Signaling and transcriptional regulation in the neural crest-derived melanocyte lineage: interactions between KIT and MITF. *Development*, 2000, 127.24: 5379-5389.
26. KOBAYASHI, T., et al. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *The EMBO journal*, 1994, 13.24: 5818-5825.
27. BOROVSANSKY, Jan; RILEY, Patrick A. (ed.). Melanins and melanosomes: biosynthesis, structure, physiological and pathological functions. *John Wiley & Sons*, 2011.
28. VACHTENHEIM, Jiri; BOROVSANSKÝ, Jan. "Transcription physiology" of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Experimental dermatology*, 2010, 19.7: 617-627.
29. CARPENTER, Christopher L.; CANTLEY, Lewis C. Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1996, 1288.1: M11-M16.

30. MOON, Seung-Hyun; CHUNG, You Chul; HYUN, Chang-Gu. Tobramycin promotes melanogenesis by upregulating p38 MAPK protein phosphorylation in B16F10 melanoma cells. *Antibiotics*, 2019, 8.3: 140.
31. SONG, Young Chan, et al. Berberine regulates melanin synthesis by activating PI3K/AKT, ERK and GSK3 β in B16F10 melanoma cells. *International journal of molecular medicine*, 2015, 35.4: 1011-1016.
32. JANG, Ji Yeon, et al. Partially purified Curcuma longa inhibits alpha melanocyte stimulating hormone stimulated melanogenesis through extracellular signal regulated kinase or Akt activation mediated signalling in B16F10 cells. *Experimental dermatology*, 2009, 18.8: 689-694.
33. YAO, Cheng, et al. Ardisia crenata extract stimulates melanogenesis in B16F10 melanoma cells through inhibiting ERK1/2 and Akt activation. *Molecular medicine reports*, 2015, 11.1: 653-657.
34. SHI, Xiang, et al. Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer. *Molecular medicine reports*, 2019, 19.6: 4529-4535.
35. MOSCA, Sarah, et al. 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.
36. MARTELLI, A. M., et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2006, 20.6: 911-928.
37. LARUE, Lionel; DELMAS, Véronique. The WNT/Beta-catenin pathway in

- melanoma. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2006, 11.1: 733-742.
38. SAITO, Hideo, et al. Microphthalmia associated transcription factor in the Wnt signaling pathway. *Pigment Cell Research*, 2003, 16.3: 261-265.
39. TAKEDA, Kazuhisa, et al. Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Human molecular genetics*, 2000, 9.1: 125-132.
40. GAJOS-MICHNIEWICZ, Anna; CZYZ, Malgorzata. WNT signaling in melanoma. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21.14: 4852.
41. YASUMOTO, Ken-ichi, et al. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *The EMBO journal*, 2002, 21.11: 2703-2714.
42. ZHANG, Wei; LIU, Hui Tu. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research*, 2002, 12.1: 9-18.
43. WAGNER, Erwin F.; NEBREDA, Ángel R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9.8: 537-549.
44. CARGNELLO, Marie; ROUX, Philippe P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2011, 75.1: 50-83.
45. KIM, Kil-Nam, et al. Octaphloretol A isolated from *Ishige foliacea* inhibits α -MSH-stimulated induced melanogenesis via ERK pathway in

B16F10 melanoma cells. *Food and chemical toxicology*, 2013, 59: 521-526.

46. CHOI, Hyungyeong, et al. Decursin prevents melanogenesis by suppressing MITF expression through the regulation of PKA/CREB, MAPKs, and PI3K/Akt/GSK-3 β cascades. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 147: 112651.
47. JIANG, Zequn, et al. 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -d-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation. *Life Sciences*, 2009, 85.9-10: 345-350.
48. KIM, Dong-Seok, et al. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *Journal of cell science*, 2003, 116.9: 1699-1706.
49. HEMESATH, Timothy J., et al. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, 1998, 391.6664: 298-301.
50. KIM, Dong-Seok, et al. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *Journal of cell science*, 2003, 116.9: 1699-1706.
51. LV, Jinpeng, et al. The Inhibitory Effect of Curcumin Derivative J147 on Melanogenesis and Melanosome Transport by Facilitating ERK-Mediated MITF Degradation. *Frontiers in pharmacology*, 2021, 12: 783730.
52. CRANE, F. L. Hydroquinone dehydrogenases. *Annual Review of Biochemistry*, 1977, 46.1: 439-469.

53. SETYAWATI, Andriyana; YAMAUCHI, Kosei; MITSUNAGA, Tohru. Potential of medicinal plants extractives as anti-melanogenesis ingredients. *Reviews in Agricultural Science*, 2018, 6: 46-60.
54. SEARLE, Tamara; AL NIAIMI, Firas; ALI, Faisal R. The top 10 cosmeceuticals for facial hyperpigmentation. *Dermatologic Therapy*, 2020, 33.6: e14095.
55. SAEEDI, Majid; ESLAMIFAR, Masoumeh; KHEZRI, Khadijeh. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 110: 582-593.
56. CABANES, Juana; CHAZARRA, Soledad; GARCIA-CARMONA, Francisco. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1994, 46.12: 982-985.
57. CHAKRABORTY, Ashok K., et al. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment cell research*, 1998, 11.4: 206-212.
58. ZHU, Wenyuan; GAO, Jie. The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. In: *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Elsevier, 2008. p. 20-24.
59. NOH, Jin Mi, et al. Kojic acid - tripeptide amide as a new tyrosinase inhibitor. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 2007, 88.2: 300-307.

60. TAKIZAWA, Tamotsu, et al. Hepatocellular tumor induction in heterozygous p53-deficient CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. *Toxicological Sciences*, 2003, 73.2: 287-293.
61. SINGH, Thakur Uttam, et al. Drug repurposing approach to fight COVID-19. *Pharmacological Reports*, 2020, 72.6: 1479-1508.
62. SULTANA, Janet, et al. Challenges for drug repurposing in the COVID-19 pandemic era. *Frontiers in pharmacology*, 2020, 11: 588654.
63. OPREA, Tudor I., et al. Drug repurposing from an academic perspective. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2011, 8.3-4: 61-69.
64. BERTOLINI, Francesco; SUKHATME, Vikas P.; BOUCHE, Gauthier. Drug repurposing in oncology—patient and health systems opportunities. *Nature reviews Clinical oncology*, 2015, 12.12: 732-742.
65. JEONG, Seo-Mi-Gon; YOON, Tae-Jin. Development of pigmentation-regulating agents by drug repositioning. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.8: 3894.
66. PILLAIYAR, Thanigaimalai; MANICKAM, Manoj; JUNG, Sang-Hun. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discovery Today*, 2017, 22.2: 282-298.
67. KINGMA, Paulus J., et al. α -Glucosidase inhibition by miglitol in NIDDM patients. *Diabetes Care*, 1992, 15.4: 478-483.
68. SCOTT, Lesley J.; SPENCER, Caroline M. Miglitol. *Drugs*, 2000, 59.3:

521-549.

69. SELS, Jean-Pierre JE; HUIJBERTS, Maya SP; WOLFFENBUTTEL, Bruce HR. Miglitol, a new α -glucosidase inhibitor. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 1999, 1.1: 149-156.
70. WANG, Ningyuan, et al. Antidiabetic drug miglitol inhibits myocardial apoptosis involving decreased hydroxyl radical production and Bax expression in an ischaemia/reperfusion rabbit heart. *British journal of pharmacology*, 2004, 142.6: 983-990.
71. SHRIVASTAVA, Atul, et al. Lipid lowering and antioxidant effect of miglitol in triton treated hyperlipidemic and high fat diet induced obese rats. *Lipids*, 2013, 48.6: 597-607.
72. JOHNSON, Andrew B.; TAYLOR, Roy. Does suppression of postprandial blood glucose excursions by the α -glucosidase inhibitor miglitol improve insulin sensitivity in diet-treated type II diabetic patients?. *Diabetes Care*, 1996, 19.6: 559-563.
73. AOKI, Chie, et al. Miglitol, an Anti-diabetic drug, inhibits oxidative stress - induced apoptosis and mitochondrial ROS over-production in endothelial cells by enhancement of AMP-activated protein kinase. *Journal of pharmacological sciences*, 2012, 12108FP.
74. KAKU, Kohei. Efficacy of voglibose in type 2 diabetes. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2014, 15.8: 1181-1190.
75. BIN, Bum Ho, et al. Novel inhibitory effect of the antidiabetic drug

- voglibose on melanogenesis. *Experimental dermatology*, 2013, 22.8: 541-546.
76. FENG, Jinsong, et al. Significance of oxygen carriers and role of liquid paraffin in improving validamycin A production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2016, 43.10: 1365-1372.
77. BAE, Jaehyun, et al. The effects of the voglibose on non-alcoholic fatty liver disease in mice model. *Scientific reports*, 2022, 12.1: 1-8.
78. KIM, Ji Won, et al. Effect of sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, empagliflozin, and α glucosidase inhibitor, voglibose, on hepatic steatosis in an animal model of type 2 diabetes. *Journal of cellular biochemistry*, 2019, 120.5: 8534-8546.
79. KATO, Junichi, et al. Alpha-glucosidase inhibitor voglibose suppresses azoxymethane-induced colonic preneoplastic lesions in diabetic and obese mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21.6: 2226.
80. GARCÍA, María Dolores; ARGÜELLES, Juan Carlos. Trehalase inhibition by validamycin A may be a promising target to design new fungicides and insecticides. *Pest Management Science*, 2021, 77.9: 3832-3835.
81. BIAN, Chuanhong, et al. Mechanism of validamycin A inhibiting DON biosynthesis and synergizing with DMI fungicides against *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22.7: 769-785.
82. ZOU, Wei, et al. Effective utilization of wastewater for valuable validamycin A biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus* K2509 in

- plant-scale bioreactor. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5.1: 1-9.
83. WANG, Zhi-Jiang, et al. The effect of validamycin A on tyrosinase: Inhibition kinetics and computational simulation. *International journal of biological macromolecules*, 2013, 55: 15-23.
84. BIN, Bum Ho, et al. Novel inhibitory effect of the antidiabetic drug voglibose on melanogenesis. *Experimental dermatology*, 2013, 22.8: 541-546.
85. BIN, Bum-Ho, et al. Novel inhibitory effect of N-(2-hydroxycyclohexyl) valioline on melanin production in a human skin model. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15.7: 12188-12195.
86. GHASEMI, Mahshid, et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22.23: 12827.
87. BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patric M.; TAN, An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 2005, 11: 127-152.
88. KIM, Moon-Moo. Recent Natural Products Involved in the Positive Modulation of Melanogenesis. *Journal of Life Science*, 2018, 28.6: 745-752.
89. NAWAZ, Ali, et al. Tyrosinase: sources, structure and applications. *Int J Biotech Bioeng*, 2017, 3.5: 142-148.
90. LAI, Xuelei, et al. Structure and function of human tyrosinase and

tyrosinase related proteins. *Chemistry - A European Journal*, 2018, 24.1: 47-55.

91. OLIVARES, Concepcion; SOLANO, Francisco. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment cell & melanoma research*, 2009, 22.6: 750-760.
92. JEONG, Seo-Mi-Gon; YOON, Tae-Jin. Development of pigmentation-regulating agents by drug repositioning. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.8: 3894.
93. ARORA, Navneet; SIDDIQUI, Ehraz Mehmood; MEHAN, Sidharth. Involvement of adenylate cyclase/cAMP/CREB and SOX9/MITF in melanogenesis to prevent vitiligo. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2021, 476.3: 1401-1409.
94. KUMARI, Sulekha, et al. Melanogenesis Inhibitors. *Acta dermato-venereologica*, 2018, 98.10.
95. HUSHCHA, Yekatsiaryna, et al. microRNAs in the Regulation of Melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.11: 6104.
96. ANDO, Hideya; ICHIHASHI, Masamitsu; HEARING, Vincent J. Role of the ubiquitin proteasome system in regulating skin pigmentation. *International journal of molecular sciences*, 2009, 10.10: 4428-4434.
97. BIN, Bum-Ho, et al. The development of sugar-based anti-melanogenic agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17.4: 583.

98. CHOI, Hyunjung, et al. Influence of N glycan processing disruption on tyrosinase and melanin synthesis in HM3KO melanoma cells. *Experimental dermatology*, 2007, 16.2: 110-117.
99. PETRESCU, Stefana M., et al. Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272.25: 15796-15803.
100. MOLINARI, Maurizio. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nature chemical biology*, 2007, 3.6: 313-320.