



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 D-(+)-Cycloserine의  
항염증 및 멜라닌생성 억제효과 규명

제주대학교 대학원

화 학 과

강 현 규

2020년 2월

마우스 세포에서 D-(+)-Cycloserine의  
항염증 및 멜라닌생성 억제효과 규명

지도교수 현 창 구

강 현 규

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2020년 2월

강현규의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

# Anti-inflammation and Anti-melanogenesis Effects of D-(+)-Cycloserine in Mouse Cells

Hyun-Kyu Kang

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

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

2020. 2.

This thesis has been examined and approved by

.....  
.....  
.....

.....  
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

목 차 .....	i
LIST OF FIGURES .....	iii
ABSTRACT .....	iv
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	5
1. 시료 및 시약 .....	5
2. 세포 배양 .....	5
3. 세포 생존율 평가 .....	6
4. NO 생성량 측정 .....	6
5. Prostaglandin E2 및 전 염증성 cytokine 생성량 측정 .....	7
6. Melanin 생성량 측정 .....	7
7. 세포 내 tyrosinase 효소 활성 측정 .....	8
8. 단백질 추출 .....	8
9. 단백질 분리 .....	9
10. 통계처리 .....	9
III. 결 과 .....	10
1. D-(+)-cycloserine (DCS)의 항염증 활성 .....	10

1) 세포 생존율 평가 .....	10
2) NO 생성량 측정 .....	12
3) Prostaglandin E2 생성량 측정 .....	14
4) 전 염증성 cytokine 생성량 측정 .....	16
5) Western blot 분석 .....	20
(1) iNOS 효소단백질 발현량 측정 .....	20
(2) COX-2 효소단백질 발현량 측정 .....	22
(3) IκB-α 인산화 단백질 발현량 측정 .....	24
(4) Akt 인산화 단백질 발현량 측정 .....	26
(5) MAPK 인산화 단백질 발현량 측정 .....	28
6) 항생제 세포 생존율 및 NO 생성량 스크리닝 평가 .....	30
2. D-(+)-cycloserine (DCS)의 미백 활성 .....	37
1) 세포 생존율 평가 .....	37
2) Melanin 생성량 측정 .....	39
3) 세포 내 tyrosinase 효소 활성 측정 .....	41
4) Western blot 분석 .....	43
(1) 세포 내 TYR, TRP-1 및 TRP-2 효소단백질 발현량 측정 .....	43
(2) 세포 내 MITF 전사 인자 단백질 발현량 측정 .....	45
IV. 고    찰 .....	47
V. 참고문헌 .....	52

## LIST OF FIGURES

Figure 1. The effect of DCS on cell viability in RAW 264.7 cells .....	11
Figure 2. The effect of DCS on NO production in RAW 264.7 cells .....	13
Figure 3. The effect of DCS on PGE <sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells .....	15
Figure 4. The effect of DCS on IL-1 $\beta$ production in RAW 264.7 cells .....	17
Figure 5. The effect of DCS on IL-6 production in RAW 264.7 cells .....	18
Figure 6. The effect of DCS on TNF- $\alpha$ production in RAW 264.7 cells .....	19
Figure 7. The effect of DCS on iNOS expression in RAW 264.7 cells .....	21
Figure 8. The effect of DCS on COX-2 expression in RAW 264.7 cells .....	23
Figure 9. The effect of DCS on I $\kappa$ B- $\alpha$ expression in RAW 264.7 cells .....	25
Figure 10. The effect of DCS on Akt expression in RAW 264.7 cells .....	27
Figure 11. The effect of DCS on the MAPK in RAW 264.7 cells .....	29
Figure 12. The effect of ametrycin on NO production in RAW 264.7 cells .....	31
Figure 13. The effect of anisomycin on NO production in RAW 264.7 cells .....	32
Figure 14. The effect of azithromycin on NO production in RAW 264.7 cells .....	33
Figure 15. The effect of roxithromycin on NO production in RAW 264.7 cells .....	34
Figure 16. The effect of spiramycin on NO production in RAW 264.7 cells .....	35
Figure 17. The effect of splitomicin on NO production in RAW 264.7 cells .....	36
Figure 18. The effect of DCS on the viability in B16F10 melanoma cells .....	38
Figure 19. The effects of DCS on melanin production in B16F10 cells .....	40
Figure 20. The effects of DCS on tyrosinase activity in B16F10 cells .....	42
Figure 21. The effects of DCS on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in B16F10 cells .....	44
Figure 22. The effects of DCS on MITF expression in B16F10 cells .....	46

## ABSTRACT

Recently, additional therapeutic potentials of classical antibiotics are gaining considerable attention. The discovery of penicillin in the 1920s had a major impact on the history of human health. Penicillin has been used for the treatment of fatal microbial infections in humans and has led to the discovery of several new antibiotics. D-(+)-cycloserine (DCS) is an antibiotic isolated from *Streptomyces orchidaceous* and is used in conjunction with other drugs in the treatment of tuberculosis. To determine whether DCS has anti-inflammatory and anti-melanogenic effects, we investigated the ability of DCS in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages and  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)-induced B16F10 melanoma cells. DCS inhibited the production of nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and the expression of proinflammatory cytokines such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-6 (IL-6) in a concentration-dependent manner. However, it had no effect on the expression of TNF- $\alpha$ . Consistent with these findings, Western blot analysis demonstrated that DCS inhibited LPS-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase type-2 (COX-2) expression via inhibition of phosphorylation of inhibitory kappa B- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) through down-regulation of phosphorylated Akt, ERK and p38. Furthermore, DCS markedly inhibited melanin synthesis and tyrosinase activity in concentration-dependent manner. Western blotting showed that DCS treatment inhibited the expression of tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein 2 (TRP-2) via inhibition of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression. These results indicate that DCS may be used as potential drugs for the treatment of inflammatory diseases and as melanogenesis inhibitor.

**Keywords:** D-(+)-cycloserine, antibiotics, anti-inflammation, NF- $\kappa$ B, Akt, MAPK, anti-melanogenesis, bioactivity, melanin, tyrosinase, MITF



## I. 서 론

최근, 고전적으로 사용되던 항생제의 새로운 분야로의 활용 가능성에 상당한 관심을 끌고 있습니다. 오랜 시간 동안 항생제는 인류의 건강을 유지하기 위해, 미생물에 대한 감염에 대항하여 증식을 억제하거나 살균하기 위한 용도로 사용되었습니다[1-3]. 항생제는 인류의 건강을 유지하기 위해 사용되면서, 질병으로부터 좀 더 자유로워졌으며, 평균 수명도 연장되었습니다[4, 5]. 항생제의 사용이 증가함에 따라 미생물도 항생물질에 대해 내성을 갖도록 진화하면서, 연구자들은 내성균에 대한 활성을 가지는 새로운 약물을 개발해왔으며 이에 따라 새로운 내성균에 의해 기존 항생제들은 항균물질로써 효과적으로 활용되지 못하고 다른 약물로 대체되었습니다[6-8]. 이번 연구에서는 경제적인 이유로 폐기되거나 다른 약물로 대체되어 효과적으로 활용되지 못하는 기존 항생제에 관하여 새로운 분야에서의 활용 가능성을 연구하고자 했습니다.

본 연구에 사용된 시료인 D-(+)-cycloserine (DCS)은 *Streptomyces orchidaceus*에서 분리된 항생제이며, 주로 외상 후 스트레스 장애, 불안장애 및 결핵을 치료하는 데 사용되고 있습니다[9-11]. 또한, DCS가 다른 항생제 등 다른 약물과 동시 처리를 통한 시너지 효과에 관해서는 연구가 보고되고 있으나, DCS의 염증 개선 효과 및 미백 활성에 관한 연구는 미흡한 실정입니다[12, 13]. 본 연구는 DCS 항생제의 새로운 염증 치료의 가능성을 조사하고, 멜라닌 생성억제 효과가 있는지 확인하기 위해, LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 대식세포와  $\alpha$ -MSH에 의해 자극된 B16F10 세포를 사용하여 DCS의 항염증 및 미백 활성에 관한 연구를 진행하였습니다.

염증은 병원체 또는 조직 손상 침입에 대한 반응으로 숙주 방어의 보호 메커니즘입니다[14]. 병원체에 의해 감염되면, 대식세포는 식균 작용을 통해 병원체를 제거하고 nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) 및 IL-6와 같은 다양한 염증 매개체를

생성함으로써, 면역 세포 모집을 통해 염증 반응을 강화합니다[15, 16]. 이러한 염증 과정은 생체 내 항상성을 유지하는 데 필수적이지만, 장기간 또는 과도한 염증은 천식, 아토피성 피부염, 죽상 동맥 경화증 및 염증성 장 질환과 같은 질병의 발병을 유발합니다[17]. 따라서 염증 수준을 적절히 조절할 필요가 있습니다.

Lipopolysaccharide (LPS)는 내독소로서 작용하는 Gram(-) bacteria의 세포 외막의 기본 성분입니다[18]. 대식세포는 세포 표면상의 패턴 인식 수용체를 통해 LPS의 병원체 관련 분자 패턴을 인식함으로써 활성화됩니다[19]. 활성화된 대식세포는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 을 비롯한 전 염증성 cytokine과 NO 및 PGE<sub>2</sub> 와 같은 몇몇 염증 매개물질을 생성하는 특징이 있는데, 이렇게 분비된 전 염증성 매개체는 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 및 mitogen activated protein kinase (MAPK) 신호 경로의 활성화에 의해 매개되는 유도성 유전자의 발현을 통해 조절됩니다[20-22].

NF- $\kappa$ B는 동중 또는 이종 이합체의 형태로 존재하는 전사 인자입니다[23]. 자극 받지 않은 상태에서, NF- $\kappa$ B는 inhibitor kappa B alpha (I $\kappa$ B- $\alpha$ )에 의해 결합된 채로 세포질에서 엄격히 통제됩니다[24]. NF- $\kappa$ B 신호전달경로의 활성화는 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 통해 proteasome에 의한 ubiquitination 및 후속 분해를 유발함으로써 조절되는데, 이는 MAPK 및 phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) 신호전달경로를 통해 활성화됩니다[25]. NF- $\kappa$ B 신호전달경로가 활성화되면, I $\kappa$ B $\alpha$ 가 분해되면서 자유로워진 NF- $\kappa$ B 이합체는 세포질에서 핵으로 빠르게 이동하고, 반응성 유전자의 프로모터에 결합하여 iNOS, COX-2 및 전 염증 매개체를 포함하는 유도성 표적 유전자의 전사를 활성화합니다[26].

MAPK는 잘 보존된 serine/threonine kinase로 유전자 발현, 유사 분열, 분화 및 세포 생존/소멸을 조절하는 세포 활성화에서 중요한 역할을 담당합니다[27]. MAPK는 extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2), c-jun N-terminal kinases 1/2 (JNK 1/2) 및 p38를 포함하는 3개의 단백질 kinase들로 구성됩니다[28]. MAPK는 인산화에 의해 활성화되고 유전자 발현을 조절하는 NF- $\kappa$ B 및 acti

vator protein-1 (AP-1)의 활성화를 유도합니다[29]. 따라서, NF- $\kappa$ B 및 MAPK 신호전달경로는 항염증 효과에 대한 주요 표적으로 간주할 수 있습니다.

피부는 태양으로부터 오는 자외선과 같은 외부자극으로부터 신체를 보호하기 위한 방어체계를 가지고 있습니다[30, 31]. 피부가 자외선에 노출되면, 각질 세포는  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)을 분비함으로써 멜라닌 세포를 자극하며, 흑갈색의 색소인 멜라닌생성을 유도합니다[32, 33]. 이렇게 생성된 멜라닌은 각질 세포로 전달되어, 자외선을 반사 및 분산시켜 강한 자외선 에너지를 감소시킬 뿐만 아니라 피부 내부에 침투한 자외선 및 자유라디칼을 흡수하여 태양광에 의한 손상으로부터 DNA를 보호하는 역할을 합니다[34-36]. 이처럼 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하기 위해 중요한 역할을 하지만, 필요 이상으로 생성되면 기미, 주근깨와 같은 과 색소 침착증을 유발할 수 있으며, 심할 경우, 흑색종과 같은 피부암까지 발병될 수 있다고 알려져 있습니다[37-39]. 따라서 적절하게 멜라닌을 생성을 조절하는 것이 필요합니다.

멜라닌 생합성은 tyrosinase (TYR), tyrosinase related protein 1 (TRP-1) 및 tyrosine-related protein 2 (TRP-2)와 같은 반응을 촉매하는 다양한 효소가 관여합니다[40, 41]. 특히, TYR은 멜라닌 생합성의 속도 결정 단계를 담당하는 주효소로, 멜라닌 생합성과정의 초기 두 단계에서 비필수 아미노산인 L-tyrosine을 수산화 반응시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로, DOPA에서 산화 반응시켜 DOPA quinone으로의 반응을 촉매하는 역할을 합니다[42]. 이후, DOPA quinone은 자발적 산화 과정을 거쳐 DOPA chrome이 형성되고, 이어서 생성된 DOPA chrome은 TRP-2로 잘 알려진 DOPA chrome tautomerase에 의해 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로의 변환이 촉진됩니다[43]. DHICA는 다시 TRP-1에 의해 indole-5,6-quinone carboxylic acid로 전환되고, 이후 자동 산화 반응을 거치고, 서로 결합함으로써 멜라닌이 합성됩니다[44]. 멜라닌의 생합성과정은 효소의 역할이 중요하게 작용하기 때문에, 멜라닌의 생성량은 TYR, TRP-1 및 TRP-2 와 같은 효소의 활성과 깊은 연관이 있습니다.

$\alpha$ -MSH는 생체 내에서 생리적 리간드로써 작용하는 호르몬으로, melanocortin 1 receptor (MC1R)에 결합하고 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 신호 전달경로를 활성화하여 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 전사 인자의 발현을 촉진 시키는 것으로 알려져 있습니다[45, 46]. MITF 전사 조절인자는 활성화되면, 핵으로 이동하여 DNA의 TYR, TRP-1 및 TRP-2의 생성에 관여하는 promoter에 결합하고, 각각의 유전자 발현을 증가시킴으로써 TYR, TRP-1 및 TRP-2의 생성을 조절한다고 보고되었습니다[47, 48]. 따라서, MITF의 발현은 멜라닌생성을 반영하는 지표로써 사용될 수 있습니다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 D-(+)-cycloserine (DCS), lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS), fetal bovine serum (FBS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), Griess reagent, sodium nitrite 및 protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, 세포 배양을 위한 배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)과 penicillin/streptomycin을 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구매하였습니다. 또한, The enhanced chemiluminescence (ECL) kit, radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, phosphate buffered saline (PBS) 및 tris-buffered saline (TBS)는 Biosesang (Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구매하였으며, 양성 대조군으로 사용된 L-N<sup>6</sup>-(1-Iminoethyl) lysine dihydrochloride (L-NIL) 과 N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulfonamide (NS-398)는 Cayman chemical company (Ann Arbor, MI, USA)에서 구매하였습니다. p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-Akt, Akt, p-I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ ,  $\beta$ -actin의 특이적 1차 항체와 anti-rabbit 및 anti-mouse antibodies 2차 항체는 Cell signaling technology (Beverly, MA, USA)에서 구매 후 사용하였습니다. 이외에 anti-iNOS 항체는 Milipore (Temecula, CA, USA)에서 구매하였으며 anti-COX-2 항체는 BD Sciences (San Diego, CA, USA)에서 구매하였습니다. PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 측정을 위한 ELISA kits는 R&D systems Inc. (St. Louis, MO, USA)와 BD Biosciences (San Diego, CA, USA)에서 구매하였습니다. 모든 다른 시약들은 분석등급 이상으로 사용하였습니다.

### 2. 세포 배양

한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 RAW 264.7 세포와 B16F10 세포

를 구매하였습니다. 세포 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS)와 1% Penicillin/Streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지를 사용하여 각각 2일, 3일 간격으로 계대배양 하였습니다.

### 3. 세포 생존율 평가

시료의 세포 독성을 평가하기 위해서 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였습니다. RAW 264.7 세포는  $1.0 \times 10^5$  cells/well로, B16F10 melanoma 세포는 24 well plate에  $8.0 \times 10^3$  cells/well로 24 well plate에 넣고 24시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 전 배양한 후, 시료를 처리하여 RAW 264.7 세포는 24시간, B16F10 세포는 72시간 동안 반응시켰으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Amnesco, USA) 시약을 0.2 mg/mL 농도로 처리하여 4시간 동안 생성된 보라색의 formazan 결정을 세포 생존율로써 측정하였으며, DMSO로 용해하고 microplate reader를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정함으로써 평가하였습니다. 세포 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군(Control)의 OD 값을 비교계산하여 백분율로 나타내었습니다.

$$\text{Cell viability (\% of control)} = (\text{sample O.D}_{540\text{nm}} / \text{control O.D}_{540\text{nm}}) \times 100 (\%)$$

### 4. NO 생성량 측정

D-(+)-cycloserine이 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 대식세포 내에서 NO 생성을 저해하는지 확인하기 위해서, 세포 배양액 속에 축적된 NO를 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine, 2.5% phosphoric acid)을 사용하여 nitrite 형태로 측정하였습니다. 세포를 24 well plate에  $1.0 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24시간 전 배양하였습니다. 이후, 시료를 처리하고 1시간에 LPS를 1 µg/mL 농도로 24시간 동안 처리하였습니다. 이후, 처리된 세포 배양액을 Griess 시약과 1:1 비율로 혼합하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였습니다. Sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)의 표준검정

곡선을 작성한 후, 측정된 OD 값을 비교하여 NO 생성을 정량계산하였습니다.

## 5. Prostaglandin E2 및 전 염증성 cytokine 생성량 측정

D-(+)-cycloserine이 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 대식세포 내에서 염증 반응 매개체의 생성을 저해하는지 확인하기 위해서, 세포 배양액 속에 축적된 PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 ELISA kit를 사용하여 평가하였습니다. 세포는 24 well plate에 1.0 x 10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 24시간 전 배양하였습니다. 시료를 1시간 동안 전처리하고, LPS를 1  $\mu$ g/mL 농도로 24시간 동안 처리하였습니다. 이후, 세포 배양액을 5000 rpm 속도로 5분간 원심 분리한 후, 상등액을 통해 ELISA kit 제조사의 방법에 따라 PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 함량을 측정하였습니다.

## 6. Melanin 생성량 측정

DCS가 B16F10 세포의 멜라닌생성에 미치는 영향을 확인하기 위해서 melanin contents assay를 진행하였습니다. 60 mm cell culture dish에 세포를 5.0 x 10<sup>4</sup> cells/dish가 되도록 3 mL씩 분주하여 24시간 전 배양하고, 다양한 농도의 시료와  $\alpha$ -MSH를 200 nM 농도로 처리하여 72시간 배양하였습니다. kojic acid는 500  $\mu$ M 농도로 처리하여 양성 대조군으로 사용하였습니다. 배양 후, 처리된 세포는 배지를 제거하고 차가운 1X PBS buffer를 사용하여 1회 세척 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, and 1% protease inhibitor cocktail)를 사용하여 20분간 세포를 lysis 시킨 후, microtube에 옮겨 담아 4 $^{\circ}$ C, 15,000rpm 조건에서 15분간 원심분리하여 세포용해물을 얻었습니다. 상등액을 제거하고 분리된 pellet에 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH를 500  $\mu$ L씩 넣어 100 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리하였습니다. 이후 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 옮겨 담아 405 nm에서 흡광도를 측정하고,  $\alpha$ -MSH만 단독 처리한 군과 백분율로 비교 계산하여 나타냈습니다.

## 7. 세포 내 tyrosinase 효소 활성 측정

60 mm cell culture dish에 세포를  $5.0 \times 10^4$  cells/dish가 되도록 3 mL씩 분주하여 24시간 전 배양하고, 다양한 농도로 시료와  $\alpha$ -MSH를 200 nM 농도로 처리하여 72시간 배양하였습니다. kojic acid는 500  $\mu$ M 농도로 처리하여 양성 대조군으로 사용하였습니다. 배양 후, 처리된 세포는 배지를 제거하고 차가운 1X PBS buffer를 사용하여 1회 세척 하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, and 1% protease inhibitor cocktail)를 사용하여 20분간 세포를 lysis한 후, microtube에 옮겨 담아 4°C, 15,000 rpm 조건에서 15분간 원심분리하여 세포용해물을 얻었으며, 이때 얻은 상등액을 취한 후, BCA Protein assay kit를 사용하여 상등액의 단백질 함량을 측정하고, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 사용하여 단백질 농도가 20  $\mu$ g/ $\mu$ L가 되도록 희석하였습니다. 희석한 단백질 20  $\mu$ L를 96-well plate에 넣고 기질인 L-DOPA를 2 mg/mL 농도로 80  $\mu$ L 첨가하였습니다. 37°C에서 2시간 동안 배양 후 생성되는 DOPA chrome을 490 nm에서 흡광도를 측정하고,  $\alpha$ -MSH만 단독 처리한 군과 백분율로 비교계산하여 나타냈습니다.

## 8. 단백질 추출

RAW 264.7 세포는 60 mm cell culture dish에 세포를  $6.0 \times 10^5$  cells/dish로 36시간 전 배양하였으며, 다양한 농도의 시료와 LPS를 1  $\mu$ g/mL로 처리하여 각각 표시된 시간 동안 배양하였습니다. B16F10 세포는 60 mm cell culture dish에 세포를  $5.0 \times 10^4$  cells/dish로 48시간 전 배양하였으며, 다양한 농도로 시료와  $\alpha$ -MSH를 200 nM 농도로 처리하여 각각 표시된 시간 동안 배양하였습니다. 처리된 세포는 차가운 1X PBS buffer를 사용하여 1회 세척 하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, and 1% protease inhibitor cocktail)를 사용하여 20분간 세포를 lysis한 후, microtube에 옮겨 담아 4°C, 15,000 rpm 조건에서 15분간 원심분리하여 세포용해물을 얻었습니다.



## 9. 단백질 분리

추출한 세포용해물은 BCA Protein assay kit를 사용하여 bovine serum albumin (BSA)의 표준검정 곡선을 작성한 후, 측정된 OD 값을 비교하여 세포용해물 속의 단백질 함량을 정량계산하였습니다. 동량의 단백질과 2x Laemmli sample buffer을 1:1 비율로 혼합하여 100℃에서 5분간 처리 후, sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel에 동량의 단백질을 loading하고, 전기영동을 통해 단백질을 크기별로 분리하였습니다. Gel에 분리된 단백질을 PVDF membrane으로 transfer 한 후 5% BSA로 overnight blocking 하였습니다. 0.1 % Tween 20이 첨가된 Tris-buffered saline buffer (TBS-T)를 사용하여 membrane을 10분 간격으로 6회 세척 후 1차 항체를 사용하여 overnight incubation 하였습니다. 이후, TBS-T로 6회 세척 하고 horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체를 사용하여 2시간 처리하였습니다. 다시 TBS-T로 6회 세척 하고 ECL kit를 사용하여 membrane과 반응시켜 Chemidoc (Fusion solo 6S.WL, VILBER LOURMAT, France)으로 현상하였습니다.

## 10. 통계처리

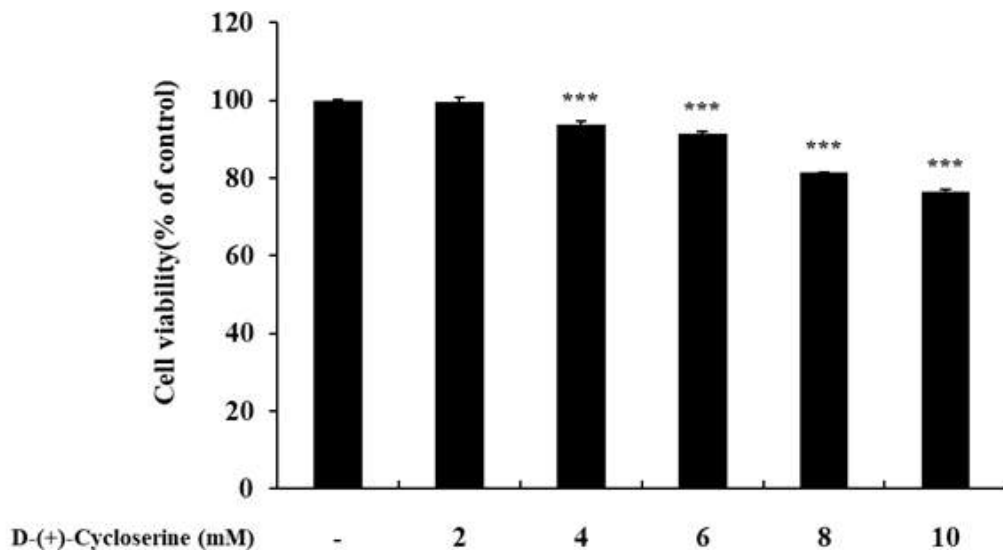
모든 데이터는 3번의 독립적인 실험으로부터의 평균  $\pm$  SD (표준 편차)로 표시 하였습니다. student's t-test를 사용하여 통계 분석을 수행하였습니다(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).  $p < 0.05$ 의 p-value 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였습니다.

### III. 결 과

#### 1. D-(+)-cycloserine (DCS)의 항염증 활성

##### 1) 세포 생존율 평가

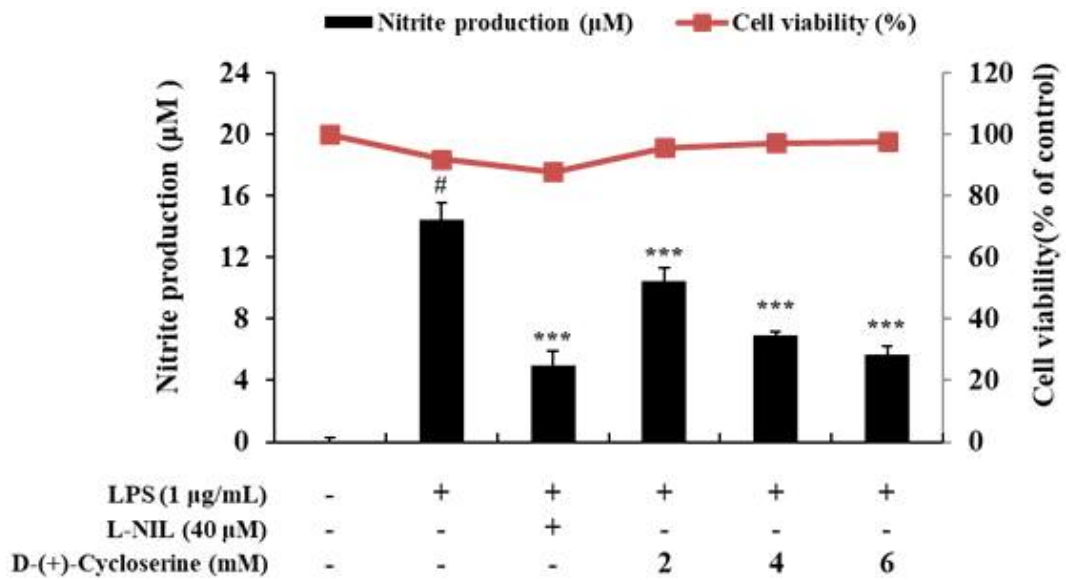
RAW 264.7 대식세포에서 항염증 활성을 가지는지 확인하기 위해서, DCS가 RAW 264.7 세포에 대하여 DCS가 세포 독성에 영향을 미치는지 확인하였습니다. 세포 생존율에 대한 평가는 MTT assay를 통하여 실시하였습니다. RAW 264.7 세포를  $1.0 \times 10^5$  cells/well 농도로 24-well cell culture plate에 24시간 동안 전 배양을 하였습니다. 이후, 임의로 설정한 다양한 농도(2, 4, 6, 8 및 10 mM)로 DCS를 24시간 처리하였습니다(**Fig. 1**). 세포 생존율은 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소를 통해 MTT solution (0.2 mg/mL) 가 tetrazolium salt로 전환 된 MTT formazan crystal을 흡광도 540nm에서 측정함으로써 평가하였습니다[20]. DCS는 2-6 mM (세포 생존율  $\geq 90\%$ ) 농도 범위에서 RAW 264.7 세포의 생존력에 영향을 미치지 않았습니다. 따라서, 우리는 후속 실험에서 DCS를 2-6 mM 농도로 처리하여 사용했습니다.



**Figure 1.** The effect of DCS on the viability of RAW 264.7 cells. Cells were plated in 24-well plates ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) for 24 h, and then treated with DCS (2, 4, 6, 8, and 10 mM) for 24 h. Cytotoxicity of DCS was evaluated using the MTT assay. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$  vs unstimulated control group. The results shown are representative of three independent experiments.

## 2) NO 생성량 측정

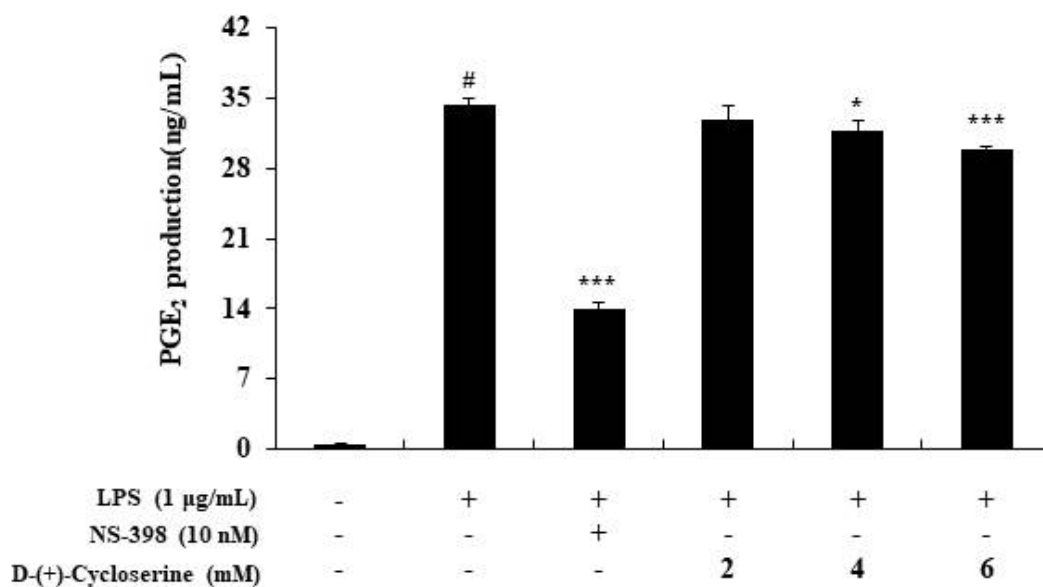
DCS가 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성을 억제할 수 있는지 조사하기 위해, Griess 시약을 사용하여 세포 배양 배지 속에 축적된 NO의 생성량을 아질산염 형태로 측정했습니다. 또한, iNOS 특이적 억제제인 N6-(1-iminethyl)-L-lysine, dihydrochloride (L-NIL)를 양성 대조군으로 실험에 사용하였습니다. (Fig. 2)와 같이, LPS 단독 처리 군은 LPS 미처리 군에 비교하여 NO 생성 수준이 현저하게 증가 되었습니다. iNOS 저해제는 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 효과적으로 억제하였습니다. DCS는 LPS만 처리한 세포(100%)와 비교하여 2-6 mM 농도에서 27.5 %, 51.8 % 및 60.5 %씩 농도 의존적으로 억제하였습니다(Fig. 2).



**Figure 2.** The effect of DCS on production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were plated in 24-well plates ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) and incubated for 24 h, and then pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h followed by LPS stimulation for 24 h. Cytotoxicity of DCS was evaluated using a MTT assays. The amount of nitric oxide in the medium was measured using a Griess reagent. L-N<sup>6</sup>-(1-Iminoethyl) lysine dihydrochloride(L-NIL) was used as a positive control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  vs unstimulated control group. <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.

### 3) Prostaglandin E2 생성량 측정

DCS가 RAW 264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제할 수 있는지 조사하기 위해, ELISA의 방법으로 세포 배양 배지 속의 PGE<sub>2</sub>의 양을 평가하였습니다. (Fig. 3)와 같이, COX-2 단백질의 특이적 억제제인 N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methanesulfonamide (NS-398)를 양성 대조군으로 실험에 사용하였습니다. LPS는 PGE<sub>2</sub> 생성의 급격한 증가를 유도하였습니다. COX-2 저해제는 LPS에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub> 생성을 효과적으로 억제하였습니다(59.5%). DCS는 시험된 농도에서 PGE<sub>2</sub> 생성을 약간 억제하였다(4.3%, 7.7% 및 12.7%) (Fig. 3).

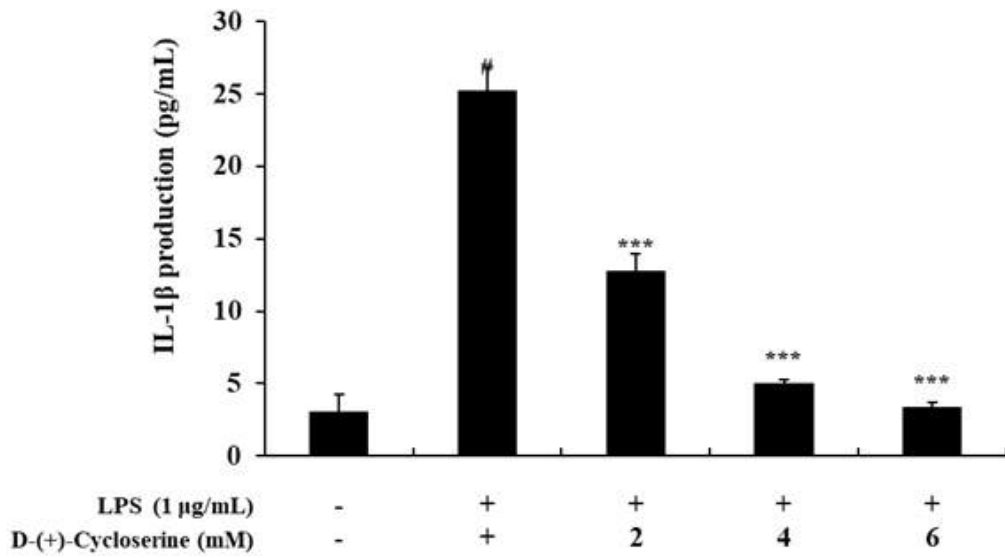


**Figure 3.** The effect of DCS on production of PGE<sub>2</sub> in the LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then stimulated for 20 h with LPS. N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulfonamide (NS-398) was used as a positive control. PGE<sub>2</sub> production was determined by ELISA. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. #*p* < 0.001 vs unstimulated control group. \**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001 vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.

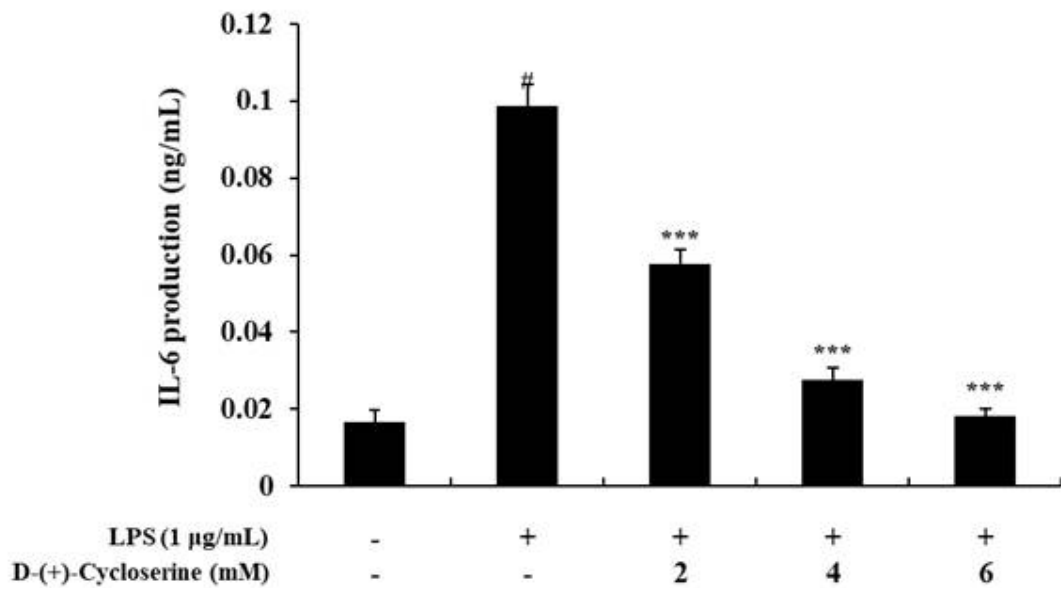
#### 4) 전 염증성 cytokine 생성량 측정

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6과 같은 잘 알려진 전 염증성 사이토카인은 병원성 자극에 의해 활성화되고 다양한 질병과 관련된 염증 반응을 매개한다고 알려져 있습니다[29-31]. DCS의 항염증에 대한 추가적 가능성을 조사하기 위해, ELISA를 사용하여 LPS에 의해 자극된 RAW 264.7 세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6과 같은 전 염증성 사이토카인의 생성을 측정하였습니다. LPS 자극은 세포 배양 배지 속의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성을 유도하였다. 시험된 농도에서, DCS는 농도 의존적 방식으로 IL-1 $\beta$  (49.3 %, 80.1 % 및 86.6 %) 및 IL-6 (41.6 %, 71.9 % 및 81.6 %)의 LPS에 의해 유도된 IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성을 억제하였습니다. (**Fig. 4,5**). 그러나, DCS는 LPS에 의해 유도된 TNF- $\alpha$  생성에 영향을 미치지 않았습니다. (**Fig. 6**)

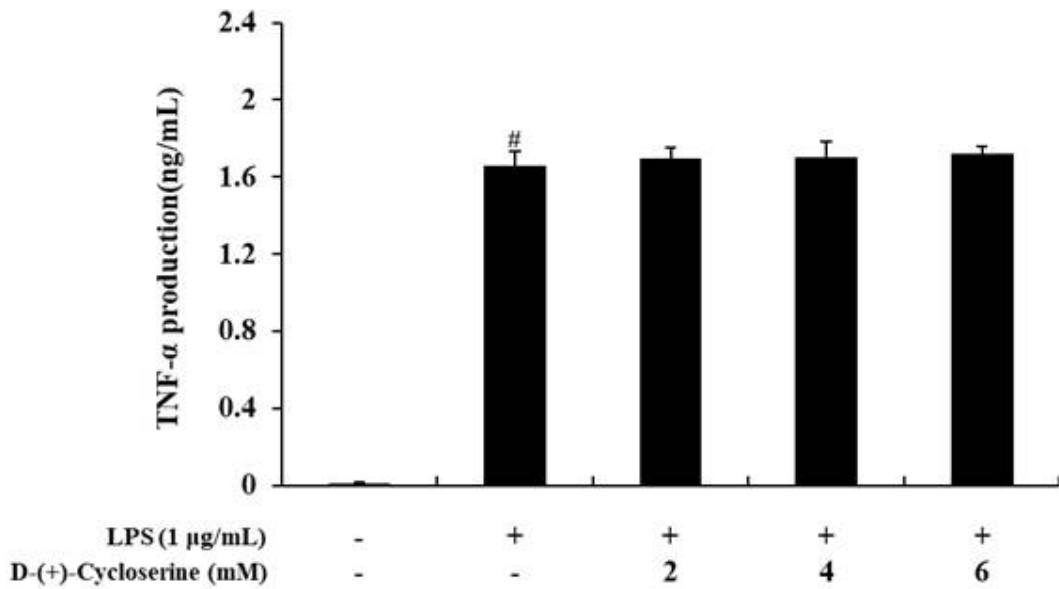




**Figure 4.** The effect of DCS on the LPS-induced production of IL-1 $\beta$  in RA W 264.7 cells. Cells were pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then stimulated for 20 h with LPS. The production of IL-1 $\beta$  were determined using ELISA. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. # $p$  < 0.001 vs unstimulated control group. \*\*\* $p$  < 0.001 vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.



**Figure 5.** The effect of DCS on the LPS-induced production of IL-6 in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then stimulated for 20 h with LPS. The production of IL-6 was determined using ELISA. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. # $p < 0.001$  vs control group. \*\*\* $p < 0.001$  vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.

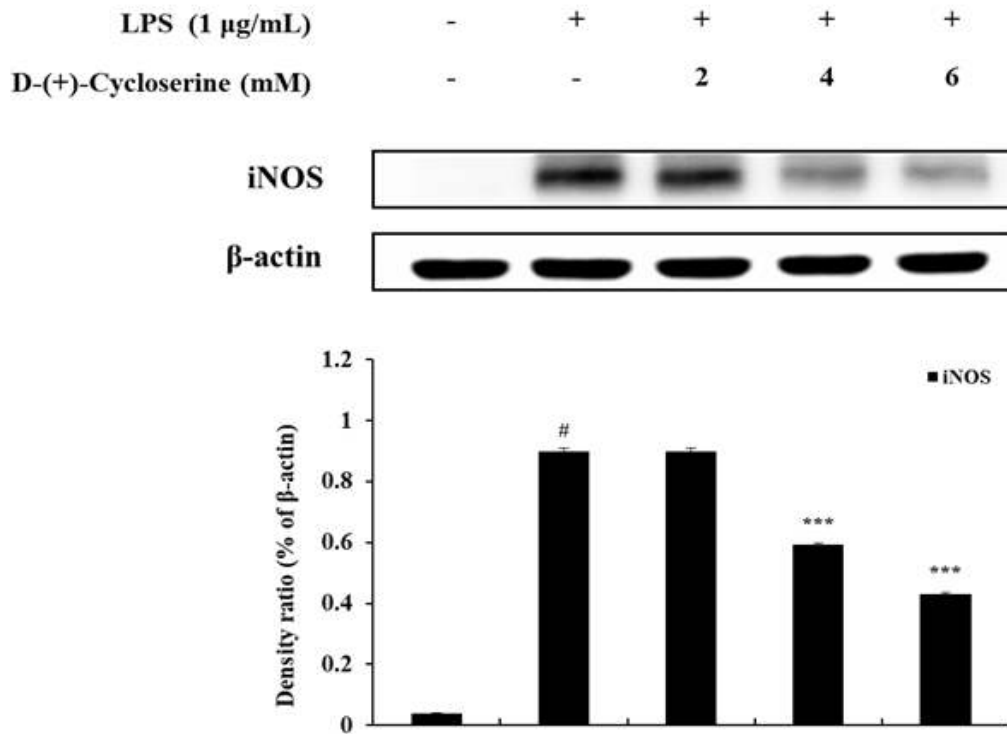


**Figure 6.** The effect of DCS on the LPS-induced production of TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells. Cells were pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then stimulated for 20 h with LPS. The production of TNF- $\alpha$  were determined using ELISA. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  vs control group. The results shown are representative of three independent experiments.

## 5) Western blot 분석

### (1) iNOS 효소단백질 발현량 측정

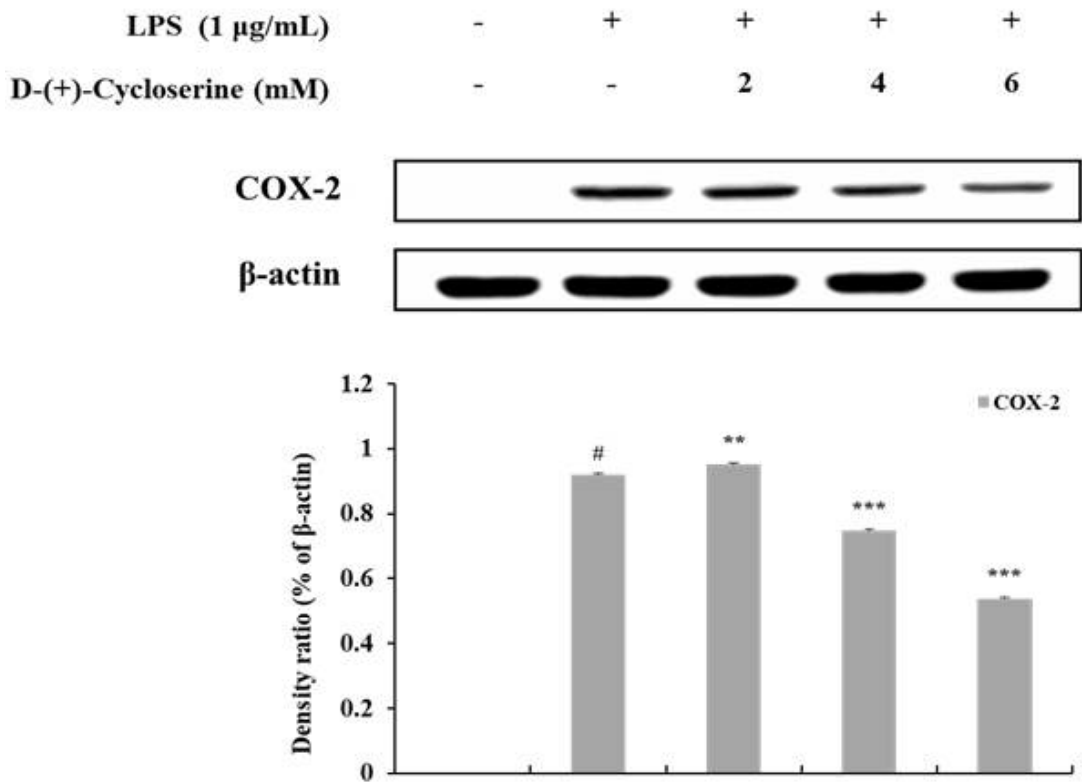
LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서의 DCS의 NO 생성억제 효과가 iNOS 단백질 발현의 하향조절을 통한 것인지 조사하기 위해, Western blot 분석을 수행하였습니다. Western blot 분석 결과는 LPS만 단독으로 자극된 그룹에서 iNOS 단백질의 발현이 급격히 증가한 것을 확인하였습니다. 그러나, DCS 처리 후 LPS로 자극된 그룹은 농도 의존적 방식으로 iNOS 단백질의 발현이 감소한 것으로 나타났습니다(**Fig. 7**). 이들 결과는 DCS가 iNOS 효소 단백질의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 억제한다는 것을 보여 주고 있습니다.



**Figure 7.** The effect of DCS on the level of iNOS in LPS-induced RAW 264.7 cells. Lysates were prepared from cells pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then treated with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 12 h.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against iNOS and  $\beta$ -actin.

## (2) COX-2 효소단백질 발현량 측정

LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서의 DCS의 PGE<sub>2</sub> 생성억제 효과가 COX-2 단백질 발현의 하향조절을 통한 것인지 조사하기 위해, Western blot 분석을 수행하였습니다. Western blot 분석 결과는 LPS만 단독으로 자극된 그룹에서 COX-2 단백질의 발현이 급격히 증가한 것을 확인하였습니다. 그러나, DCS 처리 후 LPS로 자극된 그룹은 농도 의존적 방식으로 COX-2 단백질의 발현이 약간 저해되는 것으로 나타났습니다(**Fig. 8**). PGE<sub>2</sub> 생성이 저해되는 결과와 유사하게 DCS는 COX-2의 단백질 발현을 약간 감소시키는 것을 확인하였습니다. 이 결과는 DCS가 COX-2 효소 단백질의 발현을 저해함으로써 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제한다는 것을 보여 주고 있습니다.

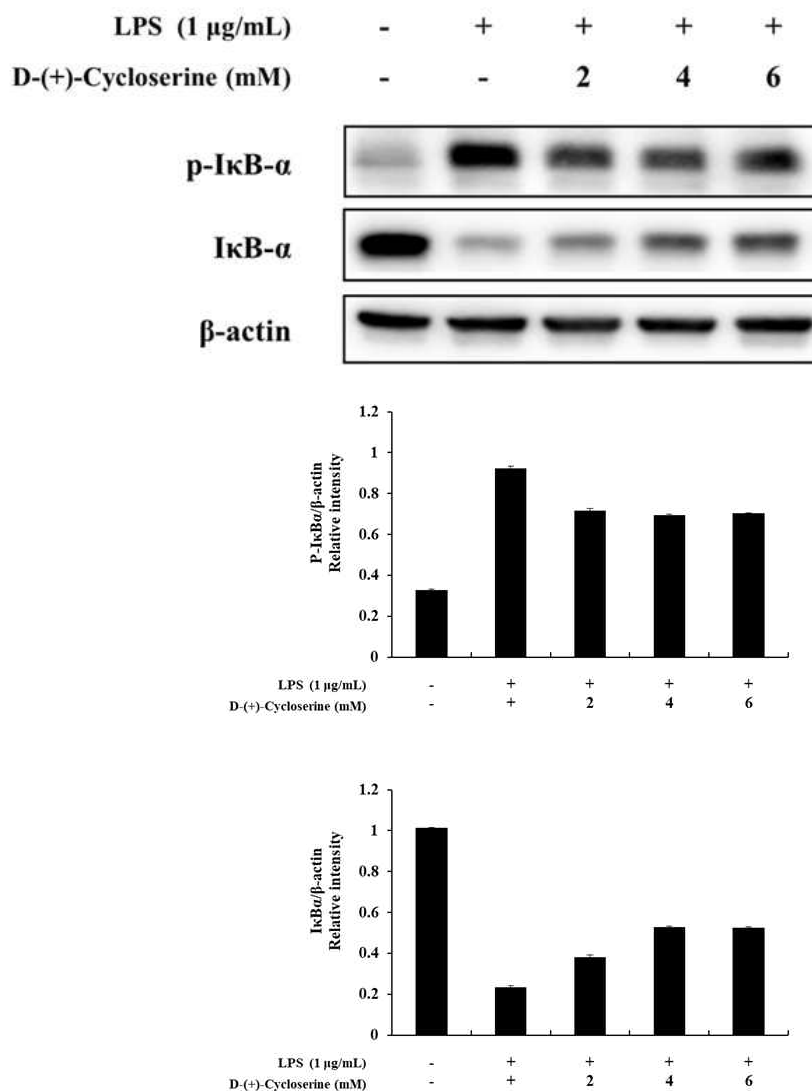


**Figure 8.** The effect of DCS on the level of COX-2 in LPS-induced RAW 26 4.7 cells. Lysates were prepared from cells pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then treated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 12 h.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against COX-2 and  $\beta$ -actin.

### (3) I $\kappa$ B- $\alpha$ 인산화 단백질 발현량 측정

DCS가 NF- $\kappa$ B 신호전달경로를 통해 염증성 사이토카인 생성 및 유도성 효소단백질의 발현을 조절하는지 확인하기 위해서, Western blot 분석을 하여 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 I $\kappa$ B- $\alpha$  및 인산화된 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 단백질 수준을 확인하였습니다. (**Fig. 9**)과 같이, LPS는 표시된 시간에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 유도하였습니다. 그리고 DCS는 LPS에 의해 유도된 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였습니다. 이러한 결과와 일치하게, DCS는 농도 의존 방식으로 세포질에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제하였습니다. 이전 연구에서, NF- $\kappa$ B는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6과 같은 전 염증성 매개체의 발현을 매개하고 iNOS 및 COX-2와 같은 염증성 효소의 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있습니다. 이 결과는 DCS가 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 조절을 통해 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제함으로써 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제함을 나타냅니다.

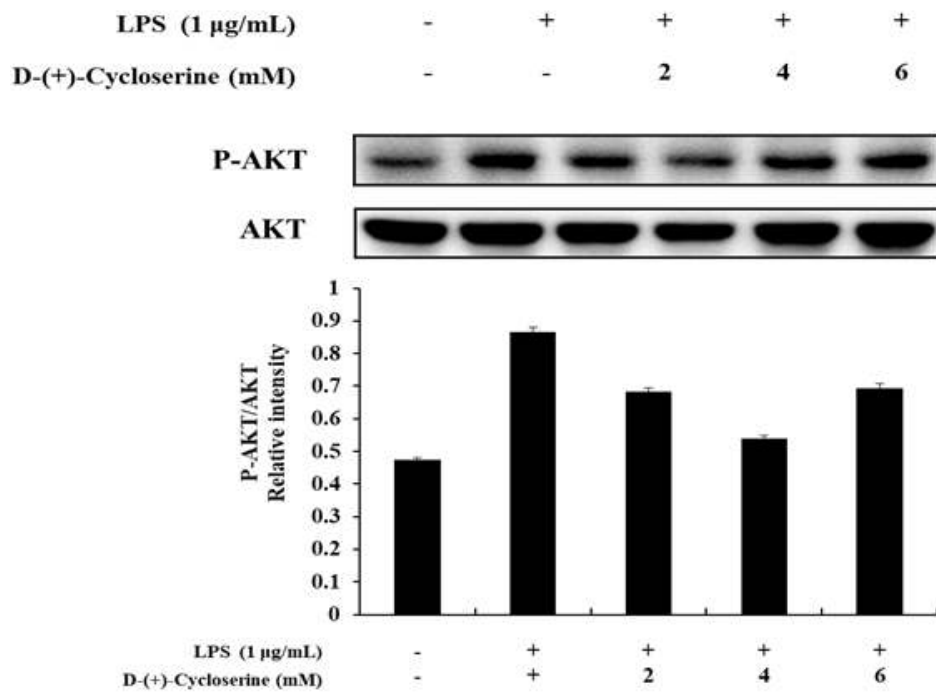




**Figure 9.** The effect of DCS on the level of phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  and I $\kappa$ B- $\alpha$  in LPS-induced RAW 264.7 cells. Lysates were prepared from cells pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then treated with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 15 min.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ , and  $\beta$ -actin.

#### (4) Akt 인산화 단백질 발현량 측정

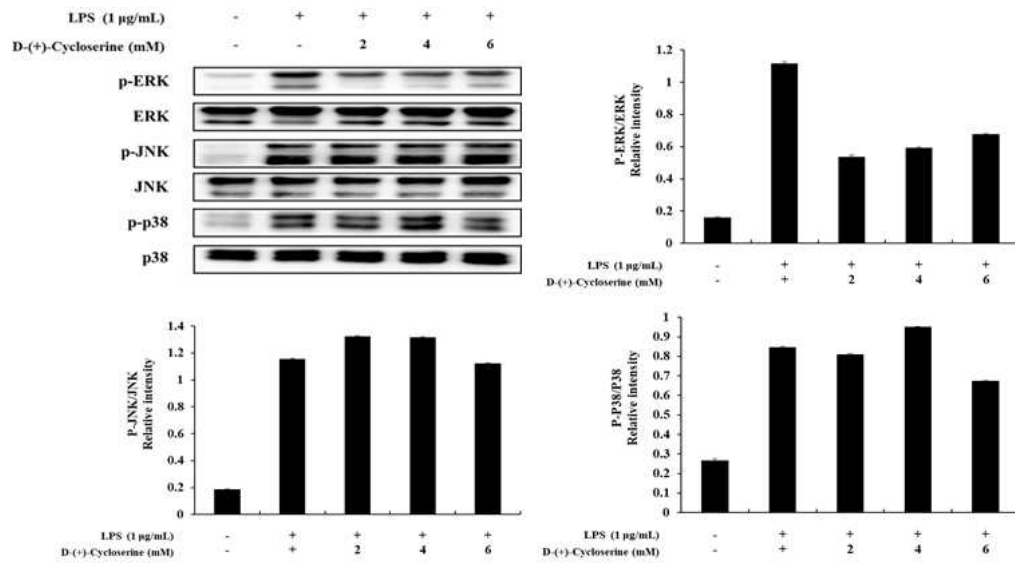
DCS가 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 억제함을 확인하였습니다. 이전 연구는 PI3K/Akt 신호전달 경로를 통해 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 촉진함으로써, NF- $\kappa$ B 활성화를 유도하는 것으로 보고되었습니다[12]. DCS가 PI3K/Akt 경로를 통해 NF- $\kappa$ B 활성화를 조절하는지 확인하기 위해서, Western blot 분석을 통해 Akt의 인산화에 대한 DCS의 영향을 확인하고자 하였습니다. 연구결과, DCS는 표시된 시간에서 LPS에 의해 유도된 Akt 인산화를 하향조절함을 확인하였습니다(**Fig. 10**).



**Figure 10.** The effect of DCS on the level of phospho-Akt and Akt in LPS-induced RAW 264.7 cells. Lysates were prepared from cells pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then treated with LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for 10 min.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against phospho-Akt, Akt, and  $\beta$ -actin.

#### (5) MAPK 인산화 단백질 발현량 측정

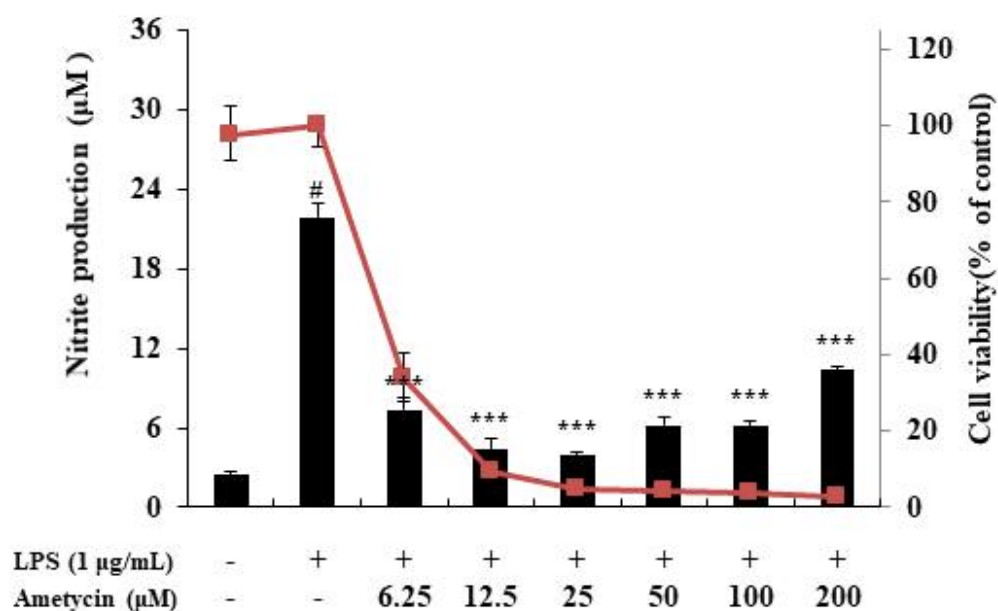
DCS가 MAPK의 인산화를 조절하는지 조사하기 위해, LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 DCS의 다양한 농도(2, 4 및 6 mM)에서 Western blot 분석을 통해 ERK, JNK 및 p38의 인산화를 조절하는지 조사하였습니다. LPS 처리군은 LPS 미처리 군에 비교하여 인산화된 ERK, JNK 및 p38이 현저히 증가한 것으로 나타났습니다. DCS는 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 ERK의 인산화를 하향 조절함을 확인하였으며, p38의 인산화에서 약간의 감소가 나타났습니다.



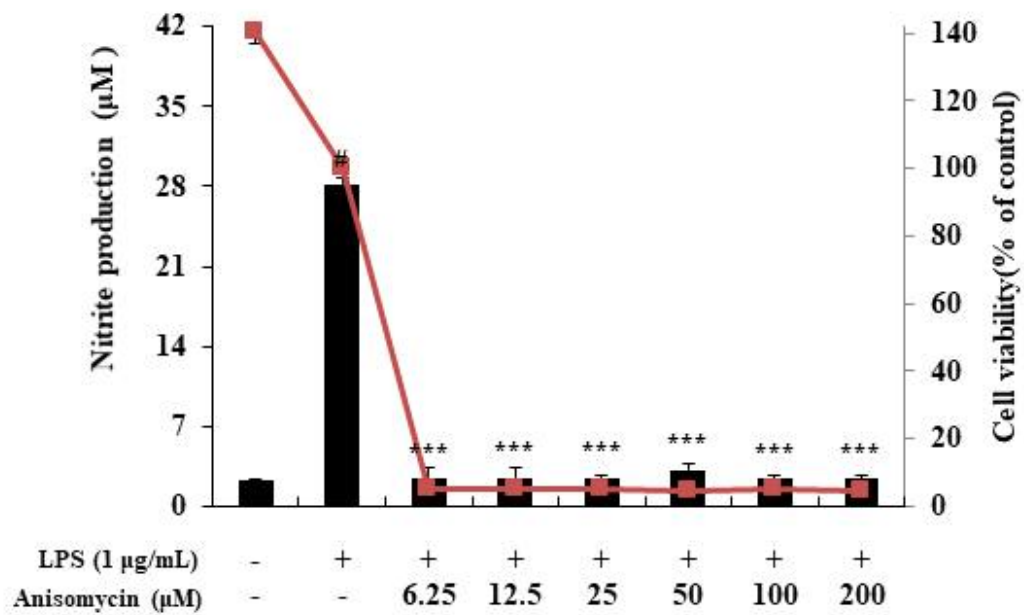
**Figure 11.** The effect of DCS on the LPS-induced MAPK in RAW 264.7 cells. Lysates were prepared from cells pretreated with DCS (2, 4, and 6 mM) for 1 h and then treated with LPS (1 µg/mL) for 15 min. β-actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against phospho-ERK, ERK, phospho-JNK, JNK, phospho-p38, p38 and β-actin.

## 6) 항생제 세포 생존율 및 NO 생성량 스크리닝 평가

DCS 외 다른 항생제의 항염증 활성화에 관하여 확인하기 위해 ametycin, anisomycin, azithromycin, roxithromycin, spiramycin, splitomicin이 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 억제하는지 평가하였다. 스크리닝 평가는 임의로 농도를 설정하여 6.25  $\mu$ M-200  $\mu$ M 농도의 범위에서 MTT assay를 통해 세포 생존율을 평가하였으며, Griess 시약을 사용하여 세포 배양액 속에 축적된 NO의 생성량을 아질산염 형태로 측정했습니다. LPS 처리는 RAW 264.7 대식세포에서 현저하게 증가된 NO 생성 수준을 나타냈습니다. ametycin과 anisomycin은 임의로 설정한 농도 내에서 RAW 264.7 세포 독성을 나타내었습니다(**Fig. 12, 13**). azithromycin과 roxithromycin은 각각 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M 농도에서 독성 없이 NO의 생성을 저해하는 것을 확인하였습니다(**Fig. 14, 15**). 또한, spiramycin은 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았으며, LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 농도 의존적 방식으로 억제하였습니다(**Fig. 16**). splitomicin의 경우, 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았으며, NO의 생성에 대해서도 활성이 나타나지 않았습니다(**Fig. 17**).

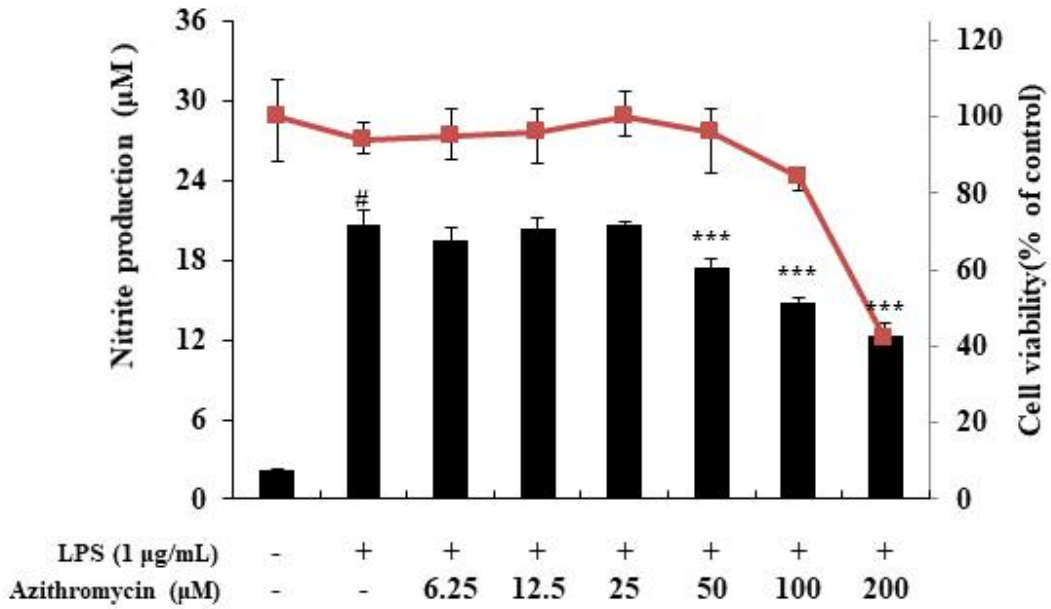


**Figure 12.** The effect of ametycin on production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were plated in 24-well plates ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) and incubated for 24 h, and then pretreated with ametycin (6.25–200  $\mu$ M) for 1 h followed by LPS stimulation for 24 h. Cytotoxicity of ametycin was evaluated using the MTT assay. The amount of nitric oxide in the medium was measured using the Griess reagent. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  vs unstimulated control group. <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.

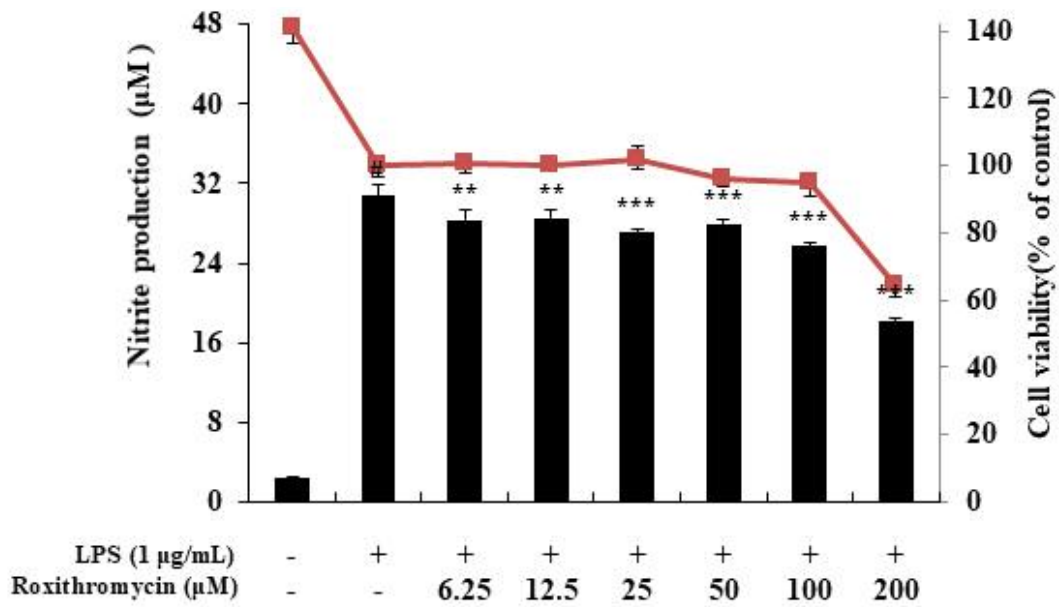


**Figure 13.** The effect of anisomycin on production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were plated in 24-well plates ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) and incubated for 24 h, and then pretreated with anisomycin (6.25–200  $\mu\text{M}$ ) for 1 h followed by LPS stimulation for 24 h. Cytotoxicity of anisomycin was evaluated using the MTT assay. The amount of nitric oxide in the medium was measured using the Griess reagent. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  vs unstimulated control group. <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.

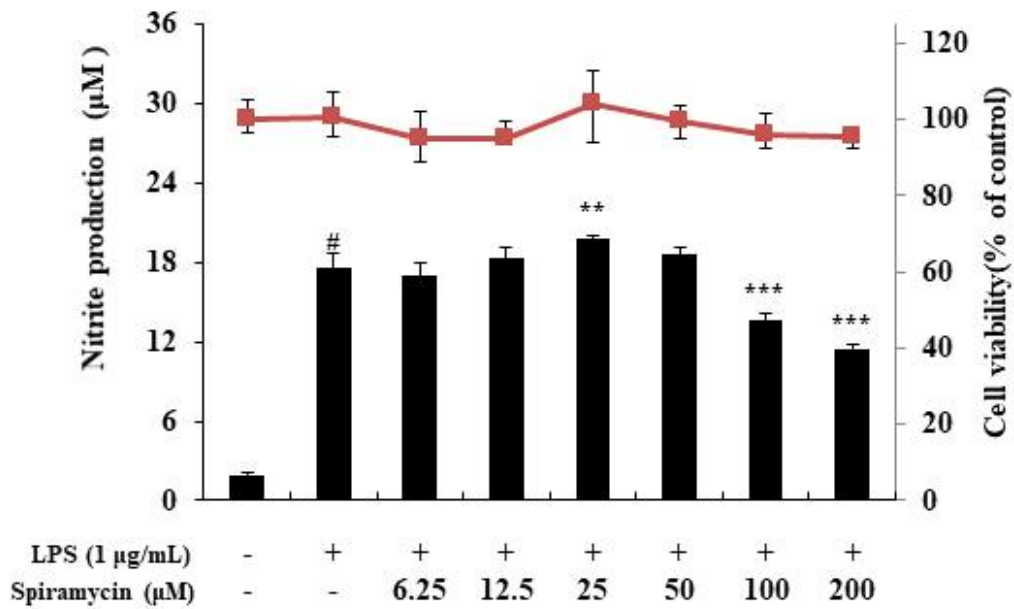




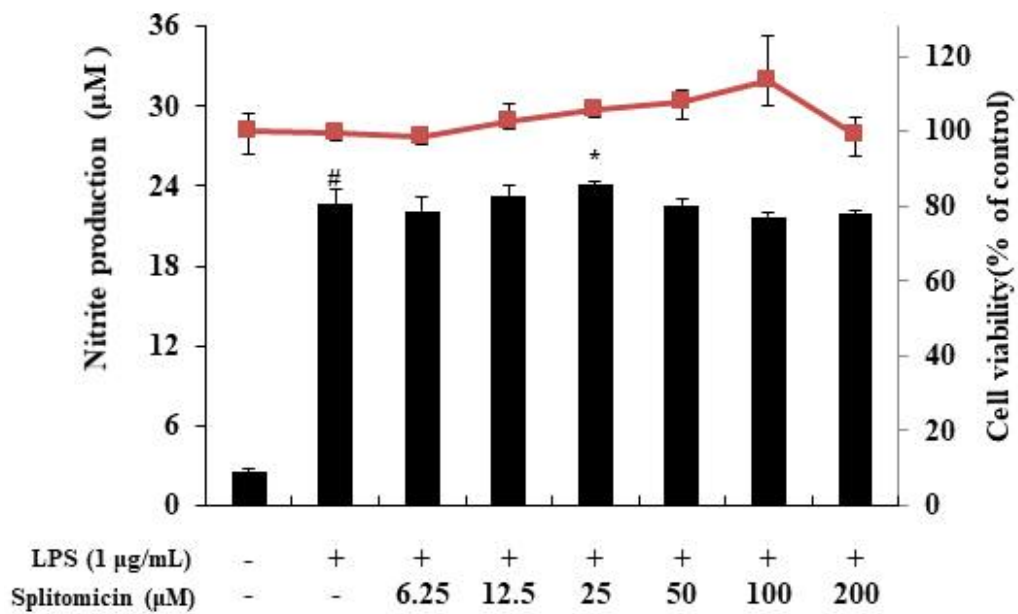
**Figure 14.** The effect of azithromycin on production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were plated in 24-well plates ( $1.0 \times 10^5$  cell s/well) and incubated for 24 h, and then pretreated with azithromycin (6.25–200  $\mu\text{M}$ ) for 1 h followed by LPS stimulation for 24 h. Cytotoxicity of azithromycin was evaluated using the MTT assay. The amount of nitric oxide in the medium was measured using the Griess reagent. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  vs unstimulated control group. <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.



**Figure 15.** The effect of roxithromycin on production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were plated in 24-well plates ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) and incubated for 24 h, and then pretreated with roxithromycin (6.25–200  $\mu\text{M}$ ) for 1 h followed by LPS stimulation for 24 h. Cytotoxicity of roxithromycin was evaluated using the MTT assay. The amount of nitric oxide in the medium was measured using the Griess reagent. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  vs unstimulated control group. <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.



**Figure 16.** The effect of spiramycin on production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were plated in 24-well plates ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) and incubated for 24 h, and then pretreated with spiramycin (6.25–200  $\mu\text{M}$ ) for 1 h followed by LPS stimulation for 24 h. Cytotoxicity of spiramycin was evaluated using the MTT assay. The amount of nitric oxide in the medium was measured using the Griess reagent. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  vs unstimulated control group. <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.

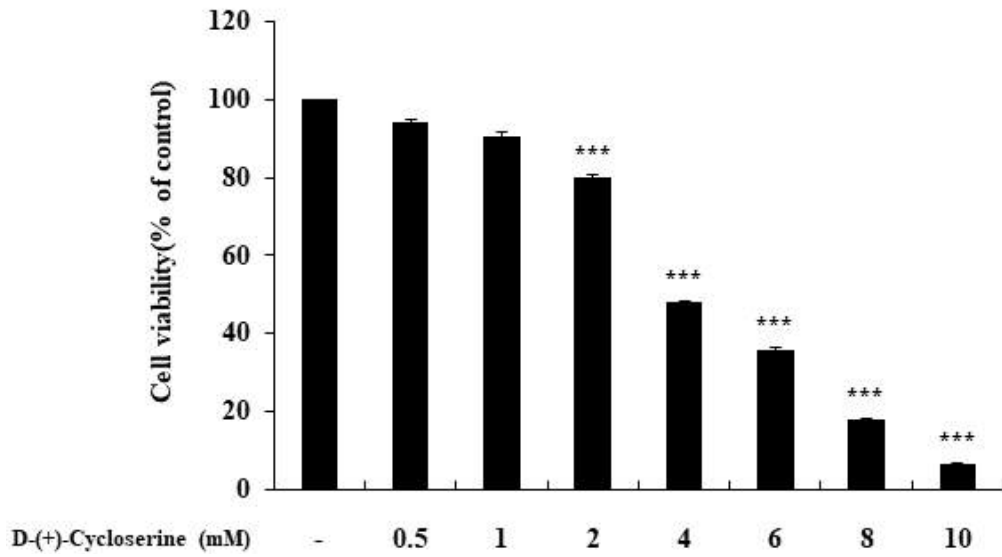


**Figure 17.** The effect of splitomicin on production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were plated in 24-well plates ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) and incubated for 24 h, and then pretreated with splitomicin (6.25–200  $\mu\text{M}$ ) for 1 h followed by LPS stimulation for 24 h. Cytotoxicity of splitomicin was evaluated using the MTT assay. The amount of nitric oxide in the medium was measured using the Griess reagent. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. <sup>#</sup> $p < 0.001$  vs unstimulated control group. <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs LPS alone. The results shown are representative of three independent experiments.

## 2. D-(+)-cycloserine (DCS)의 미백 활성

### 1) 세포 생존을 평가

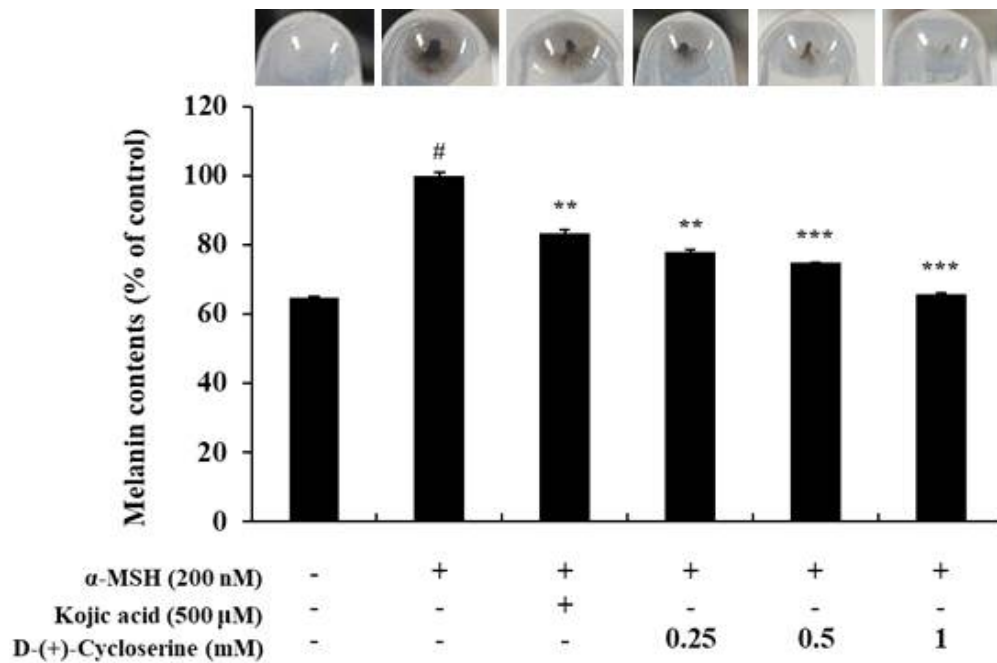
B16F10 melanoma에서 DCS의 세포 독성을 평가했습니다. 세포를 72시간 동안 다양한 농도 (2, 4, 6, 8 및 10 mM)의 DCS로 처리하였다 (**Fig. 18**). B16F10 melanoma에서의 세포 독성은 RAW 264.7 대식세포와 마찬가지로 미토콘드리아 탈수소 효소를 통해 tetrazolium salt로 전환된 MTT formazan crystal을 측정함으로써 평가되었다[20]. DCS는 2 mM 이상의 농도로 처리하였을 때, 세포 독성이 나타났기 때문에, 후속 실험에서 1 mM 이하의 농도로 DCS를 처리하였습니다.



**Figure 18.** The effect of DCS on the viability of B16F10 melanoma cells. Cells were plated in 24-well plates ( $8.0 \times 10^3$  cells/well) for 24 h, and then treated with DCS (0.5–10 mM) for 72 h. Cytotoxicity of DCS was evaluated using the MTT assay. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.001$  vs unstimulated control group. The results shown are representative of three independent experiments.

## 2) Melanin 생성량 측정

DCS가 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 확인하기 위해서, B16F10 세포에서 melanin contents assay를 통해 평가하였습니다. 세포 독성이 나타나지 않은 범위의 DCS를 다양한 농도(0.25, 0.5, 1 mM)로 처리하였으며, 양성 대조군으로 kojic acid를 사용하였습니다. 아무것도 처리하지 않은 군에 비해  $\alpha$ -MSH를 처리한 군은 melanin의 생성이 유의적으로 증가함을 확인하였습니다. 또한, 미백 활성을 나타낸다고 잘 알려진 kojic acid를 500  $\mu$ M 농도로 처리했을 시,  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 멜라닌의 생성을 감소하는 것을 확인하였습니다. DCS는 (Fig. 19)와 같이  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 멜라닌의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 확인하였습니다.

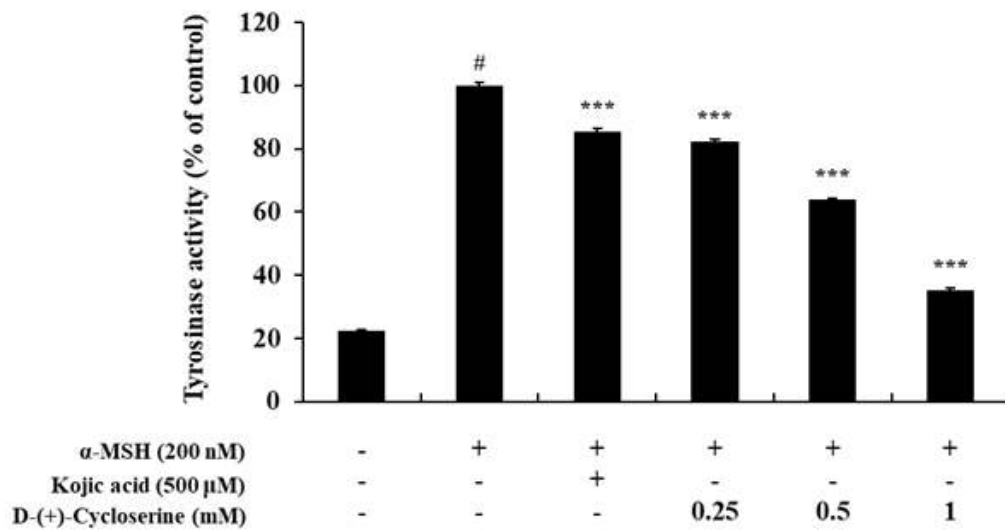


**Figure 19.** The effects of DCS on production of melanin in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish ( $5.0 \times 10^4$  cells/dish) and incubated for 24 h, then treated with DCS (0.25, 0.5 and 1 mM) for 72 h in the presence of  $\alpha$ -MSH (200 nM).  $\alpha$ -MSH was used as the negative control and kojic acid (500  $\mu$ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. # $p < 0.001$  vs unstimulated control group. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs  $\alpha$ -MSH alone. The results shown are representative of three independent experiments.



### 3) 세포 내 tyrosinase 효소 활성 평가

DCS가  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 멜라닌의 생성을 감소시키는 것이 tyrosinase 효소에 의하여 melanin 생합성이 조절되는지 확인하기 위해서 tyrosinase 효소 활성을 확인하고자 하였습니다.  $\alpha$ -MSH를 200 nM 농도로 처리하고, 다양한 농도의 DCS를 처리(0.25, 0.5, 1 mM)한 후, 72시간에 세포막을 제거하여 세포 내에 존재하는 tyrosinase 효소 단백질의 활성을 L-DOPA를 기질로 하여 생성되는 DOPA chrome의 양을 통해 측정하였습니다. 실험결과, (Fig. 20)과 같이 DCS가 tyrosinase 효소 활성을 농도 의존적으로 저해하는 것으로 확인하였습니다.

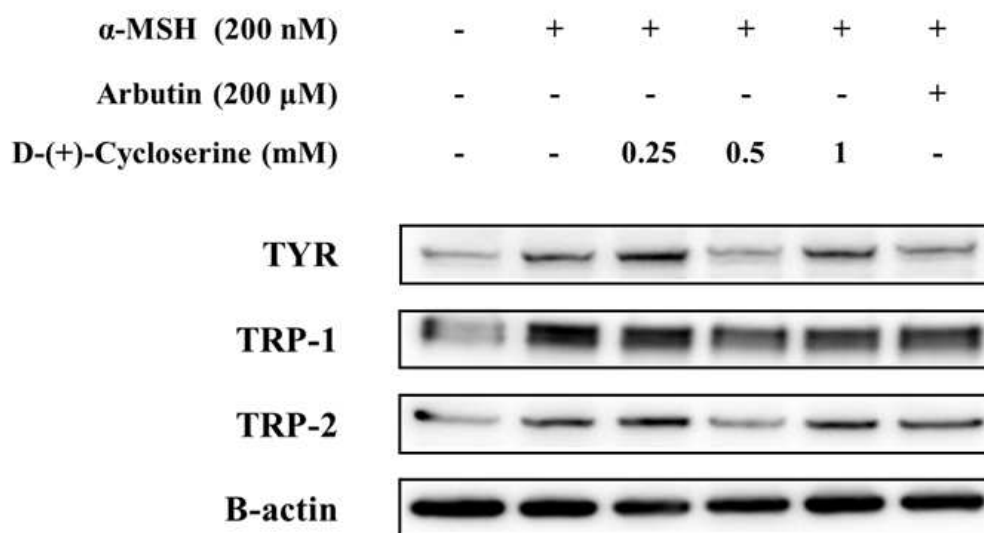


**Figure 20.** The effects of DCS on tyrosinase activity in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish ( $5.0 \times 10^4$  cells/dish) and incubated for 24 h, then treated with DCS (0.25, 0.5 and 1 mM) for 72 h in the presence of  $\alpha$ -MSH (200 nM).  $\alpha$ -MSH was used as the negative control and kojic acid (500  $\mu$ M) was used as the positive control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. # $p < 0.001$  vs unstimulated control group. \*\*\* $p < 0.001$  vs  $\alpha$ -MSH alone. The results shown are representative of three independent experiments.

#### 4) Western blot 분석

##### (1) 세포 내 TYR, TRP-1 및 TRP-2 효소단백질 발현량 측정

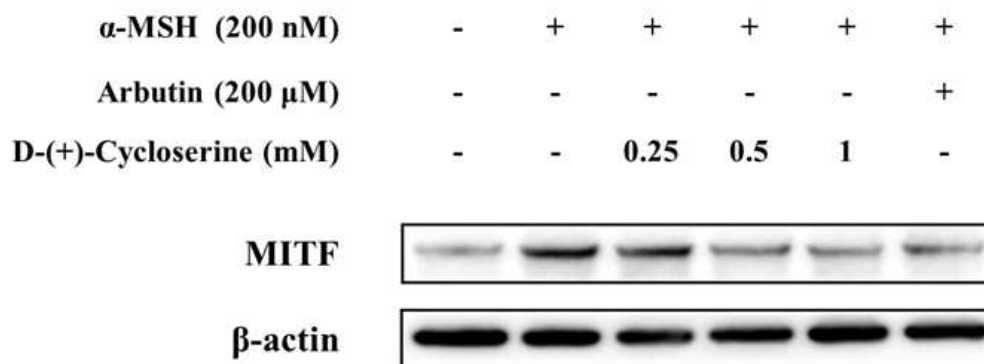
앞서 실험한 바와 같이(Fig. 19, 20) DCS는 melanin 생성을 저해하였고, tyrosinase 효소 활성을 저해함을 확인하였습니다. L-tyrosine 아미노산이 멜라닌 생성 관련 효소인 TYR, TRP-1, TRP-2에 의해 melanin 합성을 촉진하는 주효소로 작용한다고 알려져 있습니다. 이런 효소 활성이 이들 효소 단백질의 발현량과 관련이 있는지 확인하기 위해서, Western blot 분석을 통해 확인하였습니다. 실험 결과, Fig. 21과 같이 DCS를 0.25, 0.5 mM 농도로 처리하였을 때, 농도에 따라 각각의 효소 단백질의 발현을 저해함을 확인하였습니다. 이번 실험에서 DCS를 1 mM로 처리한 군에서는 농도 의존적인 결과는 얻지 못했지만, 앞서 실험한 결과와 두 가지 농도(0.25, 0.5 mM)로 처리된 결과를 보았을 때, DCS는 TYR, TRP-1, TRP-2의 발현을 감소하는 것으로 확인됩니다.



**Figure 21.** The effects of DCS on the level of TYR, TRP-1, TRP-2 in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish ( $5.0 \times 10^4$  cells/dish) and incubated for 48 h, then treated with DCS (0.25, 0.5 and 1 mM) for 24 h in the presence of  $\alpha$ -MSH (200 nM).  $\alpha$ -MSH was used as the negative control and arbutin (200  $\mu$ M) was used as the positive control.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against TYR, TRP-1, TRP-2 and  $\beta$ -actin.

## (2) 세포 내 MITF 전사 인자 단백질 발현량 측정

이전 연구에서, 이 MITF 전사 인자의 발현은 TYR, TRP-1 및 TRP-2 단백질의 발현을 조절하는 것으로 보고되었습니다. MITF는 TYR, TRP-1 및 TRP-2의 유도성 유전자의 promoter에 결합하여 각각의 효소 단백질이 생성되도록 촉진합니다. 본 연구에서는 TYR, TRP-1 및 TRP-2 효소 단백질의 하향발현이 MITF 전사 인자의 조절에 의한 것인지 확인하기 위해 추가로 Western blot 분석하였습니다. 실험결과, **Fig. 22**와 같이 DCS가 농도 의존적으로 MITF 발현을 하향조절하는 것을 확인하였습니다.



**Figure 22.** The effects of DCS on the level of MITF in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 cells. Cells were plated in 60 mm cell culture dish ( $5.0 \times 10^4$  cells/dish) and incubated for 48 h, then treated with DCS (0.25, 0.5 and 1 mM) for 24 h in the presence of  $\alpha$ -MSH (200 nM).  $\alpha$ -MSH was used as the negative control and arbutin (200  $\mu$ M) was used as the positive control.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Total cellular proteins were separated using SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and detected using specific antibodies against MITF and  $\beta$ -actin.

## IV. 고찰

병원균의 침입, 세포 및 조직의 손상과 같은 자극에 대하여 면역반응을 일으키고 회복하는 과정은 정상적인 생리적 기능이며, 생존을 위해 필수적인 과정입니다[50]. 염증 과정에서 대식세포는 전 염증성 cytokine을 분비하는데, 이를 통해 다른 면역 세포들에 신호를 전달하며, 염증 반응을 강화하여 빠르게 회복될 수 있도록 합니다[51]. 그러나, 전 염증성 매개체가 과도하게 생성되면, 염증이 더욱 심해지고, 천식, 아토피성 피부염, 죽상 동맥 경화증 및 염증성 장 질환과 같은 질병을 유발할 수 있다고 알려져 있으며, 이러한 염증성 질환을 치료하기 위해 적절한 염증 수준을 유지하도록 조절하는 것이 필요합니다[52, 53].

NO는 생체 내에서 세포 신호전달에 중요한 역할을 하는 분자 메신저입니다[54]. 대식세포가 활성화되면 NO는 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), cytokine-inducible NOS (iNOS) 및 bacterial NOS (bNOS)를 포함하여 여러 유형의 산화질소 합성 효소 (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되어 생성되는데, 신경 전달, 혈관 확장, 산화 스트레스, 항균 작용 및 병원체에 대한 면역 방어와 같은 다양한 생리 기능에 관여합니다[55]. 특히, NO는 병원체의 침입과 같은 자극에 대해 반응하여 iNOS 효소 단백질에 의한 생성량이 가장 큰 비중을 차지하며 과잉 생산을 유도합니다[56, 57]. 이전 연구에서, 과도한 NO 생성은 염증성 및 자가면역 질환을 유발하는 것으로 보고되고 있습니다[58, 59]. 따라서, NO 생성 및 iNOS 발현을 하향 조절하는 것은 염증성 질환의 치료를 위한 적절한 전략일 수 있습니다. 본 연구는 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 염증 모델에서 DCS가 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제함을 확인하였으며, western blot 분석을 통해 유도성 효소 단백질인 iNOS 발현을 통해 억제함을 검증하였습니다.

PGE<sub>2</sub>는 혈관 확장과 혈소판 응집을 억제, 평활근 조직의 수축 및 이완 등 생리적 기능에 관여하며 국소적 호르몬 역할을 합니다[60]. 일반적으로 염증의 초기

단계에서 염증 반응을 촉진하는 물질로 알려져 있으며, 과다 분비 시 발열반응을 일으키고 통각 과민증을 유발하는 등 광범위한 병리학적 상태와 관련이 있다고 알려져 있습니다[61, 62]. 이로 인해, PGE<sub>2</sub> 생성억제는 염증을 완화하는 치료 목적으로 연구되고 있습니다[63, 64]. PGE<sub>2</sub>는 세포막 인지질에 있는 arachidonic acid가 효소 단백질 COX에 의해 변환되어 합성됩니다[65]. COX는 COX-1, COX-2 두 가지가 존재하는데 주로 COX-1은 정상적인 상태에서 PG를 생성하지만, COX-2는 염증 반응과 연계되어 PGE<sub>2</sub>의 과잉 생산을 유발한다고 알려져 있습니다[66, 67]. 이번 연구에서, DCS는 LPS에 의해 유도된 PGE<sub>2</sub>의 생성을 약간 감소시켰으며, 이 결과와 일치하게 PGE<sub>2</sub>를 합성을 매개하는 주효소인 COX-2 단백질의 발현을 감소시키는 것을 검증하였습니다.

LPS에 의해 활성화된 대식세포는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine의 발현을 촉진하며, 이 3가지 cytokine은 대식세포의 염증 반응을 유도하는 데 중요한 역할을 합니다[68]. IL-1 $\beta$ 는 세포증식, 분화 및 apoptosis를 포함한 다양한 세포 활동에 관여하며, 염증 반응의 중요한 매개자입니다[69, 70]. 또한, 중추신경계에서 이 cytokine에 의한 COX-2의 유도는 염증성 통증 과민증에 기여 하는 것으로 알려져 있습니다[71]. IL-6는 대식세포에서 NF- $\kappa$ B 신호전달 경로의 활성화에 의존하며, 당뇨병, 죽상 동맥 경화증, 우울증, 알츠하이머, 다발성 골수종, 전립선암, 베체트병, 류머티즘 관절염과 같은 다양한 염증성 질환 및 많은 암과 관련되며, 염증 및 자가면역과정을 자극한다고 알려져 있습니다[72, 73]. TNF- $\alpha$ 는 면역세포를 조절하는 내인성 발열원으로 급성 단계 반응을 담당합니다[74]. 이 cytokine은 발열, apoptosis에 의한 세포 사멸, 염증, cachexia을 유도하고 IL-1과 IL-6의 생산을 통해 sepsis에 반응하여 tumorigenesis와 viral replication을 저해한다고 보고되었습니다[75, 76]. 본 연구에서, DCS는 전 염증성 매개체인 TNF- $\alpha$ 의 생성 저해 활성은 나타나지 않았지만, IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 활성을 확인하였습니다. 이를 통해, DCS가 다양한 염증성 질환을 치료하는 약물로 활용 가능성을 확인하였습니다.

염증 과정은 주로 NF- $\kappa$ B 신호전달경로에 의해 조절됩니다. NF- $\kappa$ B는 염증 및



면역을 포함하는 유전자의 조절 인자입니다[77]. 비활성 상태의 NF- $\kappa$ B 복합체는 세포질에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 에 결합함으로써 엄격하게 통제됩니다[78]. LPS에 의한 활성화는 proteasome을 통한 ubiquitination을 매개하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 후속 분해를 초래합니다[79]. 이어서, NF- $\kappa$ B 복합체는 세포질에서 핵으로 이동하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6과 같은 염증성 cytokine 및 iNOS, COX-2 유도성 효소단백질의 생성에 관여하는 유전자의 promoter에 결합하여 암호화하며, 이들의 생성을 촉진합니다[80]. 본 연구에서, Western blot 분석으로 I $\kappa$ B- $\alpha$  및 인산화된 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 단백질 발현수준을 평가하였습니다. 실험결과, DCS가 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 저해를 통해 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제함으로써 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제함을 검증하였습니다. 최근 연구에 따르면, PI3K/Akt 신호전달경로는 염증 자극하에 p65의 Ser 536 잔기의 인산화를 통해서 NF- $\kappa$ B 경로를 활성화하는 것으로 보고되었습니다[25, 81]. 본 연구에서 DCS가 LPS에 의해 유도된 Akt의 인산화를 하향조절함으로써 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화를 조절함을 확인하였습니다.

MAPK 신호전달경로는 NF- $\kappa$ B 신호전달경로를 활성화하는 것으로 알려져 있습니다[82]. 잘 보존된 serine/threonine 단백질 kinase이며, MAPK는 세포 활성화에서 중요한 역할을 합니다[83]. LPS는 MAPK의 인산화를 자극하며, MAPK의 활성화를 촉진합니다[84, 85]. 이어서, 인산화된 MAPK는 NF- $\kappa$ B 활성화를 유도함으로써, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 및 iNOS 및 COX-2의 발현을 촉진하기 때문에, MAPK의 구성 단백질인 ERK, JNK 및 p38의 인산화는 염증의 진행을 반영할 수 있습니다[86]. 본 연구에서는 DCS가 ERK 및 p38 인산화를 하향 조절함을 확인하였으며, 이들 결과는 DCS가 NF- $\kappa$ B 및 MAPK 신호전달경로를 통한 염증 치료 가능성을 나타냅니다.

멜라닌은 melanocyte에 있는 melanosome에 의해 생성되며, 각질 세포로 전달되어, 태양으로부터 오는 자외선을 반사 및 분산시켜 체내로 들어오는 자외선 에너지를 감쇄시킬 뿐만 아니라 피부 내부에 침투한 자외선 및 자유라디칼을 흡수하여 태양광에 의한 손상으로부터 DNA를 보호하는 중요한 역할을 하지만, 필요 이상으로 생성되면 기미, 주근깨와 같은 과 색소 침착증을 유발할 수 있으며, 심

할 경우, 흑색종과 같은 피부암까지 발병될 수 있습니다[87, 88]. 따라서, 적절하게 멜라닌을 생성을 조절하는 것이 연구가 많이 진행되고 있습니다[89-91]. 본 연구에서, DCS의 미백 활성을 확인하기 위해,  $\alpha$ -MSH에 의해 자극된 B16F10 세포에서의 멜라닌생성을 확인하였습니다. DCS는 독성이 없는 범위에서 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 감소시켰습니다. 이는 DCS가 과 색소 침착증과 같은 멜라닌 과생성에 의한 질병을 치료하거나 미백 기능성 약물로써 사용 가능성을 보여 주고 있습니다.

멜라닌 생합성은 tyrosinase (TYR), tyrosinase related protein 1 (TRP-1) 및 tyrosine-related protein 2 (TRP-2)와 같은 반응을 촉매하는 다양한 효소에 의해 조절되는데, 멜라닌 생합성과정의 초기 두 단계에서 비필수 아미노산인 L-tyrosine을 수산화 반응시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로, DOPA에서 산화 반응시켜 DOPA quinone으로의 반응을 촉매하고, DOPA quinone은 자발적 산화 과정을 거쳐 DOPA chrome이 형성되고, 이어서 생성된 DOPA chrome은 TRP-2로 잘 알려진 DOPA chrome tautomerase에 의해 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로의 변환이 촉진됩니다[92, 93]. DHICA는 다시 TRP-1에 의해 indole-5,6-quinone carboxylic acid로 전환되고, 이후 자동산화 반응을 거치고, 서로 결합함으로써 멜라닌이 합성됩니다[94]. 이처럼 멜라닌의 생합성과정은 효소의 역할이 중요하게 작용하기 때문에, TYR, TRP-1 및 TRP-2 와 같은 효소의 하향조절은 멜라닌생성을 저해할 수 있습니다.

실험결과, DCS는 멜라닌생성의 경향과 일치하게, tyrosinase 효소 활성을 감소시켰습니다. 이는 멜라닌의 생성 저해 활성이 tyrosinase 효소의 활성을 억제함으로써 나타나는 것을 검증합니다. 이러한 tyrosinase 효소 활성이 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 효소단백질의 발현량에 의해 조절되는 것인지 확인하기 위해 Western blot 분석을 통해 확인하였으며, DCS가 TYR, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현을 억제함을 확인하였습니다.

멜라닌생성을 유도하는 호르몬인  $\alpha$ -MSH는 MC1R에 결합하고 cAMP 신호전달

경로를 활성화하여 MITF 전사 인자의 발현을 촉진합니다[95, 96].  $\alpha$ -MSH에 의해 MITF 전사 조절인자는 활성화되면, 핵으로 이동하여 DNA의 TYR, TRP-1 및 TRP-2의 생성에 관여하는 promoter에 결합하고, 각각의 유전자 발현을 증가시킴으로써 TYR, TRP-1 및 TRP-2의 생성을 조절한다고 알려져 있습니다[97-99]. 본 연구에서 DCS의 TYR, TRP-1 및 TRP-2 단백질 발현의 억제가 MITF 전사 인자의 하향발현에 의한 것인지 확인하기 위해, Western blot 분석을 통해 확인하였습니다. 실험결과, DCS는  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 MITF의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였습니다. 이 결과는 DCS의 멜라닌생성 저해 활성이 MITF 발현의 감소를 통해 조절되는 것을 검증합니다.

결론적으로, 이번 연구에서는 *Streptomyces orchidaceous*에서 분리된 항생물질인 D-(+)-cycloserine이 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6 및 IL-1 $\beta$ 와 같은 전염증성 매개체의 생성을 저해함으로써 항염증 활성이 있다는 점을 확인하였습니다. 또한, 이들 결과는 LPS에 의해 유도된 iNOS와 COX-2 효소단백질의 발현을 감소시킴으로써 항염증 활성을 나타냄을 입증하였습니다. DCS의 기전 연구결과는 PI3K/Akt 신호전달경로에서 Akt 인산화 및 MAPK 신호전달경로에서 ERK와 p38 인산화의 하향조절을 통해 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 저해하였으며, 이는 NF- $\kappa$ B 전사 인자의 발현을 억제하여 염증 반응을 저해 활성을 나타내는 것을 검증하였습니다.

추가 연구를 통해  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포에서 DCS 항생제의 멜라닌생성 저해 활성을 확인하였고, 이 결과가 tyrosinase 효소 활성에 의한 것임을 입증하였습니다. DCS는 tyrosinase 효소 활성의 감소가 TYR, TRP-1 및 TRP-2 발현의 하향조절을 통한 것임을 확인하였으며, 기전 연구를 통해 이들 단백질의 발현은 MITF 전사 인자 발현의 하향조절을 통한 것임을 입증하였습니다. 본 연구결과는 기존 항생물질인 D-(+)-cycloserine이 항염증 치료제 및 미백 기능성 원료로의 활용 가능성을 제시합니다.

## V. 참고 문헌

1. Genilloud, O., Natural products discovery and potential for new antibiotics. *Current opinion in microbiology* **2019**, 51, 81-87.
2. Sadatsharifi, A.; Davarpanah, M. A.; Namazi, S.; Mottaghi, S.; Mahmoudi, L., Economic Burden Of Inappropriate Empiric Antibiotic Therapy: A Report From Southern Iran. *Risk management and healthcare policy* **2019**, 12, 339-348.
3. Gajdacs, M.; Spengler, G., The Role of Drug Repurposing in the Development of Novel Antimicrobial Drugs: Non-Antibiotic Pharmacological Agents as Quorum Sensing-Inhibitors. *Antibiotics* **2019**, 8, (4).
4. Nathan, C.; Cars, O., Antibiotic resistance--problems, progress, and prospects. *The New England journal of medicine* **2014**, 371, (19), 1761-3.
5. Shallcross, L. J.; Howard, S. J.; Fowler, T.; Davies, S. C., Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **2015**, 370, (1670), 20140082.
6. Norgaard, S. M.; Jensen, C. S.; Aalestrup, J.; Vandebroucke-Grauls, C.; de Boer, M. G. J.; Pedersen, A. B., Choice of therapeutic interventions and outcomes for the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative pathogens: a systematic review. *Antimicrobial resistance and infection control* **2019**, 8, 170.
7. Monserrat-Martinez, A.; Gambin, Y.; Sierecki, E., Thinking Outside the Bug: Molecular Targets and Strategies to Overcome Antibiotic Resistance. *International journal of molecular sciences* **2019**, 20, (6).
8. Masri, A.; Anwar, A.; Khan, N. A.; Siddiqui, R., The Use of

- Nanomedicine for Targeted Therapy against Bacterial Infections. *Antibiotics* **2019**, 8, (4).
9. Baker, J. F.; Cates, M. E.; Luthin, D. R., D-cycloserine in the treatment of posttraumatic stress disorder. *The mental health clinician* **2017**, 7, (2), 88-94.
  10. Chen, J.; Zhang, S.; Cui, P.; Shi, W.; Zhang, W.; Zhang, Y., Identification of novel mutations associated with cycloserine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2017**, 72, (12), 3272-3276.
  11. Hofmann, S. G.; Papini, S.; Carpenter, J. K.; Otto, M. W.; Rosenfield, D.; Dutcher, C. D.; Dowd, S.; Lewis, M.; Witcraft, S.; Pollack, M. H.; Smits, J. A. J., Effect of d-cycloserine on fear extinction training in adults with social anxiety disorder. *PloS one* **2019**, 14, (10), e0223729.
  12. Khosravi, A. D.; Mirsaeidi, M.; Farahani, A.; Tabandeh, M. R.; Mohajeri, P.; Shoja, S.; Hoseini Lar KhosroShahi, S. R., Prevalence of nontuberculous mycobacteria and high efficacy of d-cycloserine and its synergistic effect with clarithromycin against *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus*. *Infection and drug resistance* **2018**, 11, 2521-2532.
  13. Gallagher, L. A.; Shears, R. K.; Fingleton, C.; Alvarez, L.; Waters, E. M.; Clarke, J.; Bricio-Moreno, L.; Campbell, C.; Yadav, A. K.; Razvi, F.; O'Neill, E.; O'Neill, A. J.; Cava, F.; Fey, P. D.; Kadioglu, A.; O'Gara, J. P., Impaired alanine transport or exposure to d-cycloserine increases the susceptibility of MRSA to beta-lactam antibiotics. *The Journal of infectious diseases* **2019**.
  14. Oh, Y. C.; Cho, W. K.; Jeong, Y. H.; Im, G. Y.; Lee, K. J.; Yang, H. J.; Ma, J. Y., Anti-inflammatory effect of Sosihotang via inhibition of nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinases signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage

- cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2013**, 53, 343-51.
15. Yi, P. F.; Bi, W. Y.; Shen, H. Q.; Wei, Q.; Zhang, L. Y.; Dong, H. B.; Bai, H. L.; Zhang, C.; Song, Z.; Qin, Q. Q.; Lv, S.; Wu, S. C.; Fu, B. D.; Wei, X. B., Inhibitory effects of sulfated 20(S)-ginsenoside Rh2 on the release of pro-inflammatory mediators in LPS-induced RAW 264.7 cells. *European journal of pharmacology* **2013**, 712, (1-3), 60-6.
  16. Wang, Q. S.; Xiang, Y.; Cui, Y. L.; Lin, K. M.; Zhang, X. F., Dietary blue pigments derived from genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF-kappaB inactivation. *PloS one* **2012**, 7, (3), e34122.
  17. Park, G. M.; Jun, J. G.; Kim, J. K., XH-14, a novel danshen methoxybenzo[b]furan derivative, exhibits anti-inflammatory properties in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Journal of inflammation* **2013**, 10, (1), 1.
  18. 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-kappaB and MAPK Signaling Pathways in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages. *International journal of molecular sciences* **2018**, 19, (2).
  19. Lu, Y. C.; Yeh, W. C.; Ohashi, P. S., LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **2008**, 42, (2), 145-151.
  20. Kim, A. R.; Lee, M. S.; Shin, T. S.; Hua, H.; Jang, B. C.; Choi, J. S.; Byun, D. S.; Utsuki, T.; Ingram, D.; Kim, H. R., Phlorofuocuroeckol A inhibits the LPS-stimulated iNOS and COX-2 expressions in macrophages via inhibition of NF-kappaB, Akt, and p38 MAPK. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **2011**, 25, (8), 1789-95.

21. Kim, K. N.; Ko, Y. J.; Yang, H. M.; Ham, Y. M.; Roh, S. W.; Jeon, Y. J.; Ahn, G.; Kang, M. C.; Yoon, W. J.; Kim, D.; Oda, T., Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF-kappaB signaling pathways in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2013**, 57, 126-31.
22. Oh, B. K.; Mun, J.; Seo, H. W.; Ryu, S. Y.; Kim, Y. S.; Lee, B. H.; Oh, K. S., *Euonymus alatus* extract attenuates LPS-induced NF-kappaB activation via IKKbeta inhibition in RAW 264.7 cells. *Journal of ethnopharmacology* **2011**, 134, (2), 288-93.
23. Ying, X.; Yu, K.; Chen, X.; Chen, H.; Hong, J.; Cheng, S.; Peng, L., Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Cellular immunology* **2013**, 285, (1-2), 49-54.
24. Bufalo, M. C.; Ferreira, I.; Costa, G.; Francisco, V.; Liberal, J.; Cruz, M. T.; Lopes, M. C.; Batista, M. T.; Sforcin, J. M., Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF-kappaB and MAPK activation in macrophages. *Journal of ethnopharmacology* **2013**, 149, (1), 84-92.
25. Intayoung, P.; Limtrakul, P.; Yodkeeree, S., Antiinflammatory Activities of Crebanine by Inhibition of NF-kappaB and AP-1 Activation through Suppressing MAPKs and Akt Signaling in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2016**, 39, (1), 54-61.
26. Park, H. H.; Kim, M. J.; Li, Y.; Park, Y. N.; Lee, J.; Lee, Y. J.; Kim, S. G.; Park, H. J.; Son, J. K.; Chang, H. W.; Lee, E., Britanin suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and cytokine production via NF-kappaB and MAPK inactivation in RAW 264.7 cells. *International*



- immunopharmacology* **2013**, 15, (2), 296–302.
27. Kim, K. N.; Heo, S. J.; Yoon, W. J.; Kang, S. M.; Ahn, G.; Yi, T. H.; Jeon, Y. J., Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *European journal of pharmacology* **2010**, 649, (1-3), 369–75.
28. Wu, L.; Li, X.; Wu, H.; Long, W.; Jiang, X.; Shen, T.; Qiang, Q.; Si, C.; Wang, X.; Jiang, Y.; Hu, W., 5-Methoxyl Aesculetin Abrogates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation by Suppressing MAPK and AP-1 Pathways in RAW 264.7 Cells. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17, (3), 315.
29. Chun, S. Y.; Lee, K. S.; Nam, K. S., Refined Deep-Sea Water Suppresses Inflammatory Responses via the MAPK/AP-1 and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in LPS-Treated RAW 264.7 Macrophage Cells. *International journal of molecular sciences* **2017**, 18, (11).
30. Su, Y. W.; Chiou, W. F.; Chao, S. H.; Lee, M. H.; Chen, C. C.; Tsai, Y. C., Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways. *International immunopharmacology* **2011**, 11, (9), 1166–72.
31. Zhou, J.; Shang, J.; Ping, F.; Zhao, G., Alcohol extract from *Vernonia anthelmintica* (L.) willd 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.
32. Wu, P. Y.; You, Y. J.; Liu, Y. J.; Hou, C. W.; Wu, C. S.; Wen, K. C.; Lin, C. Y.; Chiang, H. M., Sesamol Inhibited Melanogenesis by Regulating Melanin-Related Signal Transduction in B16F10 Cells.



- International journal of molecular sciences* **2018**, 19, (4).
33. Kim, B.; Lee, S. H.; Choi, K. Y.; Kim, H. S., N-Nicotinoyl tyramine, a novel niacinamide derivative, inhibits melanogenesis by suppressing MITF gene expression. *European journal of pharmacology* **2015**, 764, 1-8.
  34. Nishina, A.; Ebina, K.; Ukiya, M.; Fukatsu, M.; Koketsu, M.; Ninomiya, M.; Sato, D.; Kimura, H., Dioscin Derived from *Solanum melongena* L. "Usukawamarunasu" Attenuates alpha-MSH-Induced Melanogenesis in B16 Murine Melanoma Cells via Downregulation of Phospho-CREB and MITF. *Journal of food science* **2015**, 80, (10), H2354-9.
  35. Kim, H. R.; Kim, H.; Jung, B. J.; You, G. E.; Jang, S.; Chung, D. K., Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Molecules and cells* **2015**, 38, (2), 163-70.
  36. Pintus, F.; Spano, D.; Corona, A.; Medda, R., Antityrosinase activity of *Euphorbia characias* extracts. *PeerJ* **2015**, 3, e1305.
  37. Kang, S. H.; Jeon, Y. D.; Cha, J. Y.; Hwang, S. W.; Lee, H. Y.; Park, M.; Lee, B. R.; Shin, M. K.; Kim, S. J.; Shin, S. M.; Kim, D. K.; Jin, J. S.; Lee, Y. M., Antioxidant and skin-whitening effects of aerial part of *Euphorbia supina* Raf. Extract. *BMC complementary and alternative medicine* **2018**, 18, (1), 256.
  38. Kim, K. N.; Yang, H. M.; Kang, S. M.; Kim, D.; Ahn, G.; Jeon, Y. J., Octaphloretol A isolated from *Ishige foliacea* inhibits alpha-MSH-stimulated induced melanogenesis via ERK pathway in B16F10 melanoma cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2013**, 59, 521-6.
  39. Nasr Bouzaiene, N.; Chaabane, F.; Sassi, A.; Chekir-Ghedira, L.;

- Ghedira, K., Effect of apigenin-7-glucoside, genkwanin and naringenin on tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. *Life sciences* **2016**, 144, 80-5.
40. Bae, J. S.; Han, M.; Yao, C.; Chung, J. H., Chaetocin inhibits IBMX-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells through activation of ERK. *Chemico-biological interactions* **2016**, 245, 66-71.
41. Drira, R.; Sakamoto, K., Isosakuranetin, a 4'-O-methylated flavonoid, stimulates melanogenesis in B16BL6 murine melanoma cells. *Life sciences* **2015**, 143, 43-9.
42. Tsao, Y. T.; Huang, Y. F.; Kuo, C. Y.; Lin, Y. C.; Chiang, W. C.; Wang, W. K.; Hsu, C. W.; Lee, C. H., Hinokitiol Inhibits Melanogenesis via AKT/mTOR Signaling in B16F10 Mouse Melanoma Cells. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17, (2), 248.
43. Yao, C.; Jin, C. L.; Oh, J. H.; Oh, I. G.; Park, C. H.; Chung, J. H., Ardisia crenata extract stimulates melanogenesis in B16F10 melanoma cells through inhibiting ERK1/2 and Akt activation. *Molecular medicine reports* **2015**, 11, (1), 653-7.
44. Kim, H. J.; Kim, J. S.; Woo, J. T.; Lee, I. S.; Cha, B. Y., Hyperpigmentation mechanism of methyl 3,5-di-caffeoylquinic acid through activation of p38 and MITF induction of tyrosinase. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2015**, 47, (7), 548-56.
45. Campos, P. M.; Prudente, A. S.; Horinouchi, C. D.; Cechinel-Filho, V.; Favero, G. M.; Cabrini, D. A.; Otuki, M. F., Inhibitory effect of GB-2a (13-naringenin-118-eriodictyol) on melanogenesis. *Journal of ethnopharmacology* **2015**, 174, 224-9.
46. Jackson, E.; Heidl, M.; Imfeld, D.; Meeus, L.; Schuetz, R.; Campiche, R., Discovery of a Highly Selective MC1R Agonists Pentapeptide to Be Used as a Skin Pigmentation Enhancer and with Potential Anti-Aging Properties. *International journal of molecular sciences* **2019**, 20, (24).

47. Lee, S. W.; Kim, J. H.; Song, H.; Seok, J. K.; Hong, S. S.; Boo, Y. C., Luteolin 7-Sulfate Attenuates Melanin Synthesis through Inhibition of CREB- and MITF-Mediated Tyrosinase Expression. *Antioxidants* **2019**, 8, (4).
48. Choi, M. H.; Jo, H. G.; Yang, J. H.; Ki, S. H.; Shin, H. J., Antioxidative and Anti-Melanogenic Activities of Bamboo Stems (*Phyllostachys nigra* variety henosis) via PKA/CREB-Mediated MITF Downregulation in B16F10 Melanoma Cells. *International journal of molecular sciences* **2018**, 19, (2).
49. Lee, J. Y.; Cho, Y. R.; Park, J. H.; Ahn, E. K.; Jeong, W.; Shin, H. S.; Kim, M. S.; Yang, S. H.; Oh, J. S., Anti-melanogenic and anti-oxidant activities of ethanol extract of *Kummerowia striata*: *Kummerowia striata* regulate anti-melanogenic activity through down-regulation of TRP-1, TRP-2 and MITF expression. *Toxicology reports* **2019**, 6, 10-17.
50. Sun, S.; Du, Y.; Yin, C.; Suo, X.; Wang, R.; Xia, R.; Zhang, X., Water-separated part of *Chloranthus serratus* alleviates lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cell injury mainly by regulating the MAPK and Nrf2/HO-1 inflammatory pathways. *BMC complementary and alternative medicine* **2019**, 19, (1), 343.
51. Jeong, J. B.; Jeong, H. J., Rheosmin, a naturally occurring phenolic compound inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells by blocking NF-kappaB activation pathway. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2010**, 48, (8-9), 2148-53.
52. Yuan, L.; Zhang, F.; Shen, M.; Jia, S.; Xie, J., Phytosterols Suppress Phagocytosis and Inhibit Inflammatory Mediators via ERK Pathway on LPS-Triggered Inflammatory Responses in RAW264.7 Macrophages and the Correlation with Their Structure. *Foods* **2019**, 8, (11).

53. Linghu, K. G.; Ma, Q. S.; Zhao, G. D.; Xiong, W.; Lin, L.; Zhang, Q. W.; Bian, Z.; Wang, Y.; Yu, H., Leocarpinolide B attenuates LPS-induced inflammation on RAW264.7 macrophages by mediating NF-kappaB and Nrf2 pathways. *European journal of pharmacology* **2019**, 868, 172854.
54. Korhonen, R.; Lahti, A.; Kankaanranta, H.; Moilanen, E., Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy* **2005**, 4, (4), 471-9.
55. Kim, Y. J.; Shin, Y.; Lee, K. H.; Kim, T. J., Anethum graveolens flower extracts inhibited a lipopolysaccharide-induced inflammatory response by blocking iNOS expression and NF-kappaB activity in macrophages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2012**, 76, (6), 1122-7.
56. Chun, J.; Choi, R. J.; Khan, S.; Lee, D. S.; Kim, Y. C.; Nam, Y. J.; Lee, D. U.; Kim, Y. S., Alantolactone suppresses inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by down-regulating NF-kappaB, MAPK and AP-1 via the MyD88 signaling pathway in LPS-activated RAW 264.7 cells. *International immunopharmacology* **2012**, 14, (4), 375-83.
57. Ben, P.; Liu, J.; Lu, C.; Xu, Y.; Xin, Y.; Fu, J.; Huang, H.; Zhang, Z.; Gao, Y.; Luo, L.; Yin, Z., Curcumin promotes degradation of inducible nitric oxide synthase and suppresses its enzyme activity in RAW 264.7 cells. *International immunopharmacology* **2011**, 11, (2), 179-86.
58. Park, C. M.; Park, J. Y.; Noh, K. H.; Shin, J. H.; Song, Y. S., Taraxacum officinale Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF-kappaB modulation in RAW 264.7 cells. *Journal of ethnopharmacology* **2011**, 133, (2), 834-42.
59. Choi, Y. H.; Jin, G. Y.; Li, G. Z.; Yan, G. H., Cornuside suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators by inhibiting nuclear

- factor-kappa B activation in RAW 264.7 macrophages. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2011**, 34, (7), 959-66.
60. Kim, E. H.; Choi, Y. S.; Kim, Y. M., Antioxidative and anti-inflammatory effect of *Phellinus igniarius* on RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of exercise rehabilitation* **2019**, 15, (1), 2-7.
61. Kats, A.; Gerasimcik, N.; Nareoja, T.; Nederberg, J.; Grenlov, S.; Lagnohed, E.; Desai, S.; Andersson, G.; Yucel-Lindberg, T., Aminothiazoles inhibit osteoclastogenesis and PGE2 production in LPS-stimulated co-cultures of periodontal ligament and RAW 264.7 cells, and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in PBMCs. *Journal of cellular and molecular medicine* **2019**, 23, (2), 1152-1163.
62. Hwang, D.; Kang, M. J.; Jo, M. J.; Seo, Y. B.; Park, N. G.; Kim, G. D., Anti-Inflammatory Activity of beta-thymosin Peptide Derived from Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) on NO and PGE(2) Production by Down-Regulating NF-kappaB in LPS-Induced RAW264.7 Macrophage Cells. *Marine drugs* **2019**, 17, (2).
63. Jo, A. R.; Han, H. S.; Seo, S.; Shin, J. S.; Lee, J. Y.; Kim, H. J.; Lee, K. T., Inhibitory effect of moschamine isolated from *Carthamus tinctorius* on LPS-induced inflammatory mediators via AP-1 and STAT1/3 inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2017**, 27, (23), 5245-5251.
64. An, H. J.; Kim, I. T.; Park, H. J.; Kim, H. M.; Choi, J. H.; Lee, K. T., Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF-alpha expression through inactivation of the nuclear factor-kappaB pathway in RAW 264.7 macrophages. *International immunopharmacology* **2011**, 11, (4), 504-10.
65. Adebayo, S. A.; Shai, L. J.; Eloff, J. N., First isolation of glutinol and

- a bioactive fraction with good anti-inflammatory activity from n-hexane fraction of *Peltophorum africanum* leaf. *Asian Pacific journal of tropical medicine* **2017**, 10, (1), 42-46.
66. Wang, H. R.; Sui, H. C.; Ding, Y. Y.; Zhu, B. T., Stimulation of the Production of Prostaglandin E(2) by Ethyl Gallate, a Natural Phenolic Compound Richly Contained in Longan. *Biomolecules* **2018**, 8, (3).
67. Oliveira, I.; Colares, A. V.; Cardoso, F. O.; Tellis, C. J. M.; Chagas, M.; Behrens, M. D.; Calabrese, K. D. S.; Almeida-Souza, F.; Abreu-Silva, A. L., *Vernonia polysphaera* Baker: Anti-inflammatory activity in vivo and inhibitory effect in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *PloS one* **2019**, 14, (12), e0225275.
68. Zhu, J.; Luo, C.; Wang, P.; He, Q.; Zhou, J.; Peng, H., Saikosaponin A mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF-kappaB pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Experimental and therapeutic medicine* **2013**, 5, (5), 1345-1350.
69. Colafrancesco, S.; Manara, M.; Bortoluzzi, A.; Serban, T.; Bianchi, G.; Cantarini, L.; Ciccia, F.; Dagna, L.; Govoni, M.; Montecucco, C.; Priori, R.; Ravelli, A.; Sfriso, P.; Sinigaglia, L.; Group, A. C., Management of adult-onset Still's disease with interleukin-1 inhibitors: evidence- and consensus-based statements by a panel of Italian experts. *Arthritis research & therapy* **2019**, 21, (1), 275.
70. Chen, G.; Luo, X.; Wang, W.; Wang, Y.; Zhu, F.; Wang, W., Interleukin-1beta Promotes Schwann Cells De-Differentiation in Wallerian Degeneration via the c-JUN/AP-1 Pathway. *Frontiers in cellular neuroscience* **2019**, 13, 304.
71. Kim, K. N.; Ko, Y. J.; Kang, M. C.; Yang, H. M.; Roh, S. W.; Oda, T.; Jeon, Y. J.; Jung, W. K.; Heo, S. J.; Yoon, W. J.; Kim, D., Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one mediated by suppression of

- inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2013**, 53, 371-5.
72. Kishimoto, T., The biology of interleukin-6. *Blood* **1989**, 74, (1), 1-10.
73. Papanicolaou, D. A.; Wilder, R. L.; Manolagas, S. C.; Chrousos, G. P., The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of internal medicine* **1998**, 128, (2), 127-37.
74. Zhou, W.; Shi, G.; Bai, J.; Ma, S.; Liu, Q.; Ma, X., Colquhounia Root Tablet Protects Rat Pulmonary Microvascular Endothelial Cells against TNF-alpha-Induced Injury by Upregulating the Expression of Tight Junction Proteins Claudin-5 and ZO-1. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2018**, 2018, 1024634.
75. Khan, S.; Shin, E. M.; Choi, R. J.; Jung, Y. H.; Kim, J.; Tosun, A.; Kim, Y. S., Suppression of LPS-induced inflammatory and NF-kappaB responses by anomalin in RAW 264.7 macrophages. *Journal of cellular biochemistry* **2011**, 112, (8), 2179-88.
76. Li, Z.; Jia, Y.; Feng, Y.; Cui, R.; Miao, R.; Zhang, X.; Qu, K.; Liu, C.; Zhang, J., Methane alleviates sepsis-induced injury by inhibiting pyroptosis and apoptosis: in vivo and in vitro experiments. *Aging* **2019**, 11, (4), 1226-1239.
77. Shin, J. S.; Park, S. J.; Ryu, S.; Kang, H. B.; Kim, T. W.; Choi, J. H.; Lee, J. Y.; Cho, Y. W.; Lee, K. T., Potent anti-inflammatory effect of a novel furan-2,5-dione derivative, BPD, mediated by dual suppression of COX-2 activity and LPS-induced inflammatory gene expression via NF-kappaB inactivation. *British journal of pharmacology* **2012**, 165, (6), 1926-1940.
78. Cheung, D. W.; Koon, C. M.; Wat, E.; Ko, C. H.; Chan, J. Y.; Yew, D. T.; Leung, P. C.; Chan, W. Y.; Lau, C. B.; Fung, K. P., A herbal formula containing roots of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) and *Pueraria*

- lobata (Gegen) inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through inhibition of nuclear factor kappaB (NFkappaB) pathway. *Journal of ethnopharmacology* **2013**, 145, (3), 776-83.
79. Jeong, J. H.; Ryu, D. S.; Suk, D. H.; Lee, D. S., Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Orostachys japonicus* on modulation of signal pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *BMB reports* **2011**, 44, (6), 399-404.
80. Rehman, M. U.; Yoshihisa, Y.; Miyamoto, Y.; Shimizu, T., The anti-inflammatory effects of platinum nanoparticles on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **2012**, 61, (11), 1177-85.
81. Soo Kim, H.; Young Park, S.; Kyoung Kim, E.; Yeon Ryu, E.; Hun Kim, Y.; Park, G.; Joon Lee, S., *Acanthopanax senticosus* has a heme oxygenase-1 signaling-dependent effect on *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of ethnopharmacology* **2012**, 142, (3), 819-28.
82. Zhang, C.; Li, C.; Jia, X.; Wang, K.; Tu, Y.; Wang, R.; Liu, K.; Lu, T.; He, C., In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Effects of Polyphyllin VII through Downregulating MAPK and NF-kappaB Pathways. *Molecules* **2019**, 24, (5).
83. Feng, D.; Zhou, Y.; Xia, M.; Ma, J., Folic acid inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages by suppressing MAPKs and NF-kappaB activation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **2011**, 60, (9), 817-22.
84. Cha, J. Y.; Jung, J. Y.; Jung, J. Y.; Lee, J. R.; Cho, I. J.; Ku, S. K.; Byun, S. H.; Ahn, Y. T.; Lee, C. W.; Kim, S. C.; An, W. G., Inhibitory



- effects of traditional herbal formula pyungwi-san on inflammatory response in vitro and in vivo. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2013**, 2013, 630198.
85. Pan, M. H.; Hong, H. M.; Lin, C. L.; Jhang, A. Z.; Tsai, J. H.; Badmaev, V.; Nagabhushanam, K.; Ho, C. T.; Chen, W. J., Se-methylselenocysteine inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and iNOS induction in RAW 264.7 murine macrophages. *Molecular nutrition & food research* **2011**, 55, (5), 723-32.
86. Li, L.; Sapkota, M.; Kim, S. W.; Soh, Y., Herbacetin inhibits inducible nitric oxide synthase via JNK and nuclear factor-kappaB in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *European journal of pharmacology* **2015**, 765, 115-23.
87. Karunarathne, W.; Molagoda, I. M. N.; Kim, M. S.; Choi, Y. H.; Oren, M.; Park, E. K.; Kim, G. Y., Flumequine-Mediated Upregulation of p38 MAPK and JNK Results in Melanogenesis in B16F10 Cells and Zebrafish Larvae. *Biomolecules* **2019**, 9, (10).
88. Phacharapiyangkul, N.; Thirapanmethee, K.; Sa-Ngiamsumtorn, K.; Panich, U.; Lee, C. H.; Chomnawang, M. T., Effect of Sucrier Banana Peel Extracts on Inhibition of Melanogenesis through the ERK Signaling Pathway. *International journal of medical sciences* **2019**, 16, (4), 602-606.
89. Yang, S. H.; Tsatsakis, A. M.; Tzanakakis, G.; Kim, H. S.; Le, B.; Sifaki, M.; Spandidos, D. A.; Tsukamoto, C.; Golokhvast, K. S.; Izotov, B. N.; Chung, G., Soyasaponin Ag inhibits alphaMSHinduced melanogenesis in B16F10 melanoma cells via the downregulation of TRP2. *International journal of molecular medicine* **2017**, 40, (3), 631-636.
90. Tsao, Y. T.; Kuo, C. Y.; Kuan, Y. D.; Lin, H. C.; Wu, L. H.; Lee, C. H., The Extracts of Astragalus membranaceus Inhibit Melanogenesis

- through the ERK Signaling Pathway. *International journal of medical sciences* **2017**, 14, (11), 1049–1053.
91. Zhou, S.; Sakamoto, K., Pyruvic acid/ethyl pyruvate inhibits melanogenesis in B16F10 melanoma cells through PI3K/AKT, GSK3beta, and ROS-ERK signaling pathways. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **2019**, 24, (1), 60–69.
  92. Eghbali-Feriz, S.; Taleghani, A.; Al-Najjar, H.; Emami, S. A.; Rahimi, H.; Asili, J.; Hasanzadeh, S.; Tayarani-Najaran, Z., Anti-melanogenesis and anti-tyrosinase properties of Pistacia atlantica subsp. mutica extracts on B16F10 murine melanoma cells. *Research in pharmaceutical sciences* **2018**, 13, (6), 533–545.
  93. Oh, C. T.; Kwon, T. R.; Jang, Y. J.; Yoo, K. H.; Kim, B. J.; Kim, H., Inhibitory effects of Stichopus japonicus extract on melanogenesis of mouse cells via ERK phosphorylation. *Molecular medicine reports* **2017**, 16, (2), 1079–1086.
  94. Kim, J.; Kim, Y. H.; Bang, S.; Yoo, H.; Kim, I.; Chang, S. E.; Song, Y., L-765,314 Suppresses Melanin Synthesis by Regulating Tyrosinase Activity. *Molecules* **2019**, 24, (4).
  95. Swope, V. B.; Abdel-Malek, Z. A., MC1R: Front and Center in the Bright Side of Dark Eumelanin and DNA Repair. *International journal of molecular sciences* **2018**, 19, (9).
  96. Oh, T. I.; Jung, H. J.; Lee, Y. M.; Lee, S.; Kim, G. H.; Kan, S. Y.; Kang, H.; Oh, T.; Ko, H. M.; Kwak, K. C.; Lim, J. H., Zerumbone, a Tropical Ginger Sesquiterpene of Zingiber officinale Roscoe, Attenuates alpha-MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Cells. *International journal of molecular sciences* **2018**, 19, (10).
  97. Park, S. H.; Choi, E.; Kim, S.; Kim, D. S.; Kim, J. H.; Chang, S.; Choi, J. S.; Park, K. J.; Roh, K. B.; Lee, J.; Yoo, B. C.; Cho, J. Y., Oxidative Stress-Protective and Anti-Melanogenic Effects of Loliolide

and Ethanol Extract from Fresh Water Green Algae, *Prasiola japonica*. *International journal of molecular sciences* **2018**, 19, (9).

98. Lee, A.; Kim, J. Y.; Heo, J.; Cho, D. H.; Kim, H. S.; An, I. S.; An, S.; Bae, S., The Inhibition of Melanogenesis Via the PKA and ERK Signaling Pathways by *Chlamydomonas reinhardtii* Extract in B16F10 Melanoma Cells and Artificial Human Skin Equivalent. *Journal of microbiology and biotechnology* **2018**, 28, (12), 2121–2132.
99. Chatatikun, M.; Yamauchi, T.; Yamasaki, K.; Aiba, S.; Chiabchalard, A., Anti melanogenic effect of *Croton roxburghii* and *Croton sublyratus* leaves in alpha-MSH stimulated B16F10 cells. *Journal of traditional and complementary medicine* **2019**, 9, (1), 66–72.