



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

B16F10 마우스 세포에서
lincomycin의 멜라닌 합성 증진
규명

濟州大學校 大學原

李 珉 淑

이 민 숙

2021年 2月

B16F10 마우스 세포에서 lincomycin의 멜라닌 합성 증진 규명




지도교수 현 창 구

이 민 숙

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2020년 12월

이민숙의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 尹景燮 
위 원 任 勳 貞 
위 원 玄 昌 久 

제주대학교 대학원

2020년 12월

B16F10 mouse cell to identify the enhancement of melanin synthesis of Lincomycin

Min Suk Lee

(Supervised by professor chang-Gu Hyun)

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

2020 .12

This thesis has been examined and approve by

Kyung - Sup Yoon

Hee - Jung Im

CHANG-GU HYUN

20 . 12 . 28

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



ABSTRACT

Lincomycin hydrochloride monohydrate (L.H.M), isolated from *Streptomyces lincolnensis*, is a lincosamide-based antibiotic in the form of a hydrochlorid base. L.H.M was usually used to treat *staphylococcus*, *streptococcus* and *Bacteroides fragilis* infections. Although L.H.M has been utilized in clinical treatment for a long time, it has exhibited several side effects, leading to the introduction of more effective antibiotics, such as clindamycin. Therefore, we conducted an experiment focusing on new possibilities for clinical use of L.H.M. How L.H.M roles in skin melanin production has not been investigated. In this study we used the B16F10 melanoma cell to identify the melanin inducing properties of L.H.M. Melanin contents and tyrosinase activity in the cells were increased by L.H.M without any cytotoxicity. Western blot analysis indicated that the protein level of tyrosinase, tyrosinase-related-protenin-1 (TRP-1), and tyrosinase-related-protenin-2 (TRP-2) were increased after L.H.M treatment. In addition, L.H.M enhanced the microphthalmia-associated transmission factor (MITF) expression. Moreover, L.H.M increased phosphorylation of c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and p38 mitogen-activated protein kinases in MAPK. Furthermore, the inhibition of tyrosinase activity by L.H.M was stimulated by treatment with SP600125 (a specific JNK inhibitor) and SB203580 (p38 inhibitor). We also found that L.H.M-induced melanogenesis was reversed by H89, which is a specific protein kinase an inhibitor. Finally, using MTT assay, the cell viability of L.H.M in HaCaT cell was confirmed. These results suggested that L.H.M may be used to treat or prevent hypopigmentation disorders or hair depigmentation.

Key words : L.H.M, B16F10 melanoma cells, Melanogenesis, JNK, p38

목 차

ABSTRACT.....	1
목 차.....	2
LIST OF FIGURES.....	4
I. 서론.....	6
II. 재료 및 방법.....	18
1. 시료 및 시약.....	18
2. 실험 방법.....	20
2.1 세포배양.....	20
2.2 세포독성평가.....	21
2.3 멜라닌함량측정.....	22
2.4 Tyrosinase 활성 측정.....	22
2.5 Western blot 실험.....	23
2.6 통계처리.....	24
III. 결과.....	26
1. B16F10 melanoma 세포 내에서 항생제들의 세포독성 평가.....	26
2. B16F10 melanoma 세포 내에서 멜라닌 함성에 항생제들이 미치는 영향.....	31
3. B16F10 melanoma 세포 내에서 LHM의 Tyrosinase 활성에 미치는 영향.....	36
4. Western blot 분석.....	38

4.1	멜라닌 생성 관련 효소들의 발현에 LHM이 미치는 영향.....	38
4.2	MAPK 신호전달경로에 대한 LHM의 영향.....	41
4.3	신호전달경로에 대한 저해제 및 LHM의 영향.....	43
4.4	B16F10 세포 내에서 LHM의 Akt 인산화 저해.....	45
4.5	PKA 의존 신호 경로를 통한 LHM의 멜라닌 생성 유도.....	47
5.	HaCaT keratinocyte 세포에서 LHM의 독성 평가.....	49
IV. 고찰.....		51
V. 참고문헌.....		55

<LIST OF FIGRES>

Figure 1. Melanocyte.....9

Figure 2. The biosynthetic pathway to eumlanin and pheomelanin.....9

Figure 3. Nagatibe regulation of melanogenesis in B16F10 melanoma cell...10

Figure 4. Postive regultion of melanogenesis in B16F10 melanoma cell.....10

Figure 5. Antibiotics classes.....12

Figure 6. Structure of Azithromycin.....13

Figure 7. Structure of Roxithromycin.....14

Figure 8. (a)Structure of Lincomycin hydrochloride monohydrate (LHM),(b)Structure of Clindamycin hydrochloride monohydrate15

Figure 9. Structure of Paromomycin.....16

Figure 10. principle of MTT assay.....25

Figure 11. Principle of Western blot.....25

Figure 12. Cell viability of Azithromycin on B16F10 melanoma cell.....27

Figure 13. Cell viability of Roxithromycin on B16F10 melanoma cell.....28

Figure 14. Cell viability of Paromomycin on B16F10 melanoma cell.....29

Figure 15. Cell viability of Lincomycin hydrochloride monohydrate(LHM)...30

Figure 16. Melanin contents of Azithromycin on B16F10 melanoma cell.....32

Figure 17. Melanin contents of Roxithromycin on B16F10 melanoma cell...33

Figure 18. Melanin contents of Paromomycin on B16F10 melanoma cell.....34

Figure 19. Melanin contents of Lincomycin hydrochloride monohydrate(LHM) on B16F10 melanoma cell.....	35
Figure 20. Tyrosinase activity of LHM on B16F10 melanoma cell.....	37
Figure 21. Effect of L,H.M on TRP-1, TRP-2, Tyrosinase in B16F10 cells.....	39
Figure 22. Effect of L.H.M on MITF in B16F10 cells.....	40
Figure 23. Effect of L.H.M on MAPK expression in B16F10 cells.....	42
Figure 24. Effect of the JNK (SP600125), p38(SB203580) inhibitor.....	44
Figure 25. Effect of L.H.M on Akt expression in B16F10 cells.....	46
Figure 26. Effect of the PKA inhibitor (H89).....	48
Figure 27. Cell viability of L.H.M on HaCaT cell.....	50
Figure 28. Effect of L.H.M in melanogenesis on B16F10 melanoma cell.....	54

I. 서론

멜라닌이란 여러 동물의 피부나 눈, 털 등 조직에 존재하는 흑, 갈색 색소를 총칭한다.(1,2) 기능으로는 피부의 체온을 유지해주고 자외선으로부터 피부를 보호해 준다. 또한 사람의 피부색을 결정하는 중요한 요소이다.(3,4)

멜라닌 세포는 Melanocyte 안에 있는 melanosome에 의해 생성되며 인간의 피부 착색에 관여한다.(5-9) 멜라닌 생성의 여러 가지 기전 중 가장 대표적인 단계인 L-tyrosine와 3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)는 속도제한효소로 tyrosinase 효소의 작용으로 인해 Dopachrome으로 산화된다.(10) dopachrome은 tyrosinase 효소로 인해 사이클화를 거쳐 DOPAchrome이 형성되며 TRP-2와 tyrosinase의 작용으로 인해 DHI로 산화되며 TRP-1의 효소로 인해 Eumelanin으로 합성되고, 시스테인과 결합하여 Pheomelanin을 생성한다.(11-14) eumelanin은 흑 갈색의 색소로 머리색과 피부색에 관여하며, pheomelanin은 붉은 빛을 나타내며 붉은색 머리를 가진 사람에게서 많이 발견된다.(15) tyrosinase-related-protein-1(TRP-1), tyrosinase-related-protein-2(TRP-2) or DCT, tyrosinase, MITF 효소 작용으로 인해 멜라닌이 형성된다.(16-18).

Tyrosinase는 멜라닌 생합성 과정에서 반응을 촉매하는 속도 조절 효소로 중요한 역할을 한다. TRP-1은 tyrosinase를 안정화함으로써 tyrosinase의 활성화에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며, TRP-2는 멜라닌 생성 경로에서 DOPAchrome 호변 이성화 효소이다.(19) tyrosinase 발현은 Microphthalmia-associated transcription factor(MITF)에 의해 조절된다. MITF의 주요 역할은 M-box라고 불리는 tyrosinase promoter에서 tyrosinase 발현을 증가시키고, tyrosinase을 멜라닌으로 전환시키는 효소들을 전사적으로 활성화 시킨다.(20-23)

멜라닌 양성 조절제 역할을 하는 melanocortin-1-receptor(MC1R)가 있다.(24) melanocortin 안에 포함 된 부신피질 자극 호르몬 (ACTH), 멜라닌 세포 자극 호르몬 (α -MSH)등이 작용한다.(25-27) melanocyte 세포 표면에 있는 MC1R 수용체는 다양한 멜라닌 관련 효소들의 발현과 기능을 상향 조절한다.(28, 29)

그 중 α -MSH는 adenylyl cyclase (AC)를 자극하여 cAMP의 세포 내 농도를 증가시킨다. cAMP는 Protein kinase A(PKA)를 활성화하고, 이는 차례대로 cAMP 반응 요소인 CREB 단백질을 인산화한다.(30) CREB 인산화의 활성화는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 관련 효소들의 전사를 유도한다.(31-33)

다른 멜라닌 경로로는 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달경로가 있다. MAPK는 ERK, JNK, p38 세가지의 단백질로 구성되어있는데, 이 중 ERK 단백질의 인산화는 MITF의 단백질을 인산화 하고 인산화 된 MITF 단백질은 유비퀴틴화 되어 분해되고 JNK와 p38의 인산화는 MITF 단백질의 발현을 증가시킨다는 연구결과가 보고되었다. P38의 MAPK 경로 활성화는 멜라닌 합성 증가와 관련이 있는 것으로 보고되었다.(34-36) 더욱이, protein kinase B (AKT) 신호 전달 경로의 활성화는 MITF 분해 증가 및 멜라닌 생성 효소 발현 감소와 관련되어 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 보고되었다. MAPK/AKT에 따른 신호 전달 경로는 멜라닌 생성 조절을 위한 전략적 표적으로 간주된다. (37-39)

최근 연구에 따르면 MITF를 인산화 하고 활성화를 억제하여 멜라닌 생성 억제를 유도하는 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT 신호가 포함된다.(40) 또한 cAMP의 상승 또는 PI3K의 발현 억제는 AKT 인산화의 감소는 GSK3 β 의 인산화를 활성화 시키고 β -catenin은 인산화의 영향을 받아 멜라닌 함량을 증가시키는 것으로 나타났다. 여기서 GSK3 β 는 tyrosinase promoter에서 MITF의 결합을 촉진하고, promoter의 전사를 증가시켜 멜라닌 함량을 증가시킨다고 보고되었습니다. 다른 연구에선 흑색 종 멜라닌 세포에서는 멜라닌 생성 유도체의 신호 메커니즘에 대한 PI3K/AKT 및 ERK의 억제를 통해 작용하는 tyrosinase 발현을 자극할 수도 있다고 보고되었다.(41,42)

다양한 기전으로 통해 생성된 멜라닌은 스트레스의 원인과 급격한 노화로 인해 모낭의 멜라닌 세포 수가 감소하게 되면서 흰머리와 새치가 생기게 된다. 또한 피부 보호 기능이 저하되기 때문에 피부가 얇아지면서 피부 보호 기능이 저하된

다. 쉽게 수분 증발이 일어나게 되면, 멜라닌 자극 호르몬은 쉽게 자극을 받게 되면서 과도하게 멜라닌을 방출한다. 이 때 기미, 흑색 종 등 멜라닌 과 색소 침착으로 인한 질병들을 얻을 수 있다.

하지만 과 색소 침착으로 인한 질병들이 있는 반면, 저 색소로 인한 질병들이 존재한다. 멜라닌 세포의 소실에 의해 다양한 크기 및 형태의 흰색 점들이 피부에 나타나는 후천성 탈 색소 질환들 중 가장 대표적인 질환들로 저 색소 침착증 (Hypopigmentation), 백반증 (Vitiligo), 화학물질에 의한 백색 피부증 (Chemical leukoderma), 탈색 모반 (Nevus depigmentosus) 등이 존재한다. (43)

멜라닌에 대한 질병뿐만 아닌 평상시에 흔하게 볼 수 있는 창백한 피부, 붉은 머리카락, 주근깨 및 황갈색이 없는 이러한 특징들은 멜라닌 색소가 부족한 사람들의 특징이다. 멜라닌이 부족한 사람들은 멜라닌이 풍부한 사람들에 비해 흑색 종 발병 위험이 높다고 보고되었다.(44) 피부암은 세계적으로 증가하고 있는 추세다. 백인을 비롯한 피부색이 옅은 사람에게 흔히 발생했으나, 평균수명의 증가, 진단 방법의 발전 등으로 한국 등 아시아인에게서도 증가 추세를 보이고 있다. 또한 백반증을 가진 임산부라면 유산 위험이 증가한다고 보고되었다.

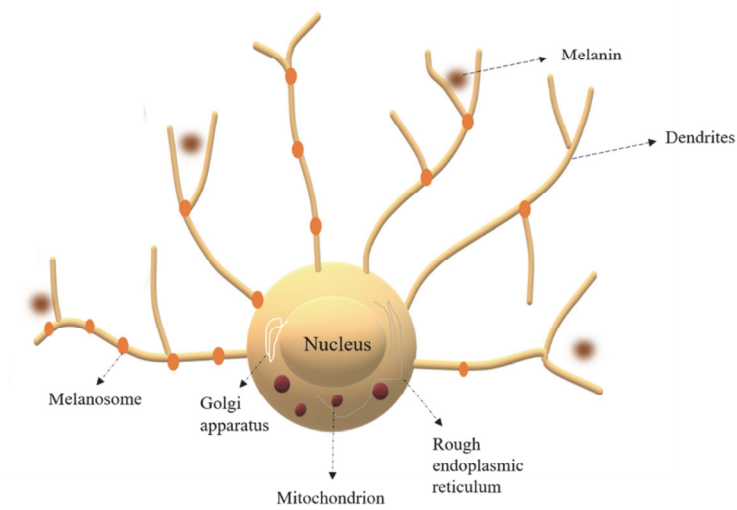


Figure 1. Melnocyte

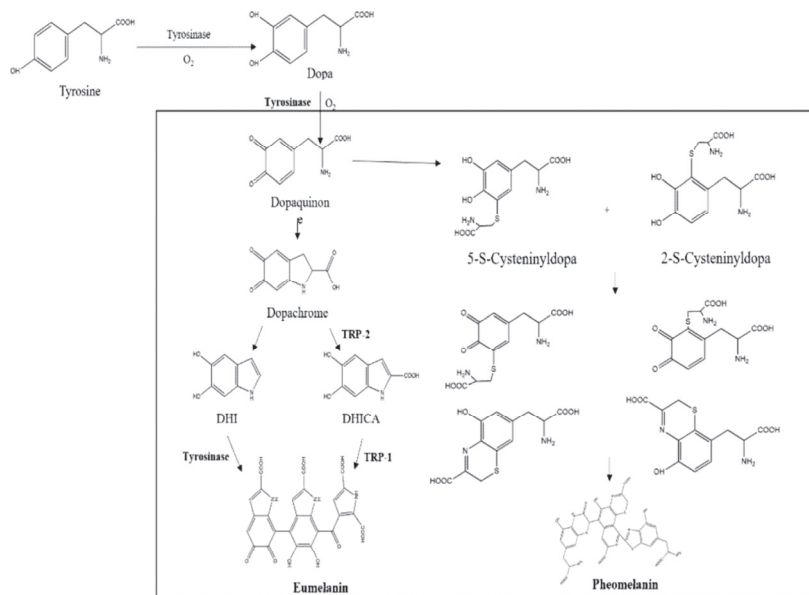


Figure 2. The biosynthetic pathway to eumelanin and pheomelanin

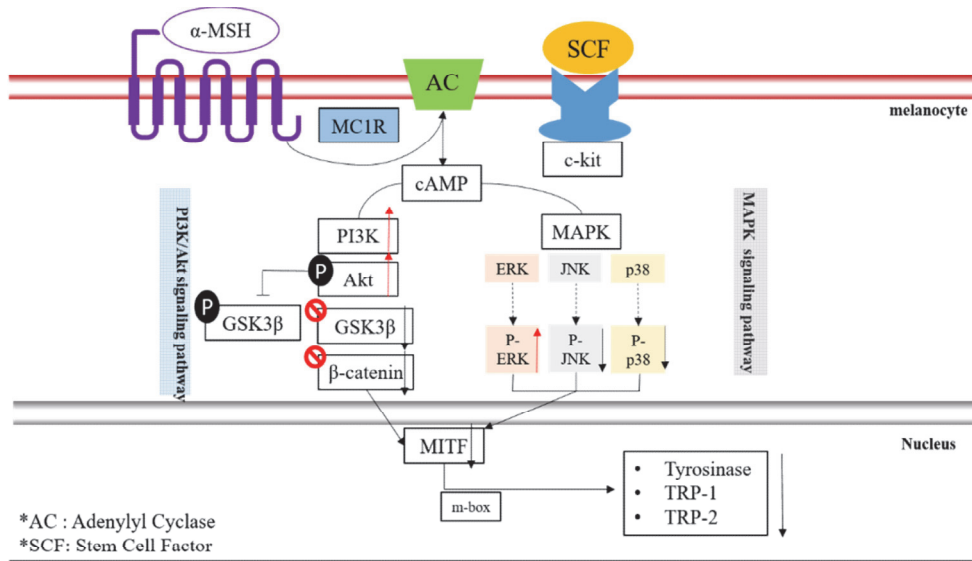


Figure 3. Negative regulation of melanogenesis in B16F10 melanoma cell.

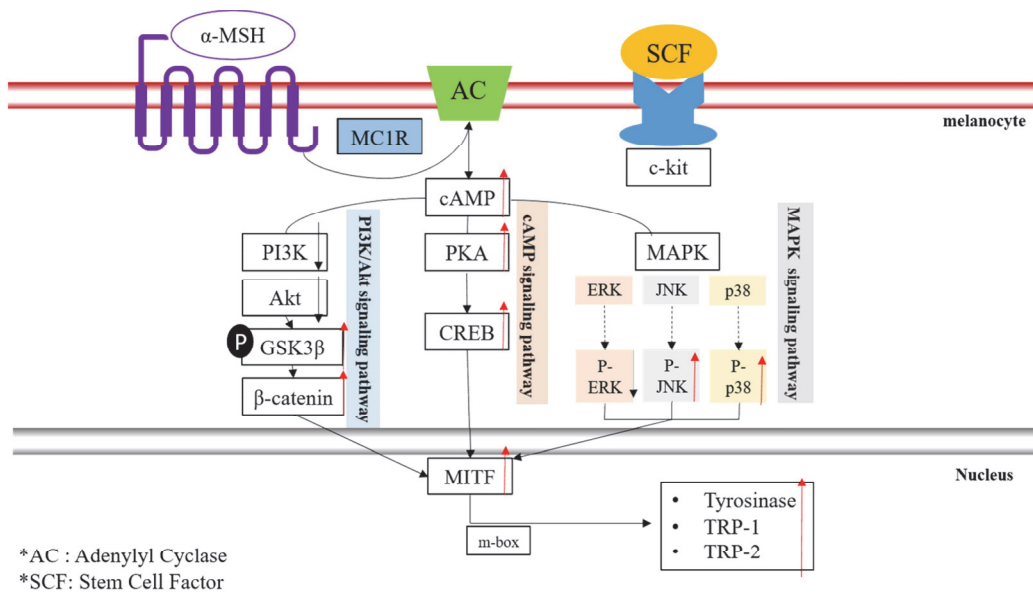


Figure 4. Positive regulation of melanogenesis in B16F10 melanoma cell.

19 세기에는 전염병이 전 세계적으로 높은 이환율과 사망률을 차지했다. 예를 들어 천연두, 콜레라, 디프테리아, 폐렴, 장티푸스, 플라크, 결핵, 발진티푸스, 매독 등과 같은 전염병은 어린이와 성인의 주요 사망 원인으로 간주되었다.(45) 후반에 들어서야 미세한 병원체의 존재를 다양한 질병의 발생과 연관시키는 것이 가능해졌다. 항균 활성을 가진 최초의 화합물의 도입은 많은 질병을 낮게 하는데 도움을 주었으며, 최초의 항생제는 1911 년 Erlich에 의해 도입되었다.(46) 그는 매독 치료제를 발견하는 연구 활동을 집중적으로 해왔으며, 그 후 동료들이 페니실린과 스트렙토마이신을 발견했다.(47) 스트렙토마이신은 결핵 치료를 위해 사용된 약물이다. 이러한 항생제는 특정 박테리아의 번식을 막거나 파괴하는 역할을 한다.(48)

이러한 항생제 들은 다양한 기능들을 한다. 그 중 세포벽 합성 억제와 단백질 합성 억제, 핵산합성 억제 등이 있다. 세포벽 합성 억제 기능 항생제는 penicillin 계, cephalosporin(세파 계), β -lactam 계 등이 존재한다. 이러한 항생제 계열들은 PBP(Penicillin-Binding Protein)라고 불리는 효소와 결합하여 세포벽 합성을 저해한다.(49)

단백질 합성 억제 항생제 계열에는 Aminoglycoside, Tetracycline, Macrolide, Lincosamide, Chloramphenicol 있으며, 단백질 합성은 총 3 단계가 거쳐서 만들어 진다. 먼저 개시 단계에서 mRNA가 tRNA 리보솜의 소 단위체와 결합하고 리보솜의 대단위체가 부착하여 복합체를 형성한다. 이러한 복합체들은 연장단계에 이르러 tRNA가 운반한 아미노산이 polypeptide chain의 말단에 하나씩 결합된다. polypeptide는 유전정보에 따라 특이적으로 합성된다. 마지막으로 종결단계에서 리보솜이 종결 코돈에 도달하면 방출인자라고 불리는 단백질이 결합하여 tRNA에 결합되어있는 polypeptide chain을 분리하고 tRNA에서 방출시켜 단백질 합성이 이루어진다. 이 때 세균단백질 합성 억제는 세균의 리보솜과 진핵 생물의 리보솜이 다른 구성이기 때문에 인체의 리보솜은 항생제의 공격을 받지 않는다. 이 항생제들은 세균이 필요한 mRNA를 만들지 못하게 하여 단백질 합성을 원천적으로 방해한다.

핵산 합성 억제 항생제는 Rifampicin 항생제가 존재한다. 정상적인 DNA 구조를

만들어 주는 효소에 작용하여 세균이 제대로 된 DNA를 합성하지 못하게 하여 세균을 사멸한다.(50)

세균 단백질 합성 억제 항생제 계열들 중 Aminoglycoside, Tetracycline, Macrolide, Lincosamide, Chloramphenicol는 구조적으로나 화학적으로 관련이 존재하지 않는다. 하지만 저항항균제라는 공통점이 존재한다. 또한 Macrolide와 lincomsamide는 유사한 작용 방식을 공유한다.(51,52) 그 중 MLS(macrolide-lincosamide-streptogramin B)항생제는 아미노산 서열 중 그 동일성과 유사성이 높다.(53,54) MLS 계열의 항생제들은 50s 대단위체에 결합하여 aminoacyl tRNA 결합을 방해한다. 이 때 세균증식에 필요한 단백질 합성이 이루어지지 않아 세균의 증식이 정지하여 정균역할을 한다.

Aminoglycoside와 Tetracycline 계 항생제가 유사한 작용 방식을 공유한다. 이들은 30s 소단위체에 부착하여 그 기능을 방해하여 단백질 합성을 억제한다. 30s ribosomal protein에 비가역적으로 붙어서 박테리아 단백질 합성을 억제하게 되며 살균 역할을 한다.

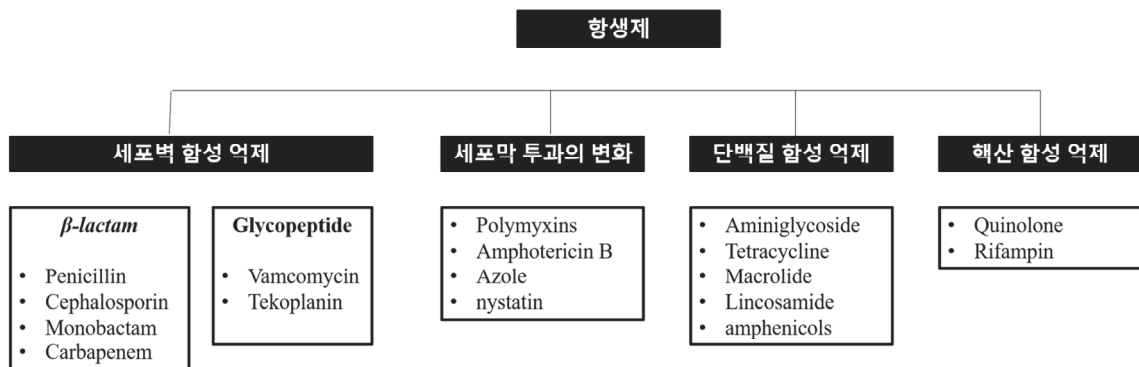


Figure 5. Antibiotics class

<Macrolide 계 항생제>

하나 이상의 deoxy sugar, cladinose, deosamine이 부착 될 수 있는 큰 macrocyclic lactone 고리로 구성된 천연 제품의 한 부류다.

- Azithromycin은 macrolide계 항생제로써 1980년에 처음 발견되었다. 세계 보건 기구 필수 의약품 목록에 등재 되어있으며, 중이염, 연쇄상 구균 인두염, 폐렴, 기타 감염 등 각종 감염증 치료에 사용된다.(55,56) 일반적인 부작용으로는 구역질, 구토, 설사, 배탈 등이 포함된다. 임신 중 복용에 미치는 악영향은 발견된 바 없다.

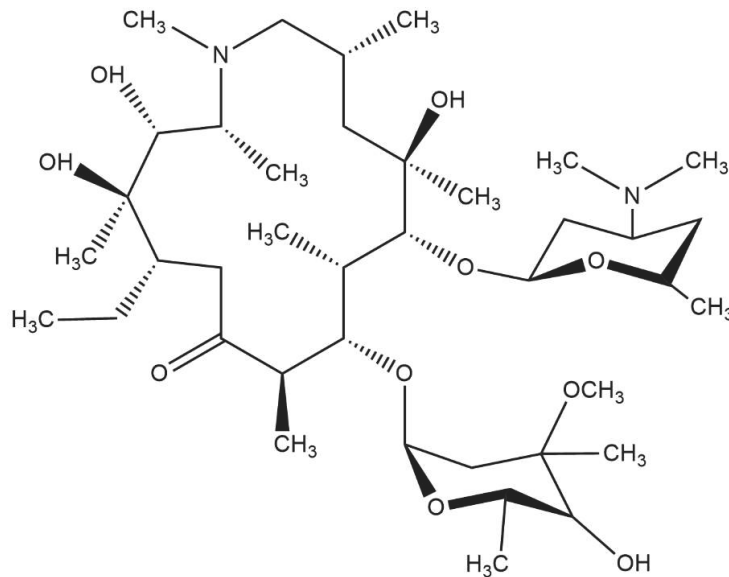


Figure 6. Structure of Azithromycin

<Lincosamide 계 항생제>

아미드 결합을 통해 연결된 pyrrolidine 고리로 구성된다.

- **Lincomycin hydrochloride monohydrate (L.H.M) (Figure 8.)**는 streptomyces lincolnensis에서 유래한 lincosamide 항생제이며,(57) 1962년 토양 박테리아(streptomyces lincolnensis)에서 분리되었다. 그리고 1964년 9월에 페니실린에 알레르기가 있거나 박테리아가 내성이 생긴 환자에게 사용하는 의료용으로 출시가 되었지만, 부작용과 독성 때문에 거의 사용하지 않고 있다. 이러한 부작용으로는 위장장애와 피부 및 피하 조직 장애가 나타난다.(58) 그리하여 lincosamide 계 중 임상에서 이용되는 clindamycin을 더 많이 사용하게 되었다. (59) Clindamycin은 Lincomycin에 비해 항 균력이 높으며, 경구 투여 시 흡수도 잘된다. 두 항생제 모두 경구 혹은 비경구가 시판되고 있으나, lincomycin의 사용은 감소하는 추세이다.

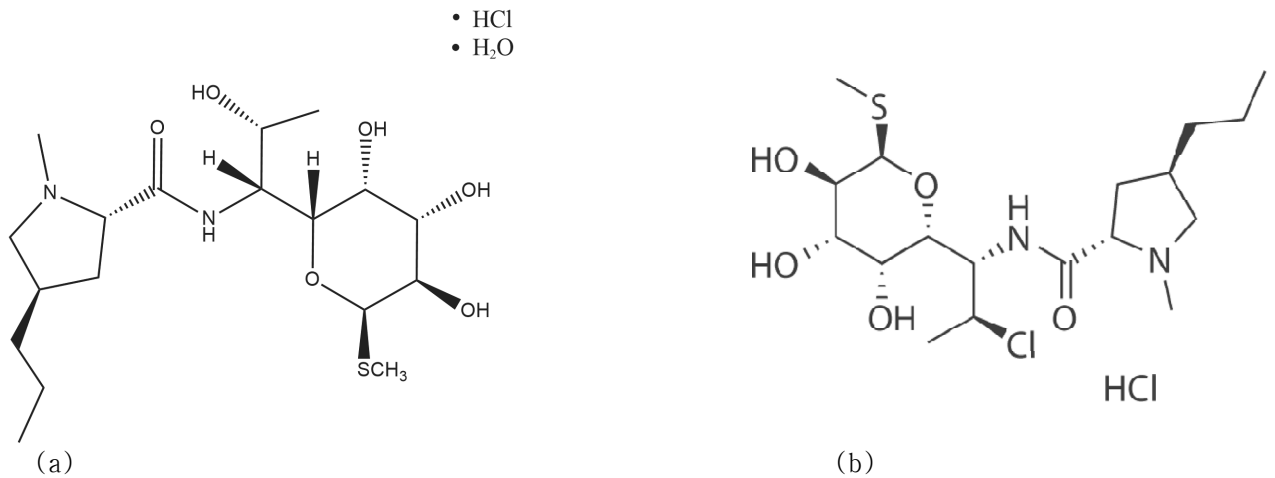


Figure 8. (a) Structure of Lincomycin hydrochloride monohydrate (LHM),
(b) Structure of Clindamycin hydrochloride monohydrate

<Aminoglycoside 계 항생제>

2-deoxystreotamide 같은 aminocyclitol ring에 2개 이상의 amino sugar가 glycosidic bond로 결합 되어있다.(60)

- **Paromomycin sulfate (Figure 9.)**는 1950년에 streptomycetes에서 발견되었으며, 1960년에 의료용으로 사용되었다. WHO 세계보건 기구에 필수 의약품 목록에 있으며 가장 안전하고 효과적인 의약품이다.(61)

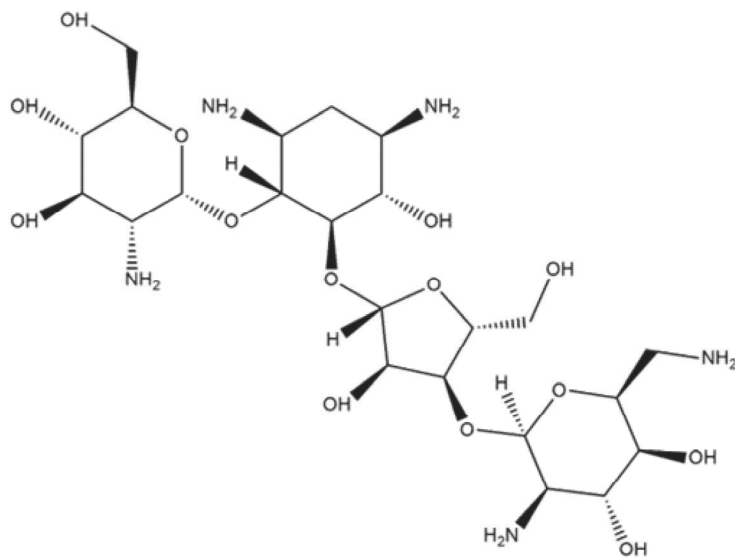


Figure 9. Structure of Paromomycin

Macrolide 계와 Lincosamide 계 항생제는 공통적으로 작용한다. 50S 대단위체에 결합하여 aminoacyl tRNA 결합을 방해한다. Aminoglycoside 계 항생제는 30s 소단위체에 부착하여 그 기능을 방해한다. 30s ribosomal protein에 비가역적으로 붙어 박테리아 단백질 합성을 억제한다.

항생제들은 많은 기능을 한다. 그러나 남용과 부작용으로 설사, 구역질, 구토, 발진, 배탈 등 특정 항생제 또는 장기간 사용 시 질의 곰팡이 감염 등을 초래할 수 있다. 항생제들은 향균 효과 및 의약품으로만 사용해왔으며, 오랫동안 사용되어 내성이 생기거나, 심각한 부작용, 더 뛰어난 항생제의 개발 등으로 현대 사회에서는 사용량이 감소했거나 더 이상 쓰이고 있지 않는다.

본 연구에서는 4종의 항생제를 가지고 이들의 다른 효능을 찾기 위해 진행하였다. 각 시료를 B16F10 melanoma 세포에 처리하였을 때 멜라닌 합성에 어떤 영향을 끼치는지 확인해보았다. 그리고 추가적으로 사람의 각질세포에서의 독성평가도 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 Lincomycin Hydrochloride Monohydrate, Paromomycin sulfate, Azithromycin, Roxithromycin은 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.(Chuo-ku, Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

Dulbecco's modifiedEagle medium(DMEM) 그리고 penicillin/streptomycin and fetal bovine serum(FBS), 0.5% Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (10X), Bicinchoninic acid(BCA) kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

양성 대조군으로 사용된 α -MSH와 NaOH, L-Dopa_(phenyl-d3)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 VWR(Radnor, Pennsylvania U.S.A)에서 구입하였다.

Antibodies Tyrosinase, Tyrosinase-related protein 1(TRP-1), Tyrosinase-related protein 2(TRP-2), Microphthalmia-associated transcription factor(MITF), β -actin 위 1차 항체는 santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다.

p-p38, p38, p-JNK, JNK, p-ERK(1/2), ERK(1/2), p-AKT, T-AKT 1차항체와 anti-mouse IgG HRP-linked Antibody, anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody 2차항체는 Cell signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

LY294002(AKT inhibitor)는 Cell signaling Technology(Danvers, MA, USA)에

서 구입하였다.

SP600125(JNK inhibitor)는 Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다.

SB203580(p38 inhibitor)는 Calbiochem (Sam Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

PD98059(ERK inhibitor)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, dimethyl sulfoxide (DMSO) and 5X Sodium Dodecyl Sulfate(5X SDS) sample buffer 및 2 x Laemmli sample buffer, Enhanced chemiluminescence (ECL) 는 Biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다.

2. 실험 방법

2.1 세포배양

B16F10 mouse melanoma cell은 ATCC®(The Global Bioresource Center)에서, HaCaT human keratinocyte cell은 CLS cell Lines Service GmbH Baden-Wurttemberg, Germany)에서 구입하였다. 10 % FBS와 1 % penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지에서 37 °C, 5 % CO₂조건에서 배양하였다. 100π dish에 3 × 10⁵으로 3일 주기로 계대하였다.

2.2 세포 독성 평가

시료가 살아있는 세포에 미치는 독성을 평가하기 위해 MTT실험을 진행하였다. MTT 실험은 비색 분석 세포 대사활동을 평가하는 실험이다. 살아있는 세포 내 미토콘드리아에 NAD (P) H- dependent cellular oxidoreductase 효소에 의해 세포에 황색 수용성 MTT 시약을 처리하면 자주색-보라색의 불용성 formazan 으로 환원이 된다. 이 때 환원된 formazan의 양을 측정하여 세포독성을 평가하는 방법이다. formazan 농도가 높을수록 자주색이 진해져 흡광도가 높아진다. (62)

B16F10 melanoma cell 을 24 well plate에 0.8×10^4 cells/well농도로 넣고, 10 % FBS와 1 % penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지에서 24 시간 동안 시료를 각 농도를 처리한 후 72 시간 후 5 mg/mL solution을 배지로 희석한 0.2 mg/mL MTT 시약을 처리하여 4시간 동안 반응시켰다. 그리고 상층액을 제거하여 DMSO를 넣어 30분 동안 formazan을 녹여준 뒤 96 well plate 에 100 μ L씩 옮겨 담아 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Swizerland)를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

HaCaT cell 을 24 well plate에 0.8×10^5 cells/well농도로 넣고, 10 % FBS와 1 % penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지에 24시간 배양한 후 free media FBS 배지를 사용하여 시료를 각 농도별로 처리하였다 24시간 후 mg/mL solution을 배지로 희석한 0.2 mg/mL MTT 시약을 처리하여 4시간 동안 반응시켰다. 그리고 상층액을 제거하여 DMSO를 넣어 30분 동안 formazan을 녹여준 뒤 96 well plate 에 100 μ L씩 옮겨 담아 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Swizerland)를 사용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.3 멜라닌 함량 측정

B16F10 melanoma cell을 6 well dish에 0.5×10^5 농도로 넣고, 10 % FBS와 1 % penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지에서 24 시간 후에 시료를 처리하고 α -MSH를 양성대조군으로 사용하였다. 시료 처리하고 72 시간 뒤에 상층액을 제거한 후 1 × PBS 로 2번 세척 해준 뒤 RIPA buffer(1 % inhibitor cocktail)을 200 μ L 넣고 4 °C에서 30분간 반응한 뒤 1.5 mL e-tube에 세포를 걸었다. 세포는 deep freezer centrifuge 15,000 rpm, -8 °C에서 20분간 원심 분리를 하여 상층액을 제거한 후 pellet만 걸어 내어 1 N NaOH(10 % DMSO)를 500 μ L 넣고 70 °C에서 1 시간 용해시켰다. 각 용해된 pellet은 96 well plate에 100 μ L씩 넣고 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Swizerland)를 사용하여 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2.4 Tyrosinase activity

B16F10 melanoma cell 을 60 π dish plate에 0.8×10^5 농도로 넣고, 10 % FBS와 1 % penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지에서 24 시간 후에 시료를 처리하고, 양성대조군을 α -MSH로 사용하였다. 시료를 처리하고 72 시간 뒤에 상층액을 분리한 뒤 1 × PBS 로 2번 세척 해준 뒤 RIPA buffer(1 % inhibitor cocktail)을 200 μ L 넣고 4 °C에서 30분간 반응한 뒤 1.5 mL e-tube 에 세포를 걸었다. 세포는 deep freezer centrifuge 15,000 rpm, -8 °C에서 20 분간 원심 리를 하여 상층액을 걸어 낸 뒤 단백질 농도는 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였다.

각각 상층액은 1 μ g/mL로 희석하고 96 well plate에 단백질 상층액 용액은 20 μ L, L-Dopa_(phenyl-d3) (2 mg/mL) 80 μ L를 넣고 37 °C에서 1 시간 30분 동안 반응하였다. 그 후 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Swizerland)를 사용하여 490 nm에서 측정하였다.

2.5 Western blot

B16F10 melanoma cell 을 60π dish에 0.8×10^5 cells/well 농도로 접종한 뒤 10 % FBS와 1 % penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM배지에 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 뒤 각 농도 별로 희석(0.5, 1, 2 mg/mL)로 희석하여 20 h, 24 h, 43 h 동안 처리하였다. 그 후에 1 × PBS 로 2번 세척 해준 뒤 RIPA buffer(1 % inhibitor cocktail)을 200 μL 넣고 4 °C에서 30분간 반응한 뒤 1.5 mL e-tube에 세포를 걸었다. 세포는 deep freezer centrifuge 15,000 rpm, -8 °C에서 20분간 원심 분리를 하여 상층액을 분리하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit를 사용하여 정량 하였다.

각각의 상층액은 단백질 20 μg 농도로 희석하여 2 x Laemmli sample buffer를 1:1 비율로 제조한 뒤 100 °C 에 5분 동안 가열하여 loading sample 을 제조하였다. loading sample을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 에 전기영동하여 단백질을 크기 별로 분리한 후 PVDF membrane으로 옮겨주었고, 5 % skim milk에 2 시간 동안 blocking 처리한 후 0.1 % tween 20 이 함유된 1 × TBST로 5분간격으로 6번 세척하였다. 그리고 측정하고자 하는 단백질의 1차항체를 1% albumin이 함유된 1 × TBST 에 적절한 농도로 희석하여 overnight 반응하였다. 반응이 끝난 1차 항체를 걸어 낸 후 1 × TBST로 5분간 6번 세척하고 HRP가 결합된 2차 항체를 1:1000 (in 1 × TBST)로 희석하여 2시간 동안 반응시킨 후 마지막으로 1 × TBST로 5분간 6번 세척한 후 ECL 용액과 반응시켜 chemidoc (Fusionsolo 6S.WL, VILBER LOURMAT, France)를 사용하여 단백질 밴드를 검출하였다.

2.6 통계처리

모든 실험의 결과는 평균 \pm 표준편차 (SD: n = 3 or 4)로 표현하였다. Student`s T-test를 사용하여 통계적 유의성 및 p 값을 표현하였다. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. control. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. Lincomycin treatment 로 나타내었습니다.

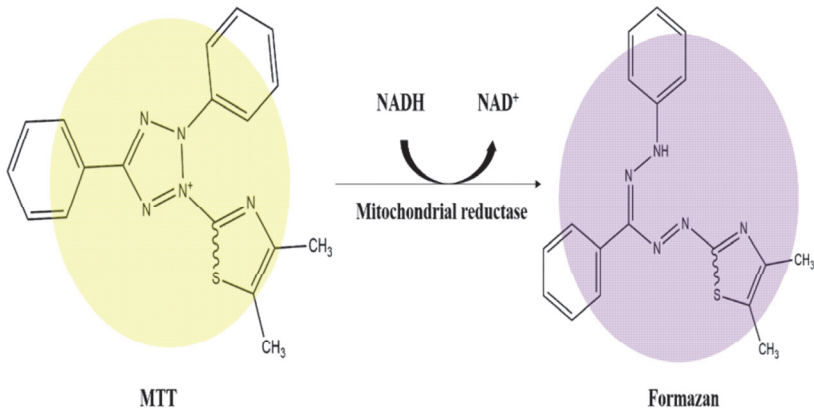


Figure 10. Principle of MTT assay

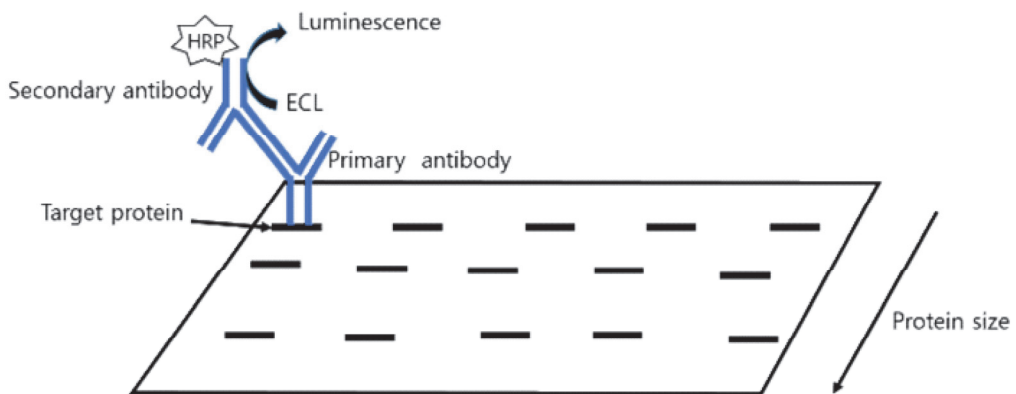


Figure 11. Principle of western blot

III. 결과

1. B16F10 melanoma 세포 내에서 항생제들의 세포독성 평가

B16F10 melanoma 세포 내에서 항생제가 세포 생존에 미치는 영향을 평가하기 위해 MTT 비색 실험을 진행하였습니다. 항생제들은 다양한 농도 범위 내에서 72 h 동안 처리하였습니다. 세포 생존율은 아무것도 처리하지 않은 세포를 기준으로 하여 측정하였고, 90 % 이상의 세포 생존율의 농도에서 추가 실험을 진행하였습니다.

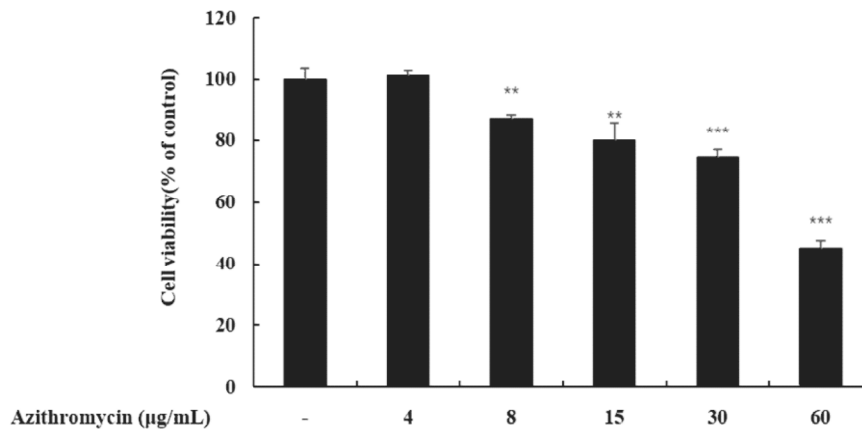


Figure 12. Cell viability of Azithromycin on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 4, 8, 15, 30, 60 µg/mL concentrations of azithromycin for 72 h. and cell viability was determined by 3-(4,5-cimethylthiazol-2-y1)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated control cells.

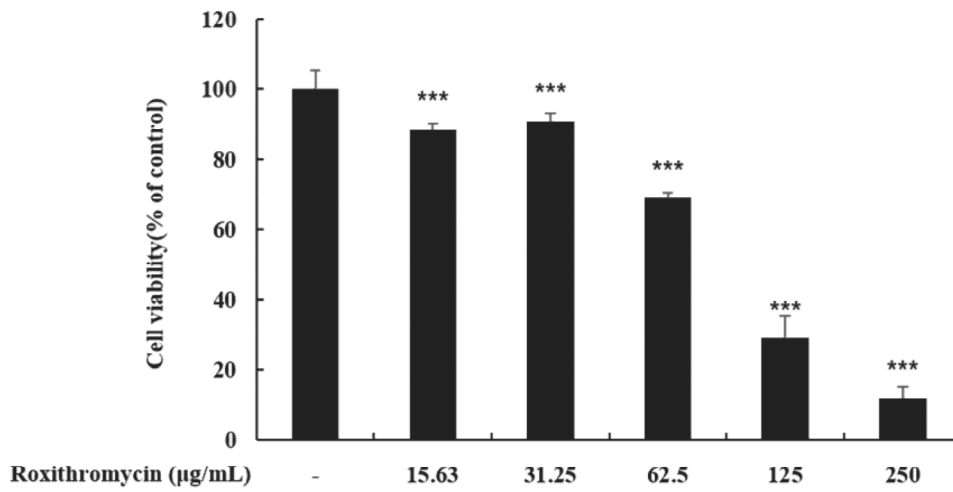


Figure 13. Cell viability of Roxithromycin on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 µg/mL concentrations of roxithromycin for 72 h. and cell viability was determined by 3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates *** $p < 0.001$ vs untreated control cells.

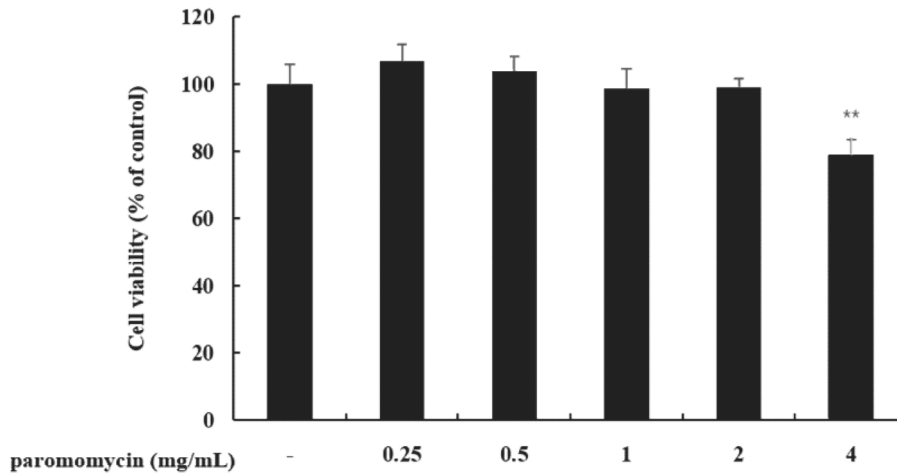


Figure 14. Cell viability of paromomycin on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL concentrations of paromomycin for 72 h. and cell viability was determined by 3-(4, 5-cimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates ** $p < 0.01$ vs untreated control cells.

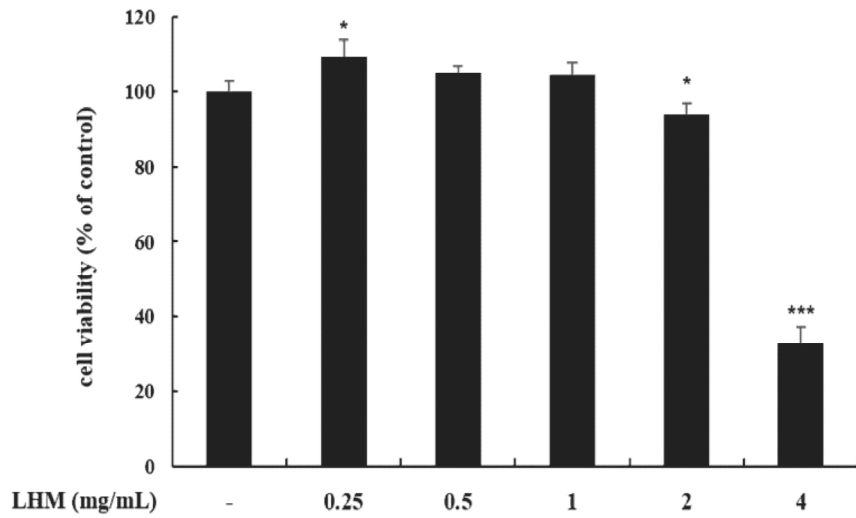


Figure 15. Cell viability of L.H.M on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 0.5, 1, 2, 4 mg/mL concentrations of lincomycin hydrochloride monohydrate(L.H.M) for 72 h. and cell viability was determined by 3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ vs untreated control cells.

2. B16F10 melanoma 세포 내에서 멜라닌 합성에 항생제들이 미치는 영향 평가

항생제들이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포 생존에 영향을 미치지 않은 농도 범위의 항생제들을 B16F10 세포에 72 h 동안 처리하였습니다. 양성대조군으로는 α -MSH (200 nM), Arbutin (200 μ M)를 사용하였습니다.

실험 결과 Roxithromycin은 이 전 논문에서 멜라닌 감소에 대한 연구결과가 나타났다.(63) 또한 4가지 항생제 중 paromomycin 과 L.H.M이 증가하였으며, 나머지는 뚜렷한 효과가 나타나지 않았다고 판단하였다. 그러므로 효과가 뚜렷한 L.H.M으로 추가실험을 진행하였다.

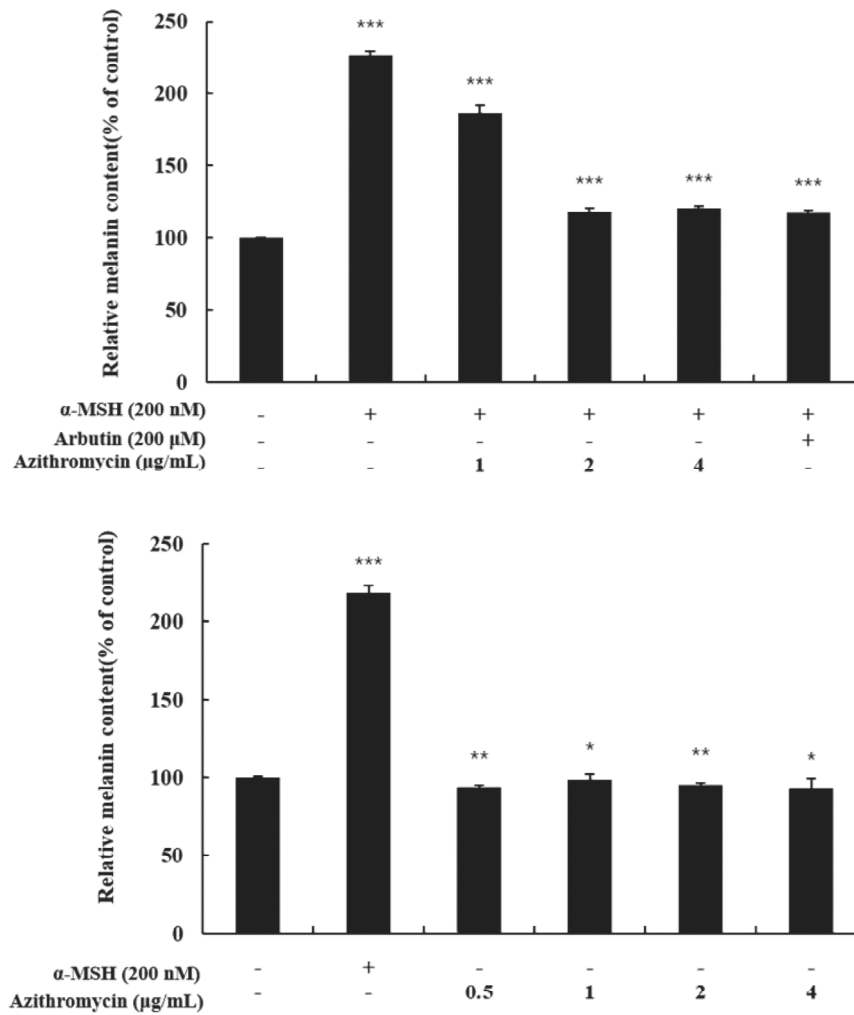


Figure 16. Melanin contents of Azithromycin on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 0.5, 1, 2, 4 μg/mL concentrations of azithromycin for 72 h. α-MSH or arbutin were used as the positive control. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated control cells.

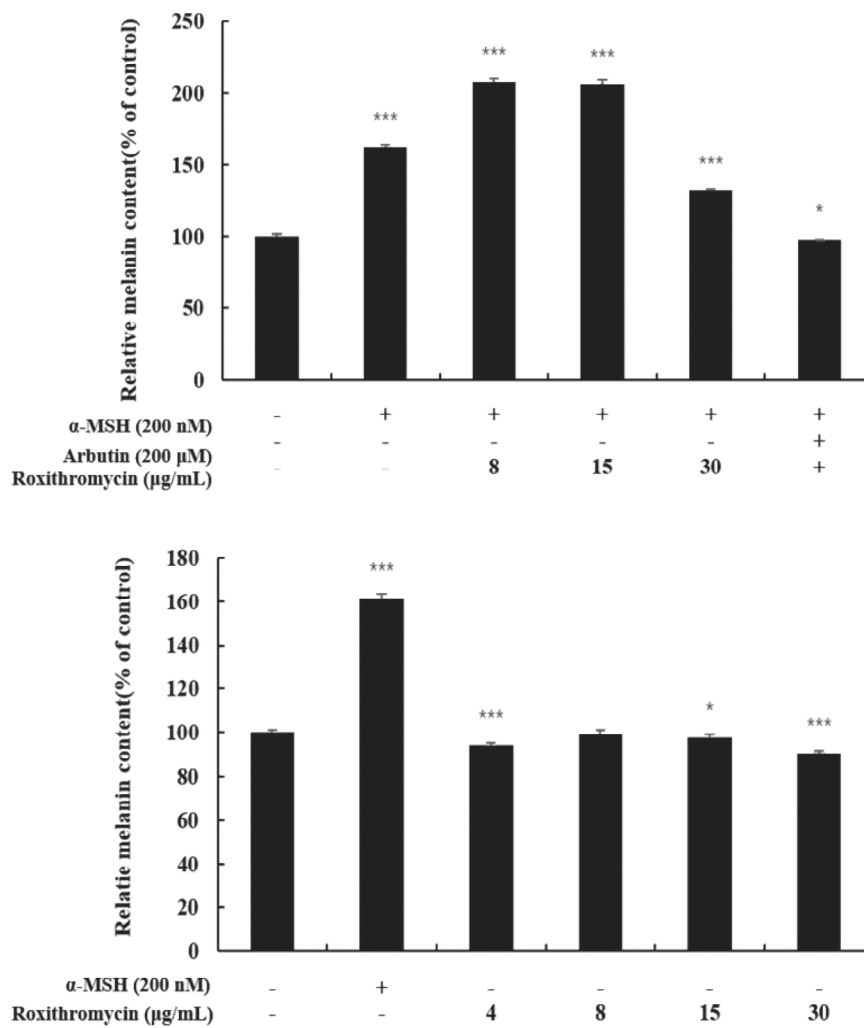


Figure 17. Melanin contents of Roxithromycin on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 4, 8, 15, 30 μg/mL concentrations of roxithromycin for 72 h. α-MSH or arbutin were used as the positive control. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs untreated control cells.

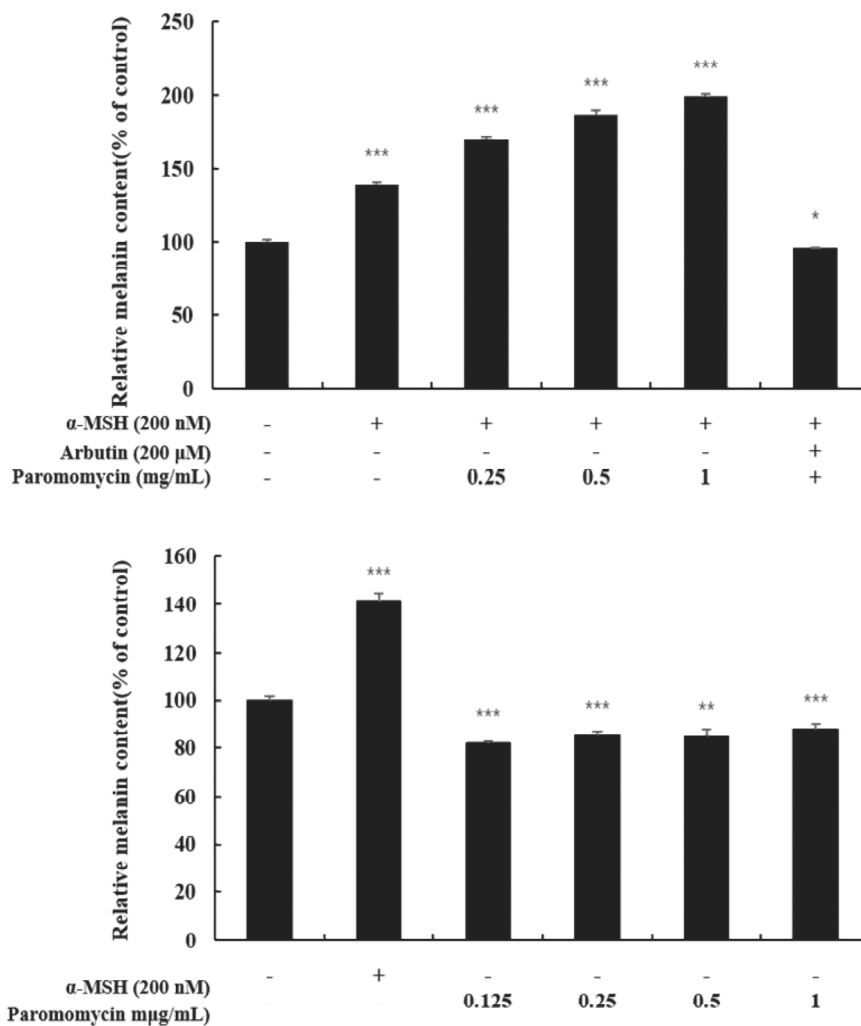


Figure 18. Melanin contents of Paromomycin on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL concentrations of paromomycin for 72 h. α-MSH or arbutin were used as the positive control. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ untreated control cells.

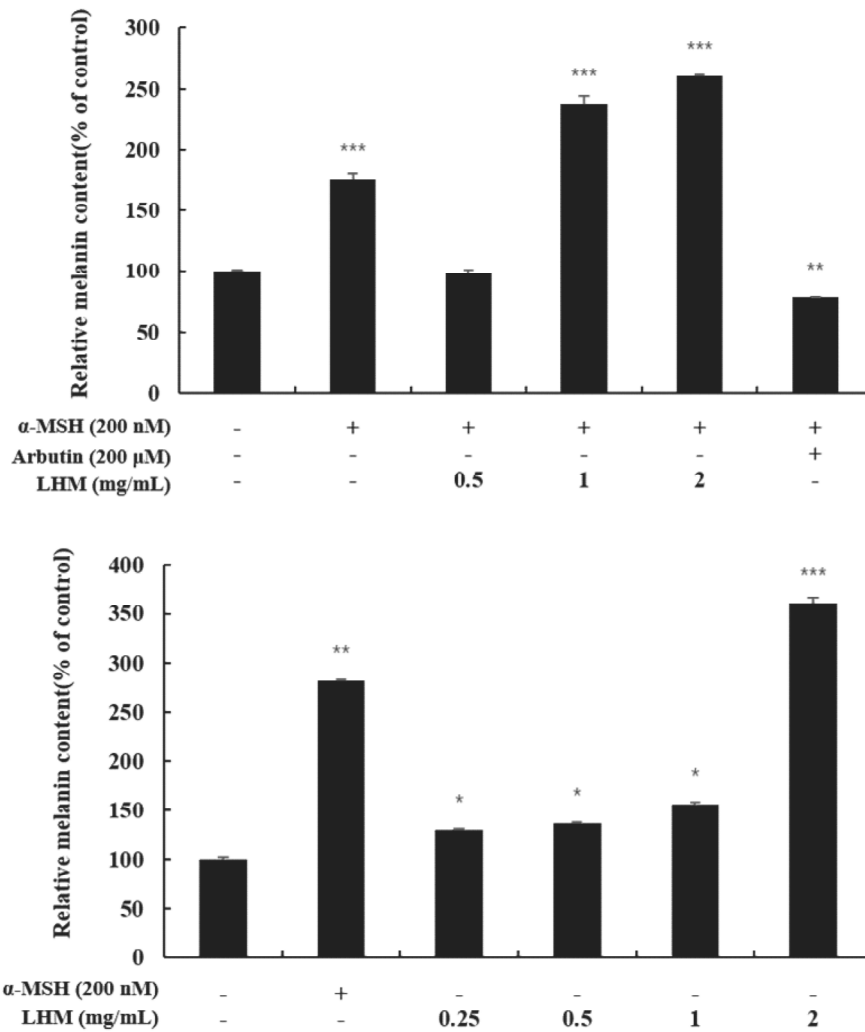


Figure 19. Melanin contents of L.H.M on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL concentrations of L.H.M for 72 h. α -MSH or arbutin were used as the positive control. Melanin contents are expressed as percentages compared to the respective values obtained for the control cells. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated control cells.

3. B16F10 melanoma 세포 내에서 L.H.M의 Tyrosinase 활성화에 미치는 영향

앞의 실험 결과에서 L.H.M이 멜라닌 함량을 증가시키는 경향이 나와 멜라닌 합성에 중요한 효소인 tyrosinase의 활성화 실험을 진행하였습니다. B16F10 세포에 양성대조군으로 α -MSH (200 nM)을 처리하였고, 다양한 농도의 L.H.M (0.5, 1, 2 mg/mL)를 처리하였습니다. 그 결과 고농도의 L.H.M을 처리한 군의 tyrosinase 활성이 대조군과 양성대조군을 비교했을 때 활성이 크게 증가한 것을 확인 할 수 있었습니다.

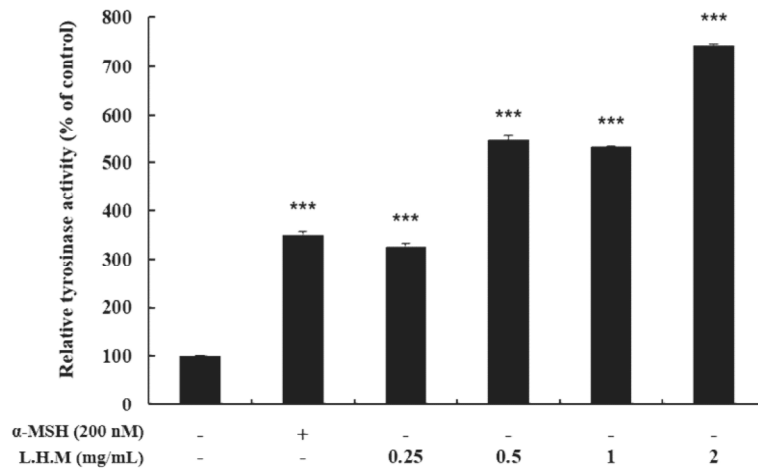


Figure 20. Tyrosinase activity of L.H.M on B16F10 melanoma cell.

The cells were treated with 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL concentrations of L.H.M for 72 h. α -MSH (200 nM) was used as the positive control. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=4). Indicates *** p < 0.001 vs untreated control cells.

4. Western 분석

4.1 멜라닌 생성 관련 효소들의 발현에 L.H.M이 미치는 영향

멜라닌이 합성되는 과정에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 중요한 역할을 합니다. 앞 선 실험에서 L.H.M이 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

이에 더 효과적으로 증명하기 위해 각 농도별에 따른 tyrosinase 그리고 멜라닌 관련 효소 (TRP-1, TRP-2) 단백질 발현 양을 비교하였고, 실험은 western blot 분석법으로 사용하여 수행하였습니다.

B16F10 세포에 L.H.M을 다양한 농도로 처리한 후 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 단백질 발현 양을 확인한 결과 유의적으로 증가하고 있음을 알 수 있었으며, 전사 조절을 좀 더 이해하기 위해 L.H.M이 MITF 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

확인한 결과 L.H.M의 농도가 증가함에 따라 MITF의 발현도 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 이와 같은 결과를 통해 L.H.M은 B16F10 세포에서 MITF의 발현을 자극하여 tyrosinase 및 멜라닌 생성 관련 단백질들의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

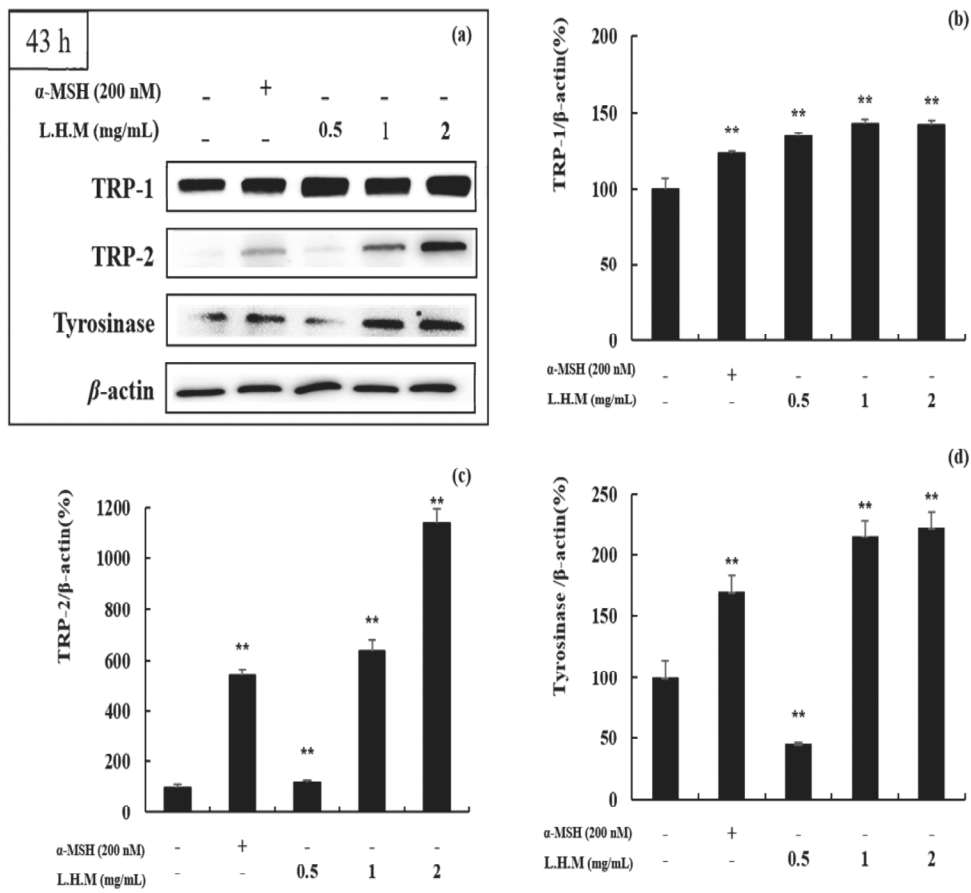


Figure 21. Effect of L.H.M on TRP-1, TRP-2, Tyrosinase in B16F10 cells. Cells were treated with 0.5, 1, 2 mg/mL concentration of L.H.M for 43h. protein levels were examined by western blotting. (a)result of western blot, protein levels (b)TRP-1, (c)TRP-2, (d)Tyrosinase. Result are expressed as a percentage of the positive control. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=3). Indicates ** $p < 0.01$ vs untreated control cells.

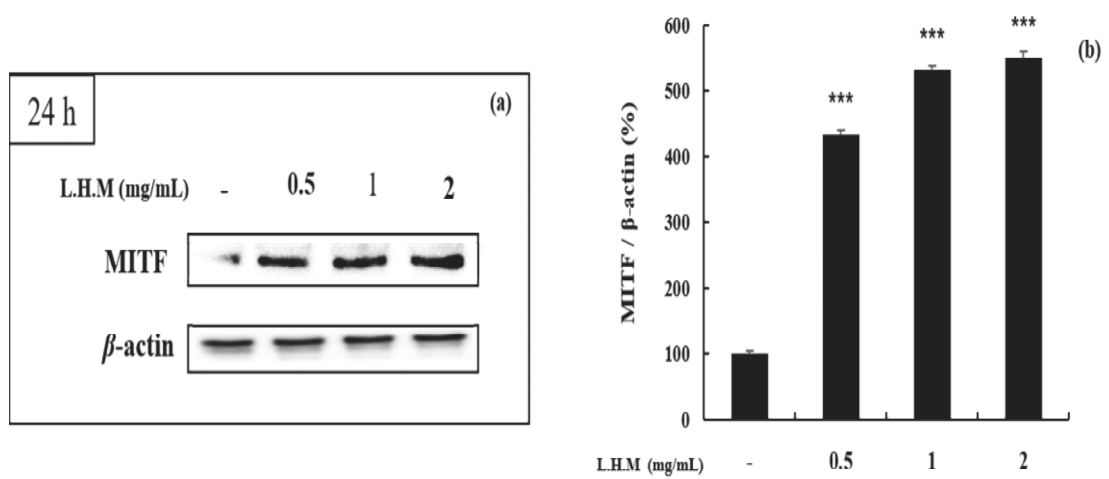


Figure 22. Effect of L.H.M on MITF in B16F10 cells.

Cells were treated with 0.5, 1, 2 mg/mL concentration of L.H.M for 24h. protein levels were examined by western blotting. (a) result of western blot, protein levels (b) MITF. Result are expressed as a percentage of the positive control. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n=3). Indicates *** $p < 0.001$ vs untreated control cells.

4.2 MAPK 신호전달경로에 대한 L.H.M의 영향

선행 연구에 의해 MAPK 신호전달 경로에서 ERK의 인산화는 MITF의 분해로 이어지고 JNK, p38의 인산화는 MITF의 발현을 조절하는 것으로 보고되었다. [13~16] 따라서 L.H.M이 B16F10세포에서 p38, ERK, JNK의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 western blot 실험을 통해 인산화의 정도를 확인해 보았다. L.H.M은 JNK, p38의 인산화를 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인 할 수 있었다.

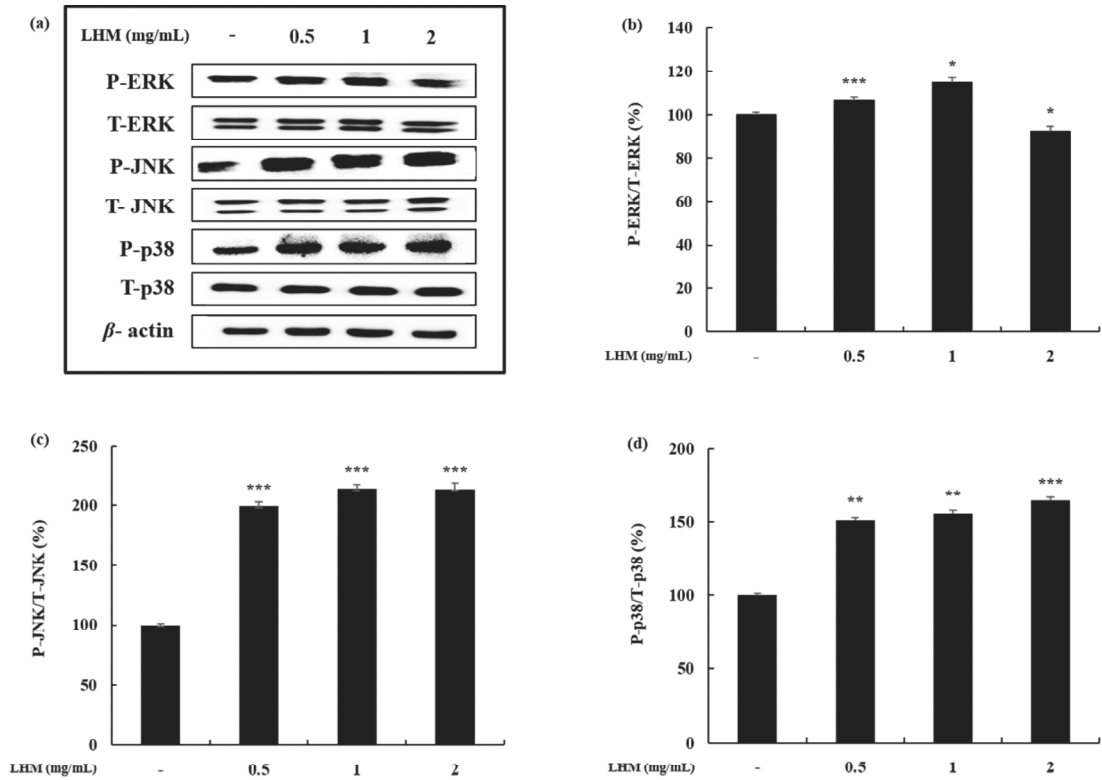


Figure 23. Effects of LHM on p-ERK, p-JNK, and p-38 expression.

The cells were treated with LHM at the indicated concentrations for 20h. (a) Results of Western blotting and protein levels of (b) p-ERK, (c) p-JNK, and (d) p-p38. The data are presented as mean \pm SD of at least four independent experiments ($n = 4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. untreated control cells. ERK: extracellular signal-regulated kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinase; P: Phosphorylated; SD: standard deviation; T: Total.

4.3 신호전달경로에 대한 저해제 및 L.H.M의 영향

L.H.M이 세포 내에서 멜라닌 형성에 관련된 신호전달경로에 어떠한 영향을 미치는지 단백질 저해제를 사용하여 tyrosinase activity와 weatern blot을 진행하였다. 앞의 실험 결과 JNK와 p38의 인산화가 증가한 것을 알 수 있었다. 그리하여 JNK inhibitor인 SP600125와 p38 inhibitor인 SB203580을 L.H.M과 동시 처리한 결과 단독 처리한 L.H.M보다 tyrosinase 활성이 감소한 것을 확인하였다. 이 실험결과를 토대로 western blot tyrosinase를 찍어본 결과 단백질이 감소한 것으로 나타났다. 이것으로 L.H.M이 JNK와 p38을 인산화 함으로써 멜라닌 생성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

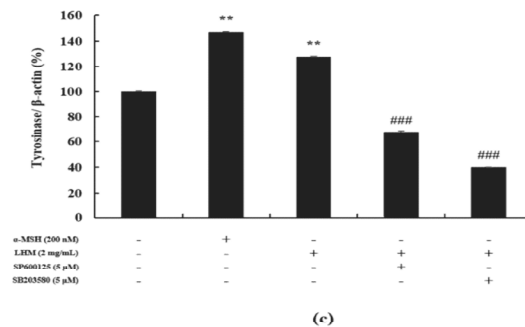
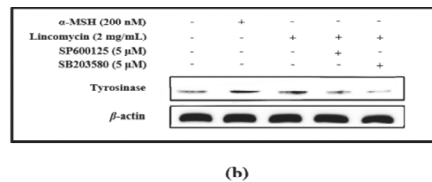
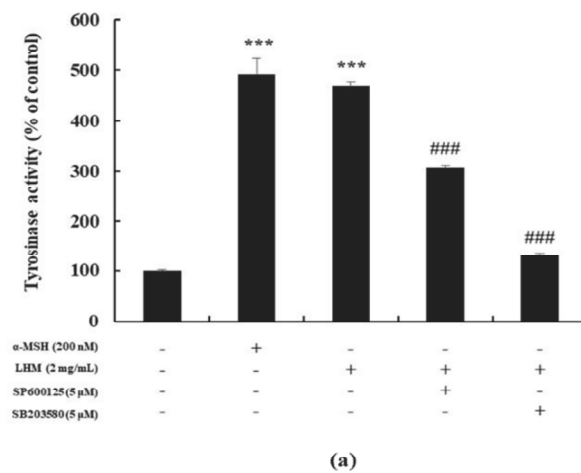


Figure 24. Effect of MAPK inhibitor on LHM-induced tyrosinase activity in B16F10 cells.

To understand the involvement of LHM on MAPK signaling pathway in melanogenesis, (a) a cellular tyrosinase activity assay and (b) Western blotting were performed using the following MAPK inhibitors: SP600125 (JNK inhibitor) and SB203580 (p38 inhibitor). (c) The protein levels of tyrosinase were quantified using image J program. The data are presented as mean \pm SD of at least four independent experiments ($n = 4$). Indicate ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. untreated control cells, and ### $p < 0.001$, vs. LHM-treated (2 mg/mL) group.

4.4 B16F10 세포 내에서 L.H.M의 AKT 인산화 저해

선행된 연구들에 따르면 AKT 신호전달 경로는 AKT의 인산화를 통해 멜라닌 생성을 조절하는 것으로 보고되었다. 또한 최근 진행된 연구결과들은, AKT 인산화는 MITF를 인산화 하여 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 보여주고 있다. 따라서 멜라닌 생성 증가를 보이고 있는 L.H.M이 B16F10 세포의 AKT 신호전달 경로에서 AKT 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 western blot 실험을 진행하였다.

실험결과, L.H.M은 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하였다.

이 결과를 토대로 L.H.M은 AKT의 인산화를 저해하여 멜라닌 생성을 증가시킨다는 것을 알 수 있다.

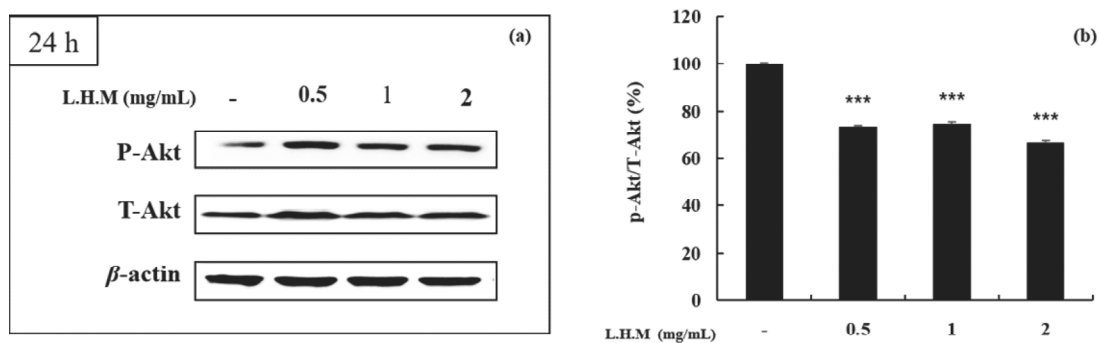
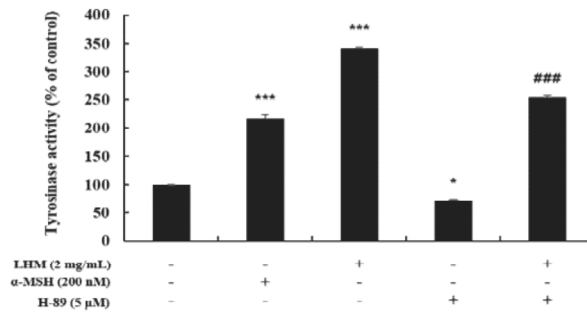


Figure 25. Effects of LHM on phosphorylation of AKT.

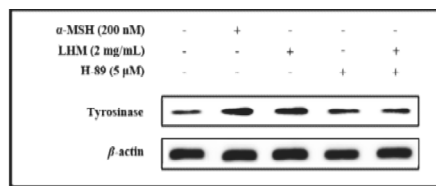
B16F10 cells were treated with 0.5, 1, 2 mg/mL concentrations of LHM for 24 h. (a) Results of Western blotting and protein levels of (b) p-AKT. Results are expressed as a percentage of the control. The data are presented as mean \pm SD of at least four independent experiments ($n = 4$). *** $p < 0.001$ vs. untreated control cells. P: Phosphorylated; SD: standard deviation; T: Total.

4.5 PKA 의존 신호 경로를 통한 L.H.M의 멜라닌 생성 유도

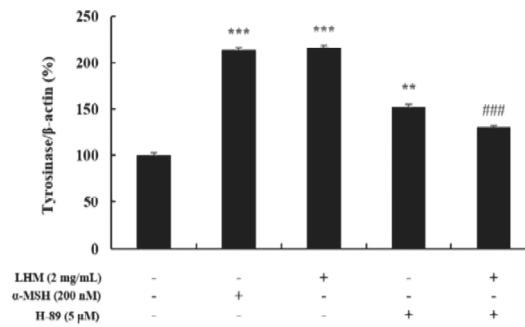
PKA 활성화에 의한 CREB의 인산화는 MITF의 전사를 유도하는 중요한 신호이다. 세포질 ATP에서 cAMP로의 전환을 촉매하고, 증가된 세포 내 cAMP는 protein kinase A(PKA)를 활성화한 다음, 핵으로 이동하여 cAMP 반응성 요소결합 단백질(CREB)을 인산화합니다. 활성화된 CREB는 MITF의 발현을 유도한다. 이러한 신호전달과정으로 인한 멜라닌생성에 영향을 주는지를 알아보기 위해 B16F10 세포에 L.H.M을 같이 처리한 군과 처리하지 않고 PKA inhibitor인 H-89를 처리하였다. 그 결과 L.H.M 단독 처리한 대조군에 비해 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 L.H.M은 PKA 의존신호경로를 통해 tyrosinase 활성을 증진 시키고 멜라닌 관련 단백질들의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있다.



(a)



(b)



(c)

Figure 26. Effect of PKA inhibitor on LHM-induced tyrosinase activity in B16F10 cells.

To understand the involvement of LHM on PKA signaling pathway in melanogenesis, (a) a cellular tyrosinase activity and (b) Western blotting were performed using the following PKA inhibitor: H-89 (PKA inhibitor). (c) The protein levels of tyrosinase were quantified using image J program. The data are presented as mean \pm SD of at least four independent experiments ($n = 4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. untreated control cells and ### $p < 0.001$, vs. LHM-treated (2 mg/mL) group.

5. HaCaT keratinocyte 세포에서 L.H.M 의 독성 평가

멜라닌 세포는 피부 기저층에 각질 세포와 함께 존재하며, 멜라닌 세포의 돌기는 주변 각질 세포와 접촉한다. 앞에서는 L.H.M이 멜라닌세포에서 멜라닌 합성 증진 효과를 가지고 있는 것을 확인하였기에 멜라닌세포 주변의 각질세포에서의 L.H.M의 영향을 확인하기 위해 인산 각질 세포인 HaCaT 세포를 사용하여 MTT assay를 진행하였다. 그 결과 멜라닌 세포에서는 2 mg/mL 이하에서 90% 이상의 세포생존율을 보였으나 각질세포에서는 1 mg/mL에서 90 % 이상의 세포 생존율을 보였다.

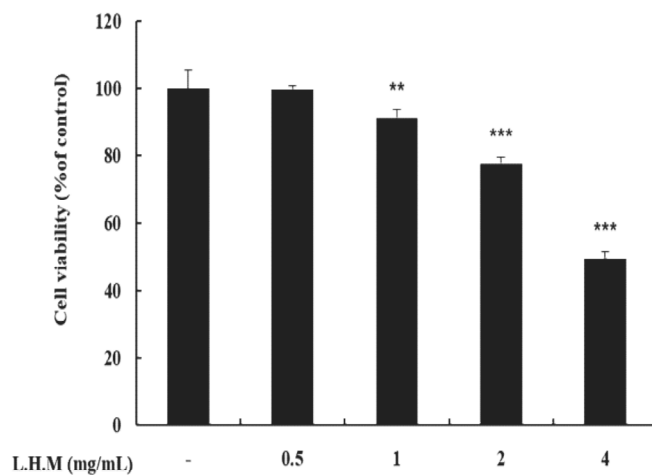


Figure 27. The cell viability of human keratinocytes treated with LHM.

The cells were treated with 0.5, 1, 2, 4 mg/mL concentrations of LHM for 24 h, and cell viability was determined using a 3-(4,5-cimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least four independent experiments (n = 4).

p<0.01, *p<0.001vs.untreatedcontrolcells.

IV. 고찰

항생제는 병원균의 침입을 막아주며, 질병의 치료 및 예방 그리고 사망률을 감소하는데 영향을 미쳤다.(64)이런 면에서 항생물질의 발견 및 항생제의 개발은 현대 의학을 발전시키게 된 하나의 계기가 됐다. 하지만 항생제의 내성에 내성에 대한 문제가 제기되고 있으며, 감염증 혹은 부작용을 같이 초래하여 사용량이 감소하거나 더 이상 사용되지 않고 있다. 본 연구에서는 20세기에 발견된 항생제들의 또 다른 활성을 찾기 위해 B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌 합성에 오래된 항생제들이 어떤 영향을 미치는지를 평가하였다.

Azithromycin, Paromomycin, Roxithromycin, Lincosamide 항생제 중 세포 독성이 없는 농도범위에서(**figure12-15**)멜라닌 생성량을 측정하였다.(**Figure16-19**) 그 결과 항생제 중 L.H.M 이 멜라닌 함량을 증가시키는 경향이 나타났다. 추가적인 실험을 통해 L.H.M 이 멜라닌 합성 효소 및 멜라닌 생성 기전을 확인하였다.

먼저 MTT assay를 통해 L.H.M 농도가 2 mg/mL 이하 농도에서는 90 % 이상의 세포 생존률을 보였다. 세포 독성이 나타나지 않는 2 mg/mL를 최고 농도로 정하고 melanin content assay 와 tyrosinase activity assay 를 진행하였다. 실험 결과 멜라닌 함량은 아무것도 처리하지 않은 대조군과 자극제를 처리한 양성 대조군에 비해 최고 농도에서 361 % 증가하였고, tyrosinase는 최고 농도에서 743 % 증가하였다. (**Figure 20**) 이것으로 보아 L.H.M 은 농도에 따라 멜라닌 함량을 증가시키고 tyrosinase 의 활성을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 또한 B16F10 세포 내에서 어떠한 작용 기전을 하는지 알아보기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 멜라닌 합성 효소인 TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 발현과 조절 인자인 MITF 단백질 발현을 확인하기 위해 L.H.M을 다양한 농도 (0.5, 1, 2 mg/mL)로 처리하였다. 그 결과 TRP-1, TRP-2, Tyrosinase는 농도에 따라 대조군에 비해 증가하는 것을 알 수 있었다. (**Figure 21**) 이 결과를 토대로 MITF를 확인한 결과 증가하는 것을 알 수 있었다. (**Figure 21, 22**) MITF 단백

질의 발현에는 다양한 기전이 존재한다. 신호전달경로인 MAPK는 ERK, JNK, p38 단백질이 발현이 된다. 이 단백질 발현에 L.H.M 의 영향을 확인한 결과 JNK 와 p38의 단백질이 대조군 보다 농도에 따라 인산화하는 것을 확인하였다. **(Figure 23)** 그 다음 PI3K/AKT 신호전달 경로를 확인한 결과 PI3K의 발현 억제제는 AKT 인산화의 감소에 의해 멜라닌 함량을 증가시키는 것으로 나타났다.

마지막으로 MAPK JNK, p38, PKA, AKT 저해제를 처리하여 B16F10 세포에서 L.H.M 의 영향을 평가하였다. Tyrosinase 와 western blot 실험을 같이 진행하였다. 먼저 tyrosinase activity 실험을 진행하였다. JNK 저해제 SP600125 (5 μ M) 과 p38 SB203580 (5 μ M)를 처리한 결과 L.H.M 2 mg/mL 단독 처리한 대조군에 비해 각각 152 %, 356 % 감소한 것으로 확인되었다. Western blot 으로 tyrosinase 단백질을 확인한 결과 저해제를 처리한 군이 L.H.M 단독 처리한 군보다 감소한 것으로 확인되었다. **(Figure 24)**

PKA 저해제 H89 (5 μ M)를 처리한 결과 tyrosinase activity에서 L.H.M 2 mg/mL 단독 처리한 대조군 보다 134 % 감소한 것으로 나타났다. **(Figure 25)**Western blot 으로 tyrosinase 단백질을 확인한 결과 L.H.M 2 mg/mL 보다 감소한 것으로 확인되었다. 이것으로 보아 L.H.M는 B16F10 세포에서 p38과 JNK를 인산화 함으로써 MITF 단백질 발현을 증가시키고, 멜라닌 합성 효소인 TRP-1, TRP-2, tyrosinase 효소의 발현을 증가함으로써 멜라닌의 합성을 증가함을 의미한다. 또한 PKA저해제(H89)가 감소함으로써 MITF 단백질 발현을 증가시킨다.

이러한 멜라닌 증가 원인은 lincomycin의 생합성으로 propyl-L-hygric acid와 methyl-thio-lincosamide의 두가지 하위 단위로 구성된다. 각각 L-tyrosine과 오탄당인산회로 중간체로부터 유도된 것으로 제안된 두 개의 중간체인 ptopyl-L-proline 및 methyl-thio-lincosamide통해 진행된다. 그 후 이 부분은 N-methyl화 되며 축합되고 변형되어 lincomycin을 생성한다.(65)위 논문은 lincomycin을 생산하는 멜라닌 음성균주에서 구별될 수 있다고 한다. 또한 페닐알라닌 또는 tyrosine hydroxylase에 의해 촉진되는 반응에 필수적라고 보고되

어있다. 그 원인은 링코마이신의 유전체인 LmbB2 단백질이 이것의 일원이라고 나타낼 수 있다. 그러므로 중간체인 L-tyrosine과 L-DOPA의 변형체인 lincomycin은 proline 구조에 의해 멜라닌이 증가된다고 말할 수 있다.

인간의 피부는 표피 기저층의 멜라닌 세포에 의해 생성되는 멜라닌 세포에 의해 착색이 된다. 표피 기저막에 부착된 각 멜라노사이트는 성숙한 멜라노솨를 수상 돌기를 통해 인근 각질 세포로 내보낸다. 각질 세포에 의한 멜라노솨 흡수는 멜라닌 세포의 수상 돌기와 각질 세포의 조절 과정을 포함하는 과정이다. 세포분열을 통해 지속적으로 새로운 각질 세포를 생성한다. 처음에 표피 기저막에 부착된 상태에서 “비 줄기” keratinocyte는 점진적으로 위쪽으로 이동하여 표피의 상부세포층을 구성한다.(66)그렇기 때문에 멜라닌 세포와 각질세포는 관계가 있다고 생각하여 사람 각질세포인 HaCaT Human keratinocyte를 통해 lincomycin의 세포독성을 평가하였다. 세포독성은 2 mg/mL에서 78 %의 세포 독성이 나타났으며 1 mg/mL 이하의 농도에서는 90 % 이상의 세포 생존률을 나타내었다. 1 mg/mL 농도 이하에서는 피부에 안전할 것으로 추측할 수 있다. (Figure 26)

본 연구의 결과들을 토대로 L.H.M이 B16F10 세포에서 melanin content 와 tyrosinase activity에서 멜라닌 증가 및 tyrosinase 활성 증가로 나타났다. 더불어 멜라닌 합성 효소(TRP-1, TRP-2, tyrosinase)도 증가하였으며, MAPK 신호전달경로에서 JNK와 p38이 인산화된 것으로 나타났다. 이전 연구에서 Lincomycin으로 RAW 264.7 세포를 통해 항염증을 밝힌 바가 있으므로,(67) 이것으로 L.H.M이 저색소와 관련된 질병이나 혹은 흰머리 방지에 근본적인 치료제는 될 수 없으나 이러한 질병을 치료하는데 도움이 될 것이라고 제안한다. 추가적으로 lincomycin에 대한 피부반응시험이 필요하다고 여겨진다. 또한 오래된 항생제들은 점차 무분별한 사용에 부작용과 내성이 생기므로 다른 기능을 찾아보는 것이 필요하다고 생각된다.

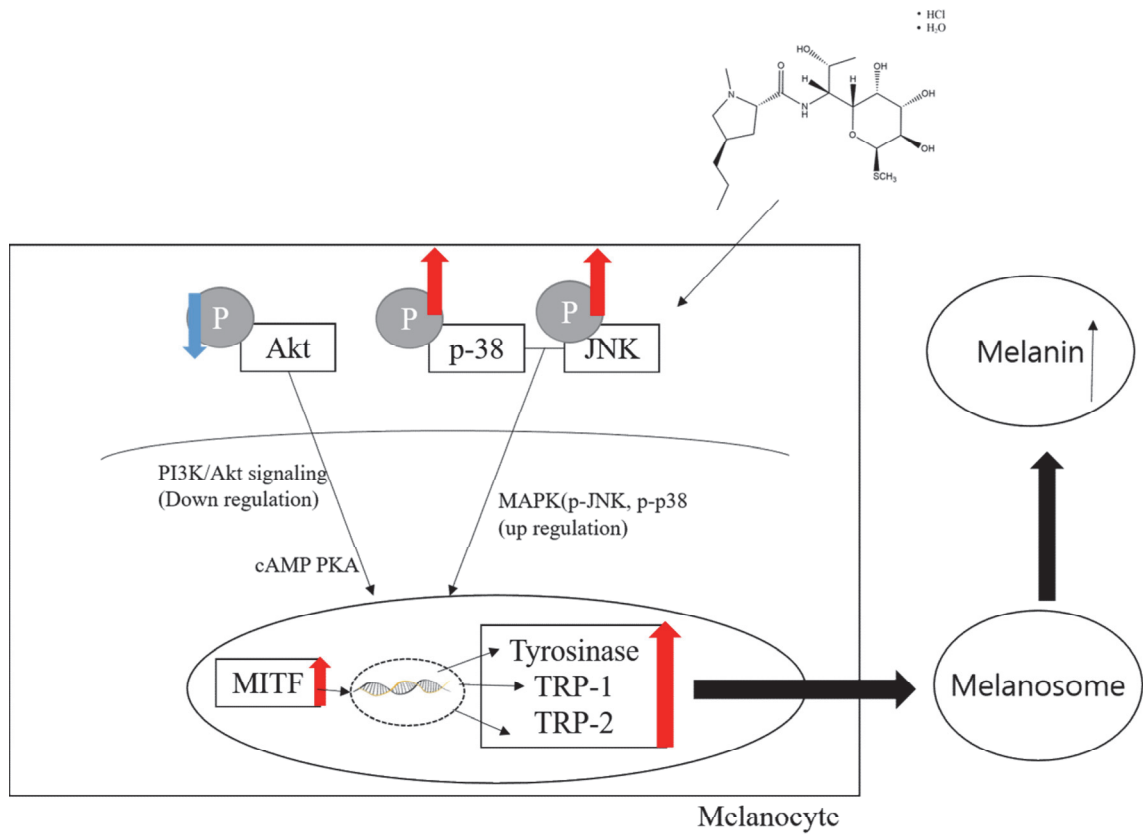


Figure 28. Effect of L.H.M in melanogenesis on B16F10 melanoma cell

V. 참고문헌

1. Sealy RC, Hyde JS, Felix CC, Menon I, Prota G, Swartz HM, et al. Novel free radicals in synthetic and natural pheomelanins: distinction between dopa melanins and cysteinyl-dopa melanins by ESR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982;79(9):2885-9.
2. Archambault M, Yaar M, Gilchrist BA. Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *Journal of investigative dermatology*. 1995;104(5):859-67.
3. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological reviews*. 2004;84(4):1155-228.
4. Kim D-S, Park S-H, Kwon S-B, Youn S-W, Park K-C. Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis. *Chemistry and physics of lipids*. 2004;127(2):199-206.
5. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007;445(7130):843-50.
6. Seiberg M. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment cell research*. 2001;14(4):236-42.
7. Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment cell research*. 2000;13(2):60-9.
8. Ortonne J-P, Prota G. Hair melanins and hair color: ultrastructural and biochemical aspects. *Journal of investigative dermatology*. 1993;101(1):S82-S9.
9. 윤영민, 배승희, 안성관, 최용범, 안규중, 안인숙. 자외선 (Ultraviolet) 이 피부 및 피부세포 내 신호전달체계에 미치는 영향. *대한피부미용학회지*. 2013;11(3):417-26.
10. Ortonne JP. Photoprotective properties of skin melanin. *British*

Journal of Dermatology. 2002;146:7-10.

11. FITZPATRICK TB, LERNER AB. Pigment and pigment tumors: Biochemical basis of human melanin pigmentation. *AMA archives of dermatology and syphilology*. 1954;69(2):133-49.
12. Lerner AB, Fitzpatrick TB. Biochemistry of melanin formation. *Physiological reviews*. 1950;30(1):91-126.
13. Pawelek JM, Lerner AB. 5, 6-Dihydroxyindole is a melanin precursor showing potent cytotoxicity. *Nature*. 1978;276(5688):627-8.
14. Hearing VJ, editor *Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; 1999: Elsevier.
15. Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Oetting WS, Ortonne J-P. *The pigmentary system: physiology and pathophysiology*: John Wiley & Sons; 2008.
16. Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment cell research*. 2000;13:103-9.
17. Scherer D, Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer—a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2010;705(2):141-53.
18. Pillaiyar T, Manickam M, Jung S-H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular Signalling*. 2017;40:99-115.
19. Kobayashi T, Imokawa G, Bennett DC, Hearing VJ. Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(48):31801-5.
20. Huang H-C, Hsieh W-Y, Niu Y-L, Chang T-M. Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(9):16665-79.

21. 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.
22. Wu H, Park H-Y. Protein kinase C- β -mediated complex formation between tyrosinase and TRP-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;311(4):948–53.
23. Tran TNT, Schulman J, Fisher DE. UV and pigmentation: molecular mechanisms and social controversies. *Pigment cell & melanoma research*. 2008;21(5):509–16.
24. García-Borrón JC, Sánchez-Laorden BL, Jiménez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment cell research*. 2005;18(6):393–410.
25. Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang MP, Lo J, et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature*. 2012;491(7424):449–53.
26. Valverde P, Healy E, Sikkink S, Haldane F, Thody AJ, Carothers A, et al. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma. *Human molecular genetics*. 1996;5(10):1663–6.
27. Abdel-Malek ZA, Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Todorovic A, Koikov LN, McNulty JC, et al. Melanoma prevention strategy based on using tetrapeptide α -MSH analogs that protect human melanocytes from UV-induced DNA damage and cytotoxicity. *The FASEB journal*. 2006;20(9):1561–3.
28. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):12222–48.
29. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature genetics*. 1995;11(3):328–30.
30. Vachtenheim J, Borovanský J. “Transcription physiology” of pigment

formation in melanocytes: central role of MITF. *Experimental dermatology*. 2010;19(7):617–27.

31. Kang SJ, Choi BR, Lee EK, Kim SH, Yi HY, Park HR, et al. Inhibitory effect of dried pomegranate concentration powder on melanogenesis in B16F10 melanoma cells; involvement of p38 and PKA signaling pathways. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(10):24219–42.

32. Su T-R, Lin J-J, Tsai C-C, Huang T-K, Yang Z-Y, Wu M-O, 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):20443–58.

33. Lin Y-S, Wu W-C, Lin S-Y, Hou W-C. Glycine hydroxamate inhibits tyrosinase activity and melanin contents through downregulating cAMP/PKA signaling pathways. *Amino acids*. 2015;47(3):617–25.

34. Shen T, Heo S-I, Wang M-H. Involvement of the p38 MAPK and ERK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of methyl 3, 5-dicaffeoyl quinate in B16F10 mouse melanoma cells. *Chemico-biological interactions*. 2012;199(2):106–11.

35. Ye Y, Chu J-H, Wang H, Xu H, Chou G-X, Leung AK-M, et al. Involvement of p38 MAPK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of San-bai-tang, a Chinese herbal formula, in B16 cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;132(2):533–5.

36. Hirata N, Naruto S, Ohguchi K, Akao Y, Nozawa Y, Iinuma M, et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (–)-cubebin in murine B16 melanoma cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007;15(14):4897–902.

37. Moon S-H, Chung YC, Hyun C-G. Tobramycin promotes melanogenesis by upregulating p38 MAPK protein phosphorylation in B16F10 melanoma cells. *Antibiotics*. 2019;8(3):140.

38. Chung YC, Kim S, Kim JH, Lee GS, Lee JN, Lee NH, et al. Pradol, an O-methylated flavone, induces melanogenesis in B16F10 melanoma cells via p-p38 and p-JNK upregulation. *Molecules*. 2017;22(10):1704.
39. Chung YC, Ko J-H, Kang H-K, Kim S, Kang CI, Lee JN, et al. Antimelanogenic effects of *Polygonum tinctorium* flower extract from traditional Jeju fermentation via upregulation of extracellular signal-regulated kinase and protein kinase B activation. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10):2895.
40. Jang JY, Kim HN, Kim YR, Choi WY, Choi YH, Shin HK, et al. Partially purified components of *Nardostachys chinensis* suppress melanin synthesis through ERK and Akt signaling pathway with cAMP down-regulation in B16F10 cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;137(3):1207-14.
41. Oka M, Nagai H, Ando H, Fukunaga M, Matsumura M, Araki K, et al. Regulation of melanogenesis through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human G361 melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2000;115(4):699-703.
42. Khaled M, Larribere L, Bille K, Aberdam E, Ortonne J-P, Ballotti R, et al. Glycogen synthase kinase 3 β is activated by cAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(37):33690-7.
43. Oetting WS. The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): a model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment cell research*. 2000;13(5):320-5.
44. Rhodes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, Mihm MC, Sober AJ. Risk factors for cutaneous melanoma: a practical method of recognizing predisposed individuals. *Jama*. 1987;258(21):3146-54.
45. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*.

2012;25(2):67-77.

46. 송영구. 항생제 개발의 역사 및 현황. 2012.
47. Bosch F, Rosich L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*. 2008;82(3):171-9.
48. Honoré N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994;38(2):238-42.
49. Bae J-H, Kim B-M, Choi M-S, Roh H-J, Park M-J. Analysis of Penicillin Antibiotics in Aquatic Products. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2010;43(6):629-36.
50. Gang C-S. 항생제 내성과 대응방안 연구. *Patent21*. 2004:37-43.
51. Roberts MC. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Molecular biotechnology*. 2002;20(3):261-83.
52. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(4):482-92.
53. Eady EA, Ross JI, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ. Macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS) resistance in cutaneous propionibacteria: definition of phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1989;23(4):493-502.
54. 진형중. MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 내성인자 단백질인 ErmSF 의 domain 발현. *미생물학회지*. 2001;37(4):245-52.
55. Greenwood D. *Antimicrobial drugs: chronicle of a twentieth century medical triumph*: Oxford University Press; 2008.
56. Peters DH, Friedel HA, McTavish D. Azithromycin. *Drugs*. 1992;44(5):750-99.
57. MacLeod A, Ross H, Ozere R, Digout G, Van Rooyen C. Lincomycin: a new antibiotic active against staphylococci and other gram-positive cocci:

clinical and laboratory studies. Canadian Medical Association journal. 1964;91(20):1056.

58. Viteri AL, Howard PH, Dyck WP. The spectrum of lincomycin-clindamycin colitis. Gastroenterology. 1974;66(6):1137-44.

59. Verdier L, Bertho G, Gharbi-Benarous J, Girault J-P. Lincomycin and clindamycin conformations. A fragment shared by macrolides, ketolides and lincosamides determined from TRNOE ribosome-bound conformations. Bioorganic & medicinal chemistry. 2000;8(6):1225-43.

60. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: an overview. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2016;6(6):a027029.

61. Le Goffic F. Structure activity relationships in lincosamide and streptogramin antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1985;16(suppl_A):13-21.

62. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. Biomaterials. 1993;14(5):359-64.

63. Funasaka Y, Kawana S. The Effects of Roxithromycin and Minocycline on Melanin Synthesis. Journal of Nippon Medical School. 2013;80(6):492-3.

64. 김홍태, 이우원, 정경태, 이승미, 손은정, 이강록, et al. 유통되는 쇠고기에서 분리한대장균의 항생제 내성 조사·연구. 한국가축위생학회지. 2008;31(1):17-26.

65. Neusser D, Schmidt H, Spizèk J, Novotná J, Peschke U, Kaschabeck S, et al. The genes lmbB1 and lmbB2 of Streptomyces lincolnensis encode enzymes involved in the conversion of L-tyrosine to propylproline during the biosynthesis of the antibiotic lincomycin A. Archives of microbiology. 1998;169(4):322-32.

66. Thingnes J, Lavelle TJ, Hovig E, Omholt SW. Understanding the melanocyte distribution in human epidermis: an agent-based computational model approach. PloS one. 2012;7(7):e40377.

67. Yang E-J, Lee N-R, Hyun C-G. Reconsideration of Classical Antibiotic Lincomycin: Anti-inflammatory Effect in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2020;48(3):366-72.