



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

Flavonoid 계열 화합물
Chrysoeriol과 Linarin의
멜라닌 합성 증진 규명

제주대학교대학원

화학과

오 소 연

2021년 8월

Flavonoid 계열 화합물 Chrysoeriol과 Linarin의 멜라닌 합성 증진 규명




지도교수 현 창 구

오 소 연

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2021년 8월

오소연의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	_____	윤 경 성	
위 원	_____	이 남 호	
위 원	_____	현 창 구	

제주대학교 대학원

2021년 8월

Effect of Chrysoeriol and Linarin on Melanogenesis Stimulation

So Yeon Oh

(Supervised by professor Chang-Gu Hyun)

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

2021. 8.

This thesis has been examined and approved.

Kyung-Sup Yoon

Nam Ho Lee

CHANG-GU HYUN

.....
Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Chrysoeriol (4',5,7-trihydroxy-3'-methoxyflavone) and linarin (5-Hydroxy-4'-methoxyflavone-7-O-rutinoside) are flavonoid compounds commonly found in nature. In this study, we investigated the melanogenesis and mechanism of chrysoeriol and linarin in B16F10 murine melanoma cells. The B16F10 cells were treated with various concentrations of chrysoeriol (1, 2, 4 and 8 μ M) and linarin (5.25, 10.5, 21 and 42 μ M) respectively to observe its effects. In the concentration range without cytotoxicity, chrysoeriol and linarin concentration-dependently increase melanin content and tyrosinase activity in B16F10 cells. To confirm the expression of melanogenic enzymes expression and its mechanism study, we performed western blot analysis. The results showed that chrysoeriol and linarin increased the expression of proteins associated with regulating melanin synthesis such as tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and 2 (TRP-2). In this regard, treatment with chrysoeriol and linarin also increased the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF). Chrysoeriol and linarin inhibited the degradation of MITF through inhibition of extracellular signal-regulated kinases (ERK) phosphorylation and also upregulated MITF by inhibiting phosphorylation of protein kinase B (AKT). Additionally, chrysoeriol inactivated glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) through phosphorylation (ser9), leading to the accumulation of β -catenin. It was confirmed that the expression of β -catenin phosphorylation, which induces the degradation of β -catenin, decreased. Moreover protein kinase A (PKA) phosphorylation was increased by treatment with chrysoeriol. The results suggest that the possibility of chrysoeriol and linarin as agents for hypopigmentation treatment through their upregulation of melanogenesis.

Key words: Chrysoeriol, Linarin, Flavonoid, B16F10, Melanogenesis

목 차

ABSTRACT	1
목 차	2
LIST OF FIGURES	4
I. 서 론	7
II. 재료 및 방법	13
1. 시료 및 시약	13
2. 실험방법	14
2.1. 세포배양	14
2.2. 세포 생존율	15
2.3. 멜라닌 함량 측정	16
2.4. Tyrosinase 활성 측정	17
2.5. Western Blot	18
3. 통계처리	19
III. 결 과	20
1. B16F10 세포 내에서 Chrysoeriol의 멜라닌 생성 효과	20
1.1. 세포 생존율	20
1.2. 멜라닌 함량 측정	22
1.3. Tyrosinase 활성 측정	24
1.4. Western Blot	26
1) 멜라닌 합성 효소 발현에 미치는 chrysoeriol의 영향	26

2) MITF 발현에 미치는 chrysoeriol의 영향	28
3) ERK 신호전달경로에 미치는 chrysoeriol의 영향	30
4) PI3K/AKT 신호전달경로에 미치는 chrysoeriol의 영향	32
5) Wnt 신호전달경로에 미치는 chrysoeriol의 영향	34
6) cAMP/PKA 신호전달경로에 미치는 chrysoeriol의 영향	36
2. B16F10 세포 내에서 Linarin의 멜라닌 생성 효과	38
2.1. 세포 생존율	38
2.2. 멜라닌 함량 측정	40
2.3. Tyrosinase 활성 측정	42
2.4. Western Blot	44
1) 멜라닌 합성 효소 발현에 미치는 linarin의 영향	44
2) MITF 발현에 미치는 linarin의 영향	46
3) ERK 신호전달경로에 미치는 linarin의 영향	48
4) PI3K/AKT 신호전달경로에 미치는 linarin의 영향	50
3. B16F10 세포 내에서 Flavone 화합물의 멜라닌 생성 효과 비교	52
1) Chryseoriol와 유사한 구조 화합물들의 멜라닌 생성 효과 비교	52
2) Linarin과 유사한 구조 화합물의 멜라닌 생성 효과 비교	54
IV. 고 찰	56
V. 참고문헌	61

LIST OF FIGURES

Figure 1. Mechanisms regulating melanogenesis	9
Figure 2. Diagram of melanogenesis	10
Figure 3. The skeleton structure of main classes of flavonoids	12
Figure 4. Structure of flavones	12
Figure 5. Effects of chrysoeriol on the viability in B16F10 cells	21
Figure 6. Effects of chrysoeriol on the melanin production in B16F10 cells	23
Figure 7. Effects of chrysoeriol on the tyrosinase activity in B16F10 cells	25
Figure 8. Effects of chrysoeriol on TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression in B16F10 cells	27
Figure 9. Effects of chrysoeriol on MITF protein expression in B16F10 cells	29
Figure 10. Effects of chrysoeriol on p-ERK protein expression in B16F10 cells	31
Figure 11. Effects of chrysoeriol on p-AKT protein expression in B16F10 cells	33

Figure 12. Effects of chrysoeriol on p-GSK-3 β , p- β -catenin and β -catenin protein expression in B16F10 cells	35
Figure 13. Effects of chrysoeriol on p-PKA protein expression in B16F10 cells	37
Figure 14. Effects of linarin on the viability in B16F10 cells	39
Figure 15. Effects of linarin on the melanin production in B16F10 cells	41
Figure 16. Effects of linarin on the tyrosinase activity in B16F10 cells	43
Figure 17. Effects of linarin on TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression in B16F10 cells	45
Figure 18. Effects of linarin on MITF protein expression in B16F10 cells	47
Figure 19. Effects of linarin on p-ERK protein expression in B16F10 cells	49
Figure 20. Effects of linarin on p-AKT protein expression in B16F10 cells	51
Figure 21. Effects of chrysoeriol, luteolin and apigenin on the melanin production in B16F10 cells	53

Figure 22. Effects of linarin and acacetin on the melanin production in
B16F10 cells 55

Figure 23. Effects of chrysoeriol in B16F10 cells 60

Figure 24. Effects of linarin in B16F10 cells 60

I. 서 론

인간의 피부의 색은 멜라닌 (melanin) 함량이나 종류, 카로티노이드 함량, 체지방량 등 다양한 요인에 의해 나타나고, 이 중에서 멜라닌은 피부색을 결정하는 주요인자이다[1 - 3]. 멜라닌은 피부의 색 뿐만 아니라 머리카락이나 홍채의 색에도 관여하며, 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다[4,5]. 그러나 멜라닌 생성이 감소하게 되면 백반증 (vitiligo), 탈색모반 (nevus depigmentosus) 등과 같은 저색소침착 (hypopigmentation)이 나타난다[6 - 8]. 멜라닌 함량이 적은 피부는 멜라닌 함량이 많은 피부보다 흑색종 (melanoma)과 같은 피부암 발생 비율이 15~70배 높아진다[9]. 현재 저색소침착증 치료에는 부작용을 일으키는 레이저 치료나 피부 수술 등을 통해 이루어지고 있다[10]. 따라서 멜라닌 합성을 촉진하는 천연 화합물은 저색소침착증을 치료하는 좋은 대안이 될 것이다.

멜라닌을 생성하는 세포인 멜라노사이트 (melanocyte)는 각질세포 (keratinocyte)와 1:10의 비율로 표피 기저층 (basal layer)에 존재한다[9]. 피부에 존재하는 멜라노사이트의 수지상 돌기 (dendrites)는 최대 36개의 각질세포와 인접해 있다[11]. 멜라노사이트 내의 세포 소기관인 멜라노솨은 멜라닌을 생성하고, 멜라노솨에서 생성된 멜라닌은 멜라노사이트의 수지상돌기를 통해 각질세포로 옮겨져 피부색을 나타낸다[12].

피부가 Ultraviolet radiation (UVR)에 의해 자극받으면 DNA가 손상되고 thymine dinucleotides와 같은 작은 DNA 조각 (fragments)들이 생성된다. 이는 DNA가 손상된 세포는 세포주기 (cell cycle)나 세포자멸 (apoptosis)을 조절하는 전사인자인 p53을 활성화시킨다. 활성화된 p53은 pro-opiomelanocortin (POMC)로부터 유래된 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)의 발현을 증가시킨다[9,13]. 각질세포에서는 생성된 α -MSH를 분비하고, α -MSH는 멜라노사이트 세포막에 존재한 melanocortin 1 receptor (MC1R)에 결합한다[14]. 활성화된 MC1R은 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) signaling pathway, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway를 통해 멜라닌 합성에 중요한 전사인자 (transcription factor)인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)가 발현되고, MITF는 멜라닌 합성 효소들의 발현을 증가시켜 최종적으로 멜라닌이 생성된다 [15,16]. Extracellular signal-regulated kinases (ERK) signaling pathway[17]나 Wnt signaling pathway[18] 또한 MITF 발현에 관여하는 멜라닌 생성 신호 전

달 경로이다. MITF는 멜라노사이트의 핵에서 멜라닌 합성 효소인 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) 및 tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)의 발현을 증가시키고, 멜라노솜에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 효소들에 의해 최종적으로 멜라닌이 생성된다[19].

α -MSH와 결합한 MC1R는 adenylyl cyclase (AC)를 활성화 시키고, cAMP를 증가시킨다. 이는 PKA와 cAMP response element-binding protein (CREB)를 인산화시킨다. 인산화된 CREB는 Mitf promoter에 결합하여 멜라닌 합성효소의 발현을 증가시킨다[16,20].

또한 PI3K/AKT signaling pathway를 통해 α -MSH에 의해 MC1R이 PI3K를 활성화하고, PI3K가 PIP₂를 PIP₃로 인산화하여 AKT를 세포막에 동원한다. 활성화된 AKT는 MITF의 발현을 저해한다. 따라서 AKT의 인산화 저해는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도하게 된다[21,22].

Extracellular signal-regulated kinases (ERK)는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 일종으로, MAPKs는 세포 증식, 분화, 세포 활동을 조절하는 serine/threonine kinase이다[23]. 인산화된 ERK는 MITF의 Ser 73을 인산화하고, 인산화된 MITF는 유비퀴틴화 (ubiquitination) 되어 proteasome에 의해 분해된다[24]. 따라서 ERK의 인산화 저해 또한 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도하게 된다.

Wnt signaling pathway도 MITF 발현에 관여한다. Wnt signaling pathway가 활성화되면 glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β)가 인산화된다. Ser 9에 인산화 된 GSK-3 β (inactivation)는 β -catenin을 축적 (accumulation)시킨다. 축적된 β -catenin은 핵 내의 lymphoid-enhancing factor/T-cell factor (LEF/TCF) 전사인자를 촉진시켜 MITF의 발현을 증가시킨다. Thy 216 잔기에 인산화된 GSK-3 β (activation)는 β -catenin의 인산화를 유도하고, 인산화된 β -catenin은 유비퀴틴화 되어 분해된다[18,25].

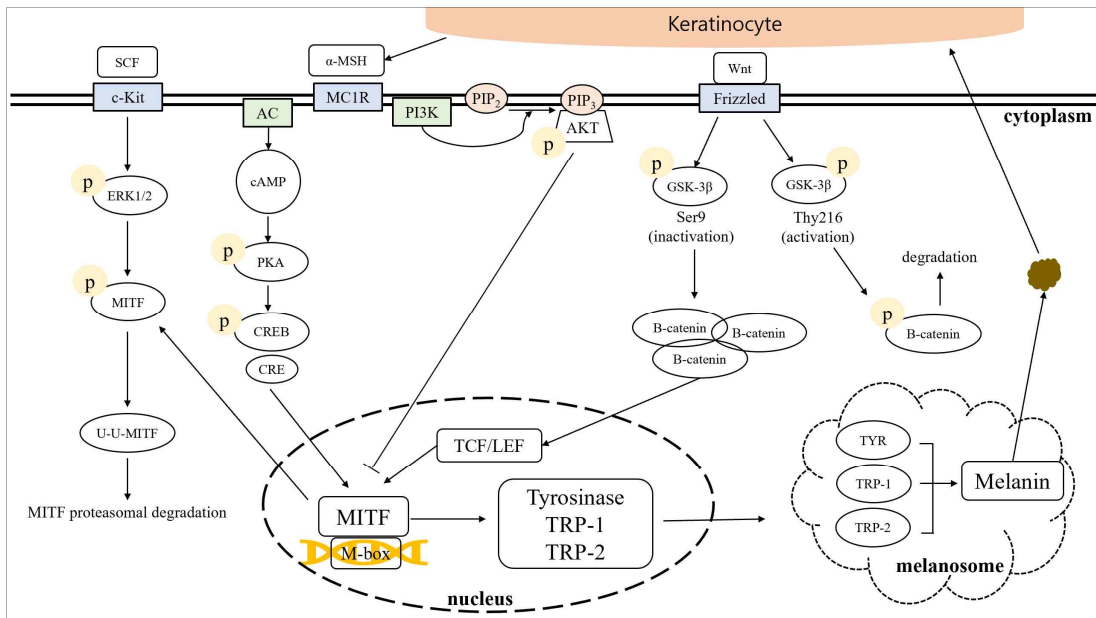


Figure 1. Mechanisms regulating melanogenesis.

멜라닌 합성 과정에서 Tyrosinase는 속도를 결정하는 초기반응에 관여하는 속도제한효소 (rate-limiting enzyme) 이다[26]. Tyrosine을 dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 하이드록시화 (hydroxylation)하는 monophenolase activity와, DOPA를 산화 (oxidation)시켜 DOPA quinone을 생성하는 diphenolase activity를 수행한다[27]. DOPA quinone은 eumelanin이나 pheomelanin으로 합성된다[28]. DOPA quinone이 DOPA chrome으로 전환되고 dihydro-indolizine (DHI)나 indole 5,6-quinone-2-carboxylic acid (DHICA)로 되며 여러 반응에 의해 최종적으로 어두운색 (brown-dark)의 eumelanin이 합성된다. 이 과정에서 TRP-1은 DHICA의 산화를 촉매하고, TRP-2는 DOPA chrome에서 DHICA로 산화 과정을 촉매한다[23]. DOPA quinone에서 cysteine이나 glutathione와 결합하면 최종적으로 붉은색 (red-yellow)을 띠는 pheomelanin이 생성된다[6].

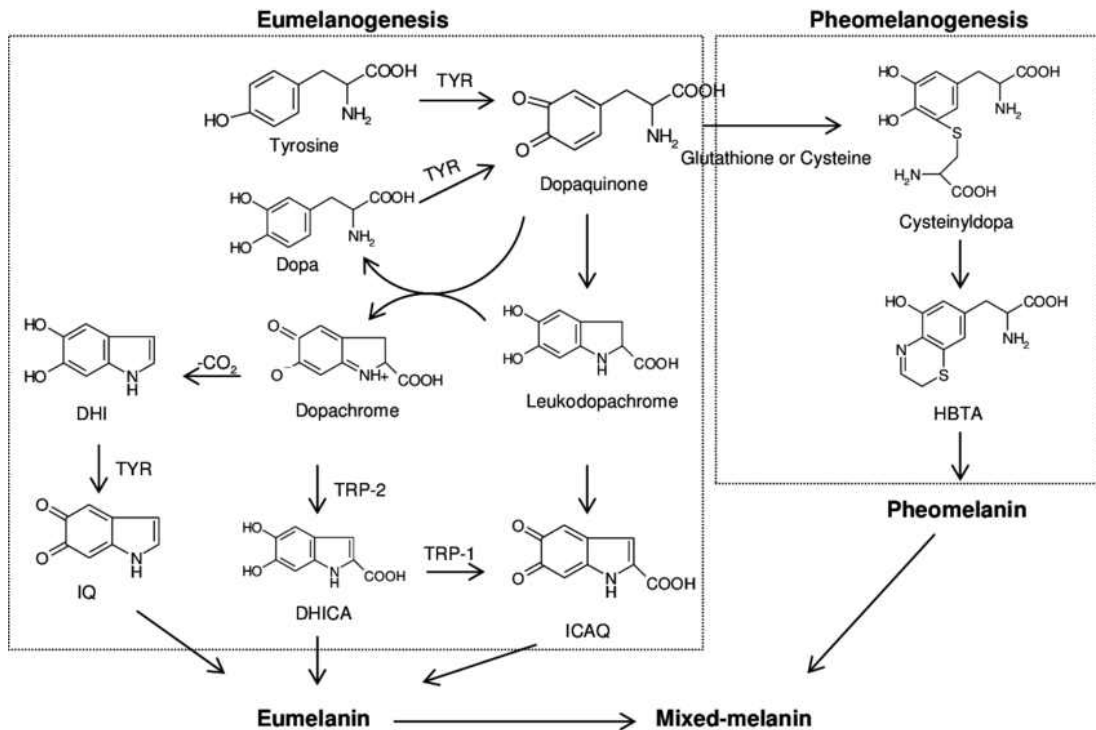


Figure 2. Diagram of melanogenesis[20]. TYR, tyrosinase; TRP; tyrosinase related protein; dopa, 3,4-dihydroxyphenylalanine; DHICA, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid; DHI, 5,6-dihydroxyindole; ICAQ, indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone; IQ, indole-5,6-quinone; HBTA, 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine.

플라보노이드 (flavonoid)는 식물계에 널리 분포하는 폴리 페놀 화합물 그룹이다. 과일, 채소, 견과류, 씨앗, 식물 줄기, 꽃 뿐만 아니라 차나 와인, 벌꿀 등에 포함되어 있다. 현재까지 5000개 이상의 플라보노이드 화합물이 확인되었다. 플라보노이드는 식물체 내에서 다양한 생물학적인 역할을 한다. 꽃에 존재하는 플라보노이드는 꽃의 색이나 향 (aroma)을 나타낸다. 이는 수분 매개자 (pollinators)를 끌어들이며 열매를 맺게 하고, 씨앗과 포자 발아, 씨앗의 성장을 돕는다. 식물의 잎에 존재하는 플라보노이드는 곰팡이균 (fungal pathogen) 및 UV로부터 식물을 보호하는 역할을 한다. 또한 에너지 전달과 식물 성장 호르몬, 호흡, 광합성 제어, 형태 형성 및 성별 결정 등에 관여한다[29 - 32]. 플라보노이드는 항산화, 항균, 항염, 항암 등에 효능이 있다고 알려져 있다. 좋은 생체 활성과 상대적으로 낮은 독성으로 인해 기능성 화장품 유효 성분으로 사용하기 좋고, 따라서 많은 연구자들이 관심을 갖는 물질이다[32,33].

플라보노이드 화합물은 flavane을 기본 구조로 한다. 이는 heterocyclic pyrane ring (C)을 통해 연결된 두 개의 benzene ring (A와 B)으로 구성되어 있다. 플라보노이드는 B링이 부착된 C 링의 탄소 및 C 링의 불포화 및 산화 정도에 따라 플라본 (flavone), 플라보놀 (flavonol), 플라바논 (flavanone), 아이소플라본 (isoflavone), 안토시아닌 (anthocyanidin) 등으로 분류된다. 이중 실험에 사용한 화합물인 플라본은 2번과 3번 탄소에 이중결합이 있고, C ring의 4번 위치에 케톤 (ketone)을 함유하고 있다. 대부분 채소나 과일에 존재하는 플라본은 A ring의 5번 위치에 수산화기 (hydroxyl group)를 가지고 있다. 대표적인 플라본으로는 luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone)과 apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone)이 있다[29,30]. 실험에 사용된 chrysoeriol은 luteolin의 유도체 (derivative)이며, linarin은 acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone)에 rutinose가 결합된 배당체 (glycoside)이다.

Chrysoeriol (4',5,7-trihydroxy-3'-methoxyflavone)은 감귤류[34,35]나 들깨 (perilla frutescens)속의 식물[36]이나 올리브나무의 잎 (zaitun leaves)[37]등에서 흔하게 발견되는 물질이다. Chrysoeriol은 항산화 (antioxidant)[38], 항염 (anti-inflammatory)[39], 항골다공증 (anti-osteoporosis)[40] 등의 효능이 있는 것으로 보고되어 있다. Linarin (5-Hydroxy-4'-methoxyflavone-7-O-rutinoside)은 국화속의 식물[41,42]이나 감귤류[35]에 널리 존재하는 성분으로 진통 (analgesic) 및 해열 (antipyretic)작용[43], 항염증[44] 및 항암 (anti-tumor)[42] 등 다양한 효능이 있다고 알려져 있지만 두 물질 모두 멜라닌 증감에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 B16F10 murine melanoma cell에서 chrysoeriol과 linarin의 멜라닌 생성 및 멜라닌 신호전달경로에 미치는 영향을 알아보고자 한다. 추가적으로 비슷한 구조의 flavone 화합물과 멜라닌 생성 효과를 비교해보았다.

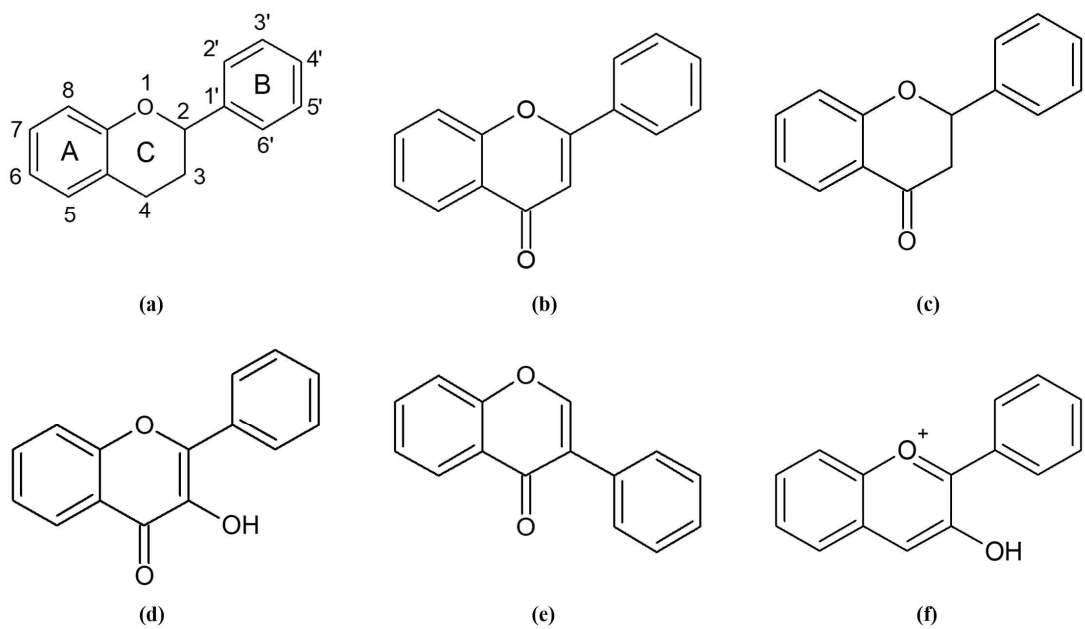


Figure 3. The skeleton structure of main classes of flavonoids. (a) flavan (basic skeleton of flavonoids), (b) flavone, (c) flavanone, (d) flavonol, (e) isoflavone, (f) antocyanidin.

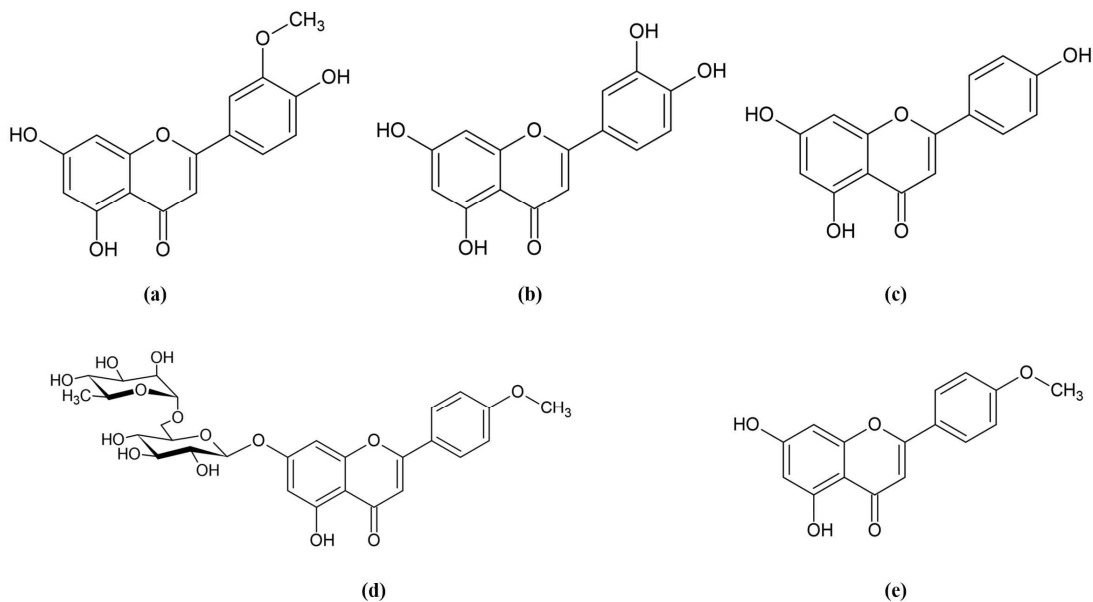


Figure 4. Structure of flavones. (a) chrysoeriol, (b) luteolin, (c) apigenin, (d) linarin, (e) acacetin.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용한 chrysoeriol, linarin, acacetin, apigenin은 extrasynthese (Genay CEDEX, France)에서 구입하였고, luteolin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin/streptomycin, trypsin-ethylenediaminetetraacetic (EDTA) acid, bicinchoninic acid (BCA) protein kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Fetal Bovine serum (FBS)은 Merck Millipore (Burlington, MA, United States)에서 구입하였다. α -MSH, protease inhibitor cocktail, sodium hydroxide (NaOH), L-DOPA, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Western blot 1차 항체 중 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였고, protease/phosphatase inhibitor cocktail과 p-ERK, p-AKT, p-GSK-3 β , p- β -catenin, p-PKA, ERK, AKT, GSK-3 β , β -catenin, PKA, β -actin 그리고 anti-mouse와 anti-rabbit 2차항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 2X Laemmli sample buffer와 Tween 20은 Bio-rad (Hercules, CA, USA), skim milk는 BD Difco (Sparks, MD, USA), bovine serum albumin (BSA)는 Bovostar (Bovogen, Melbourne, Australia)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate (SDS), tris-buffered Saline (TBS), sodium dodecyl sulfate (SDS), enhanced chemiluminescence (ECL) kit는 Biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다.

2. 실험방법

2.1. 세포배양

B16F10 murine melanoma cells은 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포는 FBS와 penicillin-streptomycin을 각각 10% (v/v)와 1% (v/v)로 첨가한 DMEM 배지를 사용하였다. 37°C, 5% CO₂ 습윤 배양기에서 배양하였고, 3일 간격으로 계대하였다.

2.2. 세포 생존율

실험에 사용된 플라본 화합물은 MTT 법을 수행하여 세포 독성 범위를 측정하였다. MTT 법은 노란색의 수용성인 MTT tetrazolium가 보라색의 비수용성인 MTT formazan으로 환원되는 것을 기반으로 한다. 이 반응은 살아있는 세포 내의 미토콘드리아 (mitochondria)에 존재하는 탈수소효소에 의해서 일어나고, 주어진 노출기간 동안 형성된 formazan 양은 well당 생존한 세포의 수에 정비례한다. 따라서 MTT 법은 세포 증식 및 생존력을 측정하기 위한 편리하고 신뢰할 수 있는 정량적 방법으로 널리 인식되고 있다[45].

B16F10 세포를 24-well plate에 well 당 8×10^3 cells/well로 분주한 후 24시간 배양하였다. 시료를 세포에 농도별로 처리한 후 72시간 동안 배양하였다. 그런 다음 상층액을 모두 제거하고 MTT 시약 (0.2 mg/mL in DMEM)을 well 당 500 μ L씩 넣고 4시간 반응시켰다. 반응시간이 끝나면 MTT 시약을 모두 제거한 후 DMSO를 넣어 형성된 formazan crystals을 녹였다. Spectrophotometric microplate reader를 사용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. 멜라닌 함량 측정

6-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 배양하였다. 시료를 세포에 농도별로 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 $1 \times$ PBS로 세척한 후 RIPA buffer를 200 μ L 넣어준 후 20분간 4°C에서 lysis 하였다. 그런 다음 cell scraper로 1.5 mL e-tube에 세포를 모아준 뒤 15,000 rpm, 30분, -8°C 조건으로 원심분리하고 pellet을 얻었다. 그런 다음 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH을 200 μ L씩 넣고 80°C에서 10분간 멜라닌을 용해하였다. Spectrophotometric microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit로 정량하였다.

2.4. Tyrosinase 활성 측정

6-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 배양하였다. 세포에 시료를 농도별로 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 1× PBS로 세척한 후 protease inhibitor cocktail을 1%로 첨가한 RIPA buffer (150 mM Sodium chloride, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 2 mM EDTA, sterile solution)로 세포를 lysis 하였다. Melanin 함량 측정과 동일한 조건에서 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit로 정량하였다. 그런 다음 96-well plate에 20 µg/mL로 정량한 단백질 20 µL와 2 mg/mL의 L-DOPA 80 µL을 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 spectrophotometric microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Western blot

6-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 배양하였다. 그 후 시료를 각 농도별로 단백질 발현시간에 따라 처리하였다. 그 후 차가운 $1 \times$ PBS로 세척한 후 protease/phosphatase inhibitor cocktail를 1%로 첨가한 RIPA buffer를 처리하여 20분간 4°C 에서 lysis 하였다. 1.5 mL e-tube에 세포를 모은 후 15,000 rpm, 30분, -8°C 조건으로 원심분리하고 상층액을 얻었다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit로 정량하였다. 각 상층액의 단백질은 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하였고, loading sample은 제조한 sample buffer와 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 정량한 단백질을 1:1 비율로 하고 100°C 에서 5분간 가열하였다. Loading sample은 loading 전까지 -20°C 에서 보관하였다. 제조한 단백질 sample은 SDS-polyacrylamide gel로 전기영동하여 단백질을 크기 별로 분리하였다. 분리된 단백질은 gel에서 polyvinylidene (PVDF) membrane으로 transfer 하였다. Membrane은 1%의 tween 20을 함유한 TBS ($1 \times$ TBS-T)로 세척하였다. 그런 다음 5%의 skim milk (in $1 \times$ TBS-T)나 5%의 BSA (in $1 \times$ TBS-T)에 1시간 동안 blocking 한 후 $1 \times$ TBS-T로 10분씩 6회 세척하였다. 확인하고자 하는 단백질의 항체는 1%의 skim milk (in $1 \times$ TBS-T)나 1% BSA (in $1 \times$ TBS-T)에 1:1000 비율로 희석하였다. 세척이 끝난 membrane은 1차 항체를 4°C 에서 12시간 이상 반응하였다. 그런 다음 $1 \times$ TBS-T로 10분씩 6회 세척하였고, 1% BSA (in $1 \times$ TBS-T)에 1:1000 비율로 희석한 2차 항체를 실온에서 2시간 이상 반응시키고 $1 \times$ TBS-T로 10분씩 6회 세척하였다. 마지막으로 부착된 2차 항체에 ECL solution을 반응시키고 chemidoc (WL, VILBER LOURMAT, France)를 사용하여 단백질을 검출하였다.

3. 통계처리

모든 실험의 결과는 세 번의 독립적인 실험을 평균과 표준편차(평균 \pm SD)로 나타내었다. 통계적 유의성은 student's t-test를 사용하여 p -value로 나타내었고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 로 표시하였다.

Ⅲ. 결 과

1. B16F10 세포 내에서 Chrysoeriol의 멜라닌 생성 효과

1.1. 세포 생존율

B16F10 세포에서 chrysoeriol이 세포에 독성을 나타내지 않는 농도를 확인하기 위해 MTT 법을 수행하였다. Chrysoeriol (2, 4, 8 및 16 μ M)과 양성대조군으로 사용되는 α -MSH (100 nM)을 각각 72시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 아무것도 처리하지 않은 세포(미처리대조군)를 기준으로 하였을 때 90% 이상의 생존율을 보인 농도 범위 내에서 이후 실험을 진행하였다. chrysoeriol은 8 μ M에서 92%, 16 μ M에서 87%의 생존율을 보였다. 따라서 chryseriol의 세포독성이 나타나지 않는 농도인 1, 2, 4 및 8 μ M 에서 이후 실험을 진행하였다(Fig. 5).

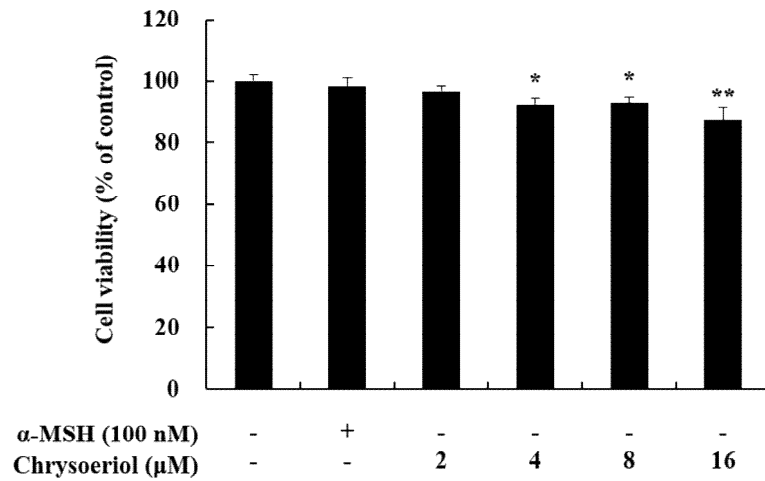


Figure 5. Effects of chrysoeriol on the viability in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol (2, 4, 8 and 16 μ M) and α -MSH (100 nM) for 72 h. Cell viability was expressed as percentages relative to non treated cells. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n = 3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

1.2. 멜라닌 함량 측정

Chrysoeriol이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포에 독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 멜라닌 생성을 확인하였다. B16F10 세포에 chrysoeriol (1, 2, 4 및 8 μM)과 α -MSH (100 nM)을 72시간동안 처리하여 생성되는 멜라닌의 함량을 측정하였다.

실험결과 미처리대조군을 100%로 하였을 때, 양성대조군은 미처리대조군에 비해 약 130% 증가하였고, chryseoriol (1, 2, 4 및 8 μM) 처리 시 각각 102%, 108%, 137% 및 204%로 멜라닌 생성이 농도의존적으로 증가함을 확인하였다 (Fig. 6).

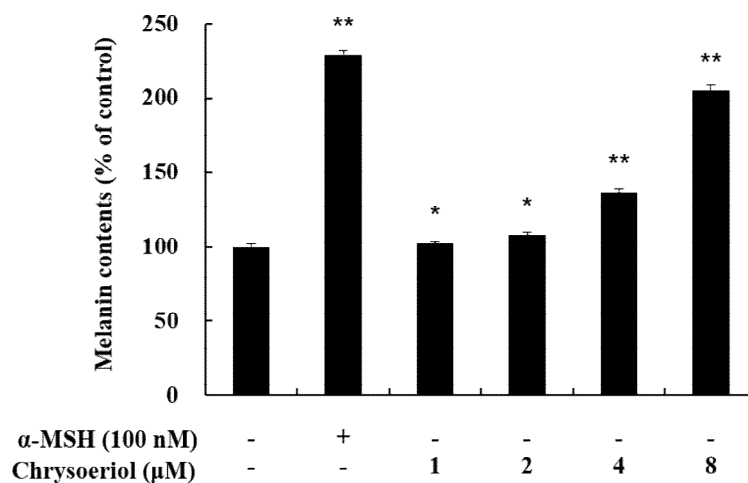


Figure 6. Effects of chrysoeriol on the melanin production in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol (1, 2, 4, and 8 μM) and α-MSH (100 nM) for 72 h. Melanin contents was expressed as percentages relative to non treated cells. α-MSH-treated cells were used as a positive control. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n = 3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

1.3. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase는 멜라닌 합성 초기단계에서 tyrosine과 DOPA의 산화반응에 관여하는 속도제한효소이다[26]. Chrysoeriol이 B16F10 세포 내의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 실험을 진행하였다. tyrosinase 활성은 L-DOPA를 기질로 하여 생성되는 DOPA chrome의 양을 비색법으로 측정하여 확인하였다.

실험결과 미처리대조군을 100%로 하였을 때, 양성대조군은 160% 증가하였고, chryseoriol (1, 2, 4 및 8 μ M) 처리 시 104%, 120%, 161% 및 219% 증가하였다. 특히 8 μ M에서는 양성대조군 보다 약 60% 정도 높은 tyrosinase 활성을 보였다 (Fig. 7).

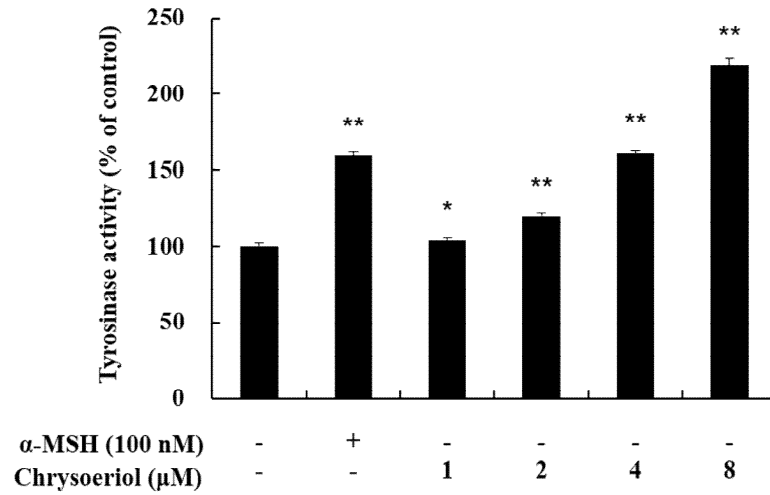


Figure 7. Effects of chrysoeriol on the tyrosinase activity in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol (1, 2, 4, and 8 μ M) and α -MSH (100 nM) for 72 h. Tyrosinase activity was expressed as percentages relative to non treated cells. α -MSH-treated cells were used as a positive control. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n = 3). * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. non treated control.

1.4. Western blot

1) 멜라닌 합성 효소 발현에 미치는 chrysoeriol의 영향

Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2는 멜라닌 합성 과정을 촉매하는 효소로서 멜라닌 생합성 과정의 각각의 단계에서 중요한 역할을 한다[23,27]. 따라서 chrysoeriol이 B16F10 세포 내의 멜라닌 합성 효소 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 western blot을 수행하여 멜라닌 합성 효소의 발현을 확인하였다.

실험결과 chrysoeriol을 농도별로 처리하였을 때, tyrosinase, TRP-1과 TRP-2는 모두 미처리대조군에 비해 효소 발현이 증가하였다. 특히 8 μ M에서 tyrosinase는 미처리대조군보다 약 75% 증가하였고, TRP-2는 미처리대조군보다 약 50% 증가하였다. TRP-1의 경우 미처리대조군 보다 4배 가까이 증가함을 확인하였다(Fig. 8).

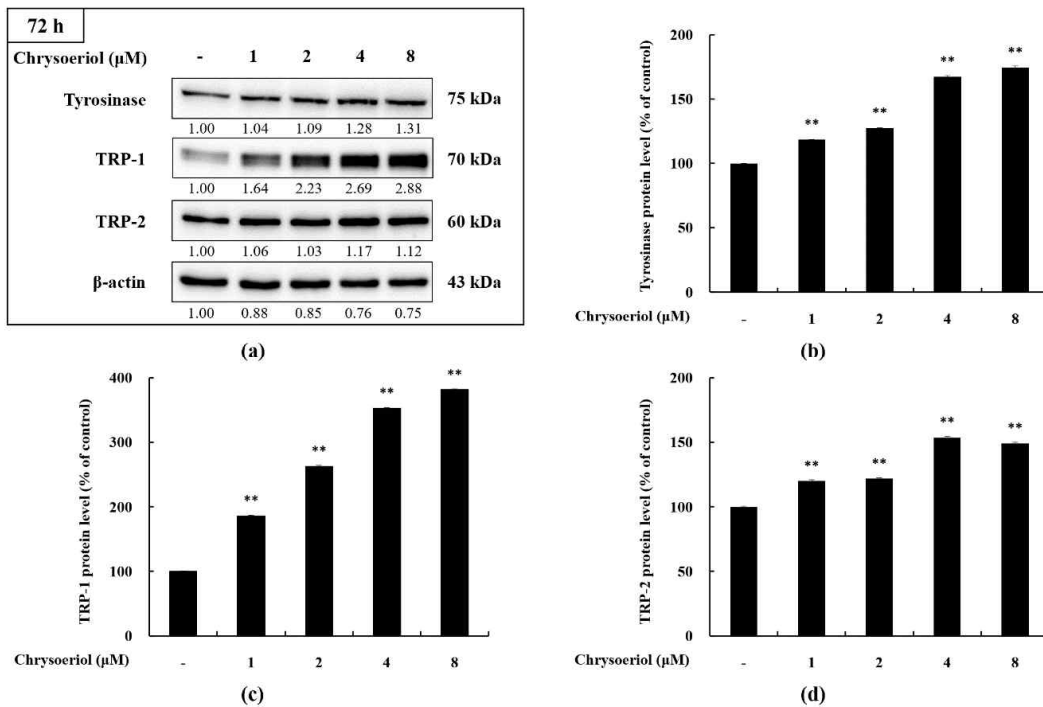


Figure 8. Effects of chrysoeriol on TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol (1, 2, 4, and 8 μM) for 72 h. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) tyrosinase, (c) TRP-1 and (d) TRP-2. β-actin was used as loading control. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and β-actin were quantified by Image J. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

2) MITF 발현에 미치는 chrysoeriol의 영향

MITF는 멜라닌 합성 효소의 발현을 조절한다. 다양한 세포 내 신호전달 경로를 통해 MITF가 활성화 되면 활성화된 MITF는 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 promoter인 M-box에 결합하여 멜라닌 합성 단백질의 발현을 증가시킨다[15]. 따라서 B16F10 세포에 chrysoeriol을 농도별로 처리한 후 MITF 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다.

실험결과 chrysoeriol 처리 농도가 증가함에 따라 MITF의 발현이 증가하였다. 특히 8 μ M에서는 미처리대조군에 비해 약 70%가 증가하였다. 따라서 chrysoeriol은 MITF의 발현을 증가시킴으로써 멜라닌 합성 효소의 생성을 증가시키고 tyrosinase 활성을 증가시킨다. 이를 통해 멜라닌 생성이 증가되는 것으로 사료된다(Fig. 9).

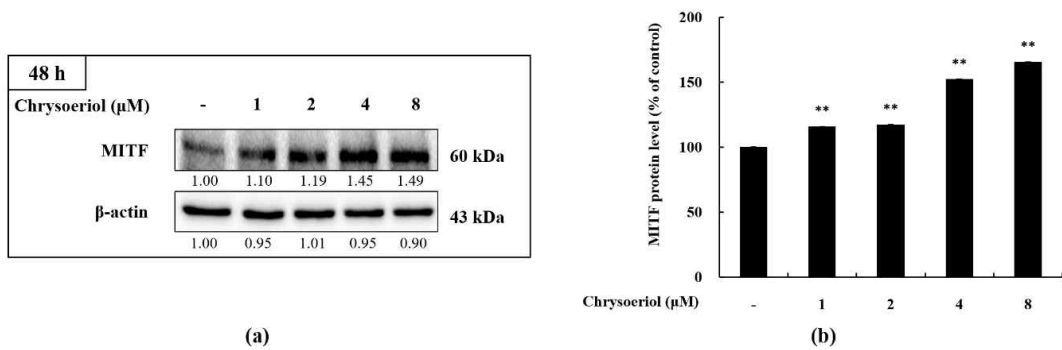


Figure 9. Effects of chrysoeriol on MITF protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol (1, 2, 4, and 8 μM) for 48 h. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) MITF. β-actin was used as loading control. MITF and β-actin were quantified by Image J. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

3) ERK 신호전달경로에 미치는 chrysoeriol의 영향

ERK는 대표적인 음성신호전달경로이다. 인산화된 ERK는 MITF의 인산화를 유도하고, 인산화된 MITF는 유비퀴틴화 되어 분해된다. 따라서 ERK의 인산화 저해는 MITF의 인산화를 저해함으로써 멜라닌 생성 단백질의 발현을 유도한다. Chrysoeriol가 ERK의 인산화에 미치는 영향을 확인해보기 위해 western blot 실험을 진행하였다.

실험결과 chrysoeriol의 처리 농도가 증가함에 따라 ERK의 인산화가 감소하는 경향을 보였고, 특히 8 μ M에서는 미처리대조군 보다 21% 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 chrysoeriol은 ERK 신호전달경로에서 ERK의 인산화 감소를 통해 MITF의 분해를 막고 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 사료된다(Fig. 10).

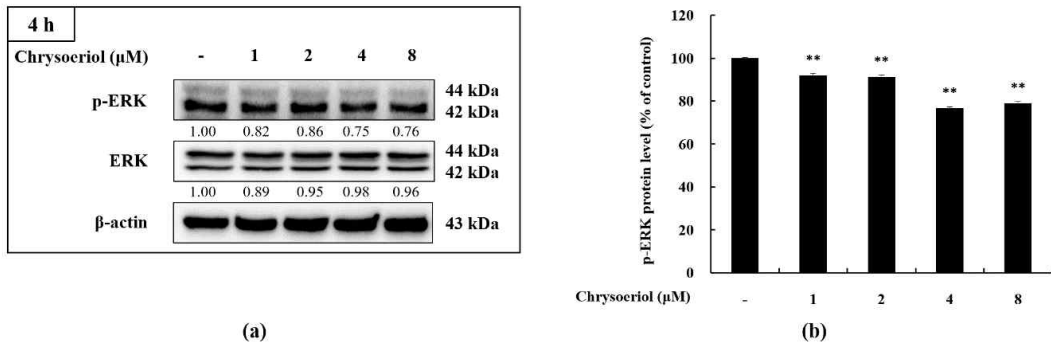
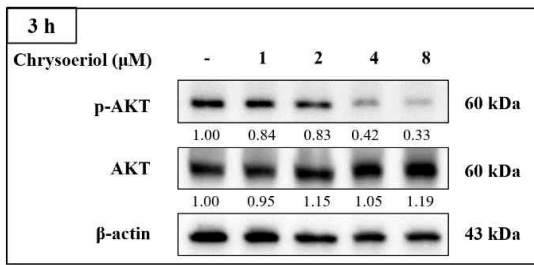


Figure 10. Effects of chrysoeriol on p-ERK protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol (1, 2, 4, and 8 μM) for 4 h. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) p-ERK. β -actin was used as loading control. p-ERK and ERK were quantified by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

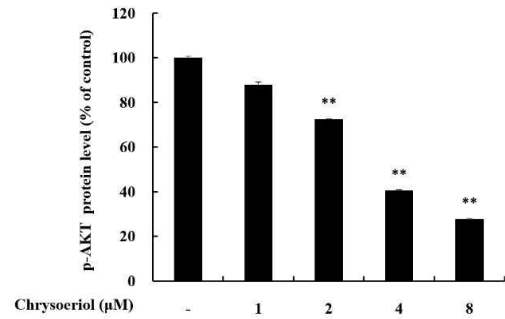
4) PI3K/AKT 신호전달경로에 미치는 chrysoeriol의 영향

AKT의 인산화는 MITF의 발현을 하향 조절하고 멜라닌 생성 단백질의 발현을 감소시켜 멜라닌 생성을 억제한다. 그러므로 AKT 인산화 억제제는 MITF의 발현을 증가시키고 멜라닌 생성을 유도한다. 따라서 chrysoeriol이 AKT의 인산화에 미치는 영향을 확인해보고자 western blot을 진행하였다.

실험결과 AKT 인산화는 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였고, 특히 8 μ M에서는 미처리대조군 보다 약 70% 감소하였다. Chrysoeriol은 PI3K/AKT 신호전달경로에서 AKT 인산화 감소를 통해 MITF 발현을 증가시키고 이를 통해 멜라닌 생성에 영향을 준다(Fig. 11).



(a)



(b)

Figure 11. Effects of chrysoeriol on p-AKT protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol (1, 2, 4, and 8 μM) for 3 h. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) p-AKT. β-actin was used as loading control. p-AKT and AKT were quantified by Image J. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

5) Wnt 신호전달경로에 미치는 chrysoeriol의 영향

인산화된 GSK-3 β (ser 9)는 비활성화 (inactivation)되어 β -catenin을 축적시키고, β -catenin은 LEF/TCF 전사인자를 통해 핵 내의 MITF의 발현을 증가시킨다. 반면에 GSK-3 β (Tyr 216)의 인산화는 활성화 (activation)되어 β -catenin를 인산화시키고, 인산화된 β -catenin은 분해된다. 따라서 p-GSK-3 β (ser 9)의 증가는 β -catenin을 축적시켜 MITF의 발현을 유도한다. Chrysoeriol가 Wnt 신호전달경로에 미치는 영향을 확인해보고자 western blot을 진행하였다.

실험결과 p-GSK-3 β (ser 9)는 2 μ M 이상의 농도에서 증가하는 경향이 보이고, 특히 8 μ M에서는 미처리대조군 보다 84% 증가하였다. Chrysoeriol의 처리 농도가 증가할수록 인산화된 p- β -catenin의 양은 점차 감소하였고, 특히 8 μ M에서는 42% 감소하였다. 반면에 β -catenin은 p- β -catenin와 대조적으로 chrysoeriol의 처리 농도 증가할수록 증가하고, 8 μ M 농도에서는 미처리대조군에 비해 약 120% 정도 증가하였다. 따라서 chrysoeriol은 Wnt 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성에 영향을 준다(Fig. 12).

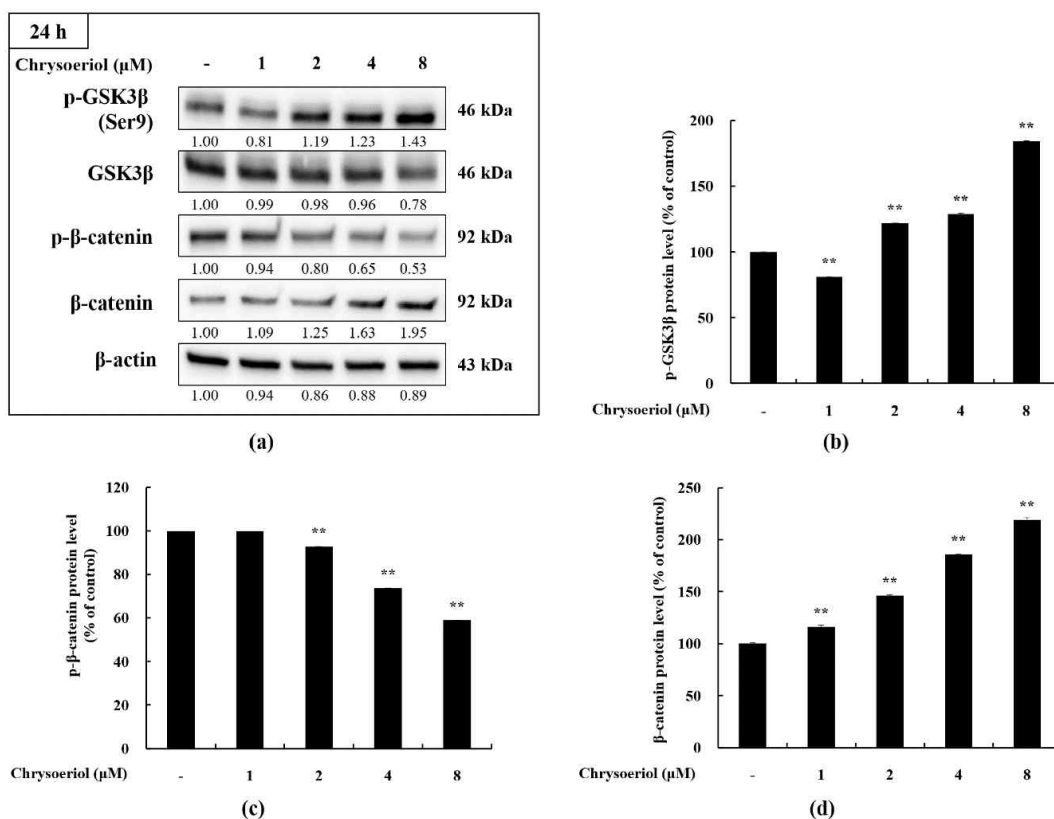


Figure 12. Effects of chrysoeriol on p-GSK-3 β , p- β -catenin and β -catenin protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol (1, 2, 4, and 8 μM) for 24 h.. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) p-GSK-3 β , (c) p- β -catenin and (d) β -catenin. β -actin was used as loading control. p-GSK-3 β , p- β -catenin, β -catenin and β -actin were quantified by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

6) cAMP/PKA 신호전달경로에 미치는 chrysoeriol의 영향

α -MSH에 의해 활성화된 MC1R은 cAMP를 증가시키고 차례로 PKA와 CREB를 인산화시킨다. 인산화된 CREB는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 합성 단백질 발현에 영향을 준다. Chrysoeriol이 cAMP/PKA 신호전달경로에 미치는 영향을 확인해보고자 western blot을 수행하였다.

실험결과 p-PKA는 chrysoeriol를 처리한 모든 농도에서 미처리대조군 보다 30% 이상 증가하였고, 특히 8 μ M에서는 미처리대조군 보다 44% 증가하였다. 따라서 이러한 결과는 chrysoeriol이 cAMP/PKA 신호전달경로를 통해 멜라닌 생성을 유도함을 시사한다(Fig. 13).

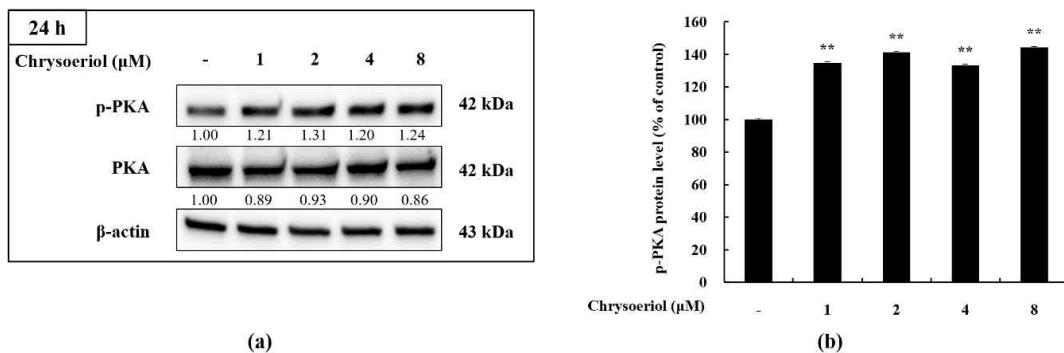


Figure 13. Effects of chrysoeriol on p-PKA protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol at the indicated concentration for 24 h. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) p-PKA. β -actin was used as loading control. p-PKA and PKA were quantified by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

2. B16F10 세포 내에서 Linarin의 멜라닌 생성 효과

2.1. 세포 생존율

B16F10 세포에서 linarin이 세포에 독성을 나타내지 않는 농도를 확인하기 위해 MTT 법을 수행하였다. Linarin (10.5, 21, 42 및 84 μM)과 양성대조군으로 사용되는 $\alpha\text{-MSH}$ (100 nM)을 각각 72시간 동안 처리하였다. 아무것도 처리하지 않은 세포를 기준으로 하였을 때 90% 이상의 생존율을 보인 농도 범위 내에서 이후 실험을 진행하였다. Linarin은 42 μM 에서 92%, 84 μM 에서 88%의 생존율을 보였다. 따라서 linarin의 세포독성이 나타나지 않는 농도인 5.25, 10.5, 21 및 42 μM 에서 이후 실험을 진행하였다(Fig. 14).

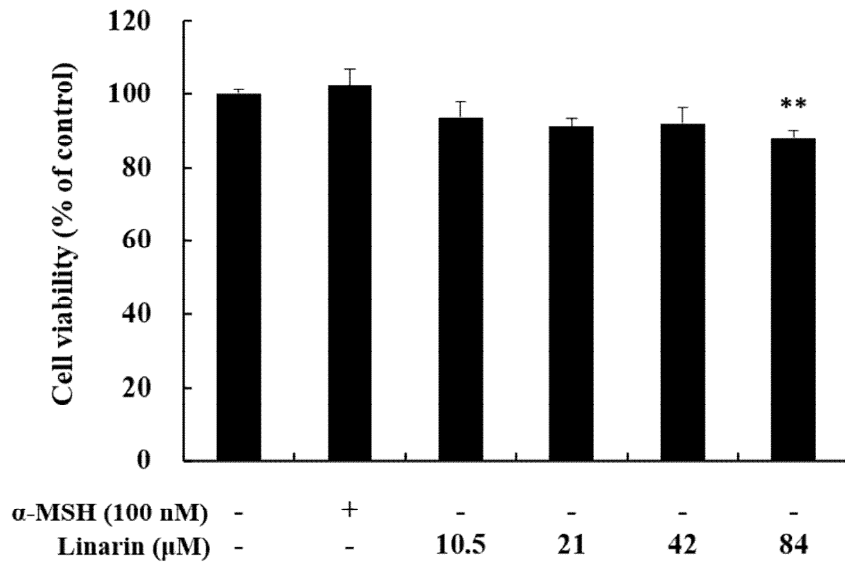


Figure 14. Effects of linarin on the viability in B16F10 cells. The cells were treated with linarin (10.5, 21, 42, and 84 μM) and $\alpha\text{-MSH}$ (100 nM) for 72 h. Cell viability was expressed as percentages relative to non treated cells. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

2.2. 멜라닌 함량 측정

Linarin이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포에 독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 멜라닌 생성을 확인하였다. B16F10 세포에 linarin (5.25, 10.5, 21, 42 μ M)과 양성대조군 α -MSH (100 nM)을 72시간 동안 처리하여 생성되는 멜라닌의 함량을 측정하였다.

실험결과 미처리대조군을 100%로 하였을 때, 양성대조군은 282% 증가하였고, linarin (5.25, 10.5, 21 및 42 μ M) 처리 시 각각 115%, 129%, 168% 및 290%로 linarin 처리 농도가 증가할수록 멜라닌 생성이 증가함을 확인하였다(Fig. 15).

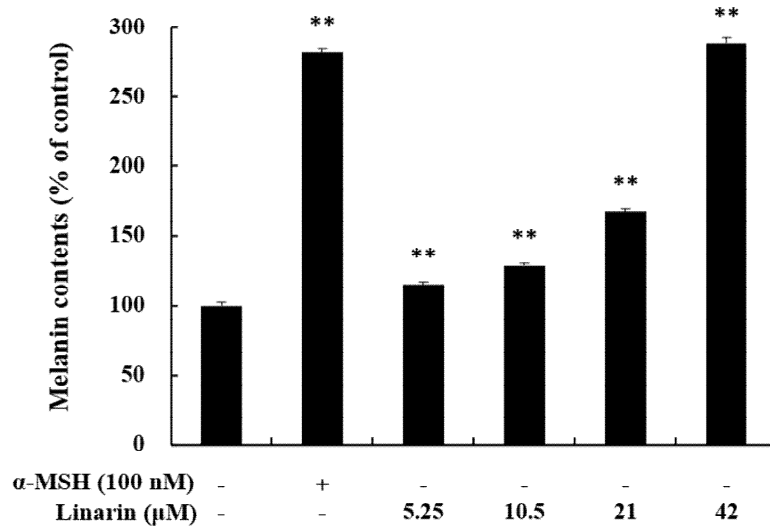


Figure 15. Effects of linarin on the melanin production in B16F10 cells. The cells were treated with linarin (5.25, 10.5, 21 and 42 μM) and α-MSH (100 nM) for 72 h. Melanin contents was expressed as percentages relative to non treated cells. α-MSH-treated cells were used as a positive control. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

2.3. Tyrosinase 활성 측정

Linarin이 B16F10 세포 내의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 실험을 진행하였다. 그 결과 미처리대조군을 100%로 하였을 때, 양성대조군은 267% 증가하였고, linarin (5.25, 10.5, 21 및 42 μ M) 처리시 각각 172%, 204%, 281% 및 308%로 농도가 증가할수록 tyrosinase의 활성이 증가하였다. 특히 42 μ M에서는 양성대조군 (267%)보다 약 40% 정도 더 높은 활성을 보였다(Fig. 16).

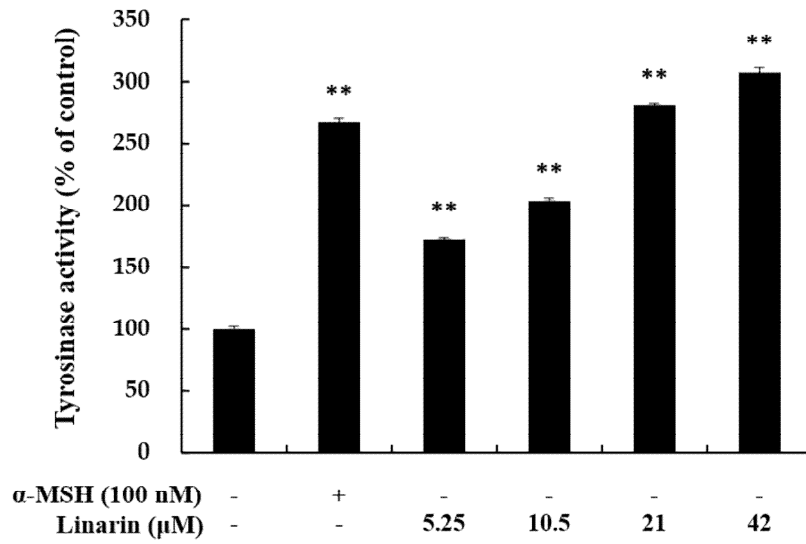


Figure 16. Effects of linarin on the tyrosinase activity in B16F10 cells. The cells were treated with linarin (5.25, 10.5, 21 and 42 μM) and α-MSH (100 nM) for 72 h. Tyrosinase activity was expressed as percentages relative to non treated cells. α-MSH-treated cells were used as a positive control. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n = 3). ** p < 0.01 vs. non treated control.

2.4. Western blot

1) 멜라닌 합성 효소 발현에 미치는 linarin의 영향

Linarin이 B16F10 세포 내의 멜라닌 합성 효소 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 western blot을 수행하여 멜라닌 합성 효소의 발현을 확인하였다.

실험결과 linarin을 농도별로 처리하였을 때, tyrosinase, TRP-1과 TRP-2는 모두 미처리대조군에 비해 효소 발현이 농도의존적으로 증가하였다. 미처리대조군을 100%로 하였을 때, 특히 8 μ M에서 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현은 미처리대조군과 비교하여 각각 218%, 152% 및 126% 증가시키는 것을 확인하였다 (Fig. 17).

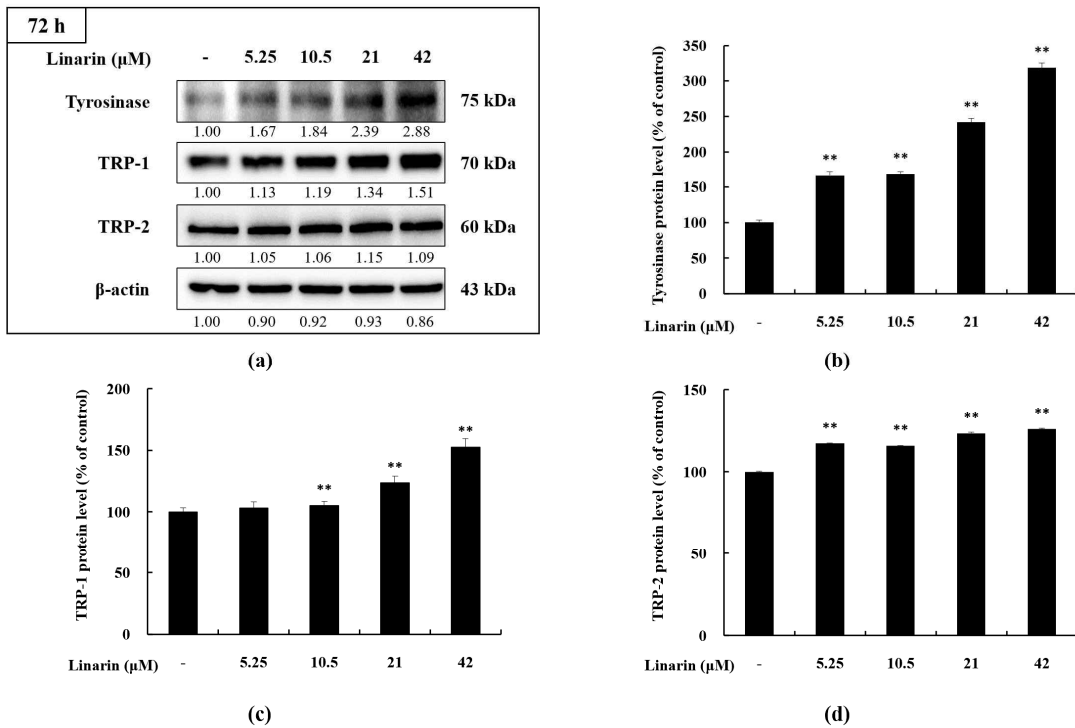
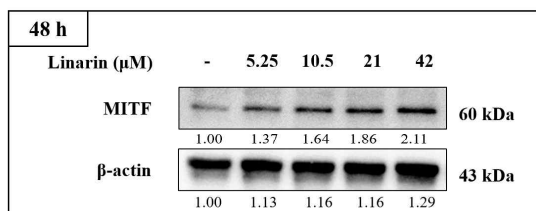


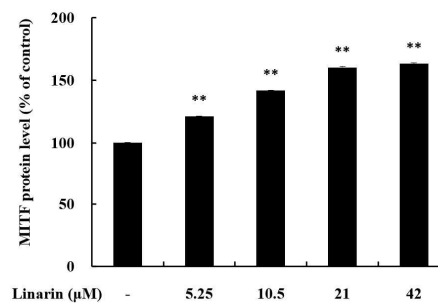
Figure 17. Effects of linarin on TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with linarin (5.25, 10.5, 21 and 42 μM) for 72 h. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) tyrosinase, (c) TRP-1 and (d) TRP-2. β -actin was used as loading control. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and β -actin were quantified by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

2) MITF 발현에 미치는 linarin의 영향

MITF는 멜라닌 합성 효소의 발현에 관여한다. 따라서 B16F10 세포에 chrysoeriol을 농도별로 처리한 후 MITF 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 linarin 처리 농도가 5.25 μ M에서 42 μ M로 증가함에 따라 각각 121%, 141%, 160% 및 163%로 MITF의 발현이 증가하였다. 따라서 chrysoeriol은 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 합성 효소의 생성을 증가시키고 이를 통해 멜라닌 생성이 증가하는 것으로 사료된다(Fig. 18).



(a)



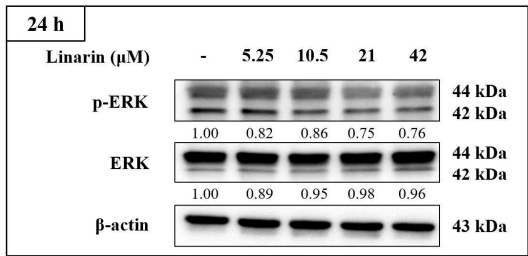
(b)

Figure 18. Effects of linarin on MITF protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with linarin (5.25, 10.5, 21 and 42 μM) for 48 h. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) MITF. β -actin was used as loading control. MITF and β -actin were quantified by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

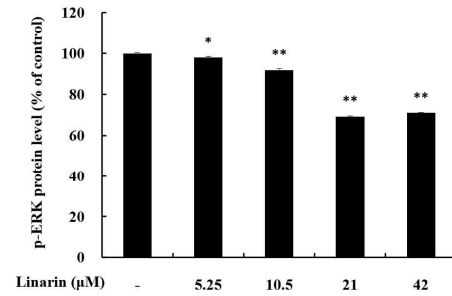
3) ERK 신호전달경로에 미치는 linarin의 영향

ERK의 인산화 저해는 MITF의 인산화를 저해함으로써 MITF의 분해를 막고, 멜라닌 생성 단백질의 발현을 유도한다. Linarin이 ERK의 인산화에 미치는 영향을 확인해보기 위해 western blot 실험을 진행하였다.

실험결과 linarin의 처리 농도가 증가함에 따라 ERK의 인산화가 감소하였다. 21 μM 이상 처리 농도에서는 미처리대조군에 비해 ERK의 인산화가 약 30% 정도 감소하였다. 따라서 linarin은 ERK 신호전달경로에서 ERK의 인산화 감소를 통해 멜라닌 생성에 영향을 준다(Fig. 19).



(a)

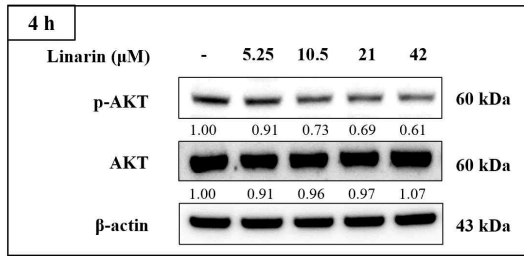


(b)

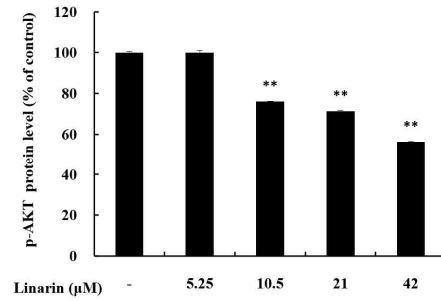
Figure 19. Effects of linarin on p-ERK protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with linarin (5.25, 10.5, 21 and 42 μM) for 24 h. Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) p-ERK. β -actin was used as loading control. p-ERK and ERK were quantified by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments ($n = 3$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

4) PI3K/AKT 신호전달경로에 미치는 linarin의 영향

Linarin이 AKT의 인산화에 미치는 영향을 확인해보고자 western blot을 진행한 결과 linarin의 처리 농도가 증가할수록 AKT의 인산화는 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히 8 μ M에서는 미처리대조군 보다 45% 정도 감소하였다. 따라서 linarin은 PI3K/AKT 신호전달경로에서 AKT 인산화 감소를 통해 MITF 발현에 관여하고 이를 통해 멜라닌 생성에 영향을 준다(Fig. 20).



(a)



(b)

Figure 20. Effects of linarin on p-AKT protein expression in B16F10 cells. The cells were treated with linarin (5.25, 10.5, 21 and 42 μM) for 4 h.

Western blot was performed to verify protein levels. (a) Western blotting results and protein level of (b) p-AKT. β -actin was used as loading control. p-AKT and AKT were quantified by Image J. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

3. B16F10 세포 내에서 Flavone 화합물의 멜라닌 생성 효과 비교

3.1. 멜라닌 함량 측정

1) Chrysoeriol와 유사한 구조 화합물들의 멜라닌 생성 효과 비교

Apigenin은 4' 위치에 수산화기(-OH)가 존재하며, luteolin은 apigenin에서 3' 위치에 수산화기(-OH)가 존재하고, chrysoeriol은 apigenin에서 3' 위치에 메톡시기(-OCH₃)가 존재한다(Fig. 4). 이런 비슷한 구조를 가진 화합물들의 구조적 차이에 의한 멜라닌 증감 효과를 비교해보고자 하였다. Luteolin과 apigenin은 chrysoeriol의 최고농도인 8 μM에서 세포독성을 나타내지 않았다.

실험결과 4' 위치에 수산화기가 존재하면서 3' 위치에 메톡시기가 있는 chrysoeriol은 앞선 실험과 같이 농도의존적으로 멜라닌 생성량이 증가하였고, 3' 위치에 수산화기가 있는 luteolin은 8 μM에서 멜라닌 증가 효과가 나타나지 않았다. 4' 위치에만 수산화기가 있는 apigenin은 8 μM에서 chrysoeriol와 비슷한 정도의 멜라닌 생성효과가 나타났다(Fig. 21).

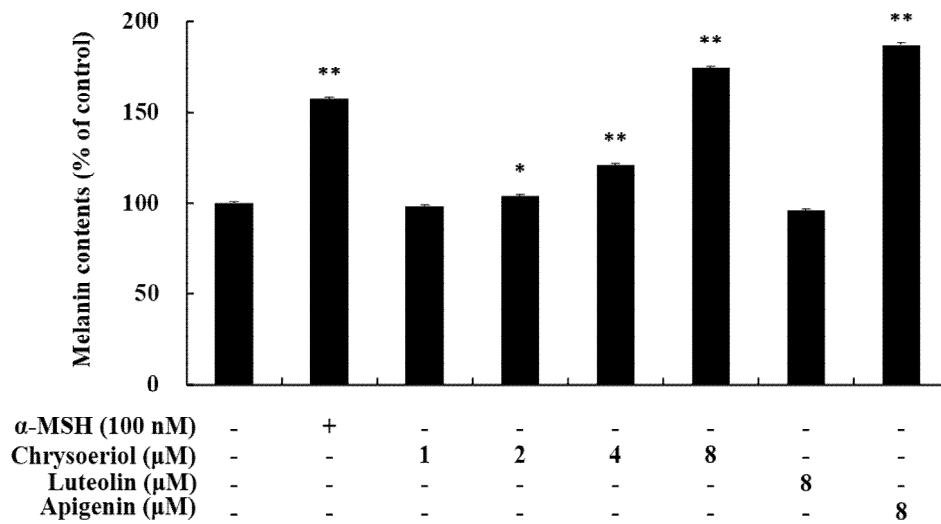


Figure 21. Effects of chrysoeriol, luteolin and apigenin on the melanin production in B16F10 cells. The cells were treated with chrysoeriol, luteolin and apigenin at the indicated concentration for 72 h. Melanin contents was expressed as percentages relative to untreated cells. α -MSH-treated cells were used as a positive control. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n = 3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

2) Linarin과 유사한 구조 화합물의 멜라닌 생성 효과 비교

Acacetin은 4' 위치에 메톡시기가 존재하는 화합물이고, linarin은 acacetin의 7번 위치에 rutinose가 결합된 화합물이다. 4'-O-methylated flavone의 7번 위치의 rutinose 존재 여부에 의한 멜라닌 증감 효과를 비교해보고자 하였다. acacetin은 10 μ M의 농도까지 생존하여 이후 실험은 해당 농도에서 진행하였다.

실험결과 linarin은 앞선 실험과 같이 농도의존적으로 멜라닌 생성량이 증가하였고, acacetin 또한 멜라닌이 증가함을 확인하였다. Linarin의 최고농도에 비해 acacetin은 약 70% 높은 멜라닌 생성이 나타났다(Fig. 22).

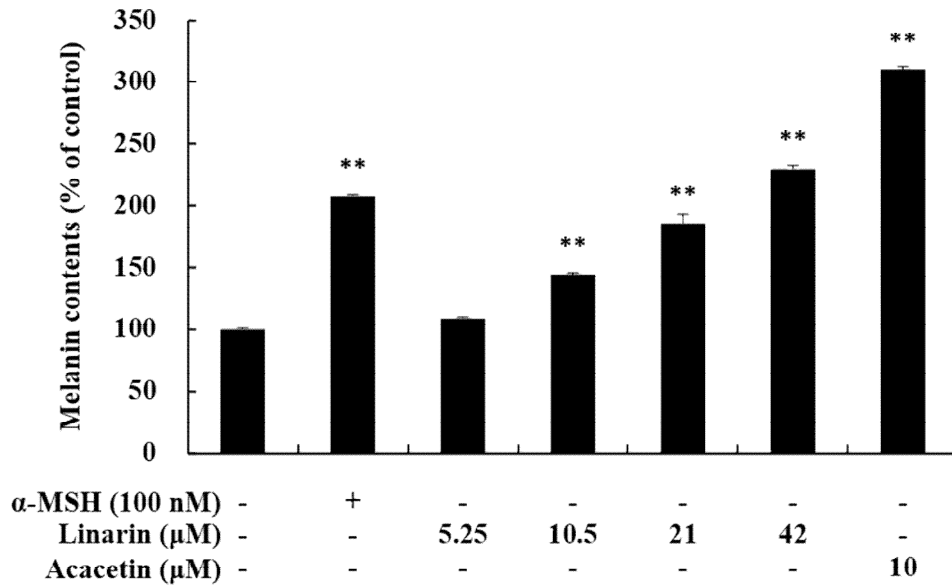


Figure 22. Effects of linarin and acacetin on the melanin production in B16F10 cells. The cells were treated with linarin and acacetin at the indicated concentration for 72 h. Melanin contents was expressed as percentages relative to untreated cells. α -MSH-treated cells were used as a positive control. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent experiments (n = 3). ** $p < 0.01$ vs. non treated control.

IV. 고 찰

멜라닌은 피부색을 결정하는 주요인자로서 자외선으로부터 피부를 보호하거나 자유라디칼(free-radicals)을 흡수하는 역할을 한다[46]. 그러나 멜라닌 생성에 문제가 생기면 백반증과 같은 저색소침착이 나타난다. 멜라닌 함량이 적은 피부는 멜라닌 함량이 많은 피부보다 피부암 발생 비율이 높아지게 된다. 현재 저색소침착증 치료에는 많은 부작용들이 나타나기 때문에 이를 안전하게 치료할 수 있는 천연소재의 물질을 찾기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다[6]. 플라보노이드는 좋은 생체 활성과 상대적으로 낮은 독성으로 인해 많은 연구자들이 관심을 가지고 있는 물질이다. 실험에 사용된 chrysoeriol은 항산화, 항염증, 항골다공증 등의 효능이 있으며, linarin은 항염증, 진통과 해열 등의 효능이 있다고 알려져 있다. 아직 chrysoeriol과 linarin의 멜라닌 생성 여부는 밝혀진 바가 없다. 따라서 chrysoeriol과 linarin의 멜라닌 증감 여부를 확인하고, 멜라닌 신호전달 경로에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 유사한 구조를 가진 flavone 화합물과 구조차이에 따른 멜라닌 생성 효과를 비교해보았다.

세포독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 chrysoeriol과 linarin은 세포 내 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성을 증가시키는 것을 확인하였다. 그리고 멜라닌 합성 효소 (tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2)의 발현과 이를 조절하는 MITF의 발현을 증가시킴을 확인하였다. MITF의 발현을 조절하는 여러 신호전달 경로를 확인한 결과 chrysoeriol와 linarin은 ERK와 AKT 인산화에 관여하는 것을 확인하였고, 추가적으로 chrysoeriol의 경우 GSK-3 β , β -catenin, PKA의 인산화에 관여하여 멜라닌 생성을 유도한다는 것을 확인하였다.

먼저 MTT를 수행한 결과 chrysoeriol은 8 μ M 이하의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았고, linarin은 42 μ M 이하의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다 (Fig. 5, 14). 따라서 이후 실험은 chrysoeriol은 1, 2, 4 및 8 μ M에서 진행하였고, linarin은 5.25, 10.5, 21 및 42 μ M에서 진행하였다. 멜라닌 증감 여부를 확인하기 위해 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성을 측정한 결과 chrysoeriol과 linarin은 α -MSH를 처리하지 않은 조건에서 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성을 농도의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 chrysoeriol과 linarin은 멜라닌 생성을 증가시키는 것을 확인하였다(Fig. 6, 7, 15, 16).

따라서 이후 western blot 실험을 수행하여 chrysoeriol과 linarin이 멜라닌 생성에 관여하는 효소의 발현에 미치는 영향을 확인해본 결과 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현이 모두 유의하게 증가한 것을 확인하였다(Fig. 8, 17). Chrysoeriol과 linarin을 처리하였을 때 멜라닌 생성이 증가한 것은 chrysoeriol과

linarin이 tyrosinase 활성을 증가시키고, 멜라닌 합성에 관여하는 효소의 발현을 증가시킴으로써 나타난다는 것을 확인하였다.

MITF는 멜라닌 합성 효소들의 중요한 전사인자이다. MITF가 tyrosinase나 그 관련 효소들의 DNA상의 프로모터인 M-box에 결합하면 해당 단백질의 발현이 증가한다. 따라서 chrysoeriol과 linarin이 MITF 발현에 영향을 미치는지 확인해 보고자 western blot을 수행하였다. 그 결과 chrysoeriol과 linarin를 처리했을 때 처리 농도가 증가할수록 MITF의 발현이 증가하였다. 따라서 chrysoeriol과 linarin를 처리하였을 때 MITF의 발현 증가로 인해 멜라닌 합성 효소들의 발현 증가하여 멜라닌 생성이 증가함을 확인하였다(Fig. 9, 18).

다양한 멜라닌 생성 신호전달경로들은 MITF의 발현에 관여하여 최종적으로 멜라닌이 생성된다. 대표적인 음성 신호전달경로에는 ERK 신호전달 경로와 PI3K/AKT 신호전달경로가 있다. ERK의 인산화는 MITF를 인산화하고, 이는 MITF의 분해를 초래한다. 따라서 ERK의 인산화 저해는 MITF의 분해를 막는다. Chrysoeriol과 linarin를 농도별로 처리했을 때 처리 농도가 증가할수록 ERK의 발현이 감소함을 확인하였다(Fig. 10, 19). 다른 음성신호경로인 PI3K/AKT 신호전달경로에서 AKT의 인산화는 MITF를 하향조절하여 멜라닌 생성을 억제한다. 따라서 AKT의 인산화 억제는 MITF의 발현을 증가시킨다. Chrysoeriol과 linarin를 농도별로 처리했을 때 처리 농도가 증가할수록 AKT의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 11, 20). Chrysoeriol과 linarin은 ERK와 AKT의 인산화를 억제하므로써 MITF의 발현에 관여하고 멜라닌 생성에 영향을 미친다.

추가적으로 chrysoeriol이 Wnt 신호전달경로와 cAMP/PKA 신호전달 경로에 미치는 영향을 확인해보았다. Wnt 신호전달경로에서 Thy 216 잔기에 인산화된 GSK-3 β 는 활성화되고 β -catenin을 인산화시켜 분해를 유도한다. Ser 9 잔기에 인산화된 GSK-3 β 는 비활성화되어 β -catenin의 축적을 유도한다. 축적된 β -catenin은 MITF의 발현을 증가시킨다. Chrysoeriol을 농도별로 처리하였을 때, p-GSK-3 β (ser 9)의 발현은 증가하는 경향을 보였다. 또한 p- β -catenin은 chrysoeriol의 처리 농도가 증가할수록 발현이 점차 감소하였고, β -catenin은 그와 반대로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 12). 따라서 chrysoeriol은 GSK-3 β 의 비활성화를 유도하여 β -catenin의 인산화를 억제하므로써 β -catenin의 분해를 억제하고, β -catenin의 축적에 관여하여 MITF 발현을 증가시킴으로써 멜라닌 생성에 영향을 미친다.

cAMP/PKA 신호전달경로에서 활성화된 cAMP는 PKA를 인산화시키고, 인산화된 PKA는 CREB를 인산화시킨다. 인산화된 CREB는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 합성에 영향을 준다. cAMP 신호전달 경로 중 PKA의 인산화는 chrysoeriol에 의해 증가되었다(Fig 13). 따라서 chrysoeriol은 cAMP/PKA 신호전달 경로에 영향을 미친다고 판단된다. 그러나 cAMP의 생성량이나 CREB의

인산화 정도를 확인해봄으로써 chrysoeriol이 cAMP/PKA 신호전달경로에 미치는 영향을 추가적으로 확인해볼 필요가 있다.

또한 피부자극시험과 같은 피부임상시험을 통해 chrysoeriol과 linarin의 피부 안전성을 평가하는 것은 멜라닌 생성 효과를 인체에 적용하는 데에 있어 도움이 될 것이라 사료된다.

더 나아가 chrysoeriol이나 linarin과 유사한 구조를 가진 flavone 화합물들의 활성을 비교하여 구조 차이에 따른 멜라닌 생성 효과를 확인해보고자 하였다. 이전 연구에 따르면 10 μ M에서 acacetin과 같은 4'-O-methylated flavonoids는 apigenin이나 luteolin과 같은 4'-OH-type flavonoids에 비해 3~7배 멜라닌을 생성한다고 보고되었다[47]. 이 연구를 바탕으로 chrysoeriol과 linarin의 구조와 유사한 flavone 화합물들의 멜라닌 생성 효과를 비교하였다.

Chrysoeriol과 유사한 구조의 flavone 화합물들의 멜라닌 함량 측정 실험은 chrysoeriol의 최고농도이며, luteolin과 apigenin의 독성이 나타나지 않는 농도인 8 μ M에서 수행하였다. 그 결과 chrysoeriol은 농도의존적으로 멜라닌 생성량이 증가하였다. 4' 위치에만 수산화기가 있는 apigenin은 멜라닌이 증가하였고 이는 같은 농도의 chrysoeriol만큼 나타났다. Apigenin에서 3' 위치에 수산화기가 첨가된 luteolin의 경우 같은 농도에서 멜라닌 증가가 나타나지 않았다(Fig. 21). Apigenin의 경우 10 μ M 이상의 농도에서 멜라닌 증가한다는 연구결과가 존재함을 확인하였고[48], 이전 연구의 결과들과 유사한 실험결과가 나타났다. 이를 통해 4' 위치에 수산화기가 있는 apigenin의 멜라닌 생성효과는 3' 위치의 수산화기의 존재에 의해 멜라닌 생성 효과가 억제되었고, 3' 위치의 메톡시기는 멜라닌 생성 효과 억제를 차폐(masking)하여 멜라닌 생성 효과가 유지된 것으로 사료된다.

또한 linarin과 acacetin의 멜라닌 생성량을 비교해본 결과 linarin은 멜라닌 생성량이 증가하였지만 4' 위치에 메톡시가 첨가된 acacetin만큼 활성을 보이진 않았다. 이전 연구에서 B16F10 세포에 naringenin (4',5,7-trihydroxyflavanone) 처리 시 멜라닌 생성이 증가하였지만, 7 위치에 rutinoside가 존재한 narirutin (naringenin-7-rutinoside)의 경우 멜라닌 생성이 나타나지 않았다[49]. 실험 결과도 마찬가지로 7번 위치 rutinoside 첨가에 의해 멜라닌 생성 활성은 감소하였지만 멜라닌 증가 여부는 변하지 않은 것을 보아 4' 위치의 메톡시기의 영향이 작용한 것으로 보인다(Fig. 22). 이 실험을 통해 멜라닌 증가 효능은 메톡시기의 존재 여부와 메톡시기의 위치의 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

본 연구를 통해 chrysoeriol과 linarin은 B16F10 세포에서 세포독성 없이 멜라닌 생성을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 또한 chrysoeriol과 linarin은 ERK signaling pathway와 PI3K/AKT signaling pathway를 통해 멜라닌 생성에 영향

을 미치고, chrysoeriol은 Wnt signaling pathway와 cAMP/PKA signaling pathway에도 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 이런 신호전달경로들은 MITF 발현에 영향을 미치고 최종적으로 멜라닌 생성이 증가하게 된다. 이러한 결과를 통해, chrysoeriol과 linarin은 저색소침착증 치료에 사용될 수 있음을 시사한다.

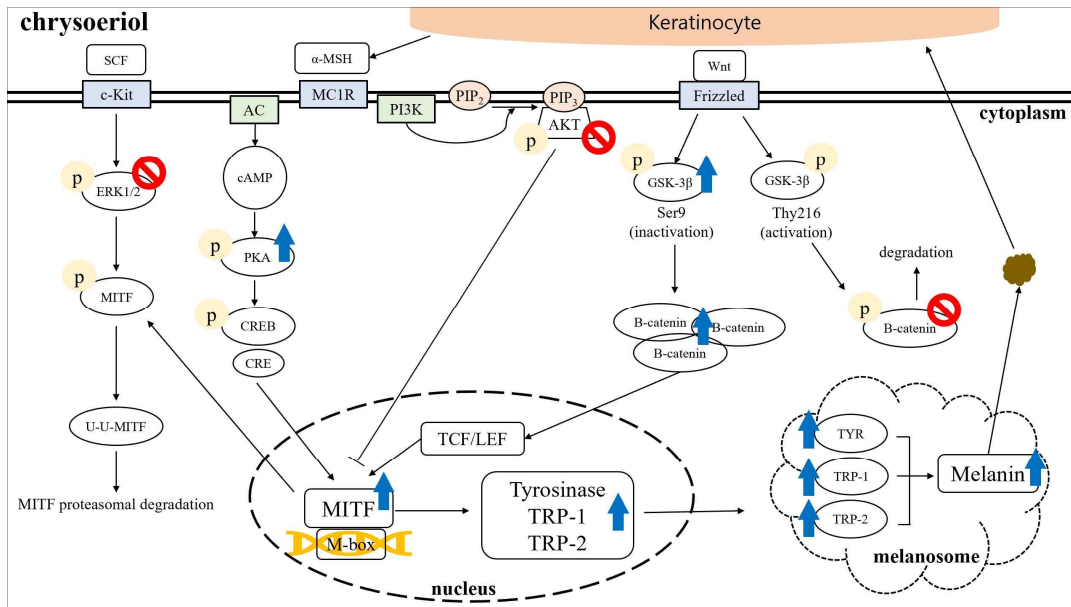


Figure 23. Effects of chrysoeriol in B16F10 cells.

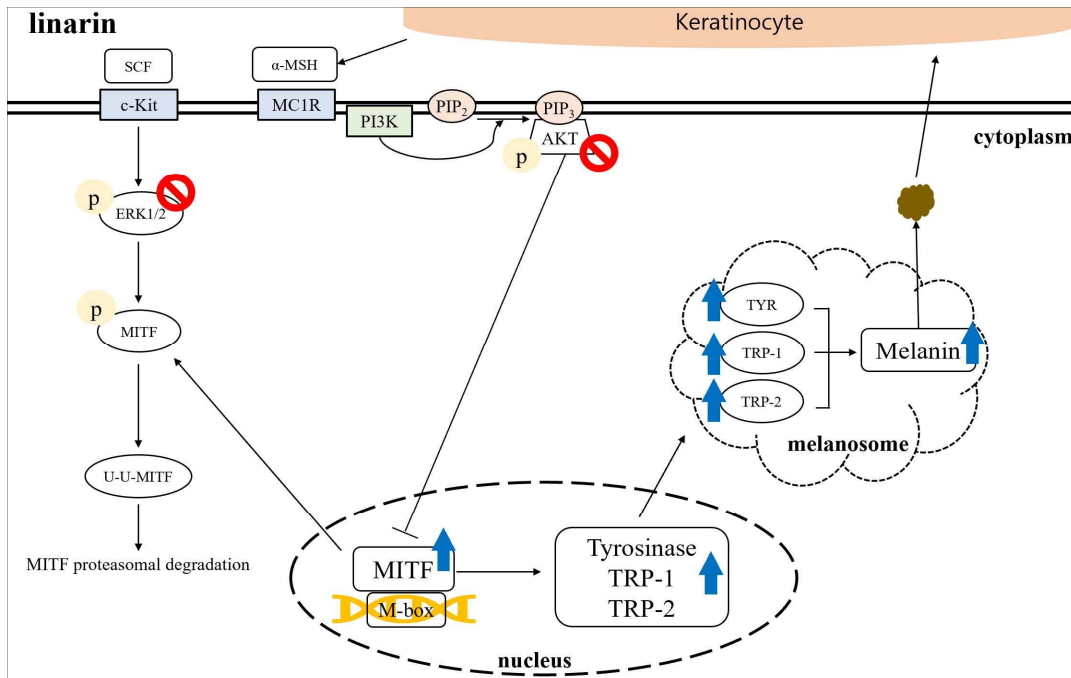


Figure 24. Effects of linarin in B16F10 cells.

V. 참고문헌

1. d'Ischia, M.; Wakamatsu, K.; Cicoira, F.; Di Mauro, E.; Garcia-Borron, J.C.; Commo, S.; Galván, I.; Ghanem, G.; Kenzo, K.; Meredith, P.; et al. Melanins and melanogenesis: From pigment cells to human health and technological applications, *Pigment Cell Melanoma Res* 2015, 28, 520 - 544.
2. Perrett, D.I.; Talamas, S.N.; Cairns, P.; Henderson, A.J. Skin Color Cues to Human Health: Carotenoids, Aerobic Fitness, and Body Fat, *Front Psychol* 2020, 11, 1 - 14.
3. Missaggia, B.O.; Reales, G.; Cybis, G.B.; Hünemeier, T.; Bortolini, M.C. Adaptation and co-adaptation of skin pigmentation and vitamin D genes in native Americans. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2020, 184, 1060 - 1077.
4. Yoshizaki, N.; Hashizume, R.; Masaki, H. A polymethoxyflavone mixture extracted from orange peels, mainly containing nobiletin, 3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone and tangeretin, suppresses melanogenesis through the acidification of cell organelles, including melanosomes, *J Dermatol Sci* 2017, 88, 78 - 84.
5. Peng, C.C.; Sun, H.T.; Lin, I.P.; Kuo, P.C.; Li, J.C. The functional property of royal jelly 10-hydroxy-2-decenoic acid as a melanogenesis inhibitor, *BMC Complement Altern Med* 2017, 17.
6. Niu, C.; Aisa, H.A. Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo, *Molecules* 2017, 22.
7. Serre, C.; Busuttill, V.; Botto, J.M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation. *Int J Cosmet Sci* 2018, 40, 328 - 347.

8. Chatterjee, M.; Neema, S. Dermoscopy of Pigmentary Disorders in Brown Skin. *Dermatol Clin* 2018, 36, 473 - 485.
9. Yamaguchi, Y.; Brenner, M.; Hearing, V.J. The Regulation of Skin Pigmentation, *J Biol Chem* 2007, 282 (38), 27557-27561.
10. Makbal, R.; Villareal, M.O.; Gadhi, C.; Hafidi, A.; Isoda, H. Argania spinosa fruit shell extract-induced melanogenesis via cAMP signaling pathway activation. *Int J Mol Sci* 2020, 21.
11. D'Mello, S.A.N.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Askarian-Amiri, M.E. Signaling pathways in melanogenesis, *Int J Mol Sci* 2016, 17, 1 - 18.
12. Shim, E.; Song, E.; Choi, K.S.; Choi, H.J.; Hwang, J. Inhibitory effect of Gastrodia elata Blume extract on alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in murine B16F10 melanoma, *Nutr Res Pract* 2017, 11, 173 - 179.
13. Seo, J.O.; Yumnam, S.; Jeong, K.W.; Kim, S.Y. Finasteride inhibits melanogenesis through regulation of the adenylate cyclase in melanocytes and melanoma cells, *Arch Pharm Res* 2018, 41, 324 - 332.
14. Kim, J.Y.; Lee, E.J.; Ahn, Y.; Park, S.J.; Kim, S.H.; Oh, S.H. A chemical compound from fruit extract of Juglans mandshurica inhibits melanogenesis through p-ERK-associated MITF degradation, *Phytomedicine* 2019, 57, 57 - 64.
15. Lee, J.Y.; Choi, H.J.; Chung, T.W.; Kim, C.H.; Jeong, H.S.; Ha, K.T. Caffeic acid phenethyl ester inhibits alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanin synthesis through suppressing transactivation activity of microphthalmia-associated transcription factor, *J Nat Prod* 2013, 76, 1399 - 1405.

16. Lee, A.; Kim, J.Y.; Heo, J.; Cho, D.H.; Kim, H.S.; An, I.S.; An, S.; Bae, S. The inhibition of melanogenesis via the PKA and ERK signaling pathways by *Chlamydomonas reinhardtii* extract in B16f10 melanoma cells and artificial human skin equivalents, *J Microbiol Biotechnol* 2018, 28, 2121 - 2132.
17. Chung, Y.C.; Kim, S.Y.; Hyun, C.G. 8-Methoxycoumarin enhances melanogenesis via the MAPKase signaling pathway, *Pharmazie* 2019, 74, 529 - 535.
18. Su, T.R.; Lin, J.J.; Tsai, C.C.; Huang, T.K.; Yang, Z.Y.; Wu, M.O.; Zheng, Y.Q.; Su, C.C.; Wu, Y.J. Inhibition of melanogenesis by gallic acid: Possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells, *Int J Mol Sci* 2013, 14, 20443 - 20458.
19. Ding, X.; Mei, E.; Hu, M.; Zhou, C.; Li, X.; Cai, L.; Li, Z. Effect of puerarin on melanogenesis in human melanocytes and vitiligo mouse models and the underlying mechanism, *Phyther Res* 2019, 33, 205 - 213.
20. Chang, T.-S. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity, *Materials (Basel)* 2012, 5, 1661 - 1685.
21. Mosca, S.; Cardinali, G.; Flori, E.; Briganti, S.; Bottillo, I.; Mileo, A.M.; Maresca, V. The PI3K pathway induced by α MSH exerts a negative feedback on melanogenesis and contributes to the release of pigment, *Pigment Cell Melanoma Res* 2021, 34, 72 - 88.
22. Sim, M.O.; Ham, J.R.; Lee, M.K. Young leaves of reed (*Phragmites communis*) suppress melanogenesis and oxidative stress in B16F10 melanoma cells, *Biomed Pharmacother* 2017, 93, 165 - 171.
23. Jeon, N.J.; Kim, Y.S.; Kim, E.K.; Dong, X.; Lee, J.W.; Park, J.S.; Shin, W. Bin; Moon, S.H.; Jeon, B.T.; Park, P.J. Inhibitory effect of carvacrol on melanin synthesis via suppression of tyrosinase expression, *J Funct Foods* 2018, 45, 199 - 205.

24. 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.; et al. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene of *Zingiber officinale* Roscoe, attenuates α -MSH-induced melanogenesis in B16F10 cells, *Int J Mol Sci* 2018, 19, 1 - 17.
25. Jang, E.J.; Shin, Y.; Park, H.J.; Kim, D.; Jung, C.; Hong, J.Y.; Kim, S.; Lee, S.K. Anti-melanogenic activity of phytosphingosine via the modulation of the microphthalmia-associated transcription factor signaling pathway, *J Dermatol Sci* 2017, 87, 19 - 28.
26. Chan, Y.Y.; Kim, K.H.; Cheah, S.H. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells, *J Ethnopharmacol* 2011, 137, 1183 - 1188.
27. Zhao, P.; Alam, M.B.; An, H.; Choi, H.J.; Cha, Y.H.; Yoo, C.Y.; Kim, H.H.; Lee, S.H. Antimelanogenic effect of an *Oroxylum indicum* seed extract by suppression of MITF expression through activation of MAPK signaling protein, *Int J Mol Sci* 2018, 19.
28. Brown, D.A. Skin pigmentation enhancers, *J Photochem Photobiol B Biol* 2001, 63, 148 - 161.
29. Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids, *Int J Antimicrob Agents* 2005, 26, 343 - 356.
30. Panche, A.N.; Diwan, A.D.; Chandra, S.R. Flavonoids: An overview, *J Nutr Sci* 2016, 5.
31. Liu-Smith, F.; Meyskens, F.L. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma, *Mol Nutr Food Res* 2016, 60, 1264 - 1274.
32. Anu, S.M.; Kim, H.J.; Kim, J.E.; Boo, Y.C. Flavonoids, taxifolin and luteolin attenuate cellular melanogenesis despite increasing tyrosinase protein levels, *Phyther Res* 2008, 22, 1200 - 1207.

33. Liu, W.N.; Shi, J.; Fu, Y.; Zhao, X.H. The stability and activity changes of apigenin and luteolin in human cervical cancer hela cells in response to heat treatment and Fe²⁺/Cu²⁺ Addition, *Foods* 2019, 8, 346.
34. Mei, Z.; Zhang, R.; Zhao, Z.; Xu, X.; Chen, B.; Yang, D.; Zheng, G. Characterization of antioxidant compounds extracted from Citrus reticulata cv. Chachiensis using UPLC-Q-TOF-MS/MS, FT-IR and scanning electron microscope, *J Pharm Biomed Anal* 2021, 192, 113683.
35. Durand-Hulak, M.; Dugrand, A.; Duval, T.; Bidel, L.P.R.; Jay-Allemand, C.; Froelicher, Y.; Bourgaud, F.; Fanciullino, A.L. Mapping the genetic and tissular diversity of 64 phenolic compounds in Citrus species using a UPLC-MS approach, *Ann Bot* 2015, 115, 861 - 877.
36. Kim, M.H.; Kwon, S.Y.; Woo, S.Y.; Seo, W.D.; Kim, D.Y. Antioxidative Effects of Chrysoeriol via Activation of the Nrf2 Signaling Pathway and Modulation of Mitochondrial Function, *Molecules* 2021, 26.
37. Supriadin, A.; Juliani, H.; Tanyela, N. Isolation flavonoid compound chrysoeriol from ethyl acetate extract of zaitun leaves (*Olea europaea*), *J Phys Conf Ser* 2021, 1869, 012052.
38. Demirtas, I.; Erenler, R.; Elmastas, M.; Goktasoglu, A. Studies on the antioxidant potential of flavones of *Allium vineale* isolated from its water-soluble fraction, *Food Chem* 2013, 136, 34 - 40.
39. Choi, D.Y.; Jeong, Y.L.; Kim, M.R.; Woo, E.R.; Yoon, G.K.; Keon, W.K. Chrysoeriol potently inhibits the induction of nitric oxide synthase by blocking AP-1 activation, *J Biomed Sci* 2005, 12, 949 - 959.
40. Kim, Y.H.; Lee, Y.S.; Choi, E.M. Chrysoeriol isolated from *Eurya ciliata* leaves protects MC3T3-E1 cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation, *J Appl Toxicol* 2010, 30, 666 - 673.
41. Abbet, C.; Slacanin, I.; Corradi, E.; De Mieri, M.; Hamburger, M.; Potterat, O. Comprehensive analysis of *Cirsium spinosissimum* Scop., a wild alpine

- food plant, *Food Chem* 2014, 160, 165 - 170.
42. Xu, Z. feng; Sun, X. ke; Lan, Y.; Han, C.; Zhang, Y. dong; Chen, G. Linarin sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis (TRAIL)-induced ligand-triggered apoptosis in human glioma cells and in xenograft nude mice, *Biomed Pharmacother* 2017, 95, 1607 - 1618.
43. Martínez-Vázquez, M.; Ramírez Apan, T.O.; Aguilar M., H.; Bye, R. Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone linarin of *Buddleia cordata*, *Planta Med* 1996, 62, 137 - 140.
44. Chen, X.; Zhang, S.; Xuan, Z.; Ge, D.; Chen, X.; Zhang, J.; Wang, Q.; Wu, Y.; Liu, B. The phenolic fraction of mentha haplocalyx and its constituent linarin ameliorate inflammatory response through inactivation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells, *Molecules* 2017, 22.
45. Kamiloglu, S.; Sari, G.; Ozdal, T.; Capanoglu, E. Guidelines for cell viability assays, *Food Front* 2020, 1, 332 - 349.
46. P.A.Riley Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 1997, 29, 1235 - 1239.
47. Horibe, I.; Satoh, Y.; Shiota, Y.; Kumagai, A.; Horike, N.; Takemori, H.; Uesato, S.; Sugie, S.; Obata, K.; Kawahara, H.; et al. Induction of melanogenesis by 4'-O-methylated flavonoids in B16F10 melanoma cells, *J Nat Med* 2013, 67, 705 - 710.
48. Ye, Y.; Chou, G.X.; Wang, H.; Chu, J.H.; Yu, Z.L. Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells, *Phytomedicine* 2010, 18, 32 - 35.
49. Huang, Y.C.; Yang, C.H.; Chiou, Y.L. Citrus flavanone naringenin enhances melanogenesis through the activation of Wnt/ β -catenin signalling in mouse melanoma cells, *Phytomedicine* 2011, 18, 1244 - 1249.