



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

석사학위논문

마우스 B16F10 세포에서  
쿠마린 유도체  
Isoimperatorin과 Imperatorin의  
멜라닌 생성 증진 효과

제주대학교 대학원

화학과

김태진

2023년 2월

마우스 B16F10 세포에서  
쿠마린 유도체  
Isoimperatorin과 Imperatorin의  
멜라닌 생성 증진 효과

지도교수 현 창 구

김 태 진

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2022년 12월

김태진의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 李南昊   
위 원 朴慶淳   
위 원 玄昌久 

제주대학교 대학원

2022년 12월

Melanogenesis promoting effect of coumarin  
derivative Isoimperatorin and Imperatorin in  
mouse B16F10 cells

Tae Jin Kim

(Supervised by professor Chang-Gu Hyun)

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

2022. 12.

This thesis has been examined and approved.

Nam Ho Lee

KYUNG SOON PARK

CHANG - GU HYUN

Dec. 2022

Date

Department of Chemistry  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY



## ABSTRACT

This study investigated the melanogenesis effect of isoimperatorin and imperatorin and the basic signaling pathway of imperatorin. The coumarin derivatives isoimperatorin and imperatorin were tested at concentrations of 6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M, which do not affect cell viability. Isoimperatorin and imperatorin increase melanin in the evaluation of melanin content and tyrosinase activity. Interestingly, there was no difference in melanin content and tyrosinase activity, despite the structural differences between isoimperatorin and imperatorin. Imperatorin increased melanin by regulating Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 enzymes, which play an important role in melanin activity. MITF is a protein factor that plays a major role in melanogenesis. Imperatorin increases melanin synthesis by finally regulating MITF through the ERK pathway of MAPKs, PKA/CREB pathway and AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway in B16F10 cells. These pathways were further identified using specific inhibitors. In addition, it was confirmed that melanin production was induced in human epidermal melanocyte cells by treating imperatorin in HEMn-MP cells. Finally, the primary stimulation evaluation of the human skin was conducted to confirm whether the use of imperatorin had a stimulation or sensitization reaction to the skin. Through this test, it was confirmed that imperatorin was a hypoallergenic substance. In conclusion, the activity of coumarin derivatives on melanin production was evaluated through research. Both isoimperatorin and imperatorin showed increased melanin, and especially imperatorin can be used as a local treatment to treat hypochromic deposition.

Key word : melanogenesis, imperatorin, isoimperatorin, signaling pathway, B16F10, HEMn-MP

# 목 차

ABSTRACT .....	1
목 차 .....	2
LIST OF FIGURES .....	5
LIST OF TABLES .....	7
I. 서론 .....	8
II. 재료 및 방법 .....	15
1. 시료 및 시약 .....	15
2. 실험방법 .....	16
2.1. 세포배양 .....	16
2.2. 세포 생존율 .....	17
1) MTT assay .....	17
2) LDH assay .....	18
2.3. Melanin contents 측정 .....	19
2.4. Tyrosinase activity 측정 .....	20

2.5. Western blot analysis .....	21
2.6. 인체 피부 일차 자극 평가 .....	22
3. 통계처리 .....	23
III. 결과 .....	24
1. B16F10 세포에서 Isoimperatorin과 imperatorin의 세포독성 평가 .....	24
2. B16F10 세포에서 멜라닌 함량 평가 .....	27
3. B16f10 세포에서 Tyrosinase 활성 평가 .....	29
4. B16F10 세포에서 Imperatorin 멜라닌 생성 증진 평가 .....	31
4.1. Western blot analysis .....	31
1) 멜라닌 생성 효소 발현에 Imperatorin이 미치는 영향 .....	31
2) MITF 발현에 Imperatorin이 미치는 영향 .....	33
3) MAPKs 신호전달 경로에 대한 Imperatorin의 영향 .....	35
4) PKA/CREB 신호전달 경로에 대한 Imperatorin의 영향 .....	37
5) AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 신호전달 경로에 대한 Imperatorin의 영향 ..	39
5. B16F10 세포에서 특이적 억제제를 이용한 멜라닌 함량 확인 .....	42
6. HEMn-MP 세포에서 멜라닌 함량과 Tyrosinase 활성 평가 .....	44
7. HaCaT keratinocyte 세포에서 Imperatorin의 세포독성 평가 .....	46
8. 인체 피부 일차 자극 평가 .....	48

IV. 고찰 .....	50
V. 참고문헌 .....	54



## LIST OF FIGURES

Figure 1. Structure of (a) isoimperatorin and (b) imperatorin. ....	12
Figure 2. The production process of melanin in which enzymes. ....	13
Figure 3. Signaling pathways in melanogenesis. ....	14
Figure 4. The effects of coumarin on the viability using MTT assay. ....	25
Figure 5. The effects of coumarin on the viability using LDH assay. ....	26
Figure 6. The effects of coumarin derivatives on the melanin contents. ....	28
Figure 7. The effects of coumarin derivatives on the tyrosinase activity. ....	30
Figure 8. The effects on the protein expression of TYR, TRP-1, and TRP-2 in B16F10 melanoma cells. ....	32
Figure 9. The effects on the protein expression and phosphorylation of MITF in B16F10 melanoma cells. ....	34
Figure 10. The effects on the phosphorylation level of ERK in B16F10 melanoma cells. ....	36
Figure 11. The effects on the protein expression of PKA and CREB in B16F10 melanoma cells. ....	38
Figure 12. The effects on the protein expression of AKT in B16F10 melanoma cells. ....	40
Figure 13. The effects on the protein expression of $\beta$ -catenin, P-GSK3 $\beta$ , and P- $\beta$ -catenin in B16F10 melanoma cells. ....	41

Figure 14. The effects of inhibitor on imperatorin-induced melanin contents in B16F10 cells. .... 43

Figure 15. The effects of imperatorin on the melanin contents and tyrosinase activity in HEMn-MP cells. .... 45

Figure 16. The effects of imperatorin on the viability in HaCaT cells. .... 47

Figure 17. Regulation of melanogenesis signaling pathway through imperatorin. .... 53

## LIST OF TABLES

Table 1. The results from the primary human skin irritation tests. ....	
.....	49

## I. 서론

인간의 피부색은 멜라닌(Melanin), 헤모글로빈(Hemoglobin), 카로틴(Carotene), 각질층의 두께 등 여러 가지 요인에 의해 결정되며 이 중 멜라닌이 주된 역할을 한다. 이런 색소들의 발현에는 유전적 인자가 가장 크게 작용 되지만 자외선, 피로, 스트레스, 호르몬과 같은 환경적인 인자에 의해서도 영향을 받는다[1-3].

멜라닌은 자외선이나 외부 자극 물질 등으로부터 피부보호 기능을 하지만, 멜라닌 생성이 감소하면 백반증(Vertiligo), 저색소 침착증(Hypopigmentation), 탈색 모반(Nevus depigmentosus), 백색증(Albino), 백모증(Poliosis) 등의 색소 질환을 일으킨다. 또한 멜라닌은 자외선을 흡수하여 피부에 자외선이 침투하는 것을 막아주고 세포에 해를 입히는 유해산소를 제거하는 역할을 하는데 표피의 멜라닌 부족은 피부암 및 피부 노화를 일으키는 원인이 될 수 있다[4,5].

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌 세포(Melanocyte) 내의 소기관인 멜라닌 소체(Melanosome)에서 합성된다. 합성된 멜라닌은 수상돌기를 통하여 주변의 각질 세포(Keratinocytes)로 이동되어 피부의 색을 나타낸다[6-9].

멜라닌의 생성은 세포 내의 복잡한 신호전달 과정에 의해 생성된다. Tyrosinase, TRP-1(tyrosinase-related protein-1)과 TRP-2(tyrosinase-related protein-2)는 멜라닌 합성에 이용되는 특이적인 효소 및 단백질로 멜라닌 생성에 중요한 역할을 한다[10,11].

Tyrosinase는 피부의 기저층에 존재해 Melanocyte에서 Tyrosinase을 산화시켜 멜라닌 생성을 촉진하는 효소이다. Tyrosinase는 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenyl alanin(DOPA)으로 hydroxylation 시키고, DOPA는 효소적 산화반응에 의해 DOPAquinone으로 전환된다. DOPAquinone은 Dopachrome으로 전환되고 dihydro-indolizine나 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid(DHICA)로 되며 여러 반응에

의해 최종적으로 Eumelanin이 합성된다[12,13]. 이 과정에서 TRP-1은 DHICA의 산화를 촉매하고, TRP-2는 DOPAchrome에서 DHICA로 산화 과정을 촉매한다. 또한 DOPAquinone에서 cysteine이나 glutathione와 결합하면 cysteinylDOPA로 대사되고 최종적으로 붉은색을 띠는 pheomelanin이 생성된다[14-18].

앞서 말한 바와 같이, 인체 내 멜라닌 합성은 고도로 조절된 경로로 150개 이상의 유전자가 관여한다. 그중에서도 MITF는 멜라노사이트 기능의 마스터 조절자이다. MITF의 발현은 멜라닌 생성에 관여하는 효소들의 발현과 밀접한 관련이 있다. 수용체로부터 신호전달은 대부분 최종적으로 MITF-M(Microphthalmia-associated transcription factor-M) 전사인자로 집약된다. MITF-M은 멜라닌 생성에 관여하는 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 유전자 프로모터에 존재하는 M-box와 결합하는 것으로 표적 유전자 전사를 활성화시킨다[19-24].

멜라닌 생성에 대한 많은 신호 전달 경로가 있는데, MITF 유전자 조절의 주요 신호 경로는 다음과 같이 4가지로 나눌 수 있다. 1) MAPKs 신호전달 경로, 2) PKA/CREB 신호 전달 경로, 3) AKT/PI3K 신호전달 경로, 4) GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 신호 경로.

MAPKs 경로는 다양한 자극의 신호를 전달, 증폭 및 통합하고 세포증식, 분화, 발달, 염증반응 및 세포 자멸사를 비롯한 적절한 생리학적 반응을 이끌어낸다. MAPKs 신호전달 경로는 이처럼 다양한 세포 기능을 제어하는데 이전 연구에 의하면, MAPKs는 멜라닌 생성을 조절하는 작용을 한다고 보고되었다. MAPKs 경로의 ERK 신호는 serine 73 잔기에서 MITF의 인산화를 유도하고, MITF 분해를 촉진하여 멜라닌 생성을 억제한다. 따라서 P-MITF의 유전자 발현 감소는 멜라닌의 생성 유도로 이어진다[25-30].

피부가 자외선을 받거나 각질형성세포로부터 산화 스트레스를 받으면 이는  $\alpha$ -MSH를 유도한다[31]. 세포 내 증가한  $\alpha$ -MSH는 뇌하수체 중엽에서 분비되며 멜라닌 세포에서만 발현되는 막 수용체인 MC1R과 결합하여 Adenylyl Cyclase를

활성화시킨다. 이는 세포 내 cAMP 신호를 증폭시켜 PKA(cyclic AMP-dependent/protein kinase)의 활성화를 유도하며, CREB(cAMP response element-binding protein)의 상향 조절로 이어져 멜라닌 세포에 특이적 전사인자인 MITF의 발현을 증가시킨다[32-38].

또한 멜라닌 생성에 관여하는 경로로써 AKT 신호전달 경로가 있다. 자극받은 MC1R은 PI3K를 활성화한다. PI3K는 지질 인산화 효소로서 세포막 인지질에 있는 PIP2의 Inositol 3번 탄소를 인산화시켜 PIP3를 만든다[39,40]. 이때 PIP3와 결합하는 PH(Pleckstrin Homology) domain인 PDK1은 AKT의 Thr 308 잔기를 인산화하고, mTORC2에 의해 Ser 473 잔기에서 인산화할 수 있도록 돕는다. 인산화된 AKT는 신호전달 경로의 활성화에 영향을 미치며, 멜라닌 생성 억제와 연관되어 있다. AKT의 인산화는 MITF 분해를 촉진해 멜라닌 생성을 억제하므로 AKT의 인산화 저해는 멜라닌 생성을 유도한다[41-45].

멜라닌 신호전달 경로로 잘 알려진 Wnt 신호전달 경로(Wingless/Integrated signaling pathway)는 Wnt 단백질 리간드가 Frizzled(Fzd) 수용체에 결합함으로써 활성화된다. Wnt가 존재하지 않을 때는 Axin, Adenomatous Polyposis Coli(APC), Casein Kinase(CK), GSK3 $\beta$ 로 이루어진 파괴복합체가  $\beta$ -catenin을 인산화하여 프로테아좀 분해에 의해  $\beta$ -catenin의 유비퀴틴화를 일으킨다[46-48]. 반면, Wnt 리간드가 수용체에 결합하여 활성화되면 Axin의 복합체로의 동원을 초래하고, 이에 따라 axin modulating  $\beta$ -catenin의 인산화의 억제로 이어진다. 이는 궁극적으로  $\beta$ -catenin의 안정화를 초래한다.  $\beta$ -catenin의 안정화 및 축적은  $\beta$ -catenin의 핵으로의 전위를 유발하여 T-cell factor-lymphoid-enhancing(TCF-LEF) 전사인자와 복합체를 형성하여 표적 유전자인 MITF 발현을 증가시킨다[49-52].

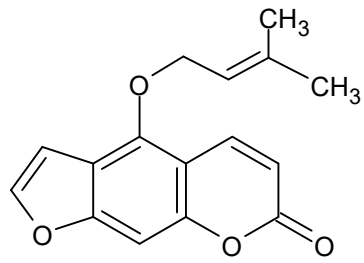
쿠마린(Coumarin, 2H-chrome-2-one)은 식물들에 널리 분포하여 씨앗, 잎, 열매로부터 분리되며, 두 개의 고리를 가진 화합물로 벤젠 분자에 육각형 헤테로고리가 부착된 형태를 갖는다. 쿠마린은 향암[53], 항산화[54], 향미생물[55], 항응고제[56] 등 다양한 생리활성이 보고되어 있다.

Isoimperatorin과 imperatorin은 coumarin에 furan 고리가 선형으로 결합한 구조인 psoralen의 치환된 형태를 가지며, 각각 5번, 8번 위치에 prenyloxy기가 치환되어 있다(Figure 1).

Isoimperatorin과 imperatorin은 *Angelica siensis*, *Peucedanum ostruthium*, *Cneoridium* 등으로부터 분리된 바 있고[57-59] isoimperatorin은 auraptin, cinidin으로 불리우며 항암[60], 항염증제[61], 항고혈압[62], 진통제[63] 및 간 보호 특성[64]이 보고되었다. 또한 imperatorin은 marmelosin, ammidin, pentosalen 등으로 불리우며 항염증제[65], 기억 결핍 개선[66], 항응고제[67], 항혈전제[68], 항경련제[69] 등의 효과가 있다고 알려져 있다.

본 연구실은 다양한 coumarin계 화합물을 대상으로 멜라닌 생성과 구조적 차이와의 연관성에 대하여 연구하고 있으며[70,71] isoimperatorin과 imperatorin의 멜라닌 생성 관련 연구는 이러한 연장선에서 시도되었다. 한편 isoimperatorin과 imperatorin을 주요 성분으로 하는 당귀 자원이 멜라닌 세포 증식 및 멜라닌 합성, Tyrosinase 활성을 촉진한다는 것으로 알려져 있으나[72], 본 연구는 B16F10 마우스 세포와 HEMn-MP 인간 표피 멜라닌 정상세포를 대상으로 isoimperatorin과 imperatorin의 멜라닌 생성 및 신호전달 과정 규명에 집중되었다. 또한 인체 자극 시험을 통하여 isoimperatorin과 imperatorin의 국소 적용 가능성 여부도 확인하였다.

(a)



(b)

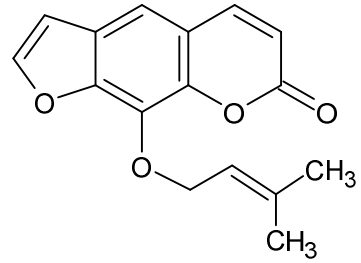


Figure 1. Structure of (a) isoimperatorin and (b) imperatorin.



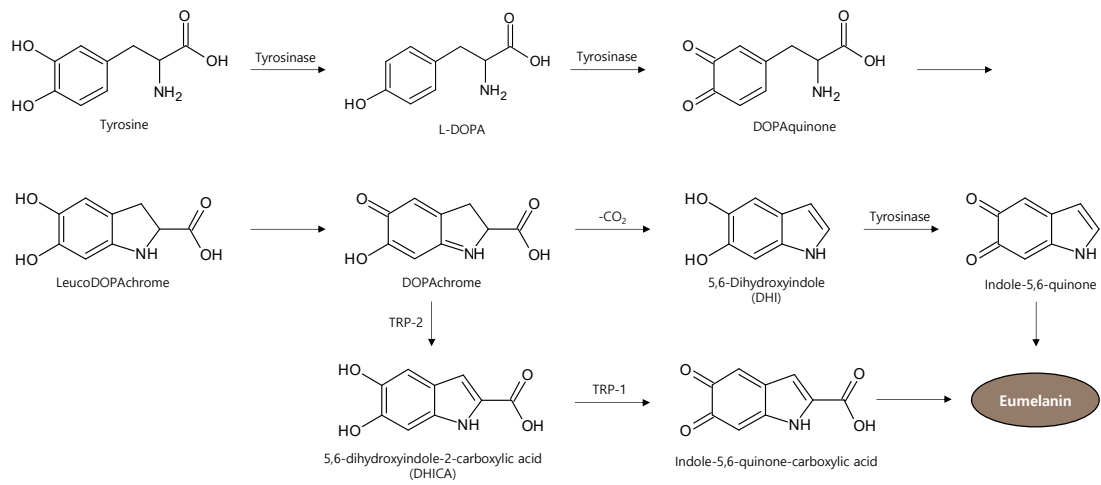


Figure 2. The production process of melanin in which enzymes.

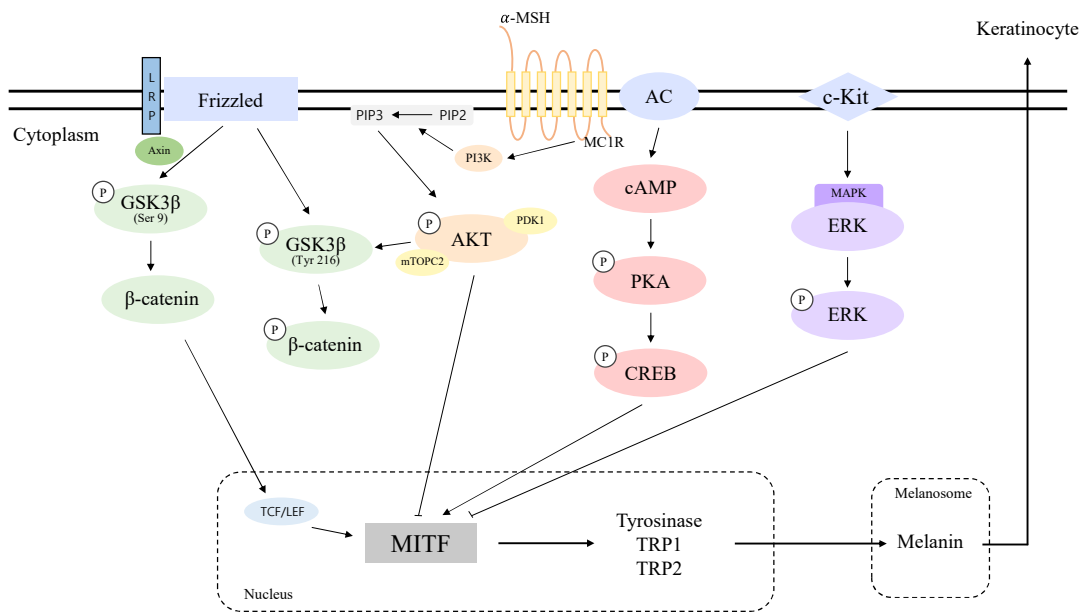


Figure 3. Signaling pathways in melanogenesis.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 Isoimperatorin( $\geq 98\%$ )은 CAYMAN CHEMICAL COMPANY(Ann Arbor, MI, USA)에서 구매하였고 Imperatorin( $\geq 98\%$ )은 Tokyo Chemical Industry(Chuo-ku, Toyko, Japan)에서 구매하였다. 세포실험을 위해 사용된  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone( $\alpha$ -MSH), L-DOPA, Protease Inhibitor Cocktail은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium, Penicillin/Streptomycin, 10X Trypsin-EDTA(0.5%)은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구매하였으며 Skim Milk는 Difco(Franklin Lakes, New Jersey, USA)에서 구매하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO), Phosphate-buffered saline(PBS), 10x TBS 및 Radioimmunoprecipitation assay buffer(RIPA buffer)는 Biosesang(seongnam, gyeonggi-do, Korea)에서 구매하였다. 1차 항체로 이용한 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, CREB, P-CREB은 Santa Cruz에서 구매하였고 P-MITF는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구매하였다. 또한 MITF, P-ERK, ERK, P-GSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ , P- $\beta$ -catenin,  $\beta$ -catenin, P-PKA, PKA, P-AKT, AKT 및 2차 항체는 Cell Signaling Technology(Danvers, Massachusetts, USA)로부터 구매하여 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 세포배양

B16F10 mouse melanoma cell은 ATCC(The Global Bioresource Center)에서 구매하였다. 세포배양은 10% Fetal Bovin Serum(FBS)와 항생제인 1% Penicillin-Streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 3일 간격으로 계대배양 하였다. Human epidermal melanocyte, neonatal(moderately pigment doner)은 Gibco에서 구매하였다. HEMn-MP cell의 배양은 Medium 254에 Human Melanocyte Growth Supplement(HMGS)를 첨가한 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 6일 간격으로 계대배양 하였다.

## 2.2. 세포 생존율

### 1) MTT assay

Cell viability를 측정하기 위해서 MTT 방법을 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. MTT assay는 살아있는 세포가 미토콘드리아 탈수소 효소를 통해 Tetrazolium salt로 전환되며 형성한 MTT formazan crystal을 유기용매에 녹여 평가하는 방법이다. B16F10 세포는 24 well plate에  $1.0 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 농도별로 시료를 처리하여 72시간 동안 반응시켰다. MTT 시약은 0.4 mg/mL 농도로 처리하여 3시간 반응하였다. 이후 배지를 제거하고 DMSO를 well당 800  $\mu$ L씩 넣어 보라색 Formazan 결정을 용해하였다. 이를 Micro plate reader를 사용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2) LDH assay

세포가 죽거나 손상되면 Lactate dehydrogenase(LDH)를 방출하게 된다. LDH assay는 세포에서 방출된 LDH의 양을 water soluble tetrazolium salt(WST)를 이용해 흡광도를 측정하는 방법이다. 24 well plate에  $1.0 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 농도별로 시료를 처리하여 72시간 동안 반응시켰다. 이후 각 well에서 세포배양액 200  $\mu$ L를 얻어 600 xg에서 5분간 원심분리해 주었다. 상층액 10  $\mu$ L를 96 well plate에 넣고 LDH Reaction Mixture을 제조하여 100  $\mu$ L씩 첨가한다. 빛이 차단된 상온에서 30분간 반응시키고 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.3. Melanin contents 측정

B16F10 세포에서 시료가 Melanin 생성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 melanin contents를 측정하였다. B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에  $7.0 \times 10^4$  cells/dish로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 여러 농도의 시료와  $\alpha$ -MSH를 처리하여 72시간 동안 반응시킨다. 배양 후 medium을 제거하고 1x PBS로 세척하였고, lysis buffer를 넣어주어 20분간 4°C에서 용해하였다. Cell scraper로 cell을 긁어 1.5 mL e-tube에 옮겨 담고, 5분간 3회 Vortexing 기기를 이용해 용액을 섞어주었다. 그리고 15000 rpm, -8°C 조건에서 20분간 원심분리하고 상층액은 제거하였다. Pellet에 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH을 200  $\mu$ L씩 넣어 80°C에서 10분간 처리하였다. 이를 96 well plate에 각각 50  $\mu$ L씩 옮겨 담고 Microplate reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.4. Tyrosinase activity 측정

시료를 처리한 B16F10 세포가 Melanin 생성을 한 것이 Tyrosinase 효소에 의한 것인지 확인하기 위해 Tyrosinase activity를 측정하였다. B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에  $7.0 \times 10^4$  cells/dish로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 시료와  $\alpha$ -MSH를 처리하여 반응시킨다. 72시간 후, 배지를 제거하고 1x PBS로 세척하고 protease inhibitor를 포함한 Ripa buffer를 넣어주어 20분간 4°C에서 lysis 하였다. Scraper로 cell을 모아 1.5 mL e-tube에 옮겨 담고, 5분 간격으로 3회 섞어주었다. 그리고 15000 rpm, -8°C 조건에서 20분간 원심분리해주고 상층액을 얻었다. BCA protein assay kit를 사용하여 단백질을 정량하여 동일한 양의 단백질을 20  $\mu$ L씩 넣고, L-dopa (2 mg/mL)를 제조하여 80  $\mu$ L씩 첨가하였다. 이를 37°C에서 1시간 반응하고 490nm에서 흡광도를 측정하였다.



## 2.5. Western blot analysis

B16F10 세포 내 단백질 발현을 확인하기 위하여, Western blot을 진행하였다. Western blot을 이용해 단백질을 크기 별로 분리하여 특정 단백질만을 Detection 하였다. 60 mm cell culture dish에 B16F10 세포를  $7 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 배양하였다. 24시간 후 시료를 농도별로 처리하였다. 일정 시간 배양 후, 단백질을 얻기 위해 차가운 1x PBS로 cell을 2회 세척하고 protease inhibitor cocktail을 1%로 첨가한 RIPA buffer를 처리하여 20분간 4°C에서 cell을 용해하였다. 이어서 -8°C에서 20분간 15000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 단백질은 BCA protein assay kit를 이용해 정량하였고, 동일한 양의 단백질을 10% SDS-PAGE(Sodium-dodecyl sulfate polyacrymide gel electrophoresis)로 전기영동하여 분리하였고 단백질은 PVDF 막으로 옮겨졌다. Membrane은 상온에서 1시간 30분 동안 5% skim milk를 사용하여 blocking 하였으며 TBS-T로 10분 간격으로 6회 세척하였다. 1차 항체는 buffer인 TBS-T에 희석해 overnight 해주었다. 이후 Membrane을 TBS-T로 세척하였고 상온에서 2시간 동안 2차 항체와 반응시켰다. 단백질 밴드 검출은 ECL Reagent(Advansta Inc, Menlo Park, CA, USA)를 사용하였고 chemidoc(WL, VILBER LOURMAT, France)를 이용해 밴드를 확인하였다. 밴드 이미지는 ImageJ software를 사용하여 분석하였다.

## 2.6. 인체 피부 일차 자극 평가

인체 피부 일차 자극 평가 시험의 경우, 원료에 의한 피부 자극을 확인하기 위한 첩포 시험으로 피부반응 검사로 자극의 정도를 평가한다. 시험은 주식회사 더마프로에 의뢰하여 진행하였다. 첩포 시험은 피부 패치를 이용하며 시험대상자의 배경 및 병력조사 등의 검사를 통하여 피험자 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당하지 않는 20~60세의 여성 30명 이상을 대상으로 실시하였다. 시험 부위인 등을 70% ethanol로 세척한 후, 시험물질 20  $\mu$ L을 시험 부위에 24시간 동안 첩포하였다. 첩포 제거 20분 후 1차 평가, 24시간 후 2차 평가를 시행하였다.

### 3. 통계처리

모든 실험의 결과는 세 번의 반복 실험을 통해 평균과 표준편차(평균  $\pm$  SD)로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's t-test를 사용하여 p-value로 나타내었고, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ 로 표시하였다.

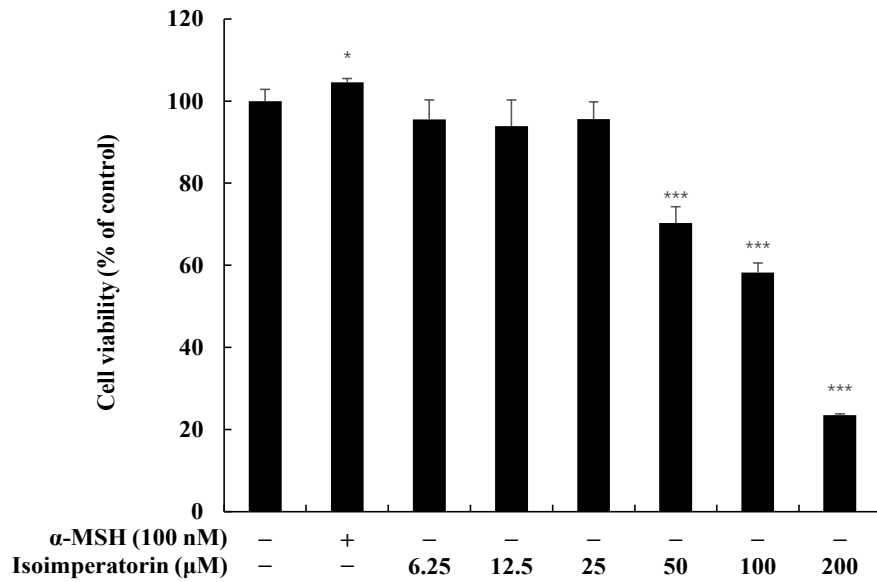
### III. 결과

#### 1. B16F10 세포에서 Isoimperatorin과 imperatorin의 세포독성 평가

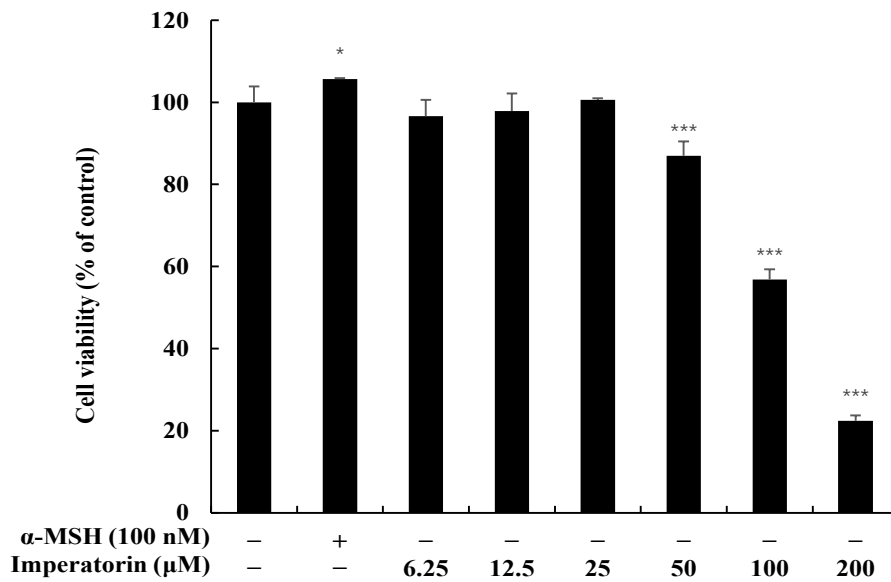
Isoimperatorin과 imperatorin이 B16F10 세포에 대해 독성을 보이지 않는 최대 농도를 확인하기 위해 세포 생존율을 확인하였다. 세포 생존율 확인을 위해 MTT assay와 LDH assay를 이용하였다. Isoimperatorin과 imperatorin을 다양한 농도(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ )로 처리하여 72시간 동안 배양되었다.

MTT assay의 경우, 세포 생존율에 영향을 주지 않는 농도는 미처리 대조군 대비 90% 이상의 생존율을 갖는 것으로 평가하였다. Figure 4에 나타난 바와 같이, MTT assay에서 isoimperatorin과 imperatorin 모두 25  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서 세포독성을 보이지 않았다.

LDH assay는 세포가 사멸할 때 세포막이 파괴되면서 방출되는 물질로 알려진 lactate dehydrogenase의 양을 측정하여 평가하는 방법으로 세포가 damage를 입으면 LDH의 양이 증가한다. 실험 결과는 미처리 대조군 대비 110% 이하일 때 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도로 평가하였다. LDH assay의 경우 isoimperatorin은 50  $\mu\text{M}$  이하, imperatorin은 25  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서 세포독성을 보이지 않았다(Figure 5). 두 결과를 종합하여 공통적인 농도 범위인 6.25, 12.5, 25  $\mu\text{M}$ 에서 이후 실험을 진행하였다.

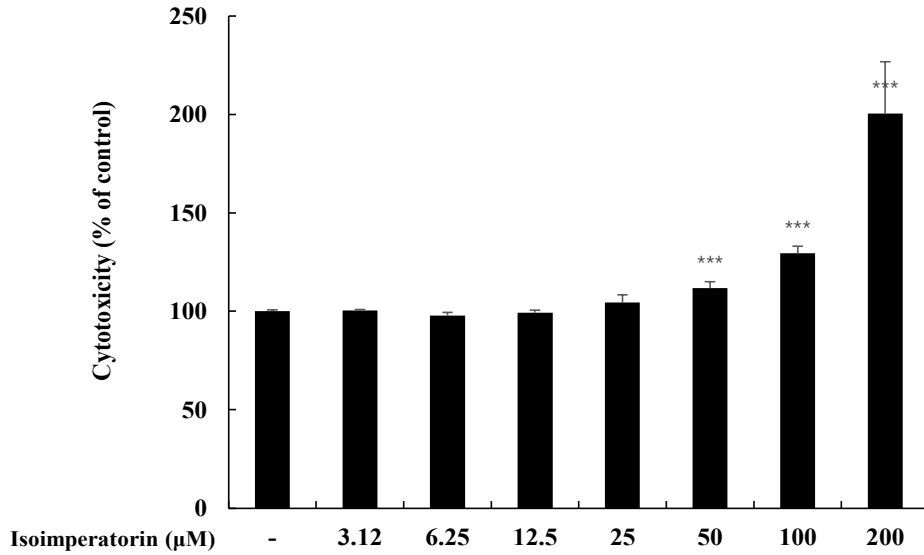


(a)

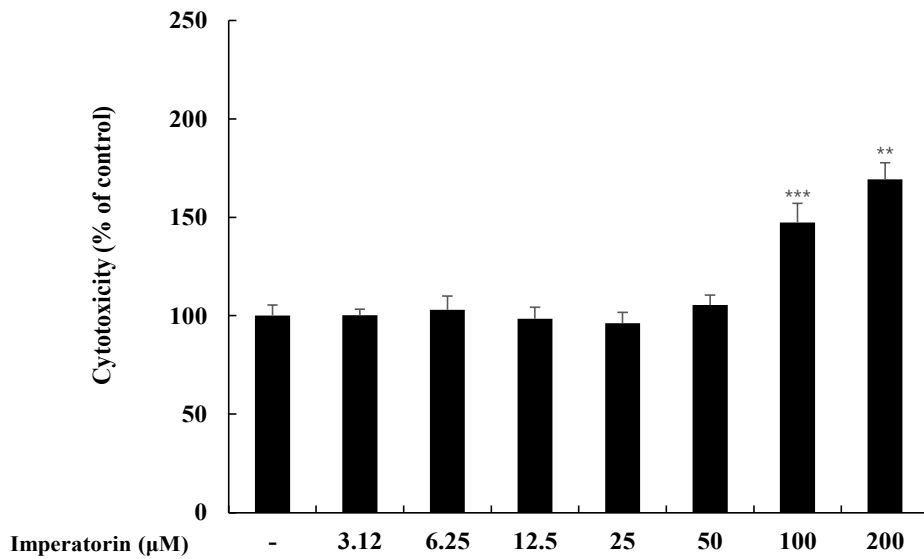


(b)

**Figure 4. The effects of coumarin on the viability using MTT assay.** Cells were treated with various densities (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM) for 72 h. MTT assay was performed to evaluate the cell viability of (a) isoimperatorin and (b) imperatorin. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.



(a)

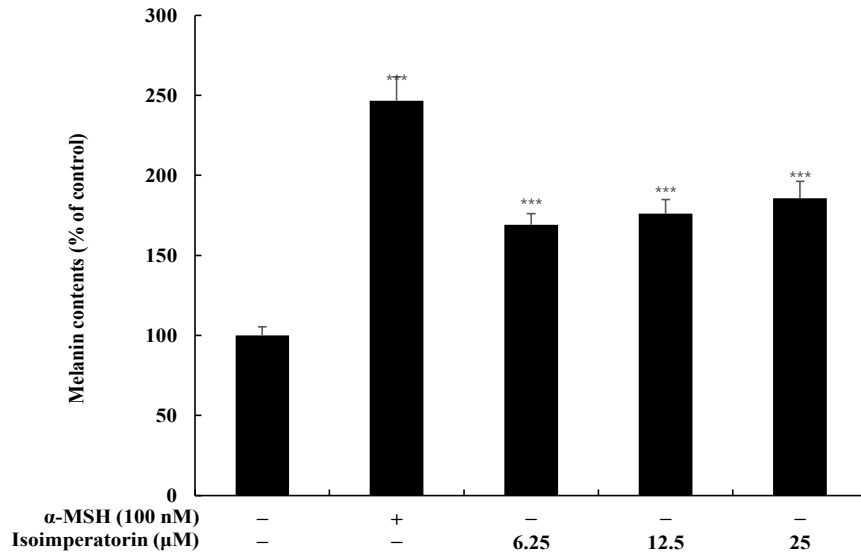


(b)

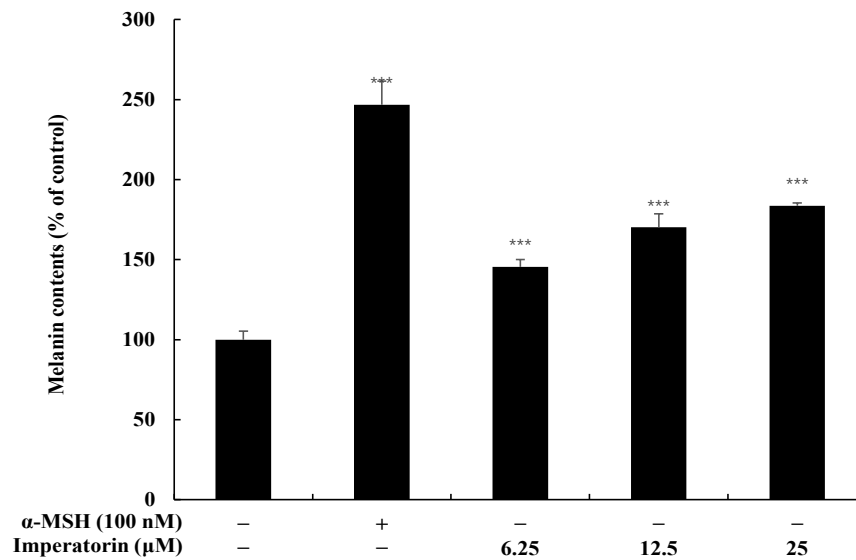
**Figure 5. The effects of coumarin derivatives on the viability using LDH assay.** Cells were treated with various densities (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM) for 72 h. LDH assay was performed to evaluate the cell viability of (a) isoimperatorin and (b) imperatorin. The results are presented as the mean ± S D from three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.

## 2. B16F10 세포에서 멜라닌 함량 평가

B16F10 세포에서 isoimperatorin과 imperatorin이 Melanin 합성에 영향을 미치는가 확인하기 위해 Melanin contents를 수행하였다. Isoimperatorin과 imperatorin은 6.25, 12.5, 25  $\mu$ M의 농도로 처리하여 72시간 동안 배양되었다.  $\alpha$ -MSH는 양성대조군으로써 사용되었다. Figure 6에 나타난 바와 같이 isoimperatorin과 imperatorin 모두 멜라닌 증진을 보였다. 미처리 대조군과 비교하여 두 시료는 농도의존적으로 증가하였으며, 미처리 대조군을 100%로 하였을 때 isoimperatorin은 고농도 25  $\mu$ M에서 185.67%, imperatorin은 고농도인 25  $\mu$ M에서 183.55%로 나타났다.



(a)



(b)

**Figure 6. The effects of coumarin derivatives on the melanin contents.**

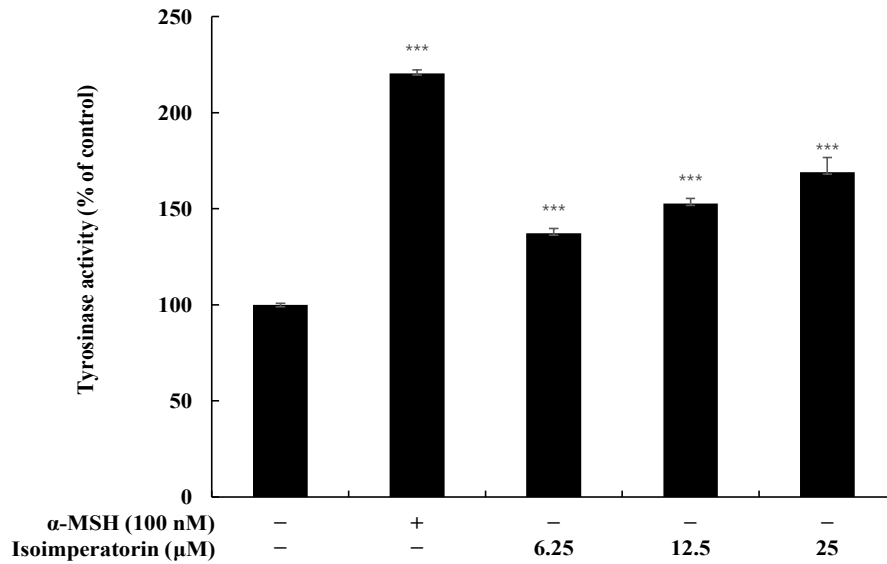
For the evaluation of melanin production, cells were treated with various densities (6.25, 12.5, 25 μM) and α-MSH (100 nM) for 72 h. α-MSH treatment was used as the positive control. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.



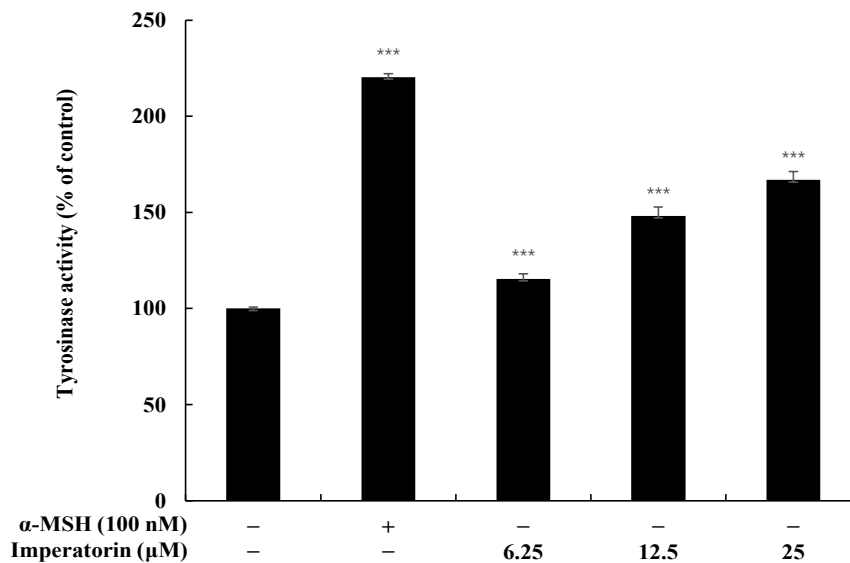
### 3. B16F10 세포에서 Tyrosinase 활성 평가

Isoimperatorin과 imperatorin를 처리한 B16F10 세포가 Melanin을 생성한 것이 tyrosinase 효소에 의한 것인지 확인하기 위해 Tyrosinase activity를 측정하였다. Isoimperatorin과 imperatorin은 6.25, 12.5, 25  $\mu$ M의 농도로 처리하여 72시간 동안 배양되었다.  $\alpha$ -MSH는 양성대조군으로써 사용되었다. Figure 7에 나타난 바와 같이 두 시료 모두 농도 의존적으로 증가하였고, Isoimperatorin은 고농도 25  $\mu$ M에서 169.03%로 나타났고 imperatorin은 166.94%로 Tyrosinase 활성이 증가하는 것을 확인하였다.

Isoimperatorin과 imperatorin은 구조적인 차이가 있지만, Melanogenesis에 대하여 두 시료는 동일한 수준의 멜라닌 증진을 보였다. 따라서 두 시료 모두를 멜라닌 증진에 대한 기작 연구를 진행하려 하였으나 isoimperatorin의 경우 선행 연구가 존재하여[73], imperatorin으로 이후 실험을 진행하였다.



(a)



(b)

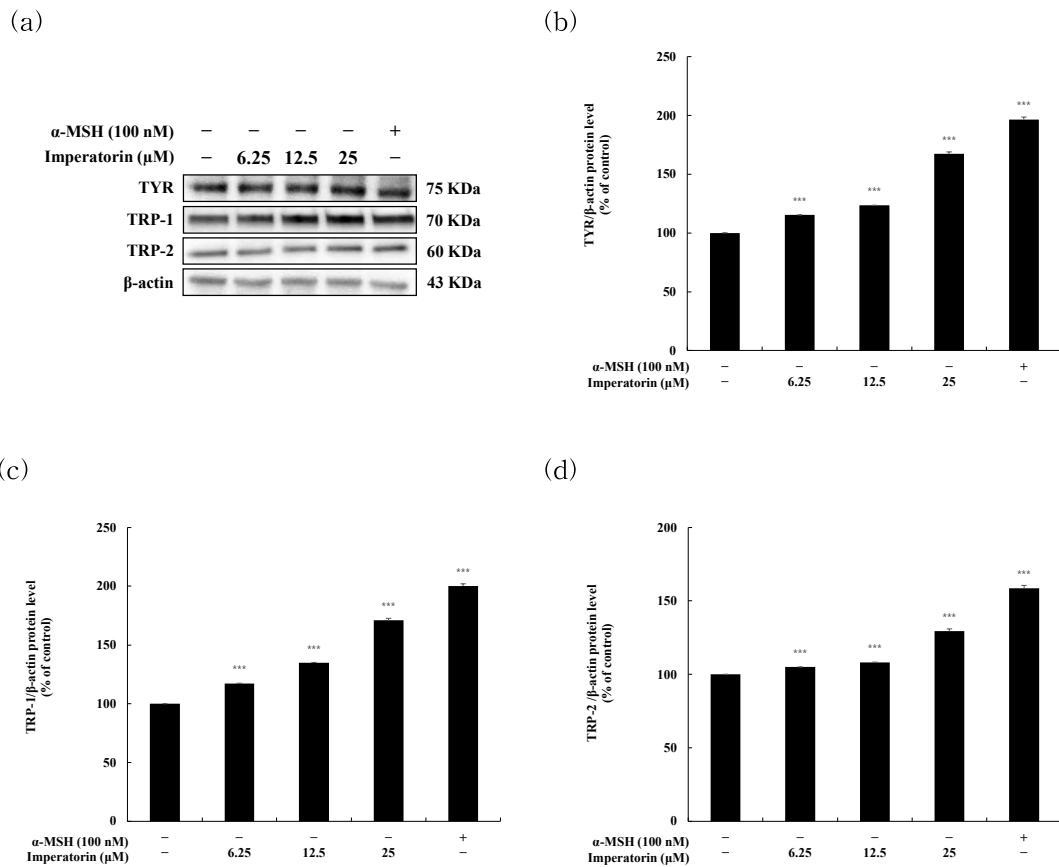
**Figure 7. The effects of Coumarin derivatives on the tyrosinase activity.** For the evaluation of tyrosinase activity, cells were treated with various densities (6.25, 12.5, 25  $\mu$ M) and  $\alpha$ -MSH (100 nM) for 72 h.  $\alpha$ -MSH treatment was used as the positive control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.

#### 4. B16F10 세포에서 Imperatorin의 멜라닌 생성 증진 평가

##### 4.1. Western blot analysis

###### 1) 멜라닌 생성 효소 발현에 Imperatorin이 미치는 영향

Tyrosinase, TRP-1과 TRP-2는 멜라닌 생성에 주요한 역할을 하는 효소이다. 멜라닌 생성과 관련된 효소의 발현 정도에 따라 그 활성이 조절된다. 앞서 확인한 imperatorin의 멜라닌 생성 유도가 효소의 활성에 따르는지 확인하기 위해 western blot을 이용해 단백질 발현 정도를 분석하였다.  $\beta$ -actin은 Loading control로서 사용되었다. 실험 결과 농도에 따라 유의적으로 Tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2 단백질의 발현이 상향 조절되어 이는 imperatorin이 melanin 생성에 TYR, TRP-1, TRP-2 효소를 이용하는 것으로 판단하였다(Figure 8).

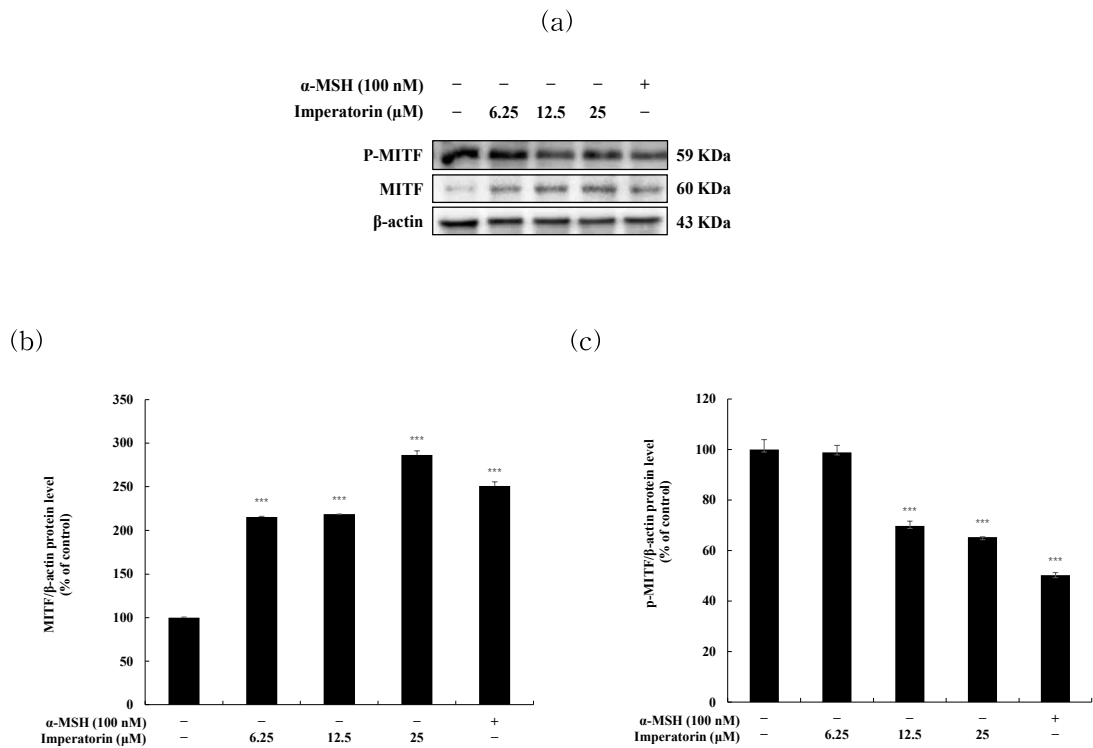


**Figure 8.** The effects on the protein expression of TYR, TRP-1 and TRP-2 in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with imperatorin (6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M) for 48 h. (a) Western blotting results; protein levels of (b) TYR, (c) TRP-1, and (d) TRP-2.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent measurements using ImageJ software. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.

## 2) MITF 발현에 Imperatorin이 미치는 영향

MITF는 멜라닌 생합성 과정에서 중요한 역할을 하는데, 앞서 멜라닌 생성에 관여하는 효소들은 MITF의 유전자 프로모터와 연결되어 그 전사가 조절된다. 따라서 MITF의 증가는 멜라닌 생성과 연관되어 있다. Figure 9. (b)에 따르면  $\alpha$ -MSH는 양성대조군으로 이용되었으며 농도가 증가함에 따라 MITF의 발현이 증가되었음을 확인하였다.

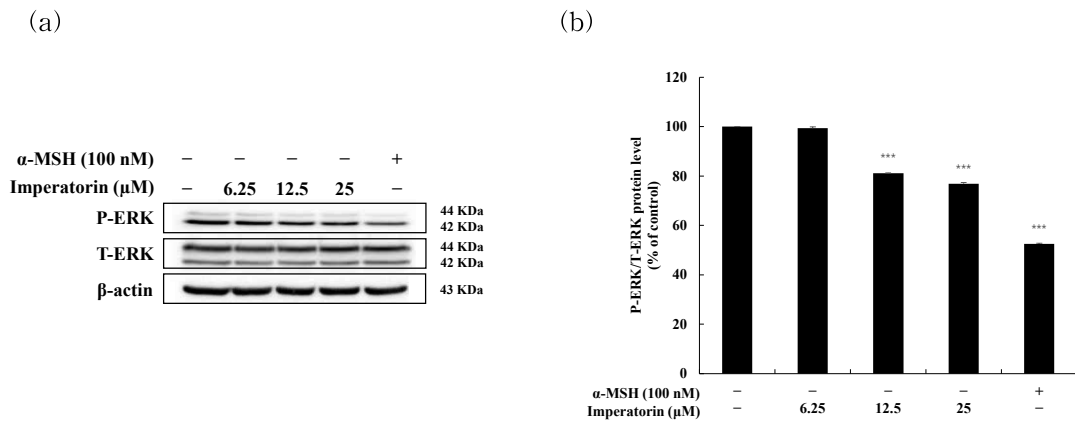
반면에, serine 73번에서 MITF의 인산화는 그에 따른 분해를 유도하고 멜라닌 생성을 저해한다. 따라서 P-MITF 발현의 감소는 멜라닌 생성을 유도한다. 이를 확인하기 위해, western blot을 이용하여 P-MITF의 단백질 발현 정도를 확인하였다. Figure 9. (c)에 따르면, 인산화된 MITF는 농도가 증가함에 따라 단백질의 발현이 감소됨을 확인하였다.



**Figure 9.** The effects on the protein expression and phosphorylation of MITF in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with imperatorin (6.25, 12.5, 25  $\mu$ M) for 24 h. (a) Western blotting results, (b) protein levels of MITF, (c) phosphorylation level of MITF.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent measurements using ImageJ software. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.

### 3) MAPKs 신호전달 경로에 대한 Imperatorin의 영향

MAPKs 신호전달 경로는 ERK(extracellular signal-regulated kinase), P38 및 JNK(c-Jun N-terminal kinase)로 이루어져 있다. 특히, ERK는 인산화를 통해 MITF 단백질 안정성을 조절하는 역할을 한다. 즉, MITF의 인산화는 안정성을 감소시키고 프로테아좀에서 분해를 일으키며, ERK 탈인산화는 역설적으로 MITF 분해를 방해하여 멜라닌 생성을 활성화시킨다. 따라서 imperatorin이 MAPKs 경로를 통해 MITF 활성을 조절하는지 여부를 조사하였다. Western blot analysis를 통해 imperatorin을 처리함에 따라 P-ERK가 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(Figure 10). 미처리 대조군을 100%로 하여 계산했을 때, 고농도인 25  $\mu$ M에서 76.82%로 나타났다. 이는 Imperatorin에 의한 효과적인 ERK 인산화의 감소로 멜라닌 생성을 자극함을 보여준다.



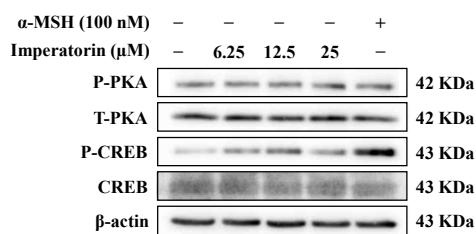
**Figure 10. The effects on the phosphorylation level of ERK in B16F10 melanoma cells.** The cells were treated with imperatorin(6.25, 12.5, and 25  $\mu$  M) for 3 h. (a) Western blotting results, (b) protein levels of P-ERK/ERK.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent measurements using ImageJ software. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.



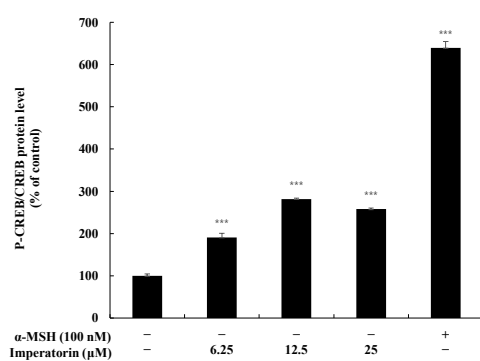
#### 4) PKA/CREB 신호전달 경로에 대한 Imperatorin의 영향

멜라닌 생성의 첫 단계에 관여하는 호르몬인  $\alpha$ -MSH는 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성과 관련된 하향 조절 단백질인, PKA(Protein kinase A)와 cAMP(Cyclic Adenosine Monophosphate) response element-binding protein의 인산화를 자극하여 멜라닌 세포의 합성을 유도한다. 따라서 다음으로 imperatorin이 B16F10 세포에서 PKA/CREB 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 유도하는지 여부를 조사하였다. B16F10 세포에서 imperatorin을 이용하여 자극함으로써 PKA와 CREB의 인산화가 농도에 따라 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(Figure 11). 종합하면 이러한 데이터는 imperatorin의 멜라닌 생성 효과가 PKA/CREB 신호 전달 경로와 밀접하게 관련되어 있으며 MITF를 통한 TYR, TRP-1 및 TRP-2의 상향 조절 후에 발생함을 보여준다.

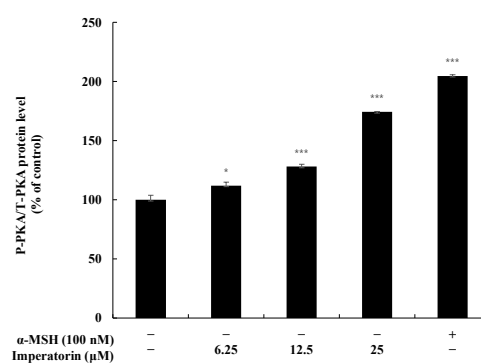
(a)



(b)



(c)



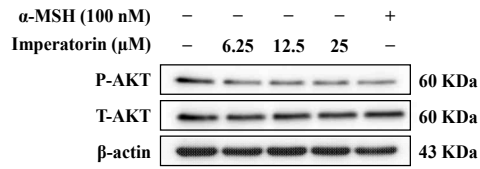
**Figure 11.** The effects on the protein expression of PKA and CREB in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with imperatorin(6.25, 12.5, and 25  $\mu$ M) for 15 min. (a) Western blotting results; protein levels of (b) P-CREB and (c) P-PKA.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent measurements using ImageJ software. \*  $p < 0.05$ , and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.

##### 5) AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 신호전달 경로에 대한 Imperatorin의 영향

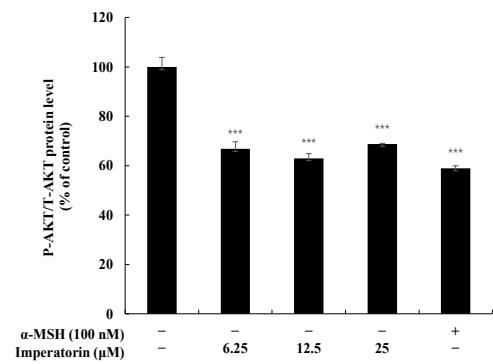
최근 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 신호 전달 경로가 멜라닌 세포 발달 및 멜라닌 생성과 밀접한 관련이 있다는 수많은 보고가 있다. AKT 인산화 및 활성화는 GSK-3 $\beta$ 의 인산화를 유도하여 GSK3 $\beta$ 를 불활성화시키고  $\beta$ -catenin 분해를 억제하여 안정성을 증가시킨다. 세포질에  $\beta$ -catenin이 축적되면 핵 전위가 촉진되고 MITF는 전사적으로 상향 조절되어 결국 멜라닌 생성에 관여하는 유전자의 발현을 유도한다. Imperatorin이 이러한 신호전달 경로에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해 Western blot analysis을 이용하여 P-AKT를 평가하였다. Figure 12에 나타난 바와 같이, imperatorin은 AKT의 인산화를 유의하게 억제하였다.

다음으로 imperatorin이 B16F10 세포에서 Wnt/ $\beta$ -catenin 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 유도하는지 여부를 확인하였다. Figure 13에 보이는 것과 같이, imperatorin이 미처리 대조군에 비해 P-GSK3 $\beta$ (Ser 9) 및  $\beta$ -catenin의 수준을 증가시키는 것으로 나타났다. 그러나 Figure 13. (b)에 따르면 imperatorin은 미처리 대조군과 비교해 P- $\beta$ -catenin 단백질의 발현을 억제하였다. 이러한 결과는 멜라닌 생성에 대한 imperatorin의 효과가 AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 신호 전달 경로와 관련될 가능성이 있음을 나타냅니다.

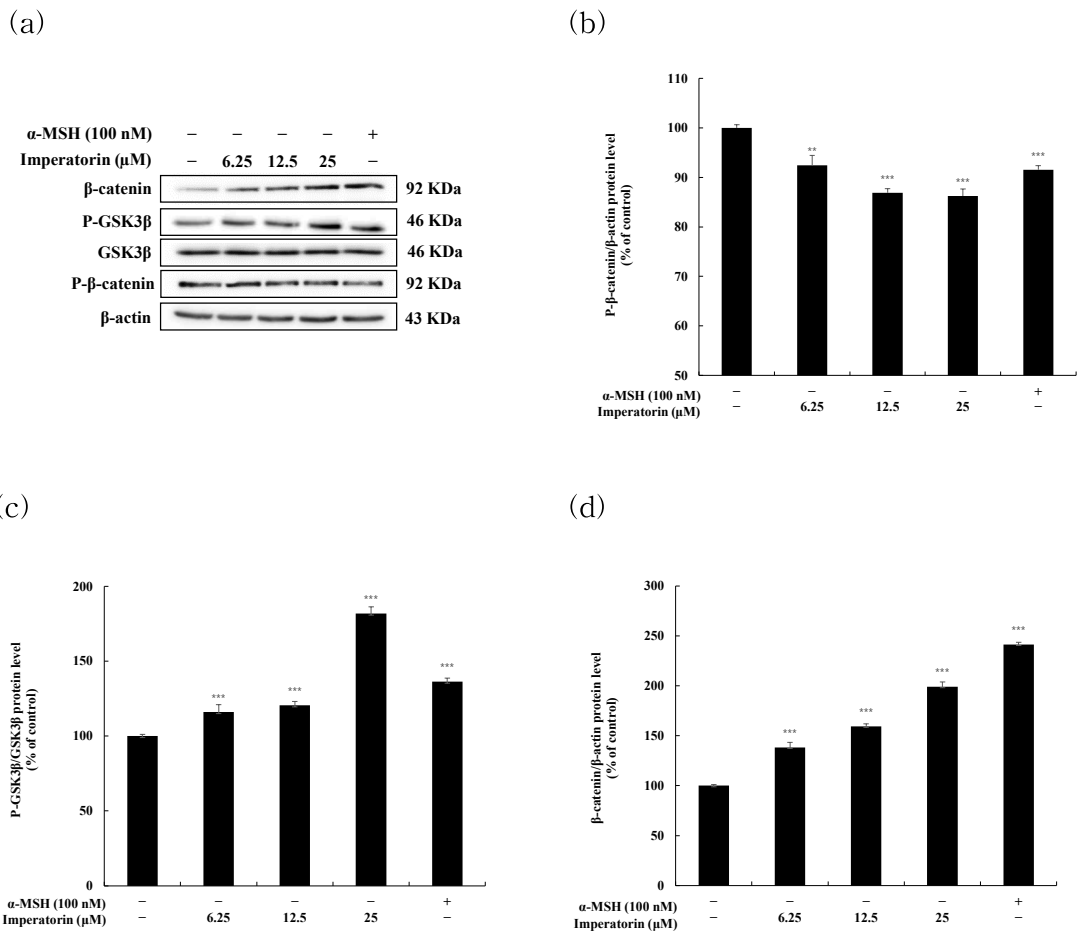
(a)



(b)



**Figure 12.** The effects on the protein expression of AKT in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with imperatorin(6.25, 12.5 and 25  $\mu$ M) for 4 h. (a) Western blotting results, (b) protein levels of P-AKT.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent measurements using ImageJ software. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.



**Figure 13.** The effects on the protein expression of  $\beta$ -catenin, P-GSK3  $\beta$ , and P- $\beta$ -catenin in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with imperatorin(6.25, 12.5, and 25  $\mu$ M) for 24h. (a) Western blotting results; protein levels of (b) P- $\beta$ -catenin, (c) P-GSK3 $\beta$ , and (d)  $\beta$ -catenin.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent measurements using ImageJ software. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.

## 5. B16F10 세포에서 특이적 억제제를 이용한 멜라닌 함량 확인

Imperatorin으로 유도하는 멜라닌 합성 과정에서 신호 경로의 역할을 추가적으로 확인하기 위하여 specific inhibitor인 ERK 억제제(PD98059), PKA 억제제(H-89) 및 AKT 억제제(LY294002)를 사용하였다. Figure 14에 도시된 바와 같이, Imperatorin의 처리는 멜라닌 함량을 증가시켰고 이러한 효과는 PD98059 및 LY294002에 의해 현저하게 활성화되었다. 또한, H-89와 imperatorin의 동시 처리는 imperatorin 단독보다 멜라닌 함량을 증가시켰다. 이러한 결과는 ERK-PKA-AKT 매개 신호전달이 imperatorin에 의해 생성되는 멜라닌의 증가에 필수적임을 나타냅니다.

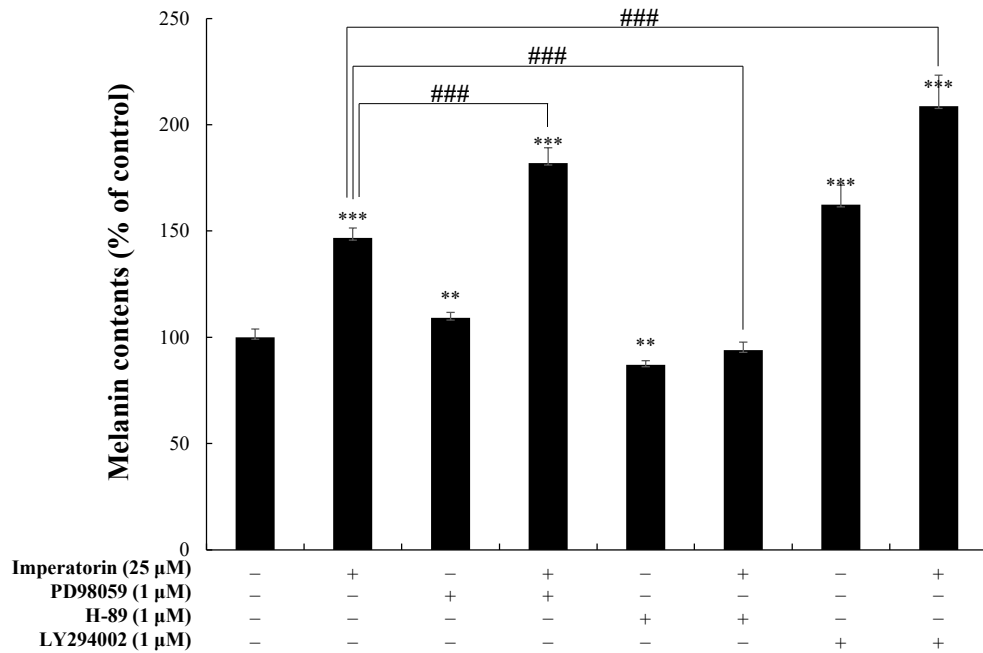
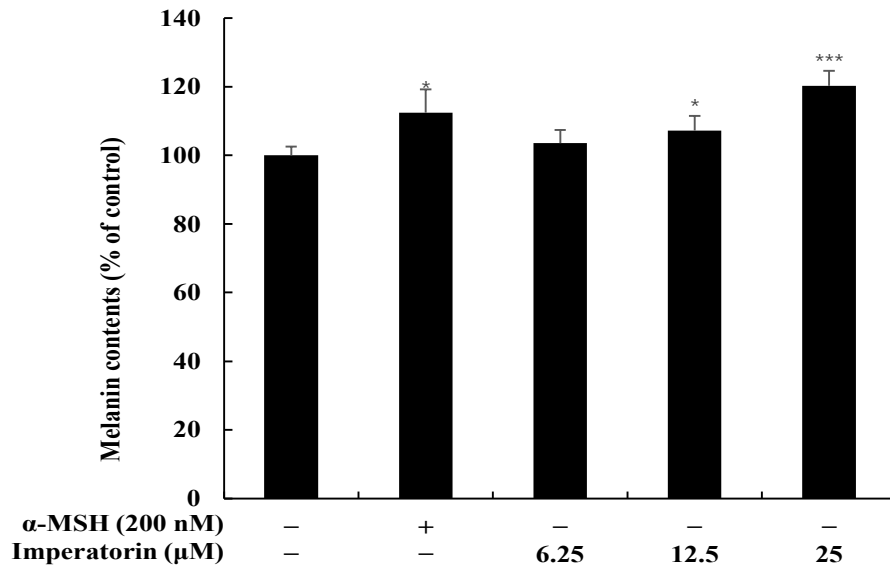


Figure 14. The effects of inhibitor on imperatorin-induced melanin contents in B16F10 cells. To determine the involvement of ERK, AKT, PKA enzyme in melanogenesis, melanin content was conducted using the PD98059, H-89 and LY294002(1 μM). The results are presented as the mean ± SD from three independent measurements using the Image J. \*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001 vs untreated group. ### p < 0.001 vs imperatorin treated group.

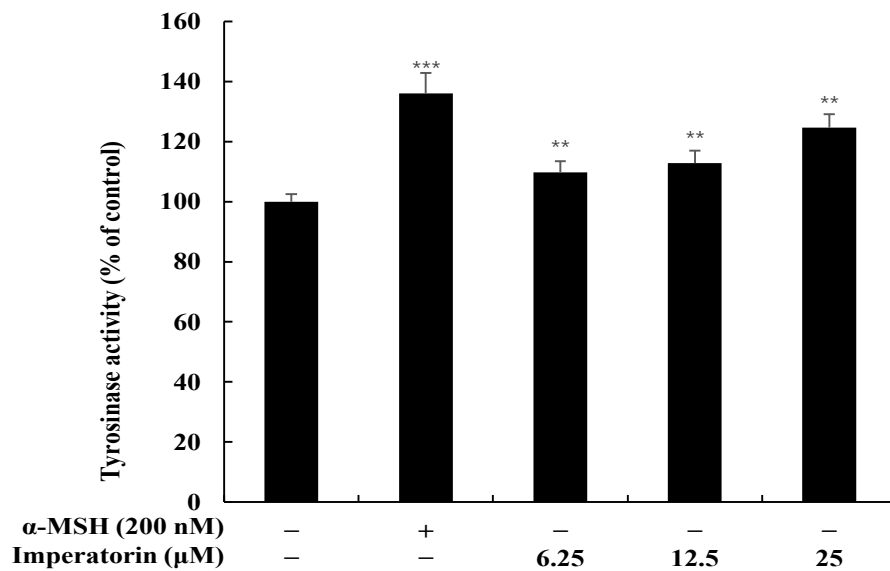
## 6. HEMn-MP 세포에서 멜라닌 함량과 Tyrosinase 활성 평가

Mouse melanoma cell인 B16F10 세포에서 imperatorin의 멜라닌 생성 활성이 인간 표피 멜라닌 세포에서도 영향을 미치는지 확인하기 위해서 HEMn-MP cell을 이용하였다. Imperatorin을 6.25, 12.5, 25  $\mu$ M로 처리하여 melanin contents와 tyrosinase 활성 평가를 수행하였다. 6 well plate에 cell을 seeding하고 48시간 뒤, 농도별로 처리하여 72시간 배양하였다.  $\alpha$ -MSH(200 nM)은 양성대조군으로 사용되었다. Imperatorin을 처리한 결과, 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성 모두 증진되었다. 미처리 대조군과 비교하여 두 시료 모두 농도에 의존적으로 효능이 증가하였다. Figure 15에서 보는 것과 같이, 미처리 대조군을 100%로 하였을 때 고농도인 25  $\mu$ M에서 멜라닌 함량이 120.20%, Tyrosinase 활성이 124.66%로 나타났다. Imperatorin이 인간 표피 멜라닌 세포에서도 효과적으로 멜라닌 생성을 유도하는 것으로 판단된다.





(a)



(b)

Figure 15. The effects of imperatorin on the melanin contents and tyrosinase activity in HEMn-MP cells. (a) melanin contents, (b) tyrosinase activity. Cells were treated with various densities(6.25, 12.5, 25  $\mu$ M) and  $\alpha$ -MSH(200 nM) for 72 h.  $\alpha$ -MSH treatment was used as the positive control. The results are presented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.

## 7. HaCaT keratinocyte 세포에서 Imperatorin의 세포독성 평가

멜라닌 세포에서 합성된 멜라닌은 수상돌기 끝으로 이동하고 각질 세포로 전달된다. Imperatorin의 처리가 이 전달과정에 있어 각질세포의 생존율에 영향을 미치는지 확인하였다. HaCaT keratinocyte cell은 세포를 24 well plate에 24시간 동안 배양한 후, 농도별로 시료를 처리하여 72시간 동안 반응시켰다. MTT assay의 경우, 미처리 대조군 대비 90% 이상의 생존율을 가지면 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 평가하였다. Figure 16에 나타난 바와 같이, MTT assay에서 imperatorin은 100  $\mu$ M 이하의 농도에서 세포독성을 보이지 않았다. 그리고 keratinocyte는 피부의 마지막 세포층으로 HaCaT cell에서 보인 세포 생존율은 피부의 안정성을 보인다고 판단하였다.

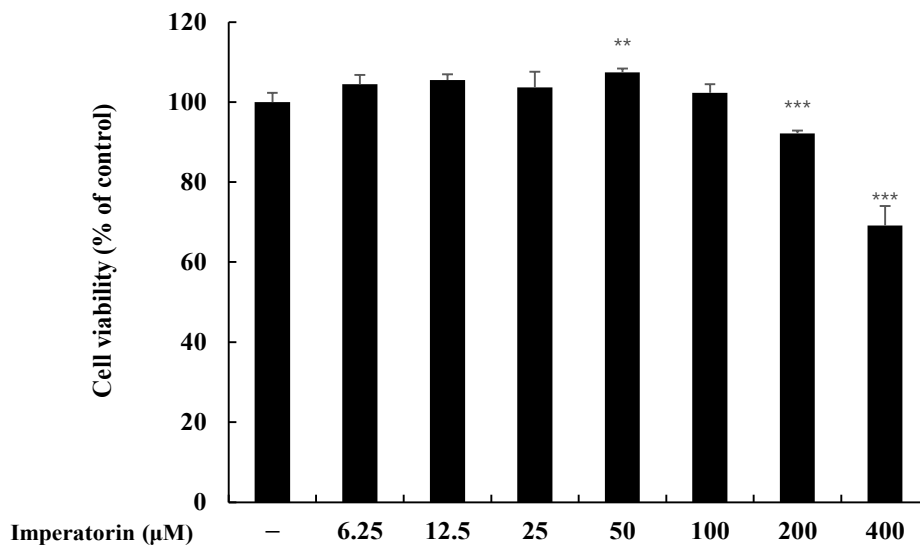


Figure 16. The effects of imperatorin on the viability in HaCaT cells. Cells were treated with various densities(6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μM) for 72 h. MTT assay was performed to evaluate the cell viability of imperatorin. The results are presented as the mean ± SD from three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. the untreated control group.

## 8. 인체 피부 일차 자극 평가

인간 피부 자극 테스트를 통해 국소 적용에서 Imperatorin의 가능성을 테스트하였다. Imperatorin은 최대 24시간 동안 25  $\mu$ M 및 50  $\mu$ M의 농도에서 피부 패치로 적용되었다. Imperatorin을 제거한 후 20분 및 24시간 동안 패치를 관찰하였다. 용매인 스쿠알렌을 음성 대조군으로 사용하였다. (IRB no. 1-220777-A-N-01호-DICN22080) Table 1에 나타난 바와 같이 시험물질(imperatorin)은 인체 피부에 대한 1차 자극 가능성 측면에서 "무자극 내지 경미한 자극"을 유발하는 것으로 분류하였다.

Test Sample	No. of Responder	20min after patch removal				24hr after patch removal				Reaction Grade (R)
		+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4	Mean
Imperatorin 25 $\mu$ M	2	-	-	-	-	2	-	-	-	0.8
Imperatorin 50 $\mu$ M	1	-	-	-	-	1	-	-	-	0.4
Sq	0									0

**Table 1. The results from the primary human skin irritation tests.**

Imperatorin was applied as a skin patch at concentrations of 25  $\mu$ M and 50  $\mu$ M for up to 24h.(n = 31)

## IV. 고찰

Isoimperatorin과 Imperatorin은 Coumarin 유도체로 5번, 8번 잔기가 prenyloxy 기로 치환된 psolaren 계열 화합물이다. Coumarin은 항산화, 항암, 항응고제 등 여러 분야에 효능을 보이는 물질로서 특히 psolaren 계열의 화합물은 이전 연구에서 멜라닌 생성을 조절한다고 알려져 있음에 따라[74, 75], 본 연구는 Isoimperatorin과 imperatorin의 멜라닌 생성과의 연관성 및 신호전달 과정에 대한 기전 연구를 수행하였다.

멜라닌은 피부와 모발에 색을 부여하는 역할을 한다. UV 자극 및 산화 스트레스 등 외부 자극에 의해 멜라닌 생성이 영향을 받는데 이는 피부를 보호하기 위한 기작이다. 이러한 멜라닌이 부족하면 백반증(Vitiligo), 저색소 침착증(Hypopigmentation)과 같은 질환이 발생할 수 있으며, 특히 백반증은 피부의 후천성 변색 색소 이상으로 인종이나 성별의 차이 없이 전 세계 인구의 1~2%가 질환을 가지고 있다[76, 77].

멜라닌 생성 과정에서  $\alpha$ -MSH는 UV 자극으로 인하여 각질형성세포(Keratinocyte)와 멜라닌 형성 세포(Melanocyte)에서 생성이 촉진되어, 자가분비과 측분비인자로서 멜라닌 생성에 중요한 역할을 한다. 뿐만 아니라,  $\alpha$ -MSH는 세포의 증식(proliferation), 세포 보호작용(cytoprotection), 돌기 형성(dendricity) 등에도 영향을 끼친다. 또한 Tyrosinase는 TRP-1 및 TRP-2와 함께 멜라닌 합성을 위한 속도 제한 효소로서 전사인자인 MITF에 의해 조절된다고 알려져 있다. 또한 MITF는 PKA/CREB, Extracellular Signal-regulated Kinase(ERK), Phosphoinositide 3-kinase(PI3K)/AKT and Glycogen Synthase Kinase(GSK)3 $\beta$  signaling pathways에 의해 조절된다.

B16F10 흑색종 세포는 멜라닌 합성 모델로 사용되었다. 멜라닌 생성에 관한 연구에 앞서 isoimperatorin과 imperatorin의 처리에 대해 세포독성을 갖지 않는 농도를 MTT assay와 LDH assay를 이용하여 확인하였다. Isoimperatorin과 imperatorin 모두 25  $\mu$ M 이하의 농도에서 독성을 갖지 않았다. 따라서 이후 실험은 모두 해당 농도 범위 내에서 실행하였다.

이어서 isoimperatorin과 imperatorin이 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성을 증가시키는지 확인하였다. Melanin contents와 cellular tyrosinase activity를 진행한 결과, isoimperatorin과 imperatorin은 구조와 상관없이 동일한 수준의 상승을 보였다. 하지만 isoimperatorin은 keratinocyte에서 멜라닌 생성에 관한 연구가 보고된 바가 있어, imperatorin의 멜라닌 생성 기전 연구에 초점을 맞추었다.

우선적으로 western blot analysis를 이용해 멜라닌 생성에 관여하는 주요 효소 단백질의 발현을 확인하였다. 다양한 경로의 신호를 전달받아 MITF가 자극되면 Tyrosinase, TRP-1와 TRP-2가 발현된다. Imperatorin은 TYR와 그 효소들을 발현을 증가시키고 이는 MITF의 증가 및 P-MITF의 감소로 인해 발생함을 확인하였다.

MAPKs signaling pathway는 MITF의 발현 및 활성화의 조절에 관여하기 때문에 멜라닌 합성에 주요 조절자 중 하나이다. ERK는 음성 신호 전달자로서, 인산화된 ERK는 신호전달 경로의 활성화에 영향을 미치고 멜라닌 생성 유도과 연관된다. Imperatorin의 처리는 ERK 인산화를 억제하였으며, 이는 MITF 단백질의 증가로 이어져 멜라닌 생성을 촉진한다.

외부의 자극으로  $\alpha$ -MSH가 생성되면 cAMP가 생성되고 차례로 PKA, CREB의 인산화를 유도한다. PKA/CREB signaling pathway는 세포의 성장이나 대사 기능 조절하는 역할을 한다. Imperatorin의 처리는 인산화된 PKA의 증가, CREB의 인산화 증가로 이어지고, PKA/CREB 신호 전달 경로를 활성화하며 멜라닌 생성을 증가시키는 것을 확인하였다.

Imperatorin은 GSK3 $\beta$  인산화를 유도하고 PI3K/AKT 신호전달을 감소하여 멜라닌 합성을 증가시켰다. 이러한 결과는 imperatorin이 AKT 및 GSK3 $\beta$  신호전달을 통해 멜라닌 생성을 유도하고 AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 경로를 표적화한다는 것을 나타낸다. 이러한 경로를 이용하여 조절함을 특이적 억제제를 이용해 추가적으로 확인하였다.

또한 HEMn-MP cell에서 imperatorin을 처리하고 melanin contents와 tyrosinase activity를 확인하였다. Imperatorin은 정상 인간 표피 멜라닌 세포에서 멜라닌 함량의 증가 및 Tyrosinase 활성 수준의 향상을 보였다. Imperatorin이 마우스 세포인 B16F10 cell뿐만 아니라 인간 세포에서도 멜라닌 생성에 대해 효능을 보이는 것을 확인하였다.

결론적으로 연구를 통해 멜라닌 생성에 대한 isoimperatorin과 imperatorin의 활성을 평가하였다. Imperatorin은 ERK, PKA/CREB, AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathway를 통해 MITF를 증가시키고 멜라닌 합성 효소 TYR, TRP-1, TRP-2의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 유도하는 것을 확인하였다. 그리고 인간 정상 표피 멜라닌 세포에서도 멜라닌 생성을 활성화함을 보였다. 따라서 imperatorin은 저색소 침착을 치료하는데 사용될 가능성이 있음을 보여준다.



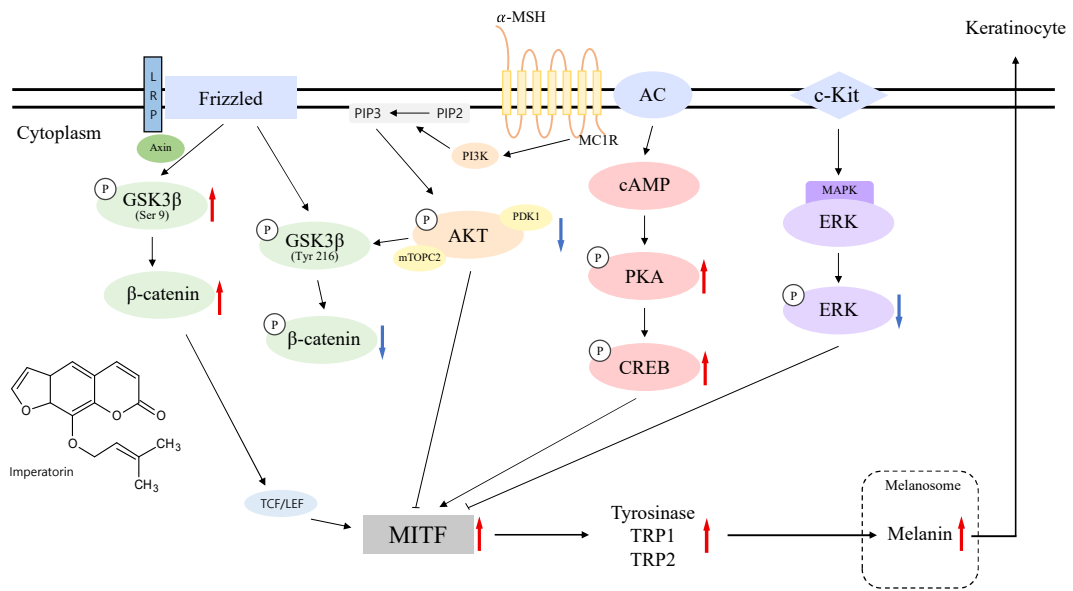


Figure 17. Regulation of melanogenesis signaling pathway through imperatorin.

## V. 참고문헌

1. P. T. Pugliese, *Physiology of the skin*, Allured Publishing Corporation, 1996. 39.
2. Chao Niu, Haji A Aisa. Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo. *Molecules*. 2017. 22(8). 1303.
3. Thanigaimalai Pillaiyar, Manoj Manickam, Sang-Hun Jung. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cell Signal*. 2017. 40. 99-115.
4. H. Lu, C. Edxards, S. Gaskell, A. Pearse, and R. Marks. Melanin content and distribution in the surface corneocyte with skin phototypes. *British J. Dermatol*. 1996. 135-263.
5. I. M. Freedberg, A. Z. Eisen, K. Wolff, K. F. Austen, L. A. Goldsmith, and S. I. Katz. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine* 6th ed. The McGraw-Hill Professional. 2003. 6.
6. Kowichi Jimbow, Walter C. Quevedo Jr., Thomas B., Fitzpatrick, George Szabo. Some Aspects Of Melanin Biology: 1950 - 1975. *Journal of Investigative Dermatology*. 1976. 67(1). 72-89.
7. E. Schauer, F. Trautinger, A. Köck, A. Schwarz, R. Bhardwaj, M. Simon, J.C. Ansel, T. Schwarz, and T. A. Luger. Proopiomelanocortin-derived pepti

- des are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 1994. 93(5). 2258.
8. A. K. Chakraborty, Y. Funasaka, A. Slominski, G. Ermak, J. Hwang, J. M. Pawelek, and M. Ichihashi, Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. 1313(2). 130.
9. K. Wakamatsu, A. Graham, D. Cook, and A. J. Thody, Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor. *Pigment Cell Res.* 1997. 10(5). 288.
10. Libert A, Ghanem G, Arnould R, Lejeune FJ. Use of an alpha-melanocyte-stimulating hormone analogue to improve alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor binding assay in human melanoma. *Pigment Cell Res.* 1989. 2(6). 8-510.
11. Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 2000. 13. 9-60.
12. D'Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A, Briganti S, Garcia-Borrón JC, Kovacs D, Ito S. Melanin and melanogenesis: methods, standards, protocols. *CMR.* 2013. 26(5). 616 - 633.
13. Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, García-Borrón JC, Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *The EMBO Journal.* 1994. 13(24). 5818 - 5825.

14. Niu C. Aisa H.A. Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity. Potential Agents for Vitiligo. *Molecules*. 2017. 22.
15. Schiaffino, M.V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. 42. 1094 - 1104.
16. Płonka, P. Grabacka M. Melanin synthesis in microorganisms, Biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim. Pol.* 2006. 53. 3.
17. Sánchez-Ferrer, Á. Rodríguez-López, J.N. García-Cánovas, F. García-Carmena F. Tyrosinase. A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta (Bba) Protein Struct. Mol. Enzym.* 1995. 1247. 1 - 11.
18. Michał Otręba, Jakub Rok, Ewa Buszman, Dorota Wrześniok. Regulation of melanogenesis: the role of cAMP and MITF. *Postepy Hig Med Dosw.* 2012. 30. 33-40.
19. C Bertolotto, R Buscà, P Abbe, K Bille, E Aberdam, J P Ortonne, R Ballotti. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTTCAT GTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol.* 1998. 18(2). 694-702.
20. C Bertolotto, K Bille, J P Ortonne, R Ballotti, In B16 melanoma cells. the inhibition of melanogenesis by TPA results from PKC activation and diminution of microphthalmia binding to the M-box of the tyrosinase promoter. *Oncogene.* 1998. 16(13). 1665-70.
21. C Bertolotto, K Bille, J P Ortonne, R Ballotti. Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motif

- s surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J Cell Biol.* 1996. 134(3). 747-55.
22. K Yasumoto, K Yokoyama, K Takahashi, Y Tomita, S Shibahara. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes., *J Biol Chem.* 1997. 3. 272(1). 503-9.
23. Yokoyama, K., H. Suzuki, K. Yasumoto, Y. Tomita, and S. Shibahara. Molecular cloning and functional analysis of a cDNA coding for human DOPAchrome tautomerase/tyrosinase-related protein-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1994. 1217(3). 317-21.
24. Hans R Widlund , David E Fisher. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene.* 2003. 19. 22(20). 3035-41.
25. Hemesath TJ, Price ER, Takemoto C, Badalian T, Fisher DE. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature.* 1998. 391. 298-301.
26. Imokawa G, Yada Y, Kimura M. Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem. J.* 1996. 314 (Pt 1): 305-312.
27. Walter Englaro, Corine Bertolotto, Roser Busca, Anne Brunet, Gilles Pagès, Jean-Paul Ortonne, Robert Ballotti. Inhibition of the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Triggers B16 Melanoma Cell Differentiation. *CELL BIOLOGY AND METABOLISM.* 1998. 273. 9966-9970.

28. Dong-Seok Kim 1, Eui-Soo Hwang, Jai-Eun Lee, Sook-Young Kim, Sun-Bang Kwon, Kyoung-Chan Park. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J Cell Sci.* 2003. 116. 1699-706.
29. Dong-Seok Kim 1, Sook-Young Kim, Jin-Ho Chung, Kyu-Han Kim, Hee-Chul Eun, Kyoung-Chan Park. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cellular Signalling.* 2002. 14. 779-785.
30. Masashi Kato, Masahide Takahashi, Anwarul A Akhand, Wei Liu, Yan Dai, Satoru Shimizu, Takashi Iwamoto, Haruhiko Suzuki & Izumi Nakashima, Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene.*, 1998. 17. 1885-1888.
31. Bonaventure J, Domingues MJ, Larue L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013. 26: 316-325.
32. Shibahara S, Yasumoto K, Amae S, Udono T, Watanabe K, Saito H, et al. Regulation of pigment cell-specific gene expression by MITF. *Pigment Cell Res.* 2000. 13. 8. 98-102.
33. ROSER BUSCÀ, ROBERT BALLOTTI. Cyclic AMP a Key Messenger in the Regulation of Skin Pigmentation. *Pigment Cell Research.* 2000. 13. 60-69.
34. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees J, Thody A. Variants of the melano

- cyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet.* 1995. 11. 328 - 330.
35. Colin R. Goding. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Gene & Dev.* 2000. 14. 1712-1728.
36. Fuller BB, Lunsford JB, Iman DS. Alpha-melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in Cloudman S-91 mouse melanoma cell cultures. *J. Biol. Chem.* 1987. 262. 4024 - 4033.
37. Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 1991. 5. 2902 - 2909.
38. Park HY, Gilchrest BA. Signaling pathways mediating melanogenesis. *Cell Mol. Biol.* 1999. 45. 919 - 930.
39. Kim, D.S., Jeong, Y.M., Park, I.K., Hahn, H.G., Lee, H.K., Kwon, S.B. Jeong, J.H., Yang, S.J., Sohn, U.D., Park, K.C. A new 2-imino-1,3-thiazoline derivative, KHG22394, inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2007. 30. 180 - 183.
40. Davies MA, Garraway LA. Molecular biology of cutaneous melanoma. In: Devita VT, Hellman TS, Rosenberg SA, et al., eds. *Principles and practice of oncology.* Philadelphia: Wolters Kluwer. 2015. 1337-45.
41. Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* 1996. 1288(1). M11-6.

42. Carpenter, C.L., & Cantley, L.C. Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. *Biochimica Biophysica Acta*, 1996. 1288, M11-M16
43. Cleary, J.M., & Shapiro, G.I. Development of phosphoinositide-3 kinase pathway inhibitors for advanced cancer. *Current Oncology Report*, 2010. 12. 87-94.
44. Franke, T.F., Kaplan, D.R., & Cantley, L.C. . PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997. 88. 435-437.
45. Vanhaesebroeck, B., & Alessi, D.R. . The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000. 345. 561-76
46. Emamian, E.S., Hall, D., Birbaum, M.J., Karayiorgou, M., and Gogos, J.A. (2004). Convergent evidence for impaired AKT1- GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat. Genet.* 36, 131 - 137
47. M. Lei, T. Yang, X. Lai et al., Upregulation of interfollicular epidermal and hair infundibulum  $\beta$ -catenin expression in *Gsdma3* mutant mice. *Acta Histochemica*. 2013. 115, 1. 63-69.
48. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Development*. 2002. 16. 1066-76.
49. Steingrimsson, E.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* 2004, 38, 365 - 411.



50. Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC Jr, Woodgett JR, Mills GB. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000. 97. 11960-5.
51. Wu J, Saint-Jeannet JP, Klein PS. Wnt-frizzled signaling in neural crest formation. Trends in Neurosciences 2003. 26(1). 40-5.
52. Schepsky, A. Bruser, K. Gunnarsson, G.J. Goodall, J. Hallsson, J.H. Goding, C.R. Steingrimsson, E. Hecht, A. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with  $\beta$ -catenin to determine target gene expression. Mol. Cell. Biol. 2006. 26. 8914 - 8927.
53. Chihiro Ito, Masataka Itoigawa, Motoharu Ju-ichi, Naoyuki Sakamoto, Harukuni Tokuda, Hoyoku Nishino, Hiroshi Furukawa. Antitumor-promoting activity of coumarins from citrus plants. Planta Med. 2005. 71(1). 84-7.
54. I Kostova 1, S Bhatia, P Grigorov, S Balkansky, V S Parmar, A K Prasad, L Saso. Coumarins as antioxidants. Curr Med Chem. 2011. 18(25). 3929-51.
55. Appendino, G. et al. Antimycobacterial coumarins from the sardinian giant fennel (*Ferula communis*). J. Nat. Prod. 2004. 67. 2108 - 2110.
56. Anne M Holbrook, Jennifer A Pereira, Renee Labiris, Heather McDonald, James D Douketis, Mark Crowther, Philip S Wells. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. Archives of internal medicine. 2005. 165(10). 1095-106.

57. Sibylle Zschocke, Jiang-Hua Liu, Hermann Stuppner, Rudolf Bauer. Comparative study of roots of *Angelica sinensis* and related umbelliferous drugs by thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography, and liquid chromatography - mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 1998. 9 (6). 283-290.
58. Sylvia Vogl, Martin Zehl, Paolo Picker, Ernst Urban, Christoph Wawrosch, Gottfried Reznicek, Johannes Saukel, Brigitte Kopp. Identification and quantification of coumarins in *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS. *J Agric Food Chem*. 2011.59(9). 4371-4337.
59. David L. Dreyer. Alson Lee. Constituents of *Cneoridium dumosum* (Nutt.) Hook. F. *Phytochemistry*. 1969. 8(8). 1499-1501.
60. Hai-Bo Yang, Hui-Ru Gao, Yuan-Jing Ren, Fei-Xiang Fang, Hong-Tao Tian, Zhen-Jiang Gao, Wei Song, Shao-Min Huang, An-Fang Zhao. Effects of isoimperatorin on proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2018. 15(5). 7993 - 7998.
61. Charith U B Wijerathne, Chang-Seob Seo, Ji-Won Song, Hee-Seon Park, Og-Sung Moon, Young-Suk Won, Hyo-Jung Kwon, Hwa-Young Son. Isoimperatorin attenuates airway inflammation and mucus hypersecretion in an ovalbumin-induced murine model of asthma. *Int Immunopharmacol*. 2017. 49. 67-76.
62. Hwang YH, Yang HJ, Ma JY. Simultaneous determination of three furanocoumarins by UPLC/MS/MS: Application to pharmacokinetic study of *Angelica dahurica* radix after oral administration to normal and experimental Colitis-induced rats. *Molecules*. 2017. 22(3). 416.

63. Wijerathne CUB, Seo CS, Song JW, Park HS, Moon OS, Won YS, Kwon HJ, Son HY. Isoimperatorin attenuates airway inflammation and mucus hypersecretion in an ovalbumin-induced murine model of asthma. *Int Immunopharmacol*. 2017. 49. 67 - 76.
64. Pokharel YR, Han EH, Kim JY, Oh SJ, Kim SK, Woo ER, Jeong HG, Kang KW. Potent protective effect of isoimperatorin against aflatoxin B1-inducible cytotoxicity in H4IIE cells. Bifunctional effects on glutathione S-transferase and CYP1A. *Carcinogenesis*. 2006. 27. 2483 - 2490.
65. Xiaoxia Zhang, Wenchao Li, Aikebaier Abudureheman, Tao Cheng, and Peng Peng. Imperatorin possesses notable anti-inflammatory activity in vitro and in vivo through inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. *Mol Med Rep*. 2017. 16(6). 8619 - 8626.
66. Ma, T. Liu, P. Wei, J. Zhao, M. Yao, X. Luo, X. Xu, S. Imperatorin alleviated endometriosis by inhibiting the activation of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway in rats. *Life Sci*. 2021, 274, 119291.
67. Sergio Rosselli 1, Antonella Maggio, Gabriella Bellone, Carmen Formisano, Adriana Basile, Carla Cicala, Alessio Alfieri, Nicola Mascolo, Maurizio Bruno. Antibacterial and anticoagulant activities of coumarins isolated from the flowers of *Magydaris tomentosa*. *Planta Med*. 2007. 73(2). 116-120.
68. I S Chen 1, C T Chang, W S Sheen, C M Teng, I L Tsai, C Y Duh, F N Ko. Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from *Formosan Puceledanum japonicum*. *Phytochemistry*. 1996 Feb. 41(2). 525-530.

69. Jarogniew J Luszczki 1, Ewa Wojda, Grzegorz Raszewski, Kazimierz Główniak, Stanisław J Czuczwar. Influence of imperatorin on the anticonvulsant activity and acute adverse-effect profile of lamotrigine in maximal electroshock-induced seizures and chimney test in mice. *Pharmacol Rep.* 2008. 60(4). 566-573.
70. Kang, J.-K. Chung, Y.-C. Hyun, C.-G. Anti-Inflammatory Effects of 6-Methylcoumarin in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages via Regulation of MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *Molecules.* 2021. 26. 5351.
71. Lee, Y.; Hyun, C.-G. Mechanistic Insights into the Ameliorating Effect of Melanogenesis of Psoralen Derivatives in B16F10 Melanoma Cells. *Molecules.* 2022. 27. 2613.
72. Deng Y, Yang L. Effect of *Angelica sinensis*(Oliv.) on melanocytic proliferation, melanin synthesis and tyrosinase activity in vitro. *Academic Journal of the First Medical College of PLA.* 2003. 23. 239-241.
73. Bijun Zeng, Kai Li, Zhibo Yang, Haizhen Wang, Chang Wang, Pan Huang, Yi Pan. Isoimperatorin (ISO) reduces melanin content in keratinocytes via miR-3619/CSTB and miR-3619/CSTD axes, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2020. 84. 1436-1443.
74. Lee Y, Hyun C-G. Mechanistic Insights into the Ameliorating Effect of Melanogenesis of Psoralen Derivatives in B16F10 Melanoma Cells. *Molecules.* 2022. 27(9). 2613.
75. Li Yin Guangxian Pang Chao Niu Maidina Habasi Jun Dou Haji Akber Aisa. A novel psoralen derivative-MPFC enhances melanogenesis via activation

n of p38 MAPK and PKA signaling pathways in B16 cells. International Journal of Molecular Medicine. 2018. 41(6).

76. Donata, Kesavan M, Austin, Mohan KS, Rajagopalan K and Kuttan R: Clinical trial of certain ayurvedic medicines indicated in vitiligo. Anc Sci Life. 9:202 - 206. 1990.

77. Lotti T, Zanardelli M and D'Erme AM: Vitiligo. What's new in the psycho-neuro-endocrine-immune connection and related treatments. Wien Med Wochenschr. 2014. 164:278 - 285.