



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](#)

Inhibitory Effects of
2'-Hydroxy-Dimethoxychalcones
on Inflammation and Melanogenesis
in Mouse Cell Lines

이 논문을 이학 석사 학위논문으로 제출함

배 성 민

제주대학교 대학원

화학과

지도교수 현창구

배성민의 이학 석사 학위논문을 인준함

2023년 6월

심사위원장	윤 경 섭 인
위 원	박 경 순 인
위 원	현 창 구 인



Inhibitory Effects of
2'-Hydroxy-Dimethoxychalcones
on Inflammation and Melanogenesis
in Mouse Cell Lines

A Thesis submitted to the graduate school of
Jeju National University in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Master of Science
under the supervision of **Chang-Gu Hyun**

The thesis for the degree of Master of Science
by **Sung-Min Bae**
has been approved by the dissertation committee.

2023. 06.

Chair K y u n g - S u p Y o o n

Member K y u n g s o o n P a r k

Member C H A N G - G U H Y U N

목 차

요약	1
LIST OF FIGURES	3
LIST OF TABLES	9
I. 서론	10
II. 재료 및 방법	18
1. 시료 및 시약	18
2. 실험 방법	20
2.1. 세포 배양	20
2.2. 세포 생존율	21
2.3. Nitric oxide (NO) 생성량 측정	23
2.4. Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) 및 전염증성 cytokine 생성량 측정	24
2.5. Melanin contents 측정	25
2.6. 세포 내 tyrosinase activity 측정	26
2.7. Western blot	27
3. 인체피부 일차자극 시험	28
4. 통계처리	29
III. 결과	30
1. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 항염증 효과 비교	30
1.1. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 Cell viability 측정	30
1.2. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 NO production 측정	30
2. RAW 264.7 세포에서 4',6'-DMC의 항염증 효과	33



2.1. 전염증성 cytokine production 측정	33
2.2. Western blot	35
2.2.1. RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 4',6'-DMC 영향	35
2.2.2. RAW 264.7 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향	35
2.2.3. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향	38
2.2.4. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 핵 전위에 대한 4',6'-DMC 영향	38
3. B16F10 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 멜라닌 생성 억제 효과 비교 ...	41
3.1. B16F10 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 Cell viability 측정	41
3.2. Melanin contents 및 Tyrosinase 활성에 대한 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 영향 ..	41
4. B16F10 세포에서 4',6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 효과	45
4.1. Western blot	45
4.1.1. B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소 및 MITF 발현에 대한 4',6'-DMC 영향	45
4.1.2. B16F10 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향	48
4.1.3. B16F10 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향	50
4.1.4. B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향	52
4.1.5. B16F10 세포에서 cAMP/PKA 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향	52
5. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 항염증 효과 비교	55
5.1. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 Cell viability 측정	55
5.2. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 NO production 측정	55
6. RAW 264.7 세포에서 2,6'-DMC의 항염증 효과	58
6.1. PGE ₂ 및 전염증성 cytokine production 측정	58
6.2. Western blot	60
6.2.1. RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 2,6'-DMC 영향	60
6.2.2. RAW 264.7 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향	60
6.2.3. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향	63

6.2.4. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 핵 전위에 대한 2,6'-DMC 영향	63
7. B16F10 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 멜라닌 생성 억제 효과 비교	66
7.1. B16F10 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 Cell viability 측정	66
7.2. Melanin contents 및 Tyrosinase 활성에 대한 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 영향	66
8. B16F10 세포에서 2,6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 효과	70
8.1. Western blot	70
8.1.1. B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소 및 MITF 발현에 대한 2,6'-DMC 영향	70
8.1.2. B16F10 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향	73
8.1.3. B16F10 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향	73
8.1.4. B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향	76
8.1.5. B16F10 세포에서 cAMP/PKA 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향	76
9. RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 항염증 효과	79
9.1. RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 Cell viability 측정	79
9.2. RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 NO production 측정	79
9.3. PGE ₂ 및 전염증성 cytokine production 측정	82
9.4. Western blot	84
9.4.1. RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 3,6'-DMC 영향	84
9.4.2. RAW 264.7 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향	84
9.4.3. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향	87
9.4.4. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 핵 전위에 대한 3,6'-DMC 영향	87
10. B16F10 세포에서 3,6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 효과	90
10.1. B16F10 세포에서 3,6'-DMC의 Cell viability 측정	90
10.2. Melanin contents 및 Tyrosinase 활성에 대한 3,6'-DMC의 영향	90
10.3. Western blot	94
10.3.1. B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소 및 MITF 발현에 대한 3,6'-DMC 영향	94

10.3.2. B16F10 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향	97
10.3.3. B16F10 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향	99
10.3.4. B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향	101
10.3.5. B16F10 세포에서 cAMP/PKA 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향	101
11. 인체피부 일차자극 시험	104
IV. 고찰	105
V. 참고 문헌	115
Abbreviations	134
Abstract	136

마우스 세포에서 염증 및 멜라닌 생성에 대한 2'-Hydroxy-Dimethoxychalcones의 억제 효과

배 성 민

제주대학교 대학원 화학과

요약

Chalcone은 식용 식물에 풍부하며 항암, 항균, 항산화 등 다양한 생물학적 활성을 나타내는 플로보노이드 전구체이다. 칼콘 유사체의 합성 및 생물학적 평가에 관한 성공 사례가 꾸준히 보고되면서 이러한 화합물과 의약 응용 분야에서의 활용 가능성에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러나 2'-hydroxy-dimethoxychalcone이 염증과 멜라닌 생성에 미치는 영향은 아직 명확하게 규명되지 않았다. 따라서 이 연구의 목적은 2'-hydroxy-3,4'-dimethoxychalcone (3,4'-DMC), 2'-hydroxy-4,4'-dimethoxychalcone (4,4'-DMC), 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxychalcone (3',4'-DMC), 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (4',6'-DMC), 2'-hydroxy-2,4-dimethoxychalcone (2,4-DMC), 2'-hydroxy-2,5'-dimethoxychalcone (2,5'-DMC), 2'-hydroxy-2,6'-dimethoxychalcone (2,6'-DMC) 및 2'-hydroxy-3,6'-dimethoxychalcone (3,6'-DMC)의 항염증 및 멜라닌 생성 억제 효과를 평가하는 것이다. 2'-hydroxy-dimethoxychalcone 유도체 중 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC는 강력한 항염증과 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내었다. 여러 생물학적 분석에서 확인된 바와 같이 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC는 세포 독성을

나타내지 않았으며 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC로 처리하면 LPS에 의해 유도된 NO, 염증성 cytokine 및 iNOS, COX-2 단백질 발현 수준이 감소하는 것으로 나타났다. 종합적으로 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC는 NF-kB, p38, ERK 단백질 인산화 및 NF-kB/p65의 핵 전위를 감소시켜 LPS에 의한 손상을 약화시키는 것으로 나타났다. 또한 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 효소의 발현을 감소시켰을 뿐만 아니라 MITF, GSK-3 β , β -catenin, AKT, PKA, CREB, p38 및 JNK의 하향조절과, ERK 및 p- β -catenin의 상향 조절을 통해 B16F10 흑색종 세포에서 멜라닌 함량 및 세포 내 tyrosinase 활성을 감소시켰다. 마지막으로 인체 피부 일차자극 시험을 통해 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC의 국소 적용 가능성을 확인한 결과, 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC는 저자극으로 판단되어 부작용을 유발하지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC가 피부 질환 치료법에 새로운 시사점을 제공할 수 있음을 보여준다.

LIST OF FIGURES

Figure 1. Signaling pathways to regulate inflammation in RAW 264.7 cells. ...	11
Figure 2. Melanin synthesis pathway.	13
Figure 3. Signaling pathways for the regulation of melanogenesis in B16F10 cells.	15
Figure 4. Structures of 2'-hydroxy-dimethoxychalcone derivatives.	17
Figure 5. MTT assay: Cell viability cytotoxicity.	22
Figure 6. Nitric oxide production assay.	23
Figure 7. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on the cell viability in LPS induced RAW 264.7 cells.	31
Figure 8. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells.	32
Figure 9. Effect of 4',6'-DMC on production of pro-inflammatory cytokines in LPS induced RAW 264.7 cells.	34
Figure 10. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of iNOS and COX-2 in LPS induced RAW 264.7 cells.	36
Figure 11. Effect of 4',6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in LPS induced RAW 264.7 cells.	37

Figure 12. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of p-I κ B- α in LPS induced RAW 264.7 cells.	39
Figure 13. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of NF- κ B (p65) in LPS induced RAW 264.7 cells.	40
Figure 14. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on the cell viability in B16F10 melanoma cells.	42
Figure 15. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on the melanin contents in B16F10 melanoma cells.	43
Figure 16. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on the tyrosinase activitys in B16F10 melanoma cells.	44
Figure 17. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of TRP-1, TRP-2 and TYR in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	46
Figure 18. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	47
Figure 19. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of β -catenin, p-GSK3 β and p- β -catenin in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	50
Figure 20. Effect of 4',6'-DMC on on phosphorylation expression of AKT in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	51
Figure 21. Effect of 4',6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in	

α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	53
Figure 22. Effect of 4',6'-DMC on phosphorylation expression of CREB and PKA in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	54
Figure 23. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones on the cell viability in LPS induced RAW 264.7 cells.	56
Figure 24. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells.	57
Figure 25. Effect of 2,6'-DMC on production of PGE ₂ and pro-inflammatory cytokines in LPS induced RAW 264.7 cells.	59
Figure 26. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of iNOS and COX-2 in LPS induced RAW 264.7 cells.	61
Figure 27. Effect of 2,6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in LPS induced RAW 264.7 cells.	62
Figure 28. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of p-I κ B- α in LPS induced RAW 264.7 cells.	64
Figure 29. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of NF- κ B (p65) in LPS induced RAW 264.7 cells.	65
Figure 30. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones derivatives on the cell viability in B16F10 melanoma cells.	67

Figure 31. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones on the melanin contents in B16F10 melanoma cells.	68
Figure 32. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones on the tyrosinase activities in B16F10 melanoma cells.	69
Figure 33. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of TRP-1, TRP-2 and TYR in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	71
Figure 34. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	72
Figure 35. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of β -catenin and p-GSK3 β in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	74
Figure 36. Effect of 2,6'-DMC on phosphorylation expression of AKT in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	75
Figure 37. Effect of 2,6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	77
Figure 38. Effect of 2,6'-DMC on phosphorylation expression of CREB and PKA in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	78
Figure 39. Effect of 3,6'-DMC on the cell viability in LPS induced RAW 264.7 cells.	80
Figure 40. Effect of 3,6'-DMC on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells.	81

Figure 41. Effect of 3,6'-DMC on production of PGE ₂ and pro-inflammatory cytokines in LPS induced RAW 264.7 cells.	83
Figure 42. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of iNOS and COX-2 in LPS induced RAW 264.7 cells.	85
Figure 43. Effect of 3,6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in LPS induced RAW 264.7 cells.	86
Figure 44. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of p-IkB-α and IkB-α in LPS induced RAW 264.7 cells.	88
Figure 45. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of NF-κB (p65) in LPS induced RAW 264.7 cells.	89
Figure 46. Effect of 3,6'-DMC on the cell viability in B16F10 melanoma cells.	91
Figure 47. Effect of 3,6'-DMC on the melanin content in B16F10 melanoma cells.	92
Figure 48. Effect of 3,6'-DMC on the tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells.	93
Figure 49. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of TRP-1, TRP-2 and TYR in α-MSH induced B16F10 melanoma cells.	95
Figure 50. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of MITF in α-MSH	

induced B16F10 melanoma cells.	96
Figure 51. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of β -catenin, p-GSK3 β and p- β -catenin in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	98
Figure 52. Effect of 3,6'-DMC on on phosphorylation expression of AKT in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	100
Figure 53. Effect of 3,6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	102
Figure 54. Effect of 3,6'-DMC on phosphorylation expression of CREB and PKA in α -MSH induced B16F10 melanoma cells.	103
Figure 55. Inflammatory signaling pathways regulated by 4',6'-DMC.	112
Figure 56. Melanogenesis signaling pathways regulated by 4',6'-DMC.	112
Figure 57. Inflammatory signaling pathways regulated by 2,6'-DMC.	113
Figure 58. Melanogenesis signaling pathways regulated by 2,6'-DMC.	113
Figure 59. Inflammatory signaling pathways regulated by 3,6'-DMC.	114
Figure 60. Melanogenesis signaling pathways regulated by 3,6'-DMC.	114

LIST OF TABLES

Table 1. Grading system for skin primary irritation test.	28
Table 2. Determination criteria for skin primary irritation.	29
Table 3. Results of 4',6'-DMC and 3,6'-DMC on human skin primary irritation test.	104
Table 4. Results of 2,6'-DMC on human skin primary irritation test. ...	104

I. 서론

염증은 인체에 발생하는 흔한 질환 중 하나로 외부에서 유입된 유해 물질에 대항하기 위한 인체의 생화학적 생리적 반응이다[1]. 가장 흔한 유해 물질은 바이러스, 박테리아, 세균, 곰팡이 등의 병원균과 이러한 병원균이 방출하는 독소이다[2]. 염증은 발병 시점에 따라 급성 또는 만성 반응으로 분류할 수 있다[3]. 급성 염증은 유해한 자극에 대한 일차적인 세포 반응이며 손상된 조직, 국소 혈관 및 면역 반응에 의해 생성된다[1]. 반면 만성 염증은 염증 반응으로 인해 손상된 조직이 점진적으로 파괴되고 회복되는 것을 특징으로 하는 병리학적인 상태이다[4]. 따라서 만성 염증이 과도하게 지속되면 동맥경화, 알레르기, 천식, 만성폐쇄성폐질환, 염증성 장질환, 건선, 류마티스 관절염 등 여러 장기에 심각한 염증성 질환을 유발할 수 있다[5-6].

그람 음성 박테리아 외막의 주요 성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 염증을 조절하는 뛰어난 기능을 가지고 있으며, *in vitro*에서 대식세포의 염증 관련 모델을 개발하는 데 널리 사용된다[7-8]. 대식세포는 인체의 모든 조직 내에 분포하고 있으며 선천성, 후천성 면역반응에 관여하여 급성 및 만성 염증 반응의 조절에 중요한 역할을 한다[9-11]. 또한, 연구에 따르면 RAW 264.7 마우스 대식세포가 일반적으로 시험관 내에서 항염증 대식세포 모델로 적합하다고 고려되고 있다[12].

대식세포는 세포 표면의 toll-like receptors (TLRs)를 통해 병원체를 검출하고, interleukin (IL)-6, IL-1 β , TNF- α 를 포함한 전 염증성 사이토카인(cytokine)과 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 생성되는 reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂) 등과 같은 염증 매개체의 과다 생산과 관련된 염증 질환에서 중요한 역할을 수행한다[13-15]. 대식세포에서 염증 매개체의 생산은 TLRs 중 하나인 toll-like receptor 4 (TLR4)와 LPS가 반응하여 나타난다[16]. 따라서 이러한 염증 매개체의 생성을 억제하는 것은 염증성 질환 치료의 중요한 목표이다.

Nuclear factor κ B (NF- κ B)는 LPS의 자극으로 iNOS 및 COX-2 유전자 발현을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타난다[17]. NF- κ B 전사인자는 세포질 내에서 p50, p65 subunits으로 구성되어 있으며 억제 분자 inhibitor κ B- α (IkB-

α)와 결합을 통해 비활성 상태로 존재한다[18-19]. NF- κ B는 산화 또는 방사선 스트레스, 염증성 사이토카인, LPS 및 성장 인자와 같은 외인성 자극에 의해 활성화될 수 있다[20]. NF- κ B가 활성화되면, I κ B- α 는 I κ B kinase (IKK) 복합체에 의해 인산화되어 유비퀴틴화 및 분해가 일어난다. [21-22]. I κ B- α 의 분해로 자유로워진 NF- κ B (p50 및 p65)는 세포질에서 핵으로 전위되어 염증 매개체의 생성을 조절한다[23-24].

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 p38 MAPK (p38), extracellular signal-regulated kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 등 세 가지 주요 계열로 구성된다[25]. MAPK는 염증 매개체, 세포의 생존, 성장, 사멸, 산화적 스트레스 등과 같은 여러 생물학적 과정을 조절하는데 중요한 역할을 한다[26-28]. MAPK 신호 전달 경로는 interleukin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), iNOS, COX-2를 포함하는 염증 유발 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 따라서 NF- κ B 및 MAPK 경로는 다양한 염증성 질환에 대한 치료제 개발의 주요 표적이 된다[29-30].

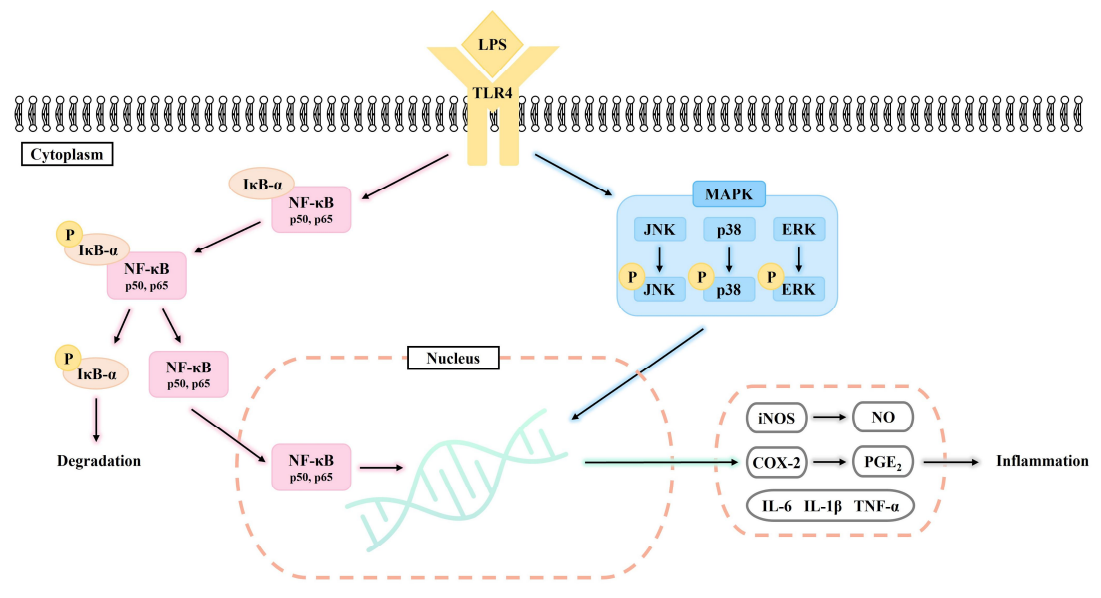


Figure 1. Signaling pathways to regulate inflammation in RAW 264.7 cells.

인간의 피부색은 주로 피부 내에 존재하는 멜라닌(brown), 카로틴(yellow), 헤모글로빈(red)과 같은 색소들에 의하여 좌우되며 이러한 색소들의 발현은 유전적인 요인 외에도 자외선, 피로, 스트레스, 호르몬과 같은 환경적인 인자에 의해 조절된다. 이 중 가장 큰 영향을 미치는 것이 멜라닌이다[31-35]. 멜라닌은 피부, 모발, 눈에 존재하는 색소로 멜라닌의 양에 따라 피부색이 결정된다[36-37].

멜라닌은 피부 표피의 기저층에 존재하는 색소 세포인 멜라닌 형성 세포(melanocyte)에서 합성되며 melanocyte는 멜라노솜(melanosome)을 포함한다[43-44]. 멜라노솜은 멜라닌 형성 세포 내에 존재하는 세포 소기관으로 멜라닌을 생성하고, 생성된 멜라닌을 주변 각질세포(keratinocyte)로 전달하여 사람의 피부색을 나타내게 된다[45-48].

멜라닌은 유해한 자외선을 흡수하여 자외선으로부터 인체를 보호하고 피부 면역 반응을 조절하는 중요한 역할을 하지만 멜라닌이 과도하게 생성되어 피부에 축적되면 기미, 주근깨, 검버섯 등과 같은 과색소 침착 장애를 유발 할 수 있다[38-42]. 따라서 멜라닌 생성을 조절하는 것은 과색소 침착성 피부 질환을 예방하는데 중요한 부분이다.

멜라닌 합성은 L-tyrosine이 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)로, 그리고 DOPA quinone으로 산화되는 것으로 시작된다. 이 두 반응은 tyrosinase (TYR) 효소 활성화에 의해 촉매되며 DOPA quinone은 DOPA chrome으로 전환되고 eumelanin 또는 pheomelanin을 생성하기 위해 분화된다[49-50]. 먼저, DOPA quinone은 자기 산화를 통해 Leuco DOPA chrome으로 전환되고, 이후 DOPA chrome이 5,6-dihydroxyindole 또는 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)가 되면 최종적으로 흑갈색(brown-black)을 띠는 eumelanin이 합성된다[51-53]. 이 과정에서 tyrosinase related protein-1 (TRP-1)은 DHICA의 산화를 촉매하고, tyrosinase related protein-2 (TRP-2)는 DOPA chrome에서 DHICA로 산화과정을 촉매한다[54-55]. DOPA quinone은 cysteine 또는 glutathione이 존재하면 Cysteinyl DOPA로 전환되고, 이후 산화 중합을 통해 1,4-benzothiazinyl-alanine 중간체를 통해 붉은색(red-yellow)을 띠는 pheomelanin이 합성된다[49].

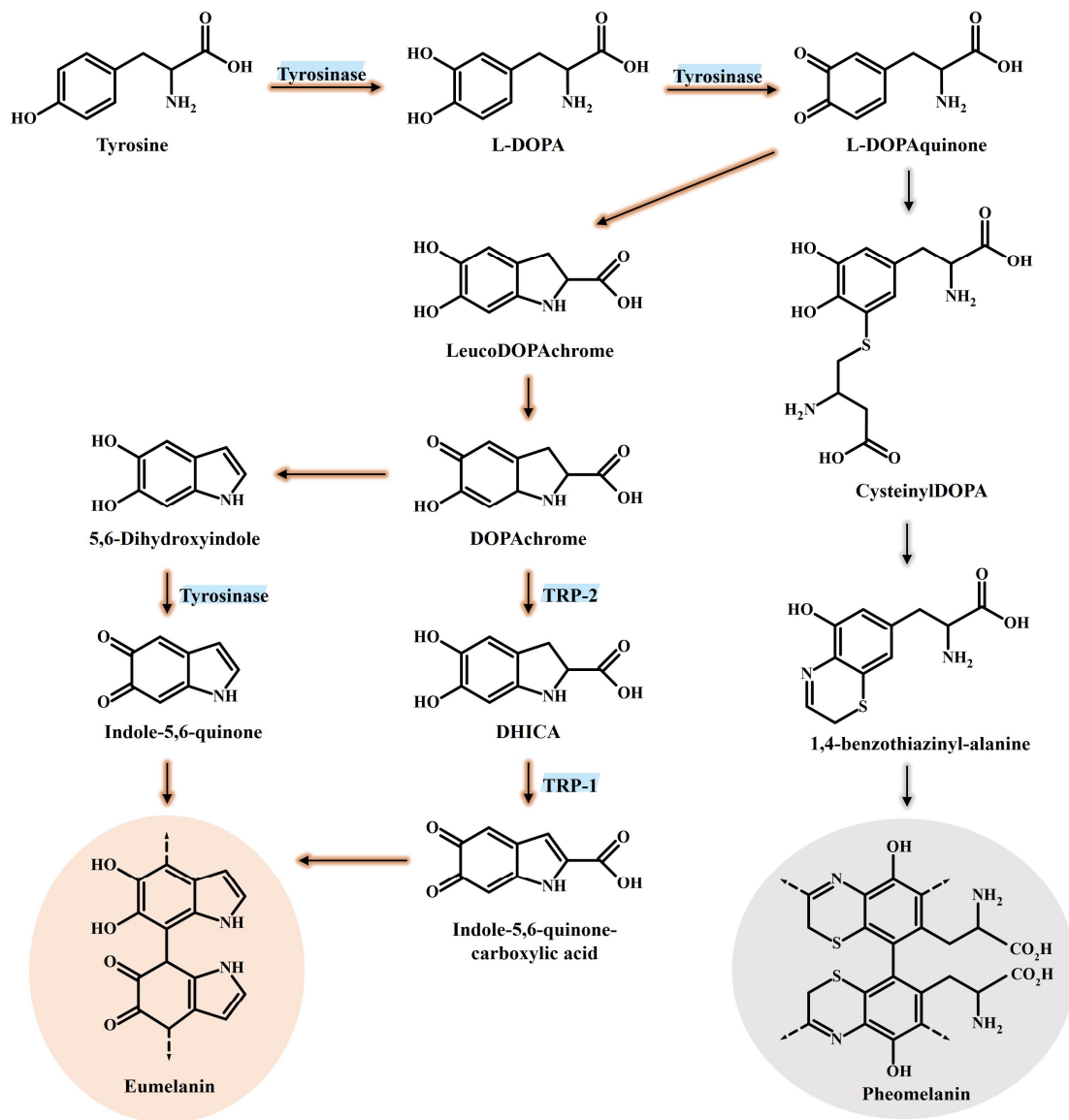


Figure 2. Melanin synthesis pathway.

피부의 각질세포가 자외선과 같은 외부 요인에 의해 자극을 받으면 세포내 α -melanocortin-stimulating hormone (α -MSH)이 분비된다[56-57]. 분비된 α -MSH는 멜라닌 형성 세포에 신호를 전달하여 멜라닌을 생성하는 여러 신호전달 경로를 활성화한다[58-59]. 멜라닌 생성 유전자의 발현을 활성화하는 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 tyrosinase promoter의 핵심 활성화인자로 멜라닌 형성 세포의 분화, 증식, 생존에 중요한 역할을 한다[60]. MITF는 TRP-1, TRP-2, tyrosinase promoter의 M-box에 결합하여 단백질의 발현을 유도하고 멜라닌 생성을 조절한다[61-63]. 따라서 MITF, TYR, TRP-1, TRP-2와 같은 여러 주요 효소 및 조절 인자의 활성을 억제하는 것은 멜라닌 생성 억제제 개발의 중요한 전략으로 간주된다.

MITF의 발현과 관련된 신호전달경로는 다음과 같다. Wnt/ β -catenin 신호전달경로는 frizzled (Fz) 수용체의 활성화, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)의 비활성화 및 β -catenin 축적을 통해 MITF 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다[64-66]. Fz 수용체가 자극을 받으면 serine (Ser) 9번 잔기의 인산화된 GSK3 β (inactivation)는 비활성화되고, 세포질에서 β -catenin의 축적을 유도한다[67-68]. 축적된 β -catenin은 핵으로 이동하여 T-cell factor (TCF) 및 lymphoid-enhancing factor (LEF)와 복합체를 형성하여 MITF 발현을 증가시킨다[68-69]. 또한 tyrosine 216번 잔기의 인산화된 GSK3 β (activation)는 활성화되어 β -catenin의 인산화를 유도하고, 유비퀴틴화(ubiquitination) 및 분해(degradation)를 일으킴으로써 MITF의 발현을 감소시킨다[70-72].

GSK3 β 의 인산화에는 Wnt 신호와 protein kinase B (AKT)가 모두 관여하는 것으로 알려져 있다[73]. 인슐린 및 기타 성장 인자는 phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 경로를 통해 Ser 473번 잔기에서 AKT를 인산화 시키고, 인산화된 AKT는 Ser 9번 잔기에서 GSK3 β 의 인산화를 통해 비활성하여 결론적으로 MITF의 발현을 증가시킨다[74-75].

Stem cell factor (SCF)는 세포막의 c-kit와 결합하여 Mitogen-activated protein kinases (MAPK)의 활성을 조절하여 멜라닌 생성 및 억제에 관여한다[76-79]. 다양한 세포 활동에 관여하는 MAPK는 extracellular-signal regulated kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK (p38)로 구성되어

있다[80]. MAPK 신호전달 경로 또한 MITF의 발현 및 활성화에 영향을 미치기 때문에 멜라닌 합성의 중요한 조절인자 중 하나이다[81]. SCF와 c-kit 결합에 의한 ERK의 인산화는 serine 73번 잔기에서 MITF를 인산화시켜 분해를 유도함으로써 결론적으로 멜라닌의 합성을 감소시키는 반면, JNK와 p38의 인산화는 멜라닌의 합성을 증가시킨다[81-83].

α -MSH의 생성이 증가하여 멜라닌세포 수용체인 melanocortin receptor 1 (MC1R)에 결합하면 세포 내 adenylate cyclase (AC)를 활성화하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 수준을 증가시킨다[84-86]. cAMP의 증가로 인해 protein kinase A (PKA)가 활성화되면 cAMP response element-binding protein (CREB)를 인산화하여 활성을 유도하고 전사인자인 MITF의 발현을 증가시켜 결론적으로 멜라닌의 생성을 촉진한다[87-89].

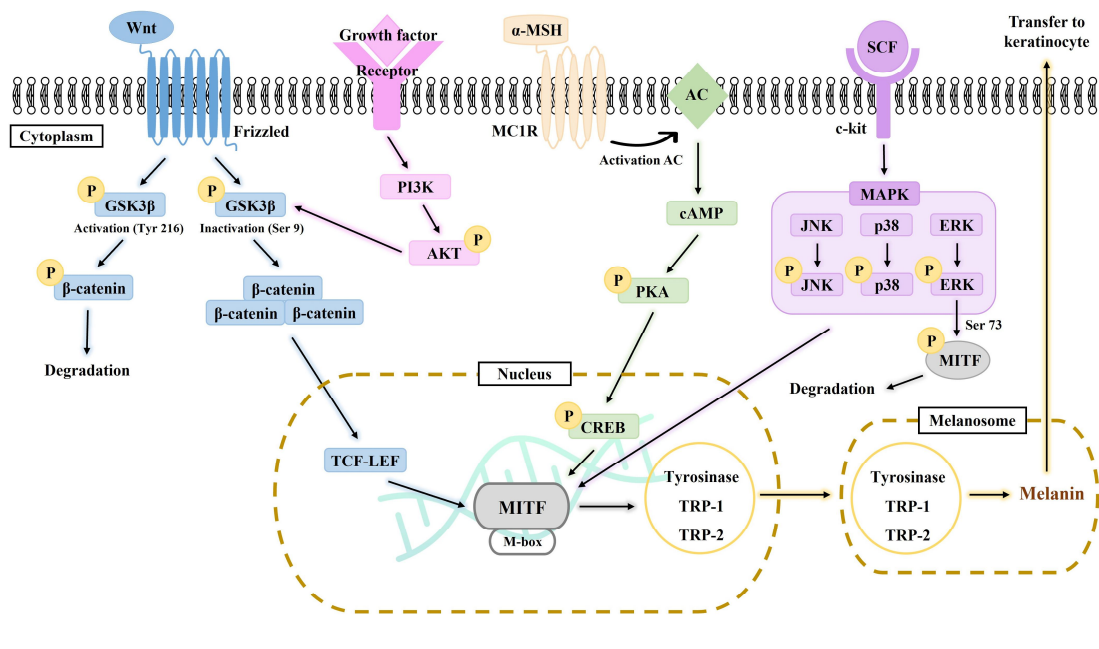


Figure 3. Signaling pathways for the regulation of melanogenesis in B16F10 cells.

Chalcone은 치환체 배열이 다른 두 개의 고리를 가진 α,β -불포화 케톤으로 chalcone에서 두 개의 고리는 3개의 지방족 탄소로 연결된다[90]. chalcone은 식용 및 약용 식물에 풍부하게 함유되어 있으며 천연 공급원에서 공급되어 플라보노이드와 이소플라보노이드의 전구체로 간주된다[90-93]. 간단한 화학 구조와 편리한 합성의 결과로 많은 chalcone 유도체가 제조되어 다양한 생물학적 계열에서 항염증[94-95], 항산화[96], 항암[97-98], 항균[99], α -glucosidase 저해 효과[100] 및 면역조절[101]과 같은 광범위한 활성을 나타낸다. Chalcone 골격을 기반으로 다양한 약리학적 특성을 가진 화합물들이 개발되었으며, 임상 시험에 따르면 이러한 독성을 일으키지 않는 농도에서 적절한 혈장 농도에 도달하는 것으로 나타났다[102]. Chalcone 유사체의 합성 및 생물학적 평가에 관한 성공 사례가 꾸준히 보고됨에 따라 이러한 화합물과 의약 응용 분야에서 잠재적 사용에 대한 관심이 증가하고 있다[103]. 그러나 2'-hydroxychalcone에 methoxy기가 붙은 구조가 염증 및 멜라닌 생성에 미치는 영향과 그에 따른 메커니즘은 아직 명확하게 규명되지 않았다. 따라서 이 연구의 목적은 2'-hydroxy-3,4'-dimethoxychalcone (3,4'-DMC), 2'-hydroxy-4,4'-dimethoxychalcone (4,4'-DMC), 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxychalcone (3',4'-DMC), 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (4',6'-DMC), 2'-hydroxy-2,4-dimethoxychalcone (2,4-DMC), 2'-hydroxy-2,5'-dimethoxychalcone (2,5'-DMC), 2'-hydroxy-2,6'-dimethoxychalcone (2,6'-DMC) 및 2'-hydroxy-3,6'-dimethoxychalcone (3,6'-DMC)의 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과와 B16F10 세포에서 멜라닌 생성 억제 효과를 평가하고자 한다. 또한, 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC는 강력한 항염증 및 멜라닌 생성 억제 효과를 나타냄으로써, 그에 따른 신호전달 경로를 확인하고자 한다.

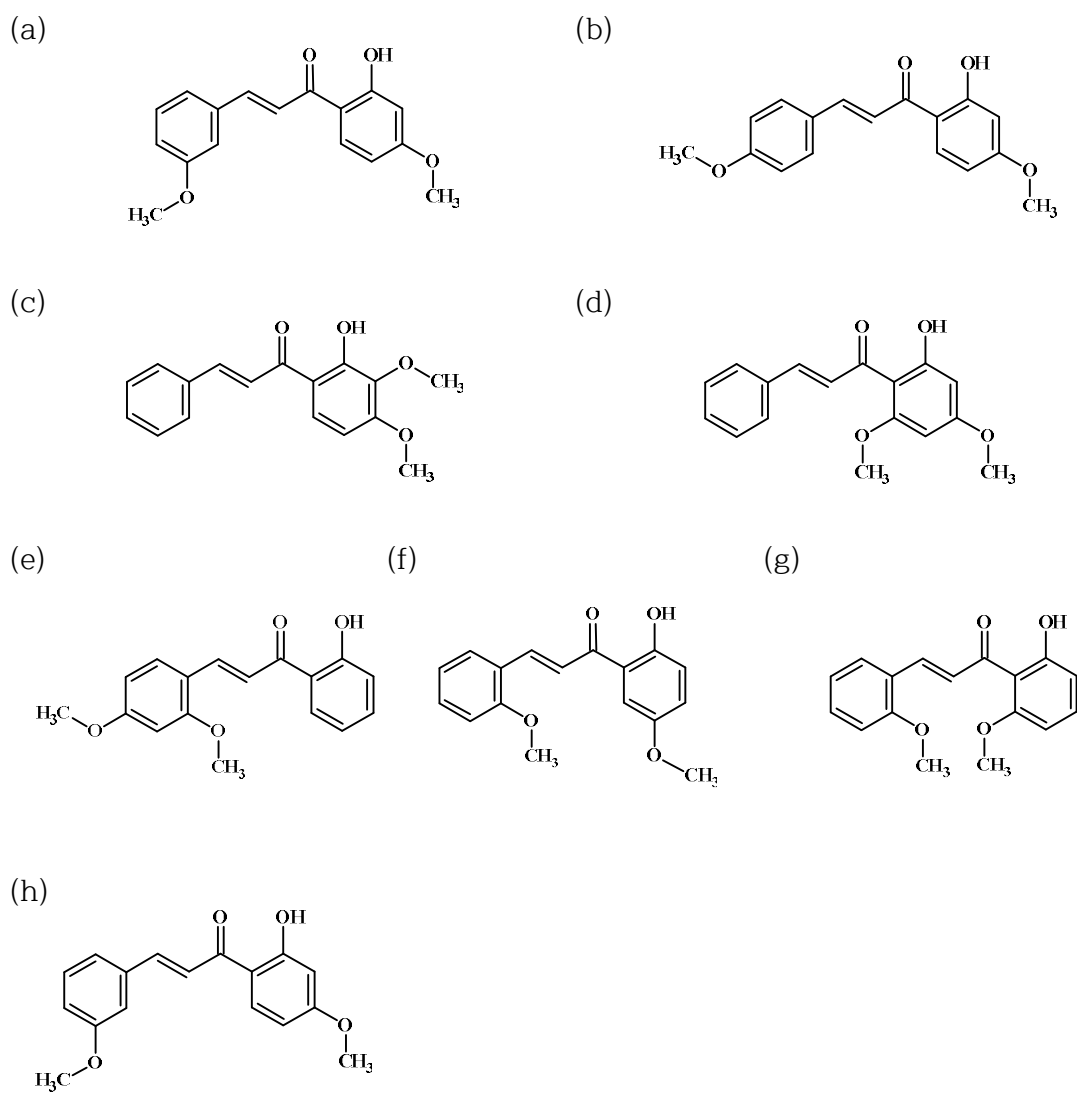


Figure 4. Structures of 2'-hydroxy-dimethoxychalcone derivatives.

- (a) 2'-hydroxy-3,4'-dimethoxychalcone (3,4'-DMC),
 (b) 2'-hydroxy-4,4'-dimethoxychalcone (4,4'-DMC),
 (c) 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxychalcone (3',4'-DMC),
 (d) 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (4',6'-DMC),
 (e) 2'-hydroxy-2,4-dimethoxychalcone (2,4-DMC),
 (f) 2'-hydroxy-2,5'-dimethoxychalcone (2,5'-DMC),
 (g) 2'-hydroxy-2,6'-dimethoxychalcone (2,6'-DMC),
 (h) 2'-hydroxy-3,6'-dimethoxychalcone (3,6'-DMC)

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin/streptomycin (P/S), 10X Trypsin-EDTA(0.5%), bicinchoninic acid (BCA) protein kit, NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Fetal Bovine serum (FBS)은 Merck Millipore (Burlington, MA, United States)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate (SDS), tris-buffered Saline (TBS), phosphate buffered saline (PBS), radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer, enhanced chemiluminescence (ECL) kit는 Biosesang (Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다. 3,4'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone (3,4'-DMC), 4,4'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone (4,4'-DMC), 3',4'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone (3',4'-DMC), 4',6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone (4',6'-DMC), 2,4-dimethoxy-2'-hydroxychalcone (2,4-DMC), 2,5'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone (2,5'-DMC), 2,6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone (2,6'-DMC), 3,6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone (3,6'-DMC), Lipopolysaccharide from Escherichia coli (LPS), α -Melanocyte-Stimulating hormone (α -MSH), griess reagent, protease inhibitor cocktail, sodium hydroxide (NaOH), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. L-N6-(1-Iminoethyl)lysine dihydrochloride (L-NIL)과 N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methane sulfonamide (NS-398)는 Cayman chemical company (Ann Arbor, MI, 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. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit 중 PGE₂, IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 는 BD

Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다. Western blot을 위해 사용된 1차 항체 중 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, p-CREB, CREB, β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였고, protease/phosphatase inhibitor cocktail과 p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-I κ B- α , I κ B- α , p-AKT, AKT, p-GSK-3 β , GSK-3 β , p- β -catenin, β -catenin, p-PKA, PKA, β -actin, p65, lamin B 그리고 2차 항체 anti-mouse와 anti-rabbit은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 이 외에 Anti-iNOS 항체는 Merck Millipore (Burlington, MA, USA), Anti-COX-2 항체는 BD Biosciences (Franklin Lades, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 실험 방법

2.1. 세포 배양

RAW 264.7 murine macrophage cell은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 세포를 분양받아 사용하였고, B16F10 mouse melanoma cell은 ATCC (The Global Bioresource Center)에서 세포를 분양받아 사용하였다. 세포 배양은 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS)과 1% (v/v) penicillin-streptomycin (P/S)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) media를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건으로 각각 2일, 3일 간격으로 계대배양 하였다.

2.2. 세포 생존율

시료의 세포 독성 범위를 측정하기 위해서 MTT 환원법을 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. MTT 법은 세포 내의 미토콘드리아 (mitochondria)에 존재하는 탈수소효소에 의해 일어나며 수용성인 노란색의 MTT tetrazolium이 비수용성인 보라색의 MTT formazan으로 환원되는 것을 기반으로 한다. 환원되어 형성된 formazan의 양은 생존한 세포의 수에 정비례한다[104]. 따라서 formazan의 농도가 높을수록 세포 생존율이 높다는 것을 의미한다[105].

RAW 264.7 세포는 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 seeding 하여 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 전 배양한 후, 시료를 24시간 동안 처리하였다. 0.2 mg/mL의 MTT 시약을 처리하여 3시간 반응시켰다. Media를 제거하고 각 well 당 DMSO를 800 μ L씩 넣어 환원되어 형성된 보라색 formazan 결정을 용해하고 Spectrophotometric microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

B16F10 세포를 24 well plate에 8.0×10^3 cells/well로 seeding 하여 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 전 배양한 후, 시료를 72시간 동안 처리하였다. 0.2 mg/mL의 MTT 시약을 처리하여 3시간 반응시켰다. Media를 제거하고 각 well 당 DMSO를 500 μ L씩 넣어 환원되어 형성된 보라색 formazan 결정을 용해하고 Spectrophotometric microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

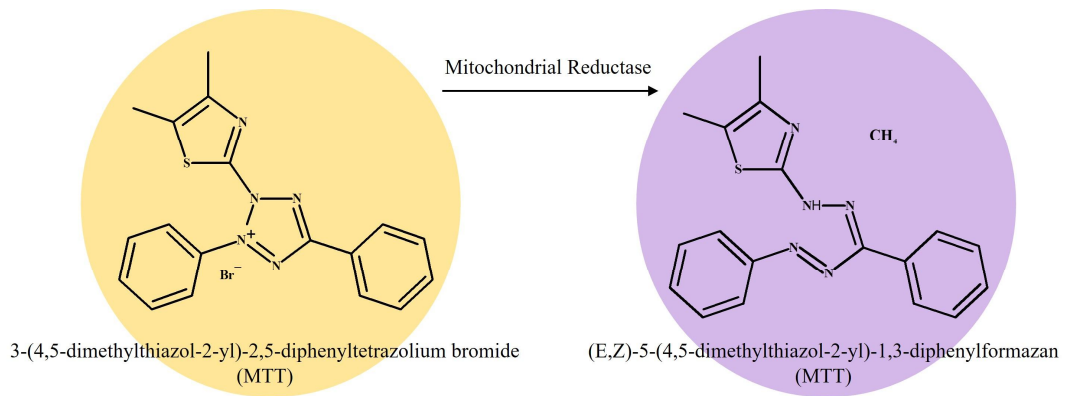


Figure 5. MTT assay: Cell viability cytotoxicity.

2.3. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

시료가 RAW 264.7 대식세포 내에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제하는지 확인하기 위해 세포 배양액에 있는 NO의 양을 Griess reagent를 사용하여 nitric oxide (NO)의 양을 nitrite (NO_2^-)의 형태로 측정하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 seeding 하여 세포 배양 방법에 명시된 조건으로 24시간 전 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, 그리고 양성대조군으로 40 μM L-NIL을 24시간 동안 처리하였다. 이후, 96 well plate에 세포 배양액과 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine, 2.5% phosphoric acid)를 1:1 비율로 혼합하여 10분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

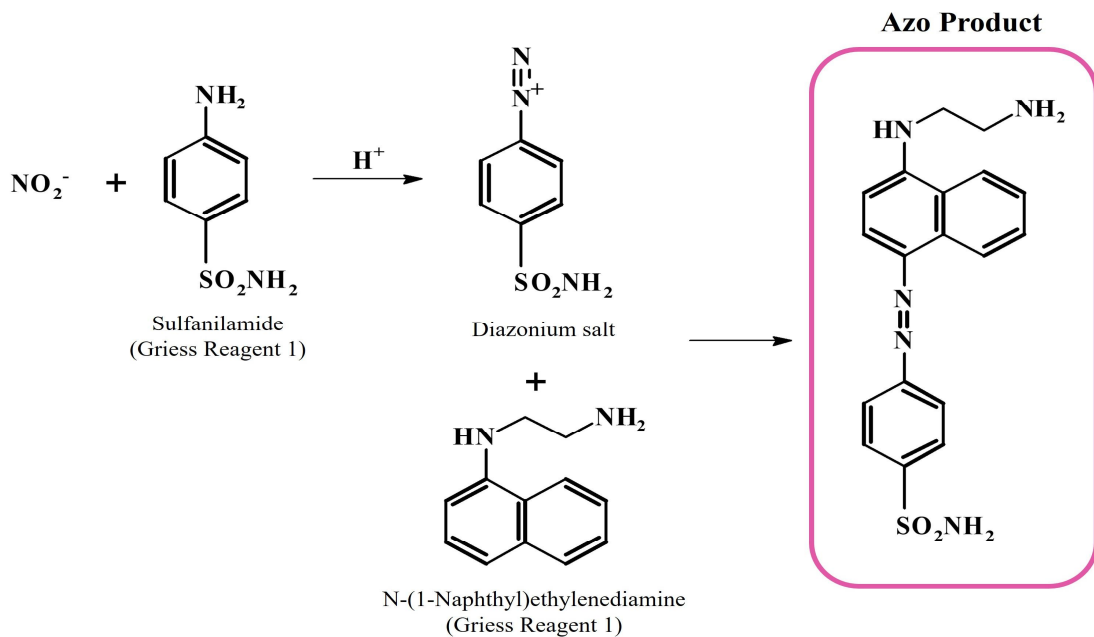


Figure 6. Nitric oxide production assay.

2.4. Prostaglandin E₂ (PGE₂) 및 전염증성 cytokine 생성량 측정

시료가 RAW 264.7 대식세포 내에서 LPS에 의해 유도된 염증 반응 매개체 및 전염증성 cytokine의 생성을 저해하는지 확인하기 위해서 ELISA kit 방법을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 seeding 하여 세포 배양 방법에 명시된 조건으로 24시간 전 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 1 μ g/mL LPS를 24시간 동안 처리하였다. 이후, 각 well의 세포 배양액을 15,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리한 후, 상등액을 얻었다. 상등액을 통해 ELISA kit 제조사의 분석법에 따라 PGE₂, IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 함량을 측정하였다.

2.5. Melanin contents 측정

시료가 B16F10 세포에서 멜라닌 함량에 미치는 영향을 확인하기 위해서 melanin contents assay를 이용하여 측정하였다. B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 7×10^4 cells/dish로 seeding 하여 세포 배양 방법에 명시된 조건으로 24시간 전 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 100 nM α -MSH, 그리고 양성대조군으로 200 μ M의 arbutin을 72시간 동안 처리하였다. 배양 후, media를 제거하고 세포를 1×PBS buffer로 2회 세척하고 lysis buffer (RIPA buffer, 1% protease inhibitor cocktail)를 사용하여 4°C에서 20분 동안 세포를 lysis 하였다. 이후, 1.5 mL e-tube에 옮겨 담아 4°C, 15,000 rpm 조건에서 30분 동안 원심 분리한 후 상등액을 제거하여 pellet을 얻었다. 분리된 pellet을 80°C에서 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 250 μ L에 용해시키고 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -MSH 단독 처리한 군을 기준으로 하여 백분율로 비교 계산하여 나타내었다.

2.6. 세포 내 tyrosinase activity 측정

시료가 B16F10 세포에서 세포 내 tyrosinase activity에 미치는 영향을 확인하기 위해서 melanin contents assay를 이용하여 측정하였다. B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에 7×10^4 cells/dish로 seeding 하여 세포 배양 방법에 명시된 조건으로 24시간 전 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 100 nM α -MSH, 그리고 양성대조군으로 200 μ M의 arbutin을 72시간 동안 처리하였다. 배양 후, media를 제거하고 세포를 1 \times PBS buffer로 2회 세척하고 lysis buffer (RIPA buffer, 1% protease inhibitor cocktail)를 사용하여 4°C에서 20분 동안 세포를 lysis 하였다. 이후, 1.5 mL e-tube에 옮겨 담아 4°C, 15,000 rpm 조건에서 30분 동안 원심 분리하여 상등액을 얻었다. BCA protein assay kit를 사용하여 bovine serum albumin (BSA)의 표준검정 곡선을 작성한 후, 분리된 상등액의 단백질 함량을 측정하고 96 well plate에 20 μ g의 동일한 양으로 단백질을 희석하여 각 well에 단백질 샘플 20 μ L와 2 mg/mL L-DOPA 80 μ L를 혼합하였다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 생성되는 DOPA chrome을 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -MSH 단독 처리한 군을 기준으로 하여 백분율로 비교 계산하여 나타내었다.

2.7. Western blot

RAW 264.7 세포는 60 mm cell culture dish에 6.0×10^5 cells/dish로 seeding 하여 세포 배양 방법에 명시된 조건으로 전 배양하였다. 다양한 농도의 시료와 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS를 처리한 후 target 단백질의 발현 시간에 따라 배양하였다.

B16F10 세포는 60 mm cell culture dish에 7.0×10^4 cells/dish로 seeding 하여 세포 배양 방법에 명시된 조건으로 전 배양하였으며, 다양한 농도의 시료와 100 nM α -MSH를 처리한 후 각 단백질 발현 시간에 따라 배양하였다.

배양 후, media를 제거하고 cold 1 \times PBS buffer로 1회 세척하고 lysis buffer (RIPA buffer, 1% protease inhibitor cocktail)를 사용하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안 세포를 lysis 하였다. 이후, 1.5 mL e-tube에 옮겨 담아 4 $^{\circ}\text{C}$, 15,000 rpm 조건에서 30분 동안 원심 분리하여 상등액을 얻었다. BCA protein assay kit를 사용하여 bovine serum albumin (BSA)의 표준검정 곡선을 작성한 후, 분리된 상등액에 포함된 단백질의 농도를 정량하고, 2 \times Laemmli sample buffer와 단백질을 1:1 비율로 혼합한 후 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 가열하여 western blot 실험을 위한 loading sample을 준비하였다. 가열한 단백질을 식힌 후, sodium dodecylsulfate(SDS)-polyacrylamide gel에 30 μg 의 같은 양의 단백질을 포함하는 sample을 100 V에서 loading한 후 전기영동을 이용하여 단백질을 크기별로 분리하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 transfer하고 5% skim milk를 함유한 1 \times TBS-T (tris-buffered saline containing 1% tween 20)로 1시간 동안 blocking 하였다. 1 \times TBS-T를 사용하여 membrane을 10분 간격으로 6회 세척하고 1 \times TBS-T에 1:2000 비율로 희석된 1차 항체를 사용하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight incubation 하였다. 이후, 1 \times TBS-T를 사용하여 1차 항체가 붙은 membrane을 10분 간격으로 6회 세척하고 1 \times TBS-T에 1:2000 비율로 희석된 2차 항체를 사용하여 상온에서 2시간 동안 반응하였다. 1 \times TBS-T로 5분 간격으로 6회 세척한 후 ECL kit를 사용하여 membrane을 반응시켜 특정 단백질을 발현시키고 각각의 표적 단백질 band는 Chemidoc (WL, VILBER LOURMAT, France)를 사용하여 검출하였다.

3. 인체피부 일차자극 시험

본 시험은 헬싱키 선언에 근거하여 주식회사 더마프로 기관생명윤리위원회로부터 윤리적, 과학적 타당성을 심의 받아 피시험자의 자발적 동의에 의해 윤리적 원칙에 따라 수행되었다. 인체 피부에 대한 일차자극 유무를 확인하기 위해 피부질환이 없는 건강한 20~60세의 남녀 30명 이상을 대상으로 선정기준에 부합하고 제외기준에 부합하지 않는 피시험자를 선정하였다. 선정된 피시험자를 대상으로 시험의 목적과 방법 그리고, 이상반응을 설명하여 참여 의사를 보이는 자는 시험참가 동의서를 작성하고 시험에 참여하도록 하였다. 시험부위(등)는 70% ethanol로 세척한 후, squalene에 녹인 시험물질 20 μ L을 시험부위에 24시간 동안 첩보하였다. 첩보 제거 20분 후에 1차 평가, 24시간 후에 2차 평가를 실시하였다. 피부 일차자극 반응도는 다음과 같이 PCPC Guidelines에 따라 평가하였다(Table 1).

Grade	Description of Clinical Observation
+1	Slight erythema
+2	Moderate erythema, possibly with barely perceptible edema at the margin, papules may be present
+3	Moderate erythema, with generalized edema
+4	Severe erythema with severe edema, with or without vesicles
+5	Severe reaction spread beyond the area of the patch

Table 1. Grading system for skin primary irritation test.

각 시험물질에 대한 피부반응 결과에 따라 아래 반응식을 통해 평균반응도를 계산하였다. 단, PCPC Guidelines에서 +5 grade의 피부반응은 임상적으로 자극반응보다는 알려지 반응일 가능성이 높으므로, 자극반응도를 평가하는 기준으로는 maximum grade +4 grade로 평가하였다(Table 2).

$$\text{Response} = \frac{\sum(\text{Grade} \times \text{No. of Responders})}{4 (\text{Maximum Grade}) \times n (\text{Total Subjects})} \times 100 \times 1/2$$

Range of Response	Judgment
$0.00 \leq R \leq 0.87$	None to Slight
$0.87 \leq R \leq 2.42$	Mild
$2.42 \leq R \leq 3.44$	Moderate
$3.44 \leq R$	Severe

Table 2. Determination criteria for skin primary irritation.

4. 통계처리

모든 실험 결과들은 세 번의 독립적인 실험을 평균과 표준편차 (평균 \pm SD)로 나타내었다. 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 통계 분석을 수행하였다. # $p < 0.001$, * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 로 표시하였다.

III. 결 과

1. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 항염증 효과 비교

1.1. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 Cell viability 측정

RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone 계열 화합물들이 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도 (2.5-40 μ M)를 각각 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 세포 생존 기준은 미처리 대조군에 대비하여 90% 이상일 경우 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다고 판단하였다. 실험 결과, 2'-hydroxy-3,4'-dimethoxychalcone (3,4'-DMC), 2'-hydroxy-4,4'-dimethoxychalcone (4,4'-DMC), 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxychalcone (3',4'-DMC) 그리고 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (4',6'-DMC)은 20 μ M 이하의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 7).

1.2. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 NO production 측정

RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 세포 독성을 보이지 않는 농도에서 NO 생성에 미치는 영향을 비교 조사하기 위해 NO 생성량 측정 실험을 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도를 처리하여 24시간 동안 배양시켰으며 iNOS 억제제인 L-NIL(40 μ M)을 양성대조군으로 사용하였다. NO 생성량은 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 얼마나 억제하였는지 조사하였다. 실험 결과, 20 μ M에서 NO의 생성을 LPS 단독 처리 군에 대비하여 4',6'-DMC는 약 83.95%, 3,4'-DMC는 약 79.75%, 3',4'-DMC는 약 33.00%, 4,4'-DMC는 약 23.10% 억제하였다(Fig. 8). 따라서 활성이 가장 우수한 4',6'-DMC로 세포독성이 나타나지 않은 20 μ M 이하의 농도에서 추가실험을 진행하였다.

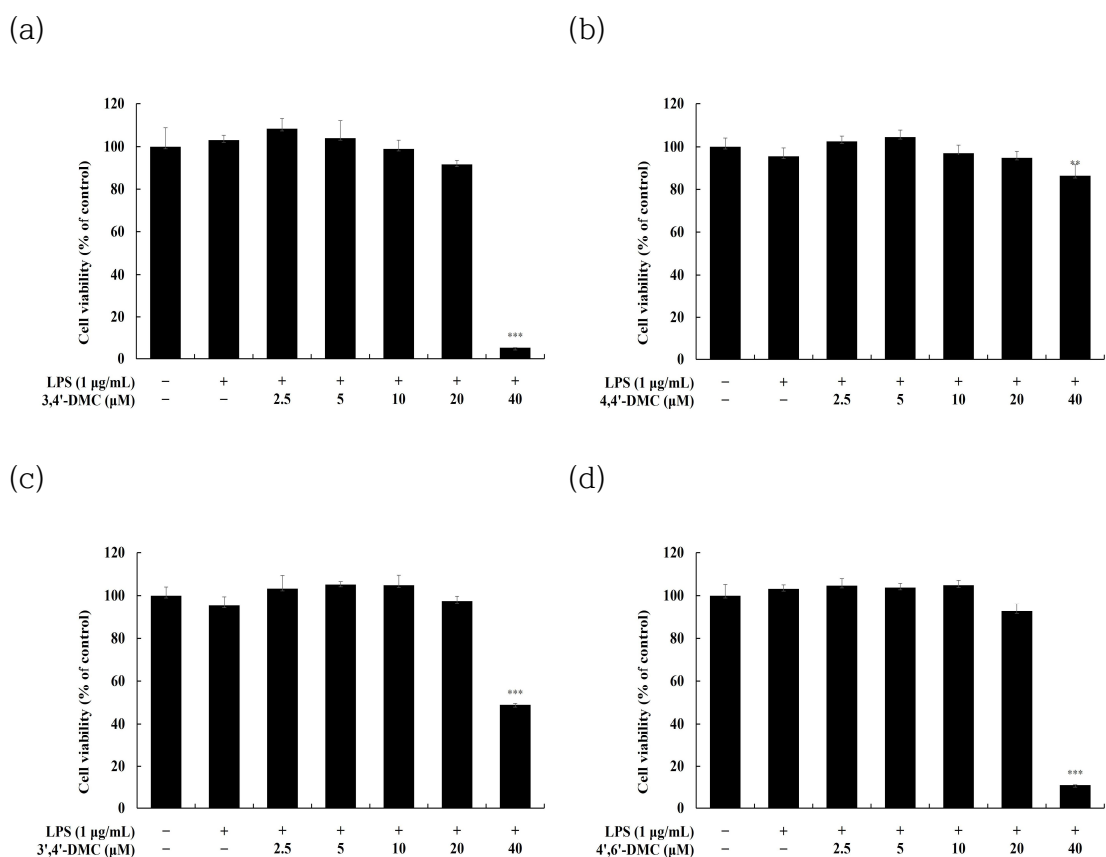


Figure 7. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on the cell viability in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones (2.5, 5, 10, 20 and 40 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) for 24 h. Cell viability of RAW 264.7 cells subjected to (a) 3,4'-DMC, (b) 4,4'-DMC, (c) 3',4'-DMC, and (d) 4',6'-DMC was measured by MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiment. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs untreated control group.

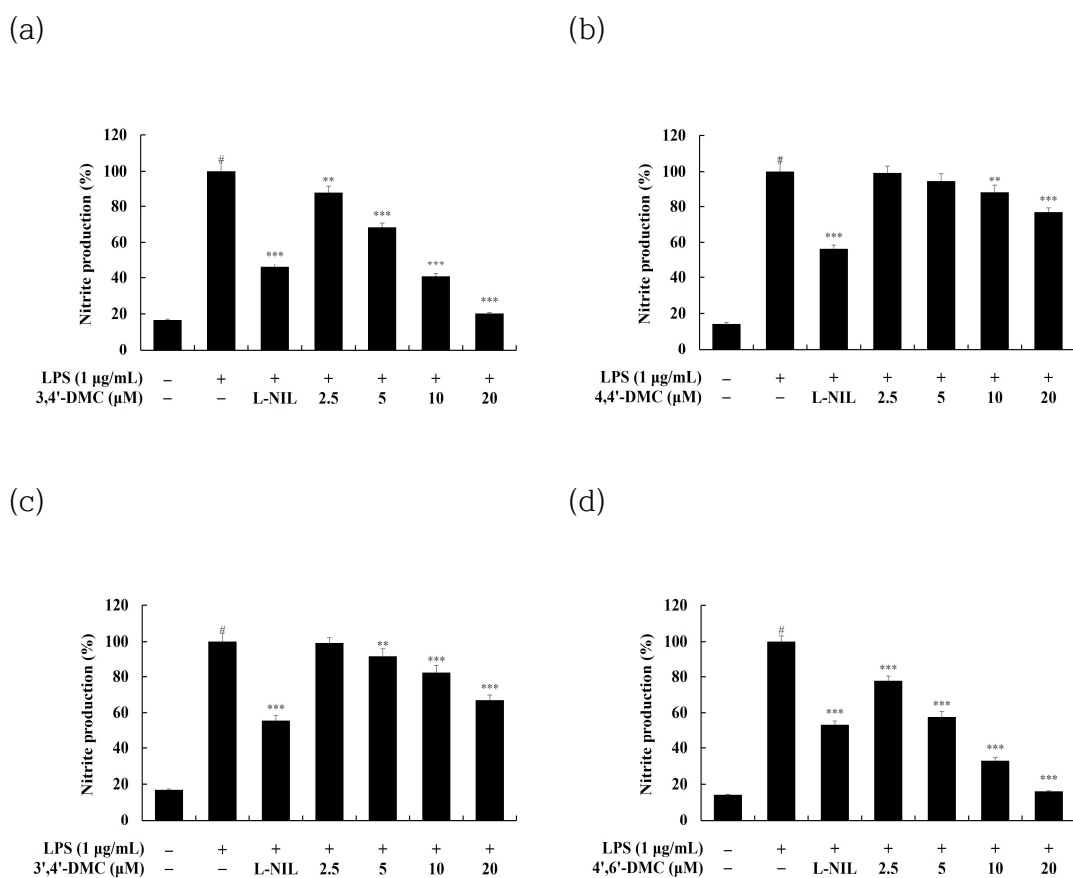


Figure 8. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. L-NIL (40 µM) was used as a positive control. Inhibition of nitric oxide production by (a) 3,4'-DMC, (b) 4,4'-DMC, (c) 3',4'-DMC and (d) 4',6'-DMC treatment in LPS-induced RAW 264.7 cells was measured using the Griess reagent. Nitric oxide production of Data are expressed as the mean ± SD from three repeated experiment. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs LPS alone group.

2. RAW 264.7 세포에서 4',6'-DMC의 항염증 효과

2.1. 전염증성 cytokine production 측정

Cytokine은 면역세포가 분비하는 단백질로 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하여 염증 반응을 매개하는 인자이다. LPS 자극으로 활성화된 대식세포는 여러 신호 전달 경로를 통해 다양한 염증성 매개체와 염증성 cytokine을 생성한다 [106-107]. 시료가 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 전염증성 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α)의 생성을 억제하는지 조사하기 위해서 ELISA kit를 사용하여 생성량을 측정하였다. RAW 264.7 대식세포에서 4',6'-DMC의 다양한 농도 (2.5-20 μ M)를 처리하여 24시간 동안 배양시켰으며 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 얼마나 억제하였는지 조사하였다. 실험 결과, 20 μ M에서 IL-6, IL- β , TNF- α 의 생성을 LPS 단독 처리 군에 대비하여 각각 약 83.12%, 68.52% 그리고 91.64% 억제하였다(Fig. 9).

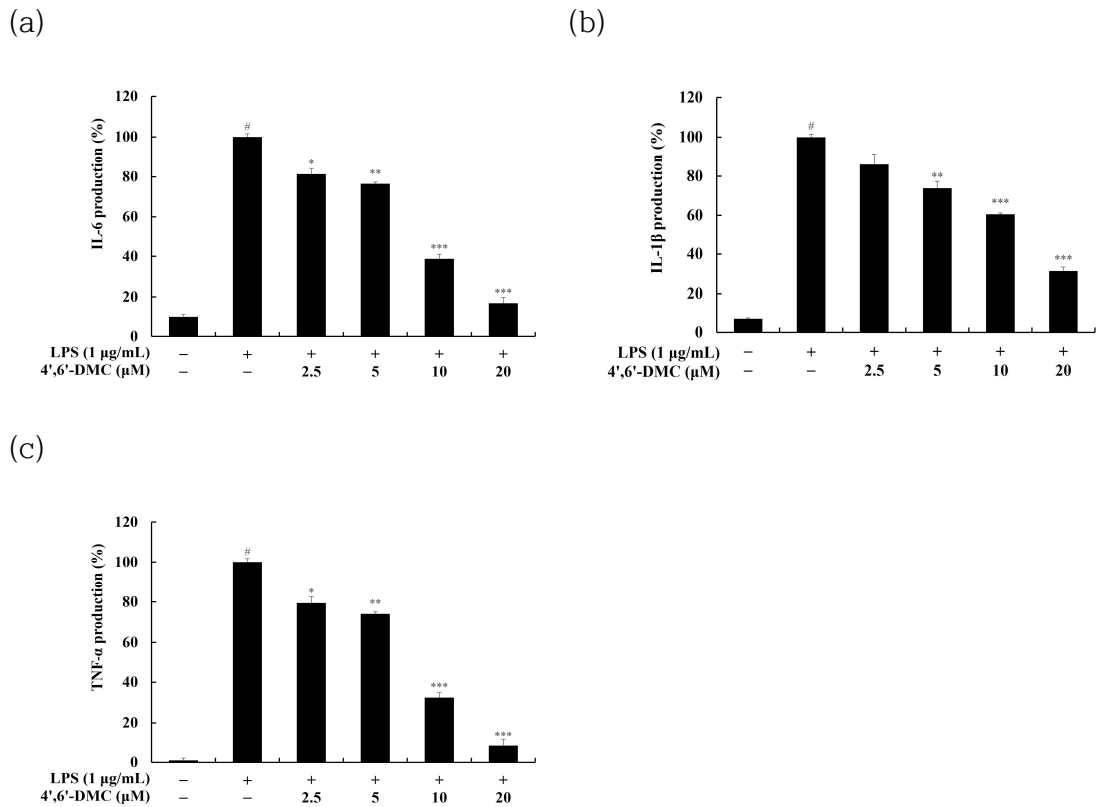


Figure 9. Effect of 4',6'-DMC on production of pro-inflammatory cytokines in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (2.5, 5, 10 and 20 μM) in the presence of LPS (1 μg/mL) stimulation for 24 h. (a) IL-6 production, (b) IL-1β production and (c) TNF-α production were determined using an ELISA kit. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{*}*p* < 0.1, ^{**}*p* < 0.01, ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

2.2. Western blot

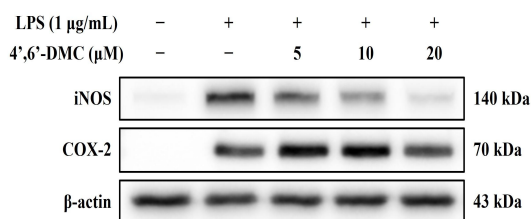
2.2.1. RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 4',6'-DMC 영향

RAW 264.7 세포에서 2,6'-DMC가 세포 독성을 보이지 않는 범위인 10 μM 이하의 농도에서 NO, PGE₂ 생성 억제제가 iNOS와 COX-2 발현량 억제의 하향조절에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 iNOS, COX-2의 발현량은 4',6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 처리 군에 대비하여 20 μM 에서 iNOS를 83.15%, COX-2 10.8% 감소시켰다(Fig. 10). 따라서 4',6'-DMC에 의한 iNOS, COX-2 발현량 감소가 염증성 매개체인 NO와 PGE₂ 생성 감소로 이어질 수 있음을 시사한다.

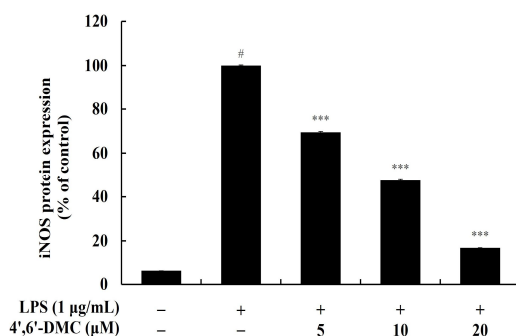
2.2.2. RAW 264.7 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향

LPS로 자극된 대식세포에서 MAPK 신호 전달 경로의 활성화를 억제함으로써 다양한 염증성 cytokine 및 염증 매개체 생성의 감소로 항염증 효과가 나타난다 [120-122]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 4',6'-DMC의 NO 및 전염증성 cytokine 생성 억제가 MAPK 신호 전달 경로에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 ERK, p38의 인산화는 4',6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 처리 군에 대비하여 20 μM 에서 인산화된 ERK, p38를 각각 약 22.54%, 46.43% 감소시켰다 (Fig. 11). 따라서 4',6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로의 활성화 억제를 통해 NO 및 전염증성 cytokine의 생성 수준을 하향 조절함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

(a)



(b)



(c)

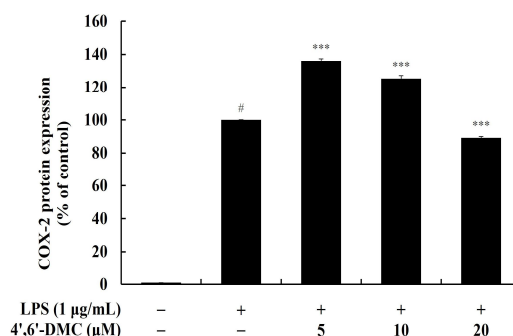


Figure 10. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of iNOS and COX-2 in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (5, 10 and 20 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) iNOS/β-actin, (c) COX-2/β-actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

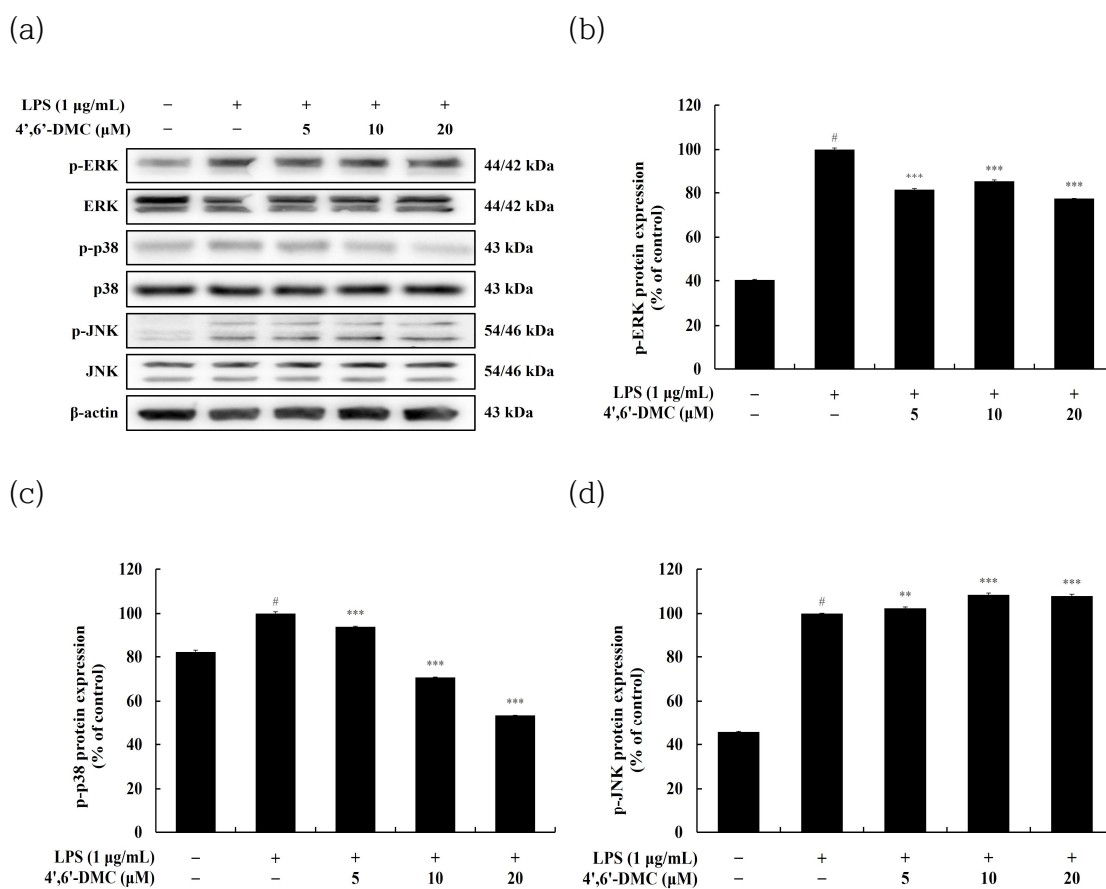


Figure 11. Effect of 4',6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (5, 10 and 20 μ M) in the presence of LPS (1 μ g/mL) stimulation for 20 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-ERK/ERK, (c) p-p38/p38, (d) p-JNK/JNK. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{**} $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$ vs LPS alone group.

2.2.3. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향

NF- κ B는 I κ B- α 와의 결합을 통해 세포질에서 비활성화 상태로 존재하며 I κ B- α 가 인산화되면서 분해된 후 LPS로 자극된 대식세포에서 NF- κ B의 활성화가 일어난다. 활성화된 NF- κ B는 세포질에서 핵으로 이동하여 다양한 염증성 cytokine 및 염증 전사 인자의 구성원을 활성화한다고 보고되었다[123-126]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 4',6'-DMC의 전염증성 cytokine 및 염증성 매개체 생성의 억제가 NF- κ B 신호 전달 경로에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 I κ B- α 의 인산화는 4',6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 억제되었으며 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 20 μ M에서 인산화된 I κ B- α 를 약 37.98% 감소시켰다(Fig. 12). 따라서 4',6'-DMC가 I κ B- α 의 인산화 조절을 통해 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

2.2.4. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 핵 전위에 대한 4',6'-DMC 영향

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 p65가 세포질에서 핵으로의 전위를 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, 세포질에서 p65의 생성은 4',6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 증가하였고, 핵에서 p65의 생성을 유의하게 억제하였다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 4',6'-DMC 20 μ M에서 세포질에서의 p65를 약 334.41% 증가시켰으며, 핵에서의 p65를 약 51.11% 감소시켰다(Fig. 13) 따라서 4',6'-DMC가 NF- κ B의 핵 전위를 방지함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

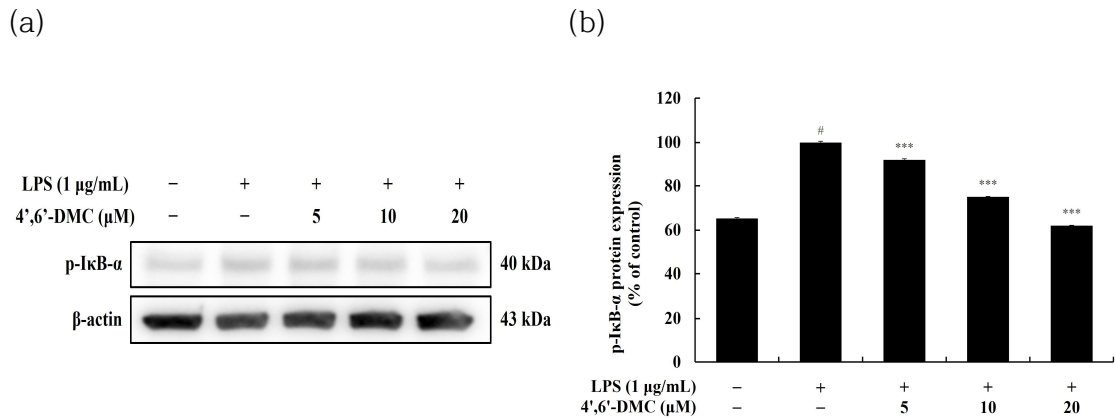
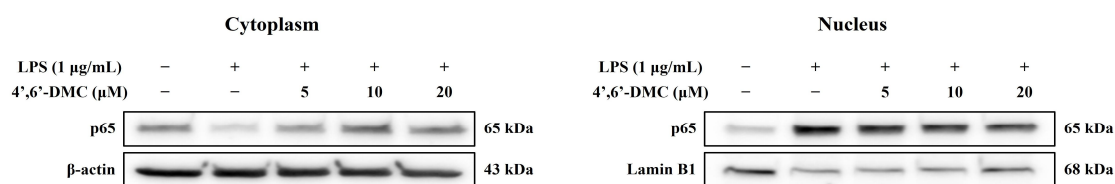
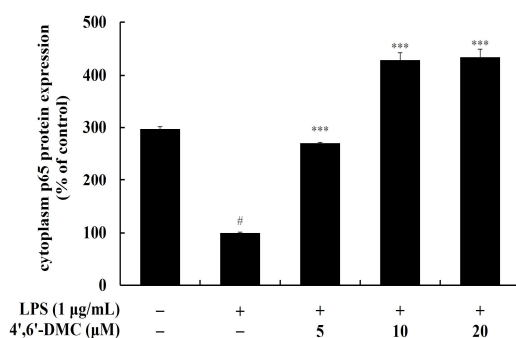


Figure 12. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of p-IκB-α in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (5, 10 and 20 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 15 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-IκB-α/β-actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. #*p* < 0.001 vs untreated control group. ****p* < 0.001 vs LPS alone group.

(a)



(b)



(c)

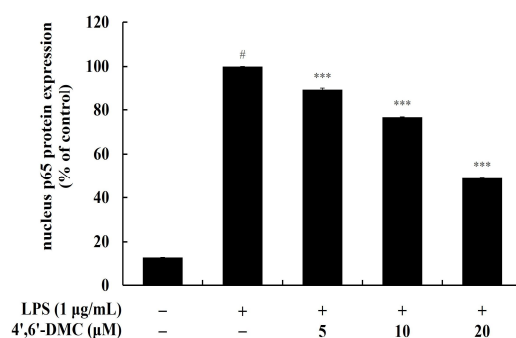


Figure 13. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of NF- κ B (p65) in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (5, 10 and 20 μ M) in the presence of LPS (1 μ g/mL) stimulation for 15 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p65/ β -actin in cytoplasm, (c) p65/Lamin B1 in nucleus. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin and Lamin B1. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs LPS alone group.

3. B16F10 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 멜라닌 생성 억제 효과 비교

3.1. B16F10 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 Cell viability 측정

B16F10 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone 계열 화합물들이 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. B16F10 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도 (2.5-40 μ M)를 각각 처리하여 72시간 동안 배양시켰다. 세포 생존 기준은 미처리 대조군에 대비하여 90% 이상일 경우 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다고 판단하였다. 실험 결과, 4,4'-DMC는 20 μ M 이하의 농도에서, 3,4'-DMC, 3',4'-DMC는 10 μ M 이하의 농도에서, 4',6'-DMC는 5 μ M 이하의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 14).

3.2. Melanin contents 및 Tyrosinase 활성에 대한 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones의 영향

B16F10 melanoma 세포에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone 계열 화합물들이 세포 독성을 보이지 않는 농도에서 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성 측정 실험을 수행하였다. B16F10 melanoma 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도를 처리하여 72시간 동안 배양시켰으며 α -MSH (100 nM) 및 arbutin (200 μ M)은 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용되었다. 실험 결과, 5 μ M에서 멜라닌 생성을 α -MSH 단독 처리군에 대비하여 4',6'-DMC는 약 32.58%, 3,4'-DMC는 약 18.25%, 3',4'-DMC는 약 6.08% 억제하였고, 4,4'-DMC는 약 7.69% 증가하였다(Fig. 15). 또한 tyrosinase 활성을 α -MSH 단독 처리군에 대비하여 4',6'-DMC는 약 40.18%, 3,4'-DMC는 약 3.69%, 3',4'-DMC는 약 15.30% 억제하였고, 4,4'-DMC는 약 8.16% 증가하였다(Fig. 16). 따라서 항멜라닌 활성이 가장 우수한 4',6'-DMC로 세포독성이 나타나지 않은 5 μ M 이하의 농도에서 추가실험을 진행하였다.

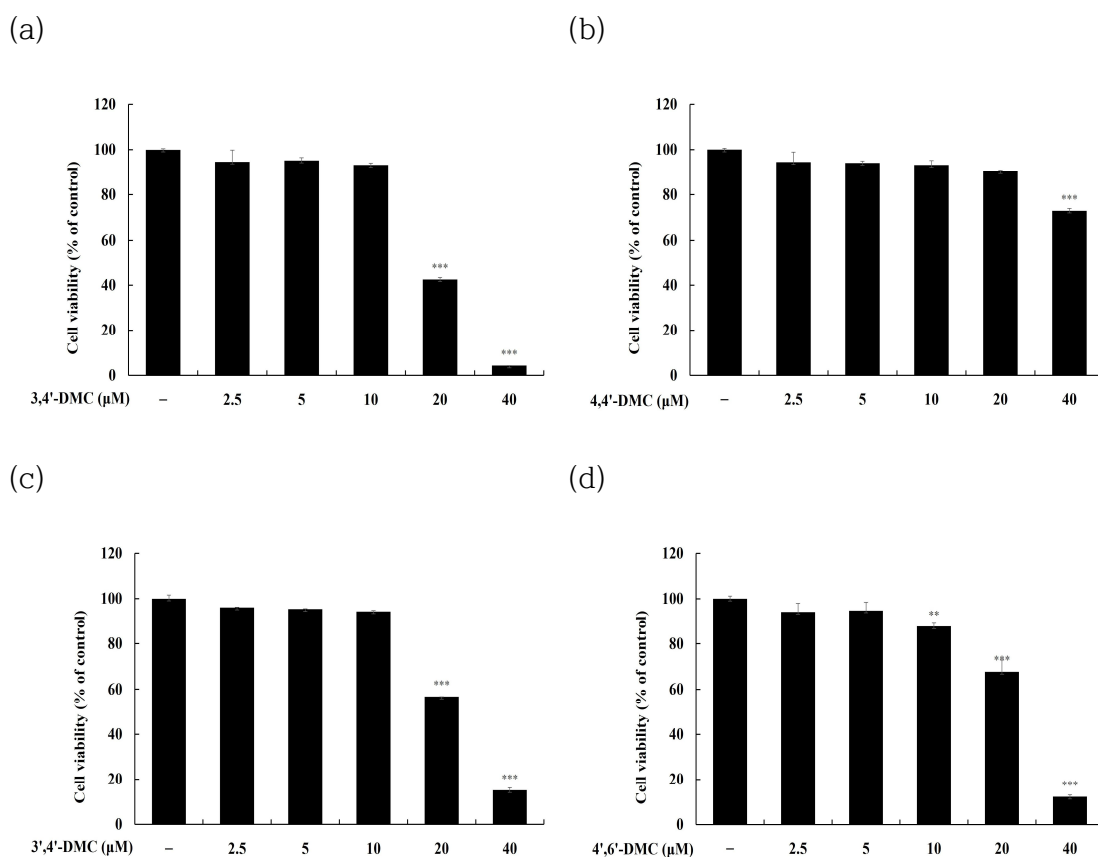


Figure 14. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on the cell viability in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones (2.5, 5, 10, 20 and 40 μM) for 72 h. Cell viability of B16F10 cells subjected to (a) 3,4'-DMC, (b) 4,4'-DMC, (c) 3',4'-DMC, and (d) 4',6'-DMC was measured by MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiment. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs untreated control group.

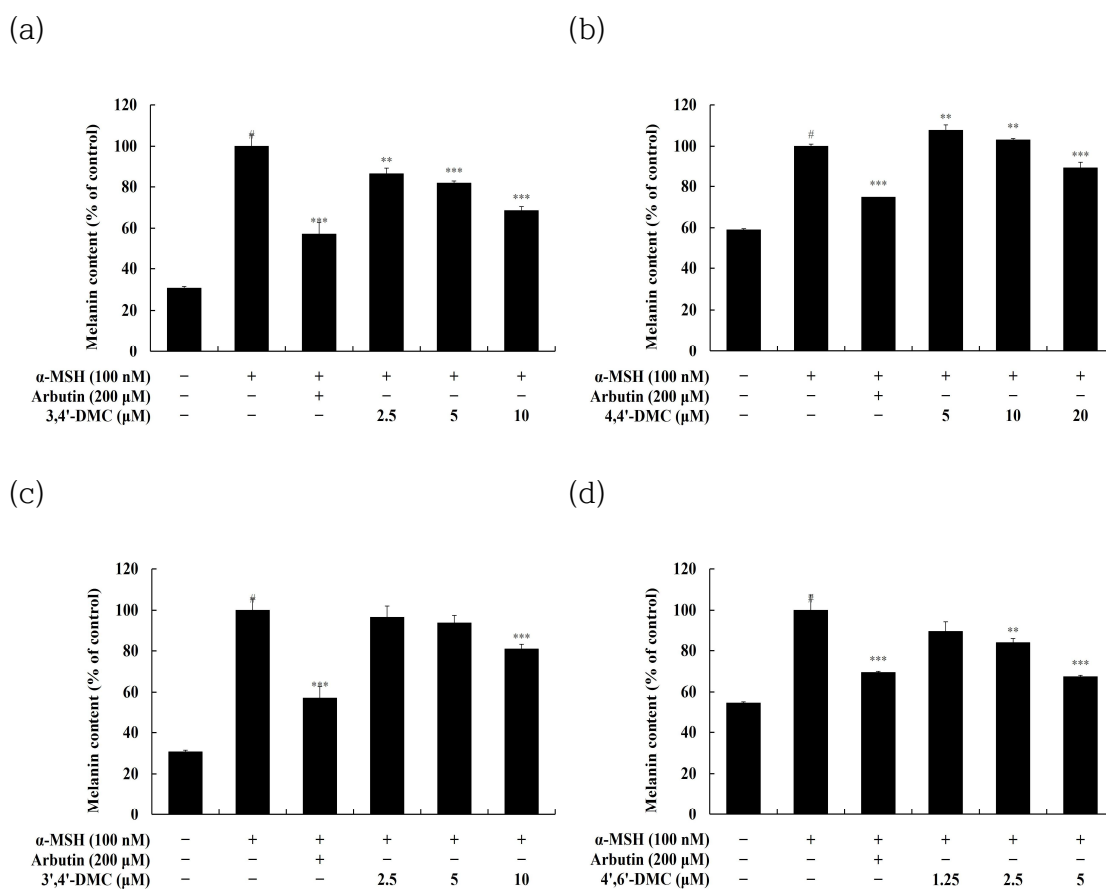


Figure 15. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on the melanin contents in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 72 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. Melanin contents of B16F10 cells subjected to (a) 3,4'-DMC, (b) 4,4'-DMC, (c) 3',4'-DMC and (d) 4',6'-DMC. Data are expressed as the mean \pm SD from three independent experiment. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

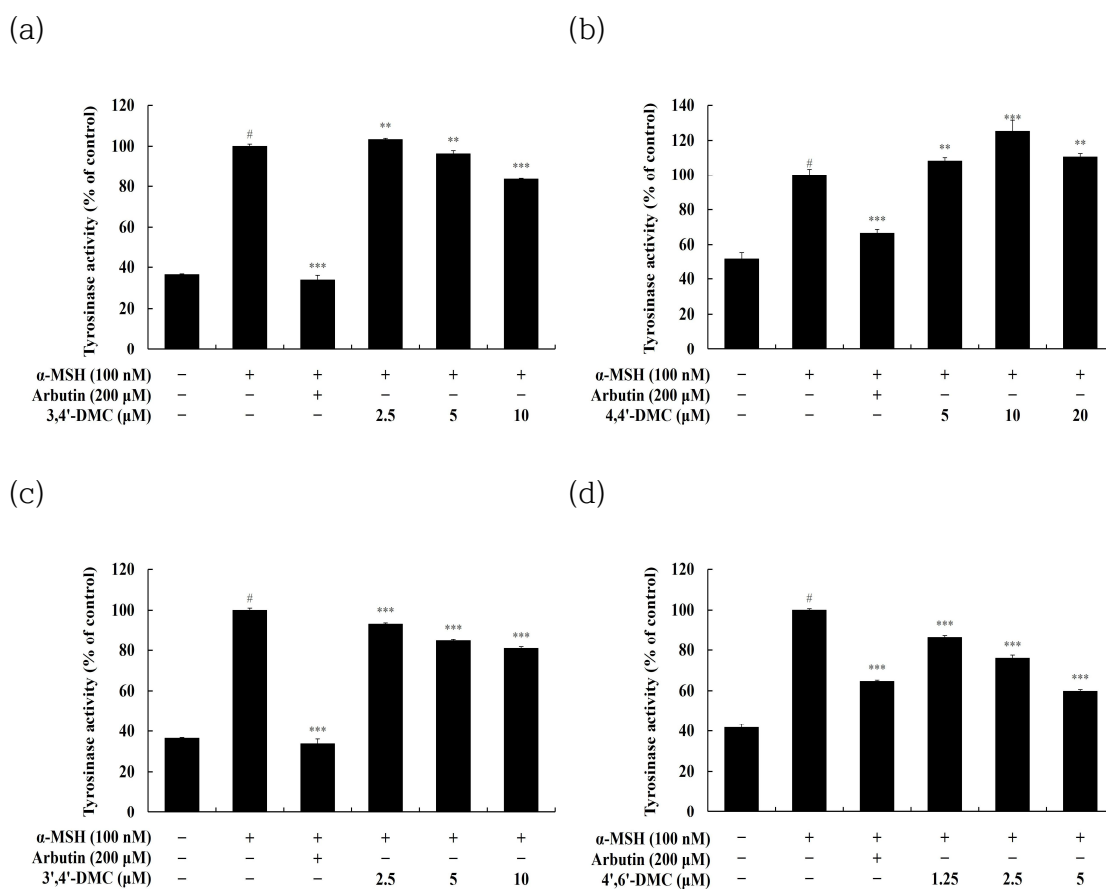


Figure 16. Effect of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones on the tyrosinase activities in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 72 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. Tyrosinase activities of B16F10 cells subjected to (a) 3,4'-DMC, (b) 4,4'-DMC, (c) 3',4'-DMC and (d) 4',6'-DMC. Data are expressed as the mean \pm SD from three independent experiment. # p < 0.001 vs untreated control group. ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

4. B16F10 세포에서 4',6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 효과

4.1. Western blot

4.1.1. B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소 및 MITF 발현에 대한 4',6'-DMC 영향

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 멜라닌 합성에 관여하는 효소이며 MITF는 멜라닌 생성 효소들의 전사인자로서 TYR, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 생성에 관여하는 효소를 활성화하여 멜라닌 세포의 성장, 분화 및 기능을 조절하는 역할을 한다[108-109]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 4',6'-DMC가 이러한 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현에 영향을 주는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 TYR, TRP-1 그리고 TRP-2의 발현량은 4',6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 TRP-1, TRP-2, TYR를 각각 약 30.34%, 25.68%, 28.82% 감소시켰다(Fig. 17). 이러한 4',6'-DMC의 멜라닌 생성 효소 억제 효과에 대한 MITF의 영향을 조사하기 위해 MITF 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 MITF의 발현량은 농도 의존적으로 유의하게 억제되었으며 α -MSH 단독 처리 군에 대비하여 4',6'-DMC는 5 μ M에서 약 21.81% 감소시켰다(Fig. 18). 따라서 4',6'-DMC의 멜라닌 생성 효소의 발현이 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 멜라닌 생성이 억제된다는 것을 알 수 있다.

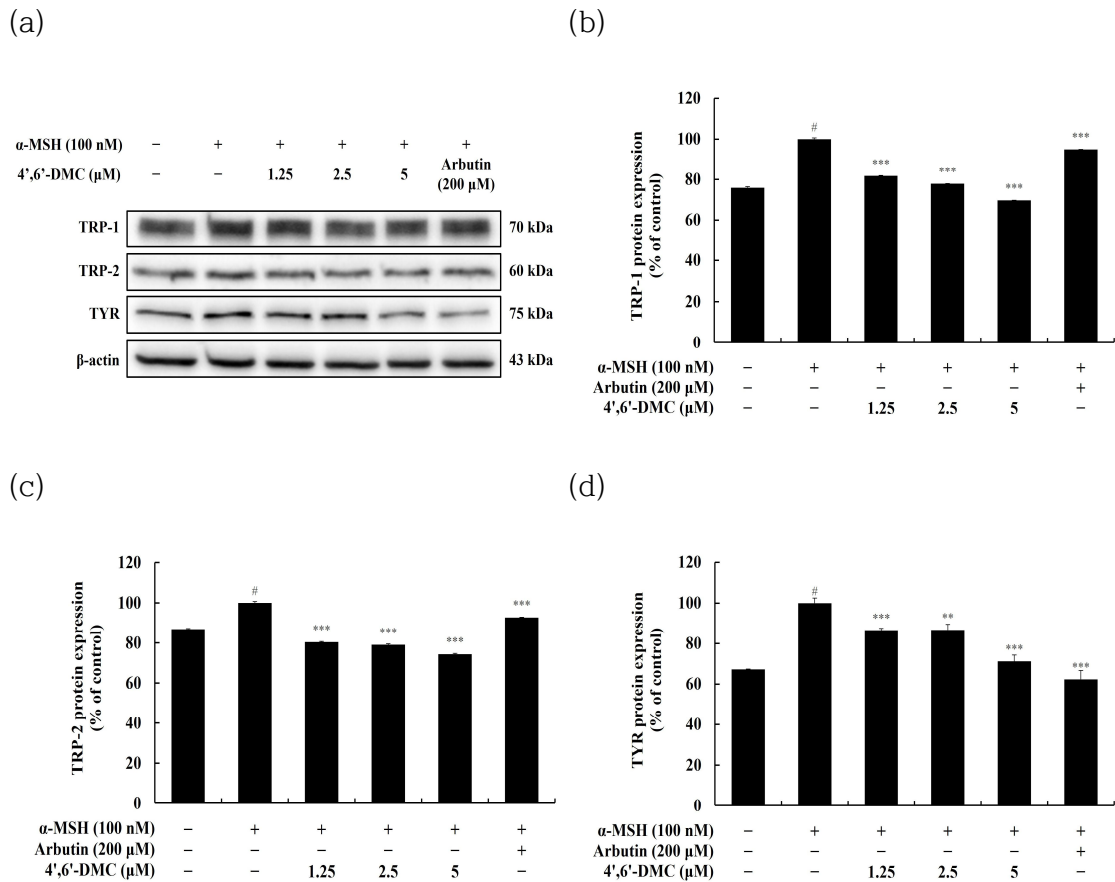


Figure 17. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of TRP-1, TRP-2 and TYR in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) TRP-1/ β -actin, (c) TRP-2/ β -actin, (d) TYR/ β -actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # p < 0.001 vs untreated control group. ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

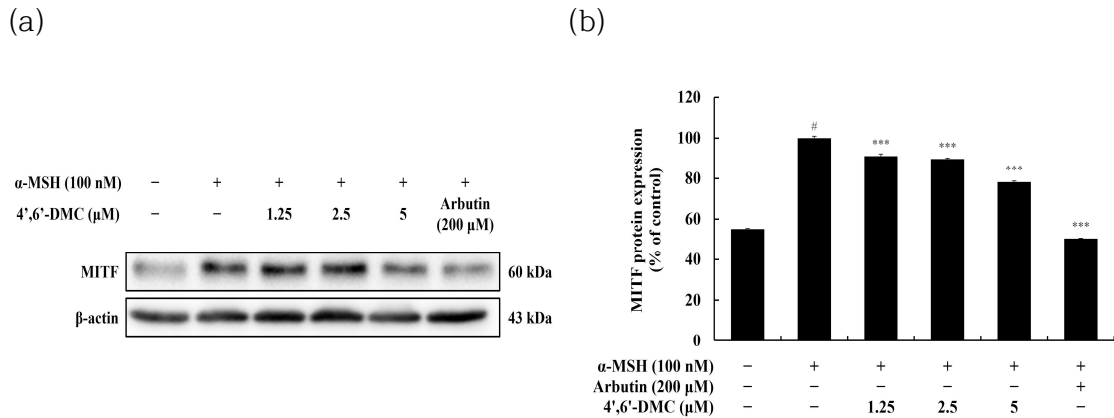


Figure 18. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) MITF/ β -actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # p < 0.001 vs untreated control group. *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

4.1.2. B16F10 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향

Wnt/ β -catenin 경로에서 막 수용체 단백질인 Frizzled가 Wnt 리간드와 결합하여 활성화되면 serine 9번 잔기에서 인산화 및 비활성화된 GSK3 β 는 세포질에서 β -catenin을 방출하고 방출된 β -catenin은 핵으로 전위되어 최종적으로 MITF의 발현을 증가시킨다[110-112]. 또한 tyrosine 216번 잔기에서 인산화된 GSK3 β 는 활성화되어 β -catenin의 인산화를 유도하고, 유비퀴틴화 및 분해를 일으킴으로써 MITF의 발현을 감소시킨다[70-72]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 4',6'-DMC가 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 β -catenin의 발현량과 GSK3 β 의 인산화는 4',6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 α -MSH에 의해 유도된 β -catenin의 인산화는 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 β -catenin과 인산화된 GSK3 β 를 각각 약 39.37%, 56.36% 감소시켰고, 인산화된 β -catenin을 약 51.12% 증가시켰다(Fig. 19). 따라서 4',6'-DMC가 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

4.1.3. B16F10 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향

PI3K/AKT 경로는 이전 연구에서 GSK3 β 와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 활성화된 AKT는 Ser 9에서 GSK3 β 를 인산화하여 GSK3 β 를 비활성화하고 β -catenin의 분해를 억제할 수 있는 것으로 여겨진다[113-115]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 4',6'-DMC가 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 AKT의 인산화는 4',6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 AKT를 약 50.28% 감소시켰다(Fig. 20). 따라서 4',6'-DMC가 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

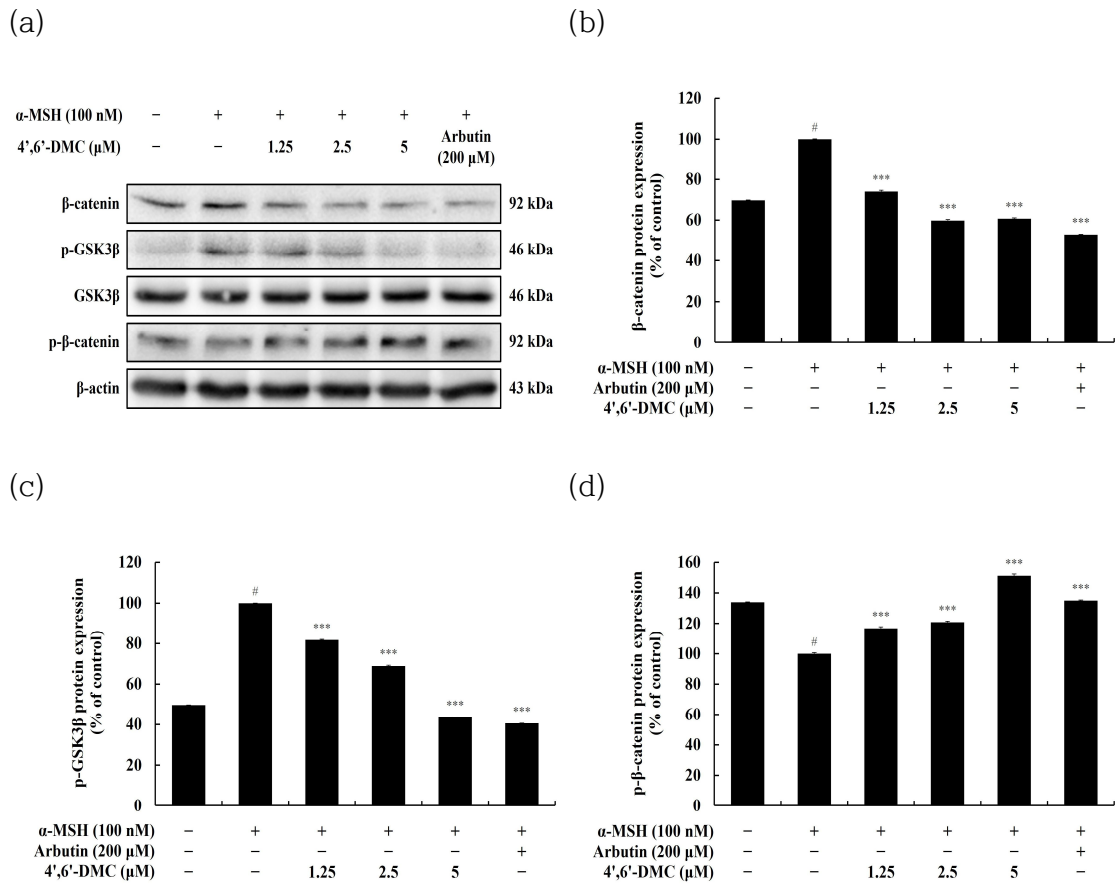


Figure 19. Effect of 4',6'-DMC on protein expression of β -catenin, p-GSK3 β and p- β -catenin in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) β -catenin/ β -actin, (c) p-GSK3 β /GSK3 β , (d) p- β -catenin/ β -actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

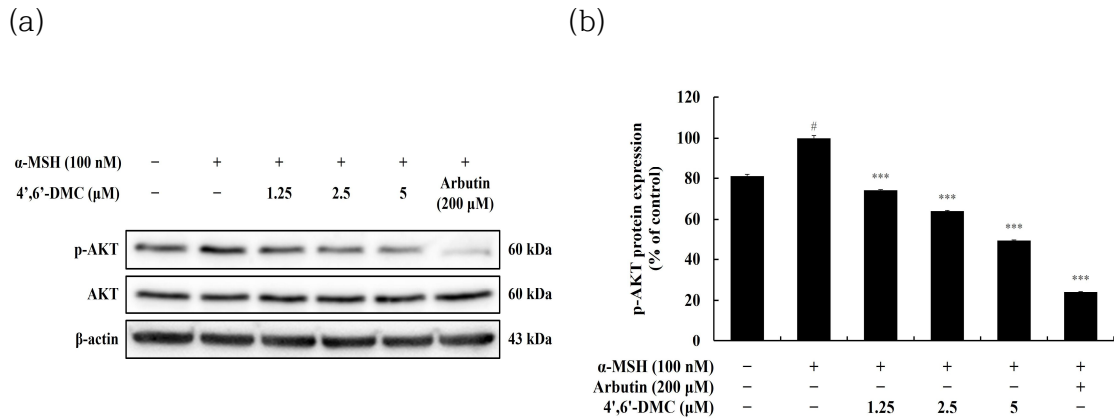


Figure 20. Effect of 4',6'-DMC on phosphorylation expression of AKT in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 4 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-AKT/AKT. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

4.1.4. B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향

MAPK 경로에서 ERK는 음성 신호전달 경로로, ERK의 인산화는 MITF의 인산화를 유도하여 분해됨으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 하향 조절한다. 이와 반대로 p38 및 JNK의 인산화는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 상향 조절한다 [116-118]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 4',6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, 4',6'-DMC의 농도가 증가함에 따라 음성 신호 전달 경로인 ERK의 인산화는 유의하게 증가하는 것으로 나타났고, 양성 신호 전달 경로인 p38과 JNK의 인산화는 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 ERK를 약 62.18% 증가시켰고, 인산화된 p38, JNK를 각각 약 59.71%, 35.34% 감소시켰다(Fig. 21). 따라서 4',6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

4.1.5. B16F10 세포에서 cAMP/PKA 신호 전달 경로에 대한 4',6'-DMC 영향

cAMP/PKA 경로에서 α -MSH는 MC1R과 직접 결합하여 MC1R을 활성화하고 세포 내 cAMP의 축적을 유발한다. cAMP에 의해 PKA가 인산화되고 핵 안으로 전위되어 CREB의 인산화 및 활성화를 촉진하여 MITF의 전사를 상향 조절한다 [119]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 4',6'-DMC가 PKA/CREB 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 CREB과 PKA의 인산화는 4',6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 CREB과 PKA를 각각 약 37.27%, 64.25% 감소시켰다(Fig. 22). 따라서 4',6'-DMC가 cAMP/PKA 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

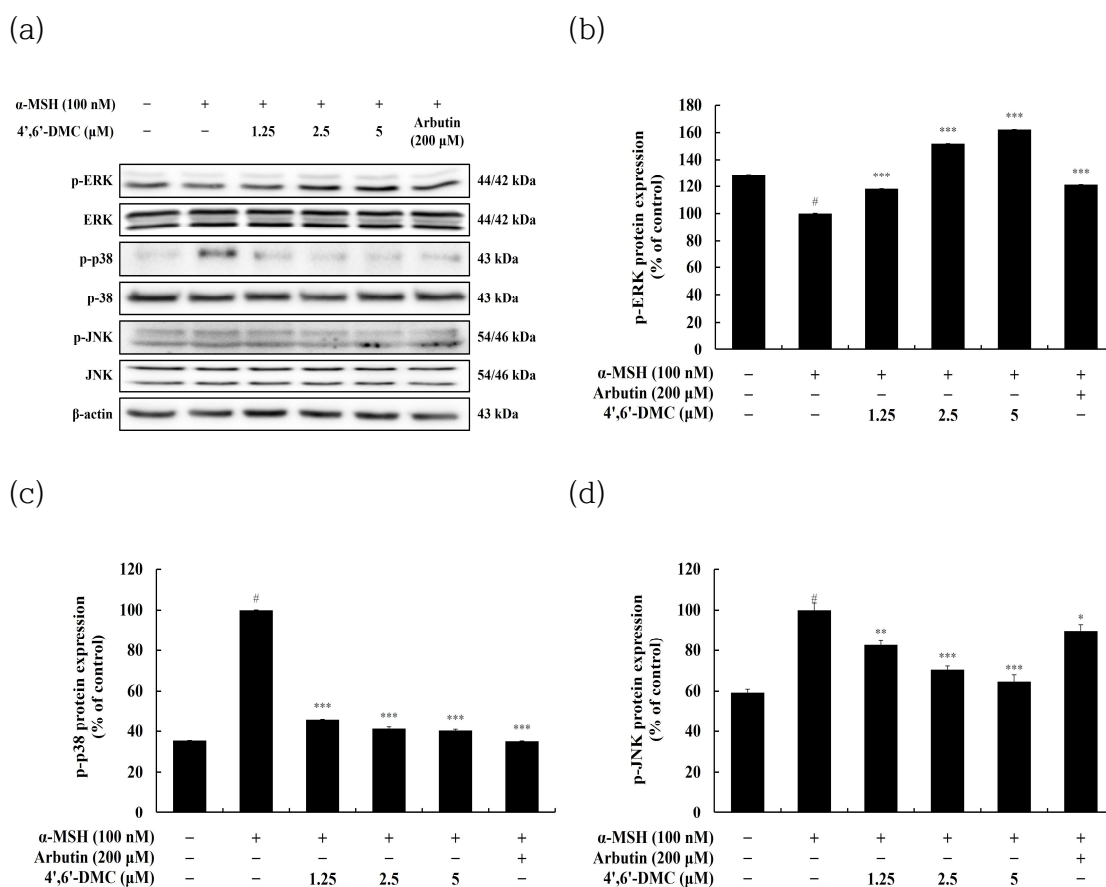
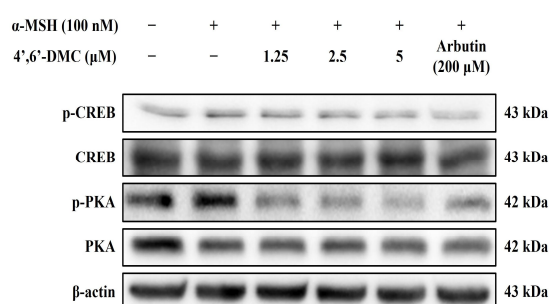
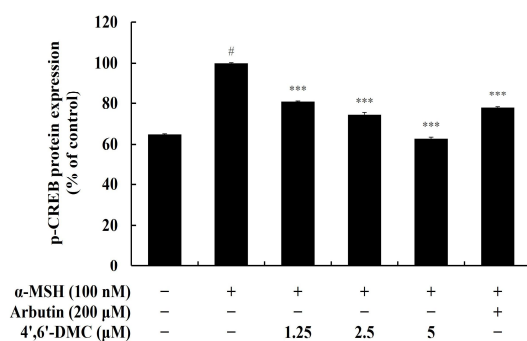


Figure 21. Effect of 4',6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 4 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-ERK/ERK, (c) p-p38/p38, (d) p-JNK/JNK. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # $p < 0.001$ vs untreated control group. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

(a)



(b)



(c)

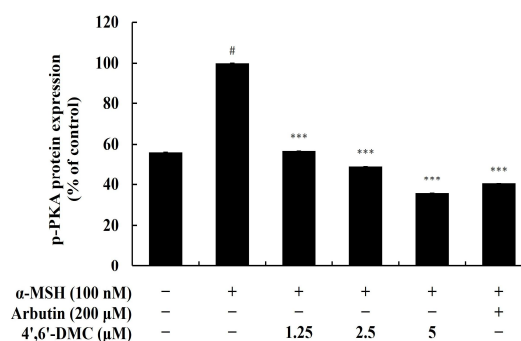


Figure 22. Effect of 4',6'-DMC on phosphorylation expression of CREB and PKA in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 4',6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-CREB/CREB, (c) p-PKA/PKA. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

5. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 항염증 효과 비교

5.1. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 Cell viability 측정

RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcone 계열 화합물들이 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도 (2.5-40 μ M)를 각각 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 세포 생존 기준은 미처리 대조군에 대비하여 90% 이상일 경우 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다고 판단하였다. 실험 결과, 2'-hydroxy-2,4-dimethoxychalcone (2,4-DMC)은 20 μ M 이하의 농도에서, 2'-hydroxy-2,5'-dimethoxychalcone (2,5'-DMC) 그리고 2'-hydroxy-2,6'-dimethoxychalcone (2,6'-DMC)은 10 μ M 이하의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 23).

5.2. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 NO production 측정

RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 세포 독성을 보이지 않는 농도에서 NO 생성에 미치는 영향을 비교 조사하기 위해 NO 생성량 측정 실험을 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도를 처리하여 24시간 동안 배양시켰으며 iNOS 억제제인 L-NIL (40 μ M)을 양성대조군으로 사용하였다. NO 생성량은 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 얼마나 억제하였는지 조사하였다. 실험 결과, 10 μ M에서 NO의 생성을 LPS 단독 처리 군에 대비하여 2,6'-DMC는 약 61.95%, 2,5'-DMC는 약 53.22%, 2,4-DMC는 약 36.04% 억제하였다(Fig. 24). 따라서 활성이 가장 우수한 2,6'-DMC로 세포독성이 나타나지 않은 10 μ M 이하의 농도에서 추가 실험을 진행하였다.

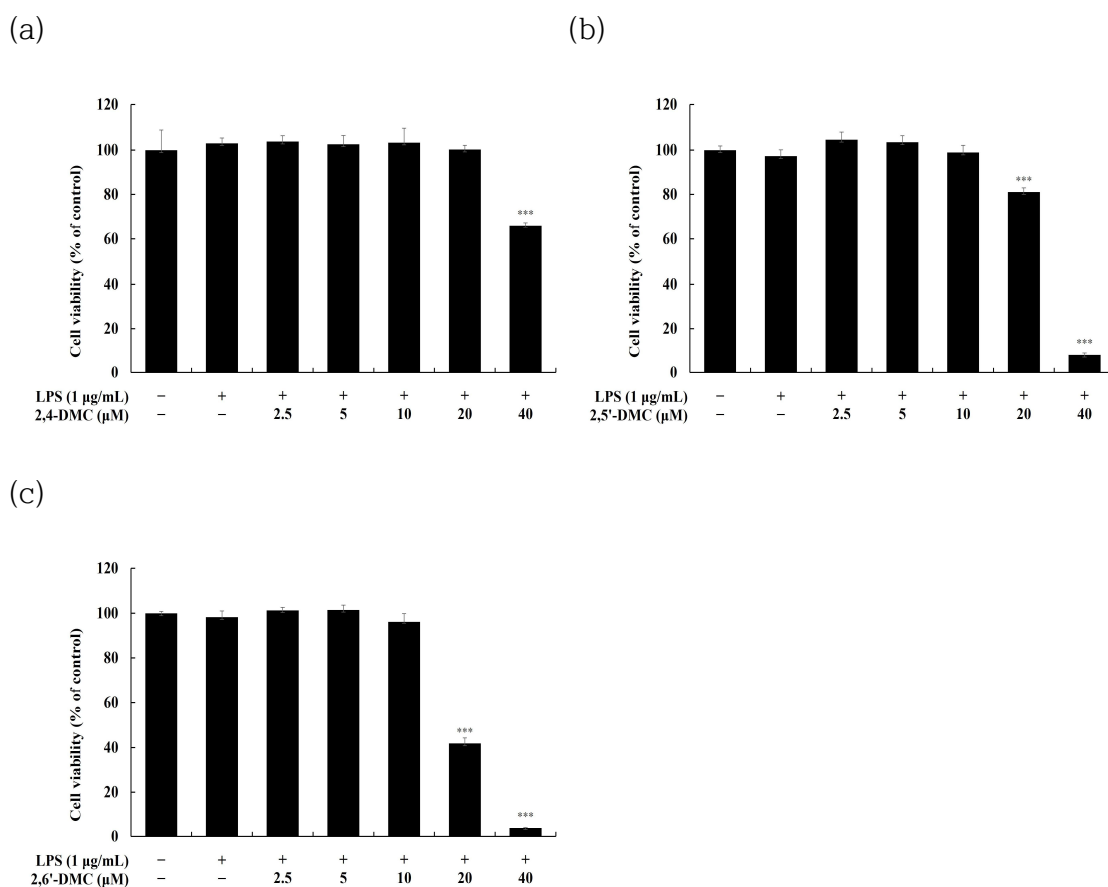


Figure 23. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones on the cell viability in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-2-methoxychalcones (2.5, 5, 10, 20 and 40 μM) in the presence of LPS (1 μg/mL) for 24 h. Cell viability of RAW 264.7 cells subjected to (a) 2,4-DMC, (b) 2,5'-DMC and (c) 2,6'-DMC was measured by MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiment. *** $p < 0.001$ vs untreated control group.

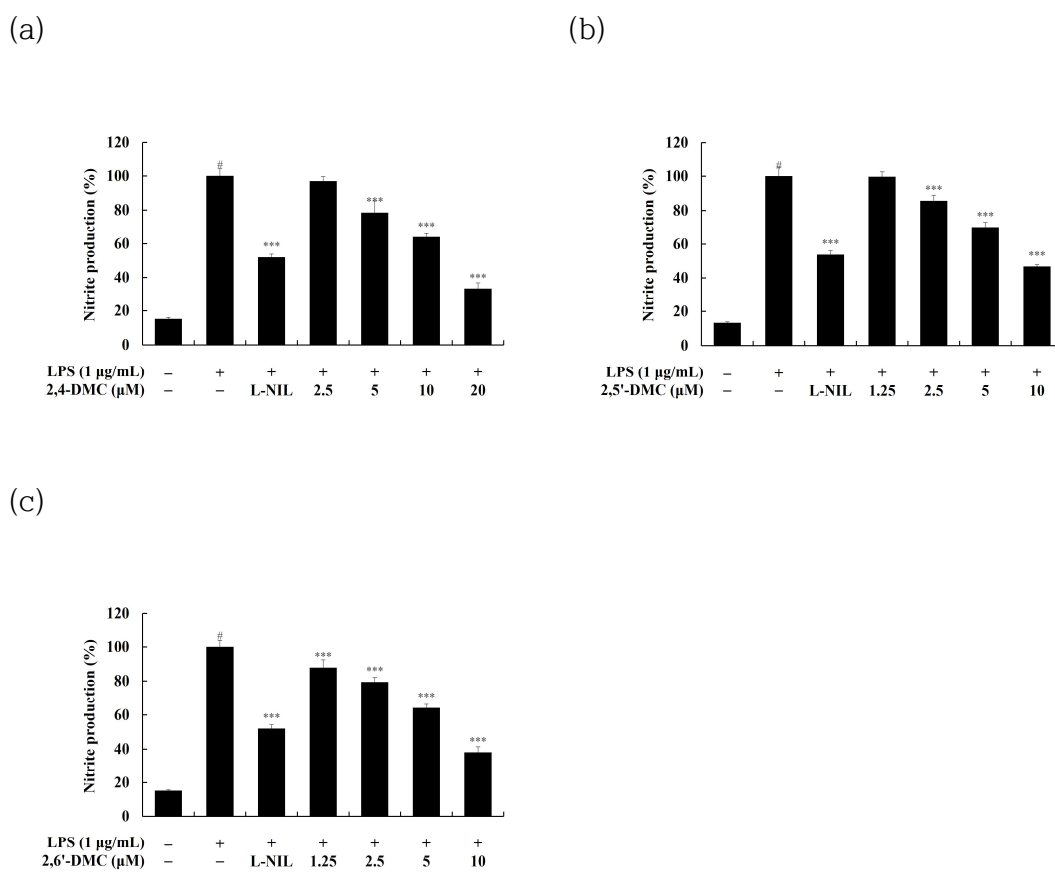


Figure 24. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-2-methoxychalcones in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. L-NIL (40 µM) was used as a positive control. Inhibition of nitric oxide production by (a) 2,4-DMC, (b) 2,5'-DMC, (c) 2,6'-DMC treatment in LPS-induced RAW 264.7 cells was measured using the Griess reagent. Nitric oxide production of Data are expressed as the mean ± SD from three repeated experiment. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

6. RAW 264.7 세포에서 2,6'-DMC의 항염증 효과

6.1. PGE₂ 및 전염증성 cytokine production 측정

PGE₂는 COX-2에 의해 유도되며 염증 및 발암을 포함하는 다양한 병리학적 과정에 관여하고 있고, cytokine은 면역세포가 분비하는 단백질로 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하여 염증 반응을 매개하는 인자이다. LPS 자극으로 활성화된 대식세포는 여러 신호 전달 경로를 통해 다양한 염증성 매개체와 염증성 cytokine을 생성한다[106-107]. 시료가 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 PGE₂와 전염증성 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α)의 생성을 억제하는지 조사하기 위해서 ELISA kit를 사용하여 생성량을 측정하였다. RAW 264.7 대식세포에서 2,6'-DMC의 다양한 농도 (1.25-10 μ M)를 처리하여 24시간 동안 배양시켰으며 COX-2 억제제인 NS-398 (1 μ M)을 PGE₂ 생성량 측정의 양성대조군으로 사용하였다. PGE₂와 염증성 cytokine 생성량은 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 얼마나 억제하였는지 조사하였다. 실험 결과, 10 μ M에서 PGE₂, IL-6, TNF- α 의 생성을 각각 약 24.23%, 11.62%, 40.98%, 60.10% 억제하였다(Fig. 25).

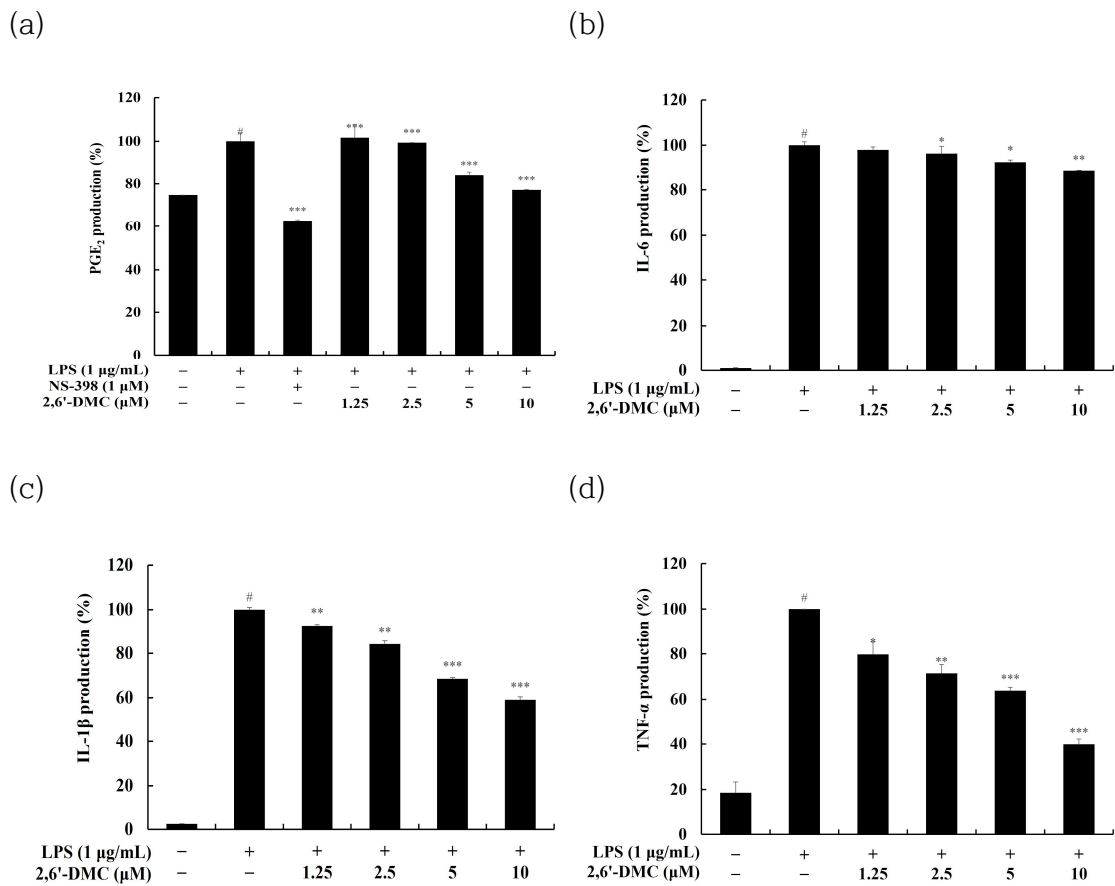


Figure 25. Effect of 2,6'-DMC on production of PGE₂ and pro-inflammatory cytokines in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (1,25, 2.5, 5 and 10 μM) in the presence of LPS (1 μg/mL) stimulation for 24 h. (a) PGE₂ production, (b) IL-6 production, (c) IL-1β production and (d) TNF-α production were determined using an ELISA kit. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. **p* < 0.1, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs LPS alone group.

6.2. Western blot

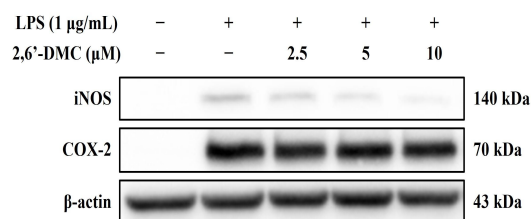
6.2.1. RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 2,6'-DMC 영향

RAW 264.7 세포에서 2,6'-DMC가 세포 독성을 보이지 않는 범위인 10 μ M 이하의 농도에서 NO, PGE₂ 생성 억제에 iNOS와 COX-2 발현량 억제의 하향조절에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 iNOS, COX-2의 발현량은 2,6'-DMC에 의해 유의하게 억제되었다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 10 μ M에서 iNOS를 72.23%, COX-2를 16.52% 감소시켰다(Fig. 26). 따라서 2,6'-DMC에 의한 iNOS, COX-2 발현량 감소가 염증성 매개체인 NO와 PGE₂ 생성 감소로 이어질 수 있음을 시사한다.

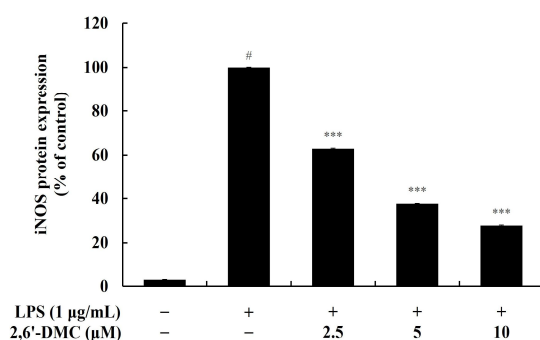
6.2.2. RAW 264.7 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향

LPS로 자극된 대식세포에서 MAPK 신호 전달 경로의 활성화를 억제함으로써 다양한 염증성 cytokine 및 염증 매개체의 생성의 감소로 항염증 효과가 나타난다 [120-122]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 2,6'-DMC의 NO 및 전염증성 cytokine 생성 억제가 MAPK 신호 전달 경로에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 p38의 인산화는 2,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 10 μ M에서 인산화된 p38을 약 39.63% 감소시켰다(Fig. 27). 따라서 2,6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로의 활성화 억제 통해 NO 및 전염증성 cytokine의 생성 수준을 하향 조절함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

(a)



(b)



(c)

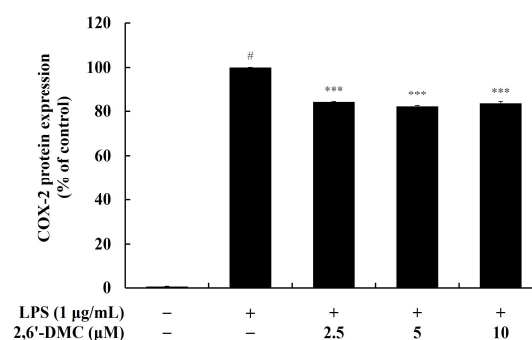


Figure 26. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of iNOS and COX-2 in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) iNOS/β-actin, (c) COX-2/β-actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

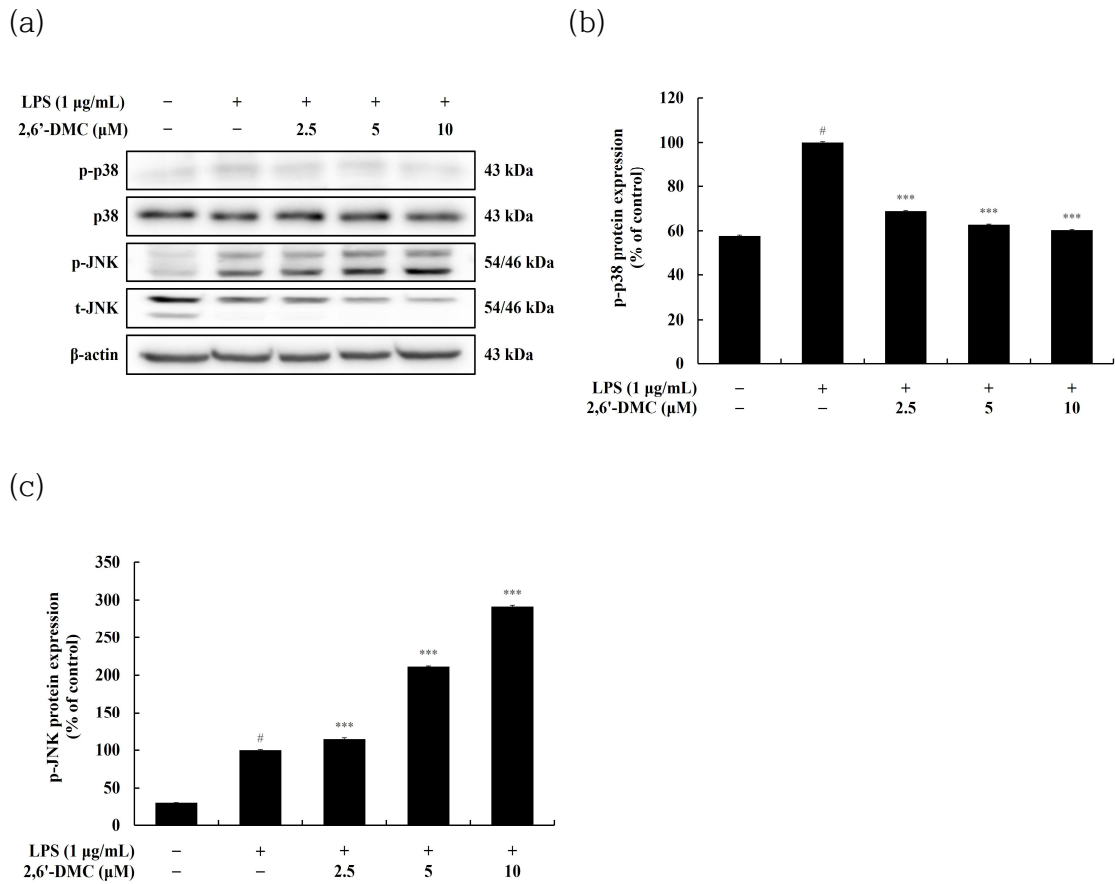


Figure 27. Effect of 2,6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 20 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-p38/p38, (c) p-JNK/JNK. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

6.2.3. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향

NF- κ B는 I κ B- α 와의 결합을 통해 세포질에서 비활성화 상태로 존재하며 I κ B- α 가 인산화되면서 분해된 후 LPS로 자극된 대식세포에서 NF- κ B의 활성화가 일어난다. 활성화된 NF- κ B는 세포질에서 핵으로 이동하여 다양한 염증성 cytokine 및 염증 전사 인자의 구성원을 활성화한다고 보고되었다[123-126]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 2,6'-DMC의 전염증성 cytokine 및 염증성 매개체 생성의 억제가 NF- κ B 신호 전달 경로에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 I κ B- α 의 인산화는 2,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 억제되었으며 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 10 μ M에서 인산화된 I κ B- α 를 약 46.92% 감소시켰다(Fig. 28). 따라서 2,6'-DMC가 I κ B- α 의 인산화 조절을 통해 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

6.2.4. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 핵 전위에 대한 2,6'-DMC 영향

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 p65가 세포질에서 핵으로의 전위를 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, 세포질에서 p65의 생성은 2,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 증가하였고, 핵에서 p65의 생성을 유의하게 억제하였다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 10 μ M에서 세포질에서의 p65를 약 109.35% 증가시켰으며, 핵에서의 p65를 약 40.55% 감소시켰다(Fig. 29) 따라서 2,6'-DMC가 NF- κ B의 핵 전위를 방지함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

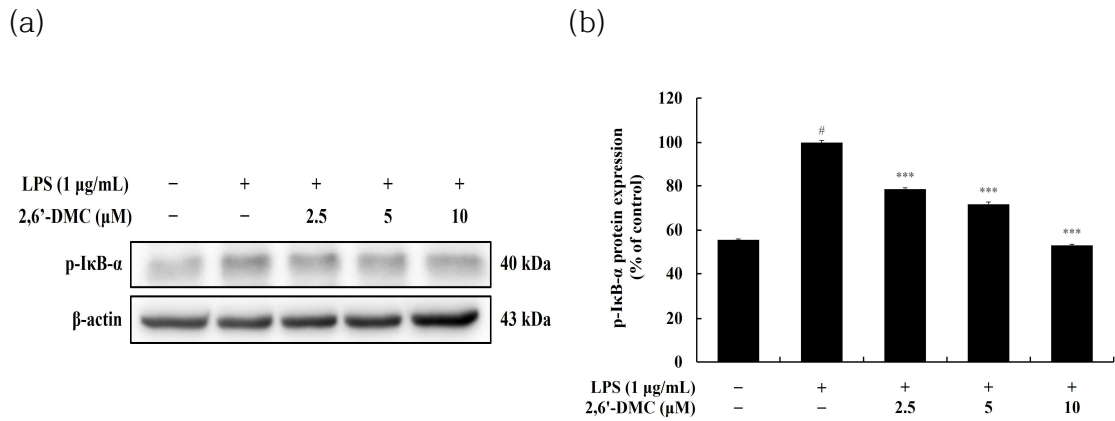
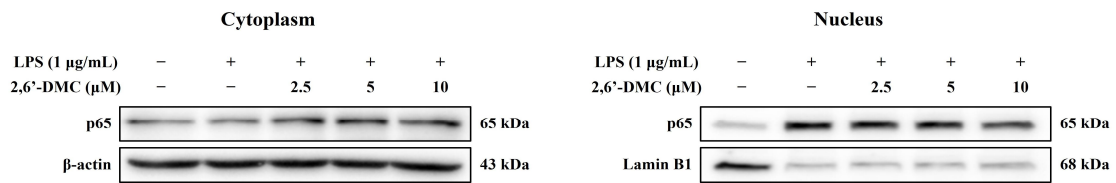
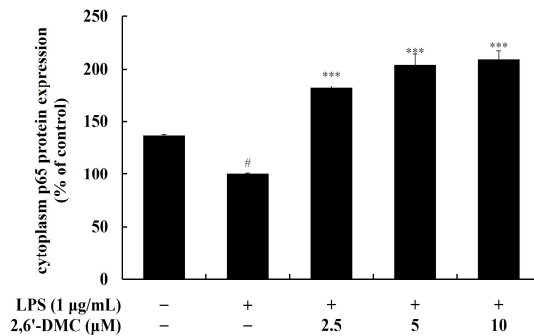


Figure 28. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of p-IκB-α in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 15 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-IκB-α/β-actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. #*p* < 0.001 vs untreated control group. ****p* < 0.001 vs LPS alone group.

(a)



(b)



(c)

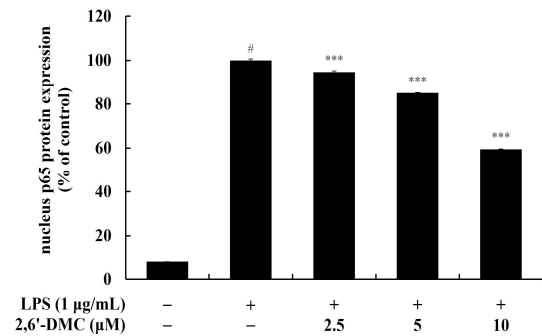


Figure 29. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of NF-κB (p65) in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 15 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p65/β-actin in cytoplasm, (c) p65/Lamin B1 in nucleus. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin and Lamin B1. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. **p* < 0.1, ****p* < 0.001 vs LPS alone group.

7. B16F10 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 멜라닌 생성 억제 효과 비교

7.1. B16F10 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 Cell viability 측정

B16F10 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcone 계열 화합물들이 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. B16F10 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도 (2.5-40 μM)를 각각 처리하여 72시간 동안 배양시켰다. 세포 생존 기준은 미처리 대조군에 대비하여 90% 이상일 경우 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다고 판단하였다. 실험 결과, 2,4-DMC는 10 μM 이하의 농도에서, 2,5'-DMC, 2,6'-DMC는 5 μM 이하의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 30).

7.2. Melanin contents 및 Tyrosinase 활성에 대한 2'-hydroxy-2-methoxychalcones의 영향

B16F10 melanoma 세포에서 2'-hydroxy-2-methoxychalcone 계열 화합물들이 세포 독성을 보이지 않는 농도에서 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성 측정 실험을 수행하였다. B16F10 melanoma 세포에서 각 화합물들의 다양한 농도를 처리하여 72시간 동안 배양시켰으며 α -MSH (100 nM) 및 arbutin (200 μM)은 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용되었다. 실험 결과, 5 μM 에서 멜라닌 생성을 α -MSH 단독 처리군에 대비하여 2,6'-DMC는 약 36.62%, 2,5'-DMC는 약 6.65%, 2,4-DMC는 약 4.68% 억제하였다(Fig. 31). 또한 tyrosinase 활성을 α -MSH 단독 처리군에 대비하여 2,6'-DMC는 약 46.83%, 2,5'-DMC는 약 14.69%, 2,4-DMC는 약 4.23% 억제하였다(Fig. 32). 따라서 항멜라닌 활성이 가장 우수한 2,6'-DMC로 세포독성이 나타나지 않은 5 μM 이하의 농도에서 추가 실험을 진행하였다.

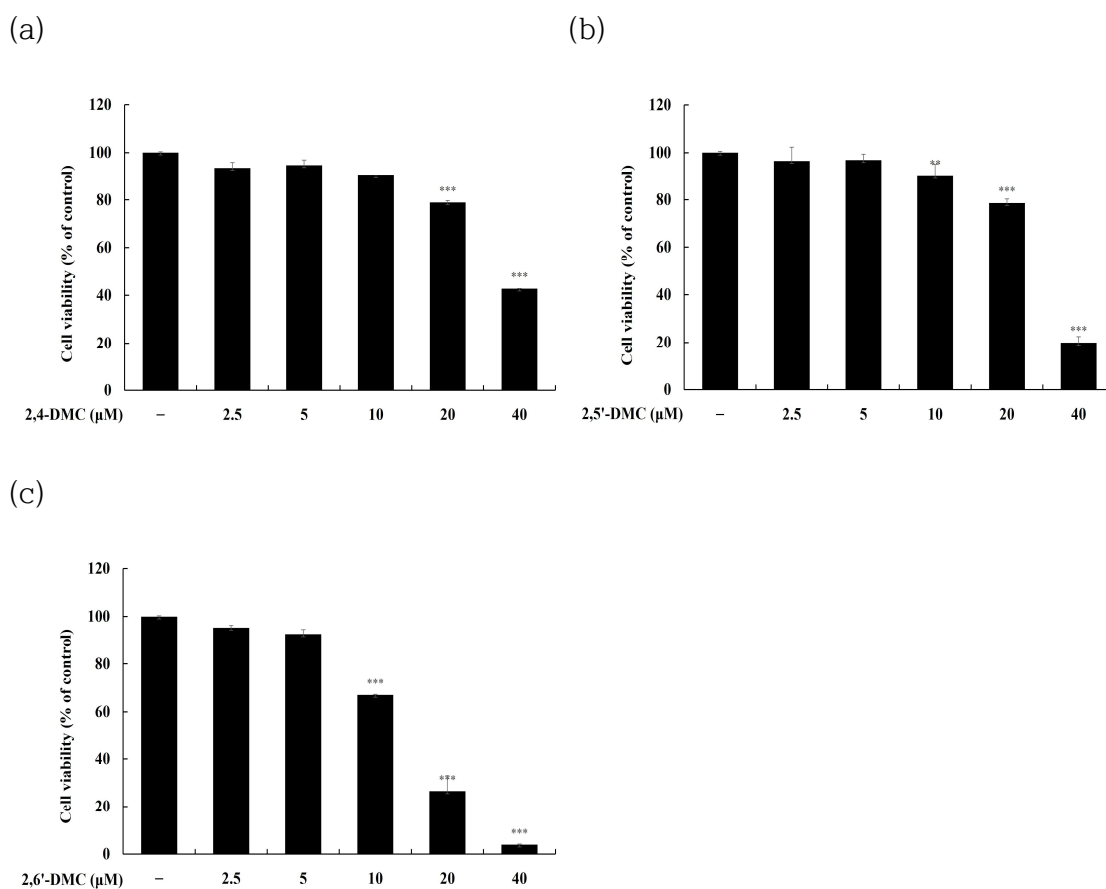


Figure 30. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones derivatives on the cell viability in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-2-methoxychalcones (2.5, 5, 10, 20 and 40 μM) for 72 h. Cell viability of B16F10 cells subjected to (a) 2,4-DMC, (b) 2,5'-DMC and (c) 2,6'-DMC was measured by MTT assay. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiment. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated control group.

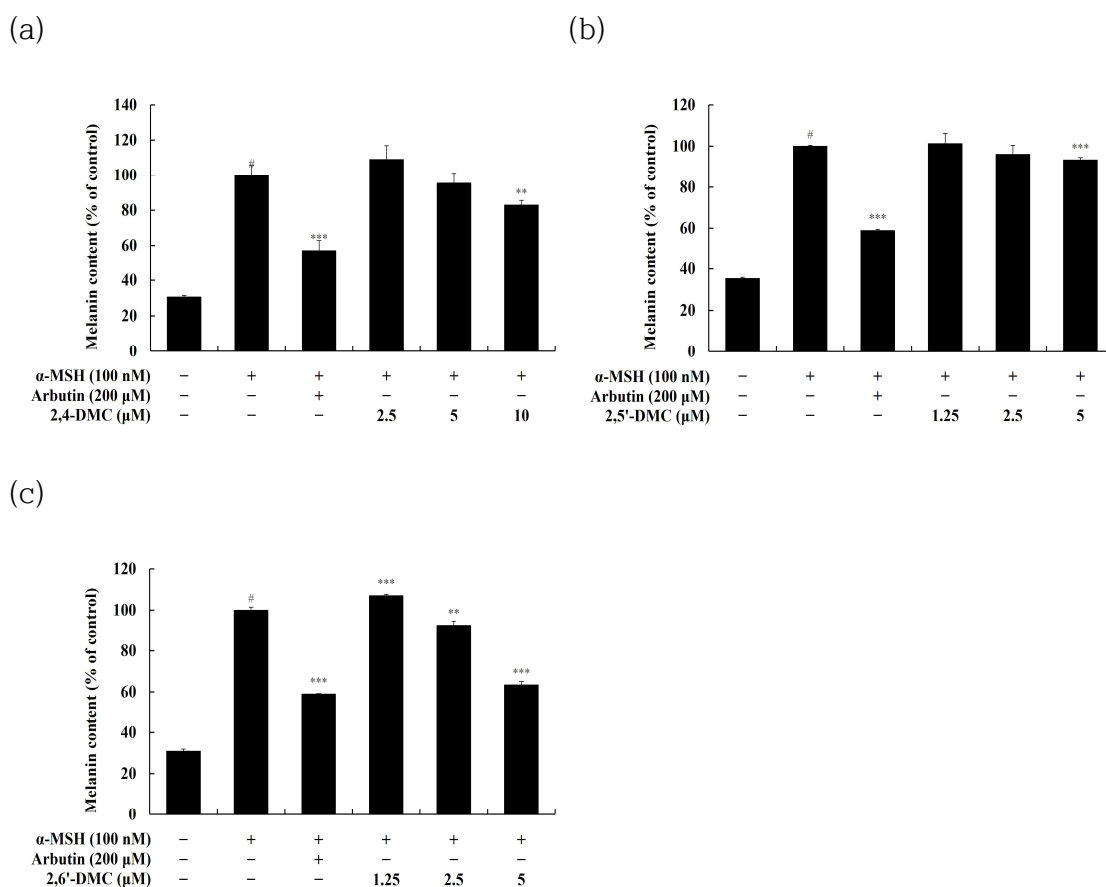


Figure 31. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones on the melanin contents in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-2-methoxychalcones in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 72 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. Melanin contents of B16F10 cells subjected to (a) 2,4-DMC, (b) 2,5'-DMC and (c) 2,6'-DMC. Data are expressed as the mean \pm SD from three independent experiment. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

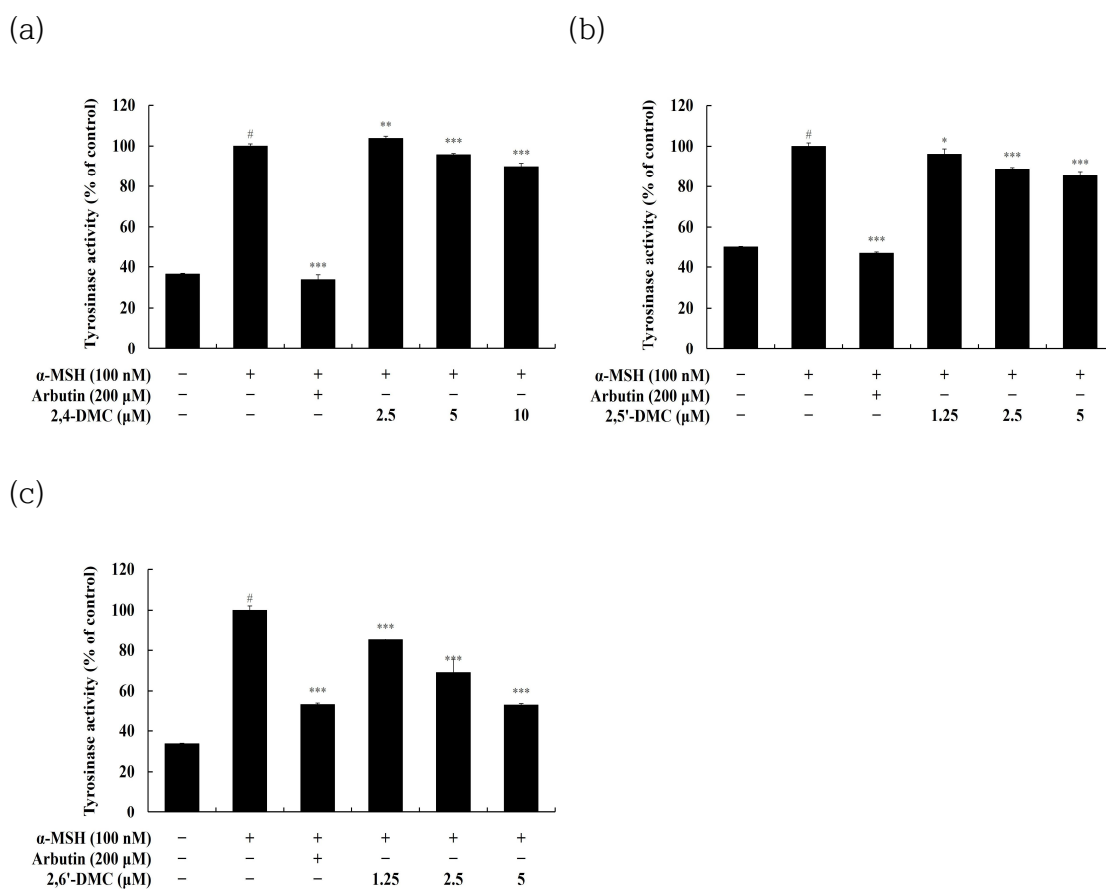


Figure 32. Effect of 2'-hydroxy-2-methoxychalcones on the tyrosinase activities in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2'-hydroxy-2-methoxychalcones in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 72 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. Tyrosinase activities of B16F10 cells subjected to (a) 2,4-DMC, (b) 2,5'-DMC and (c) 2,6'-DMC. Data are expressed as the mean \pm SD from three independent experiment. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

8. B16F10 세포에서 2,6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 효과

8.1. Western blot

8.1.1. B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소 및 MITF 발현에 대한 2,6'-DMC 영향

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 멜라닌 합성에 관여하는 효소이며 MITF는 멜라닌 생성 효소들의 전사인자로서 TYR, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 생성에 관여하는 효소를 활성화하여 멜라닌 세포의 성장, 분화 및 기능을 조절하는 역할을 한다[108-109]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 2,6'-DMC가 이러한 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현에 영향을 주는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 TYR, TRP-1 그리고 TRP-2의 발현량은 2,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 TYR, TRP-1, TRP-2를 각각 약 32.77%, 71.90%, 56.16% 감소시켰다(Fig. 33). 이러한 2,6'-DMC의 멜라닌 생성 효소 억제 효과에 대한 MITF의 영향을 조사하기 위해 MITF 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 MITF의 발현량은 농도 의존적으로 유의하게 억제되었으며 α -MSH 단독 처리 군에 대비하여 2,6'-DMC는 5 μ M에서 약 41.76% 감소시켰다(Fig. 34). 따라서 2,6'-DMC의 멜라닌 생성 효소의 발현이 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 멜라닌 생성이 억제된다는 것을 알 수 있다.

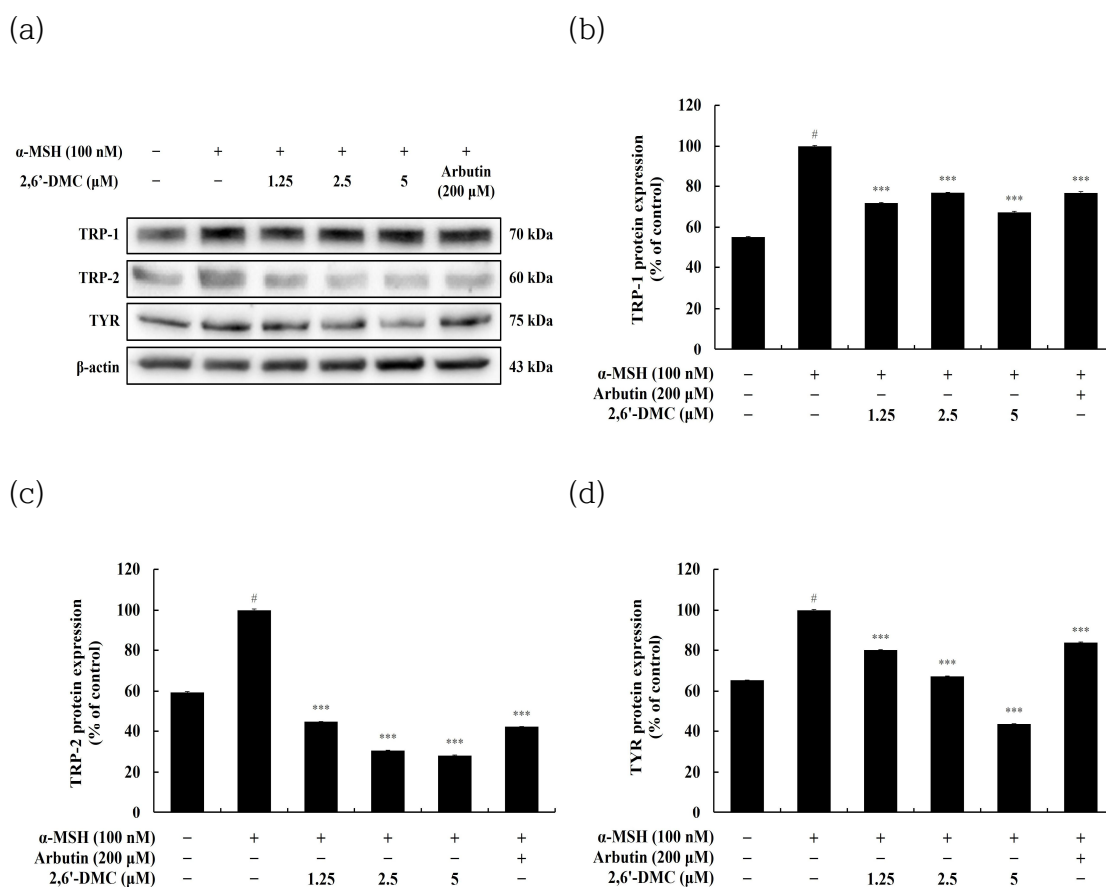


Figure 33. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of TRP-1, TRP-2 and TYR in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) TRP-1/ β -actin, (c) TRP-2/ β -actin, (d) TYR/ β -actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # p < 0.001 vs untreated control group. *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

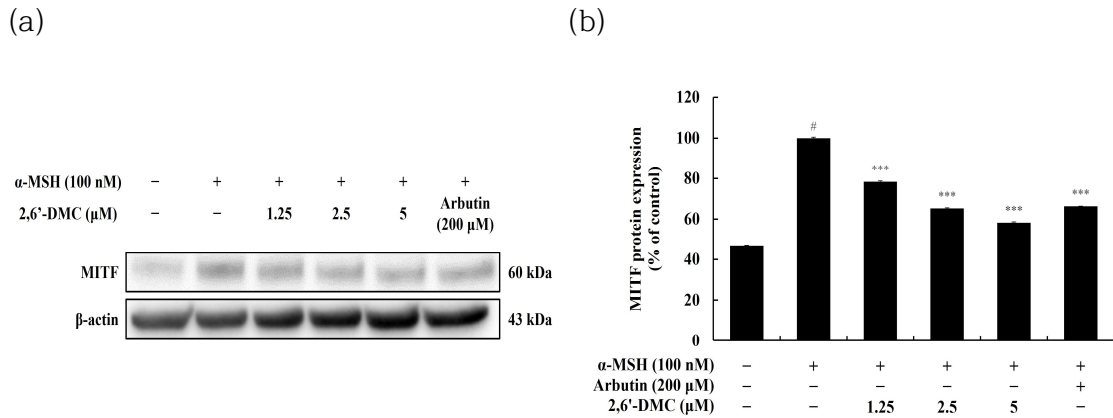


Figure 34. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) MITF/ β -actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # p < 0.001 vs untreated control group. *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

8.1.2. B16F10 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향

Wnt/ β -catenin 경로에서 막 수용체 단백질인 Frizzled가 Wnt 리간드와 결합하여 활성화되면 serine 9번 잔기에서 인산화 및 비활성화된 GSK3 β 는 세포질에서 β -catenin을 방출하고 방출된 β -catenin은 핵으로 전위되어 최종적으로 MITF의 발현을 증가시킨다[110-112]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 2,6'-DMC가 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 β -catenin의 발현량과 GSK3 β 의 인산화는 2,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 β -catenin과 인산화된 GSK3 β 를 각각 약 69.57%, 32.62% 감소시켰다(Fig. 35). 따라서 2,6'-DMC가 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

8.1.3. B16F10 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향

PI3K/AKT 경로는 이전 연구에서 GSK3 β 와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 활성화된 AKT는 Ser 9에서 GSK3 β 를 인산화하여 GSK3 β 를 비활성화하고 β -catenin의 분해를 억제할 수 있는 것으로 여겨진다[113-115]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 2,6'-DMC가 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 AKT의 인산화는 2,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 AKT를 약 44.36% 감소시켰다(Fig. 36). 따라서 2,6'-DMC가 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

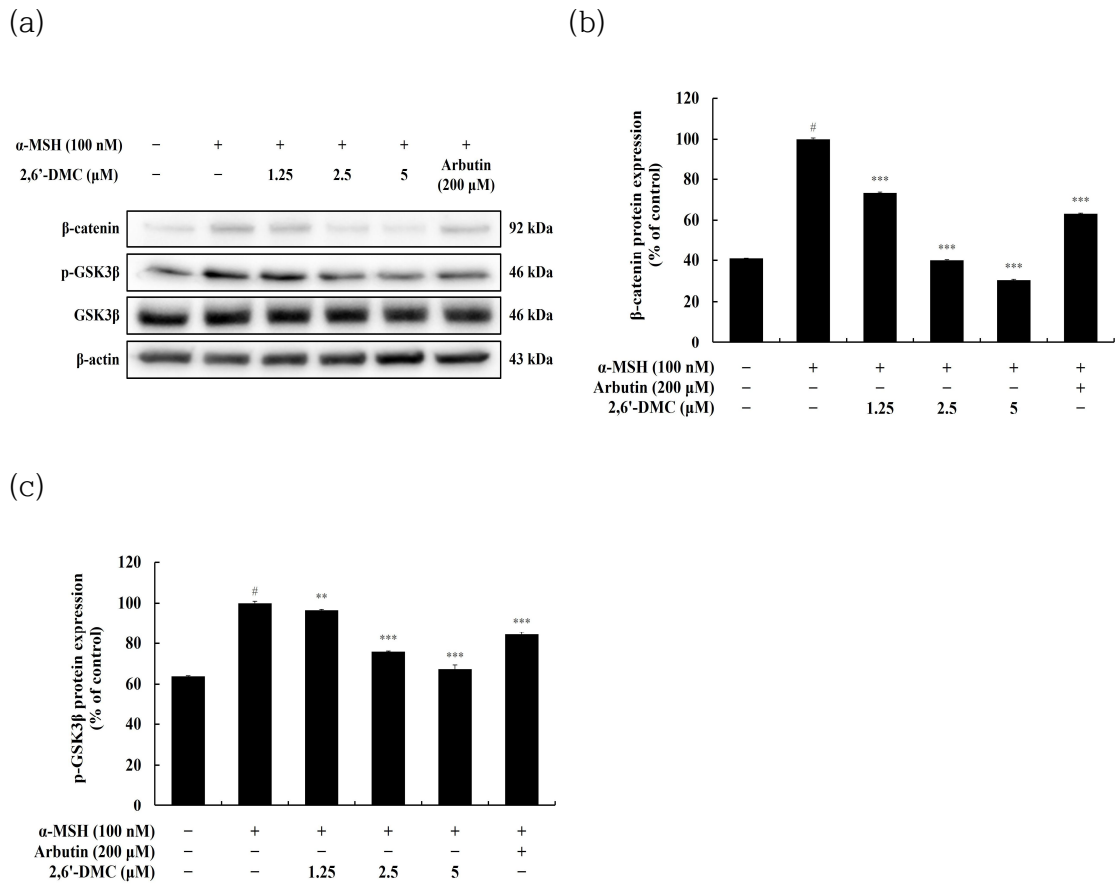


Figure 35. Effect of 2,6'-DMC on protein expression of β -catenin and p-GSK3 β in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) β -catenin/ β -actin, (c) p-GSK3 β /GSK3 β . Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # $p < 0.001$ vs untreated control group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

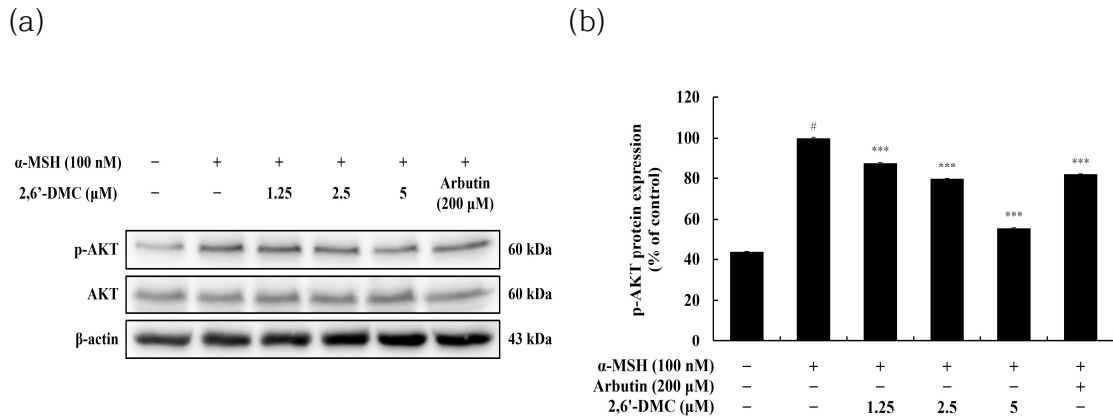


Figure 36. Effect of 2,6'-DMC on phosphorylation expression of AKT in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 4 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-AKT/AKT. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] p < 0.001 vs untreated control group. ^{***} p < 0.001 vs α -MSH alone group.

8.1.4. B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향

MAPK 경로에서 ERK는 음성 신호전달 경로로, ERK의 인산화는 MITF의 인산화를 유도하여 분해됨으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 하향 조절한다. 이와 반대로 p38 및 JNK의 인산화는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 상향 조절한다 [116-118]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 2,6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, 2,6'-DMC의 농도가 증가함에 따라 음성 신호 전달 경로인 ERK의 인산화는 유의하게 증가하는 것으로 나타났고, 양성 신호 전달 경로인 p38과 JNK의 인산화는 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 ERK를 약 182.74% 증가시켰고, 인산화된 p38, JNK를 각각 약 11.83%, 19.93% 감소시켰다(Fig. 37). 따라서 2,6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

8.1.5. B16F10 세포에서 cAMP/PKA 신호 전달 경로에 대한 2,6'-DMC 영향

cAMP/PKA 경로에서 α -MSH는 MC1R과 직접 결합하여 MC1R을 활성화하고 세포 내 cAMP의 축적을 유발한다. cAMP에 의해 PKA가 인산화되고 핵 안으로 전위되어 CREB의 인산화 및 활성화를 촉진하여 MITF의 전사를 상향 조절한다 [119]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 2,6'-DMC가 PKA/CREB 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 CREB과 PKA의 인산화는 2,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 CREB과 PKA를 각각 약 54.31%, 81.06% 감소시켰다(Fig. 38). 따라서 2,6'-DMC가 cAMP/PKA 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

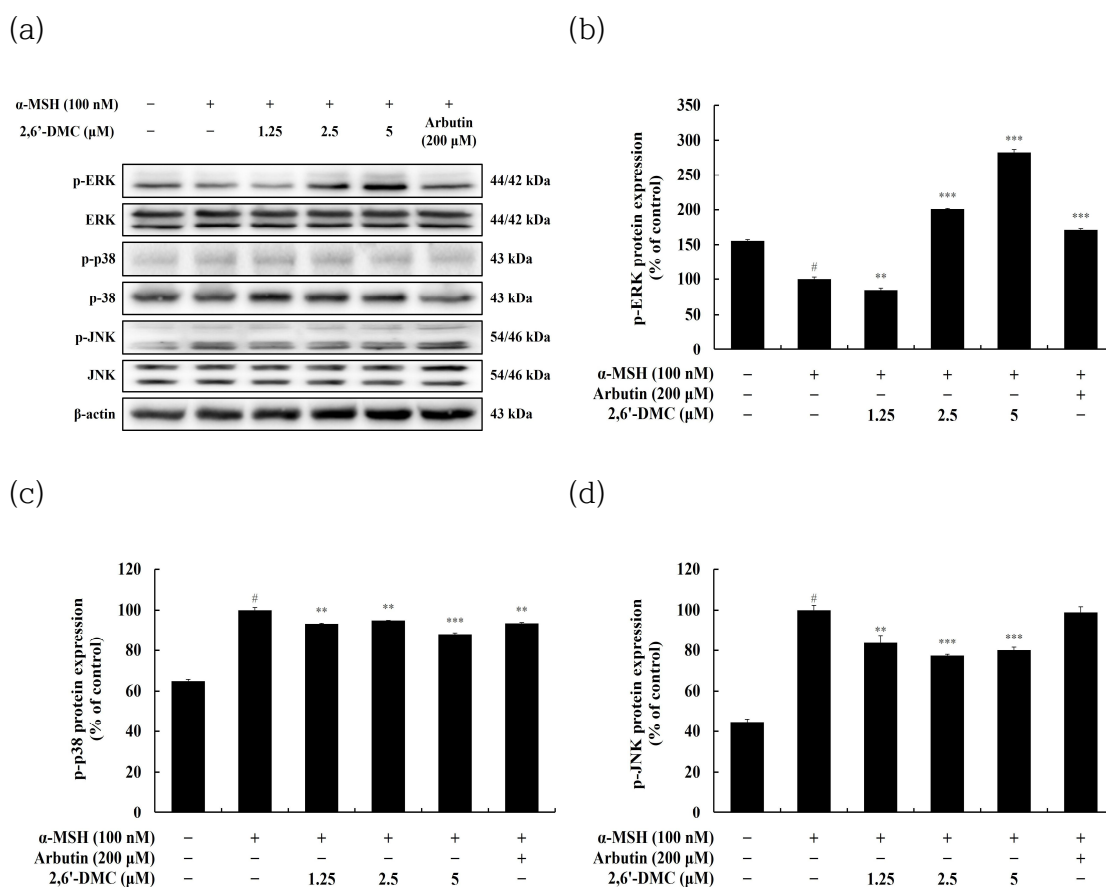
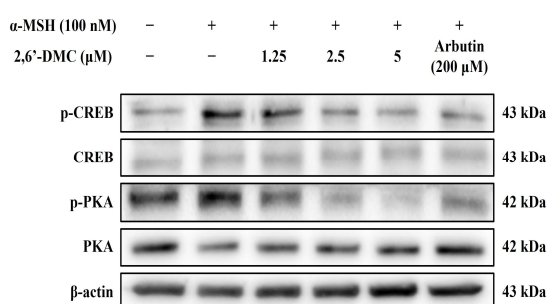
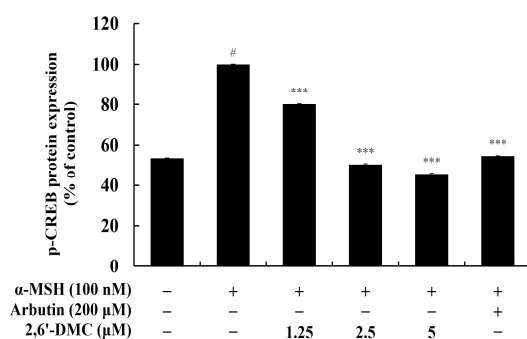


Figure 37. Effect of 2,6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 4 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-ERK/ERK, (c) p-p38/p38, (d) p-JNK/JNK. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

(a)



(b)



(c)

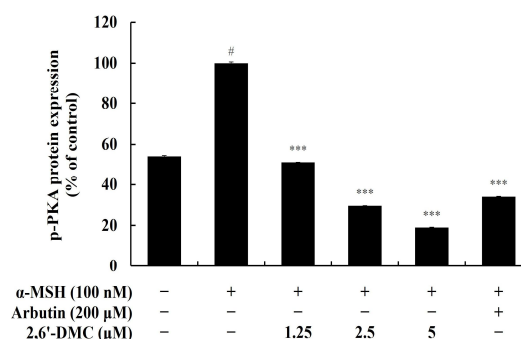


Figure 38. Effect of 2,6'-DMC on phosphorylation expression of CREB and PKA in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 2,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-CREB/CREB, (c) p-PKA/PKA. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

9. RAW 264.7 세포에서 2'-hydroxy-3,6'-dimethoxychalcone (3,6'-DMC)의 항염증 효과

9.1. RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 Cell viability 측정

RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC가 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 다양한 농도 (2.5-40 μM)를 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 세포 생존 기준은 미처리 대조군에 대비하여 90% 이상일 경우 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다고 판단하였다. 실험 결과, 3,6'-DMC는 10 μM 이하의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 39).

9.2. RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 NO production 측정

RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 세포 독성을 보이지 않는 범위인 10 μM 이하의 농도에서 NO 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 NO 생성량 측정 실험을 수행하였다. RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 다양한 농도 (1.25-10 μM)를 처리하여 24시간 동안 배양시켰으며 iNOS 억제제인 L-NIL (40 μM)을 양성대조군으로 사용하였다. NO 생성량은 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 단독 처리 군에 대비하여 얼마나 억제하였는지 조사하였다. 실험 결과, 10 μM 에서 NO의 생성을 LPS 단독 처리 군에 대비하여 3,6'-DMC는 약 72.58% 억제하였다(Fig. 40). 따라서 세포 독성이 나타나지 않은 10 μM 이하의 농도에서 추가 실험을 진행하였다.

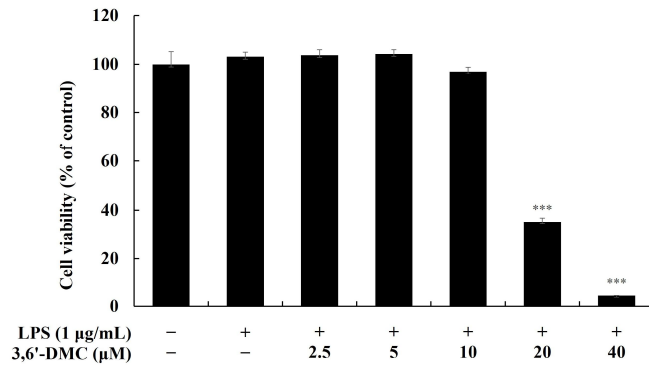


Figure 39. Effect of 3,6'-DMC on the cell viability in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (2.5, 5, 10, 20 and 40 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) for 24 h. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiment. *** $p < 0.001$ vs untreated control group.

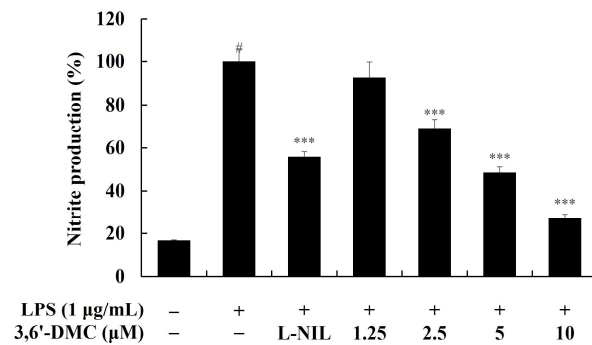


Figure 40. Effect of 3,6'-DMC on nitric oxide production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (1.25, 2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. L-NIL (40 µM) was used as a positive control. Inhibition of nitric oxide production by 3,6'-DMC treatment in LPS-induced RAW 264.7 cells was measured using the Griess reagent. Nitric oxide production of Data are expressed as the mean ± SD from three repeated experiment. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs LPS alone group.

9.3. PGE₂ 및 전염증성 cytokine production 측정

PGE₂는 COX-2에 의해 유도되며 염증 및 발암을 포함하는 다양한 병리학적 과정에 관여하고 있고, cytokine은 면역세포가 분비하는 단백질로 면역세포의 활성화, 증식 및 분화를 조절하여 염증 반응을 매개하는 인자이다. LPS 자극으로 활성화된 대식세포는 여러 신호 전달 경로를 통해 다양한 염증성 매개체와 염증성 cytokine을 생성한다[106-107]. 시료가 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 PGE₂와 전염증성 cytokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α)의 생성을 억제하는지 조사하기 위해서 ELISA kit를 사용하여 생성량을 측정하였다. RAW 264.7 대식세포에서 3,6'-DMC의 다양한 농도 (1.25-10 μ M)를 처리하여 24시간 동안 배양시켰으며 COX-2 억제제인 NS-398 (1 μ M)을 PGE₂ 생성량 측정의 양성대조군으로 사용하였다. PGE₂와 염증성 cytokine 생성량은 LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 얼마나 억제하였는지 조사하였다. 실험 결과, 10 μ M에서 PGE₂, IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 생성을 각각 약 26.71%, 51.89%, 20.47%, 69.16% 감소시켰다(Fig. 41).

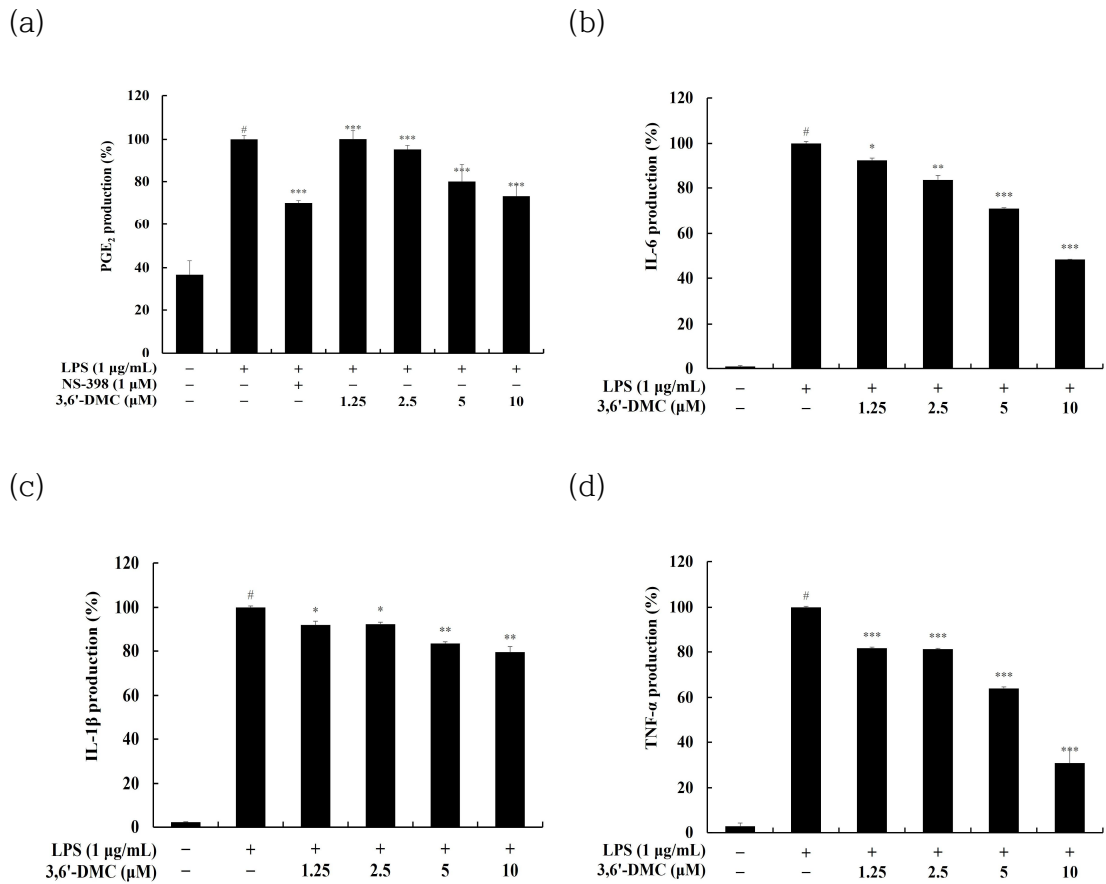


Figure 41. Effect of 3,6'-DMC on production of PGE₂ and pro-inflammatory cytokines in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (1.25, 2.5, 5 and 10 μM) in the presence of LPS (1 μg/mL) stimulation for 24 h. (a) PGE₂ production, (b) IL-6 production, (c) IL-1β production and (d) TNF-α production were determined using an ELISA kit. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. **p* < 0.1, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs LPS alone group.

9.4. Western blot

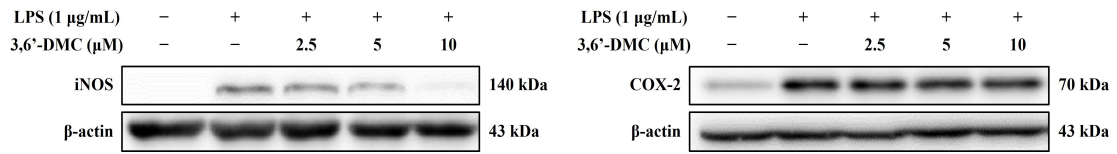
9.4.1. RAW 264.7 세포에서 iNOS 및 COX-2 발현에 대한 3,6'-DMC 영향

RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC가 세포 독성을 보이지 않는 범위인 10 μ M 이하의 농도에서 NO, PGE₂ 생성 억제에 iNOS와 COX-2 발현량 억제의 하향조절에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 iNOS, COX-2의 발현량은 3,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 10 μ M에서 iNOS를 85.49%, COX-2를 16.72% 감소시켰다(Fig. 42). 따라서 3,6'-DMC에 의한 iNOS, COX-2 발현량 감소가 염증성 매개체인 NO와 PGE₂ 생성 감소로 이어질 수 있음을 시사한다.

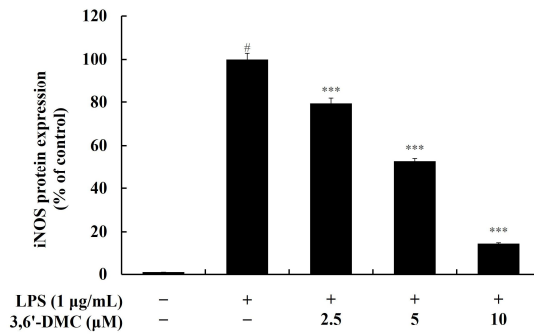
9.4.2. RAW 264.7 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향

LPS로 자극된 대식세포에서 MAPK 신호 전달 경로의 활성화를 억제함으로써 다양한 염증성 cytokine 및 염증 매개체의 생성의 감소로 함염증 효과가 나타난다 [120-122]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 NO 및 전염증성 cytokine 생성 억제가 MAPK 신호 전달 경로에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 ERK, p38의 인산화는 3,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 10 μ M에서 인산화된 ERK, p38를 각각 약 25.80%, 67.31% 감소시켰다 (Fig. 43). 따라서 3,6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로의 활성화 억제 통해 NO 및 전염증성 cytokine의 생성 수준을 하향 조절함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

(a)



(b)



(c)

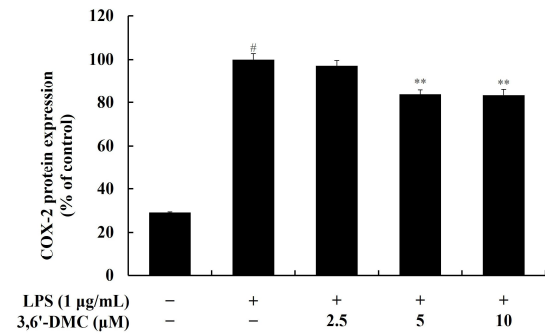


Figure 42. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of iNOS and COX-2 in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 24 h. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) iNOS/β-actin, (c) COX-2/β-actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{**}*p* < 0.01, ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

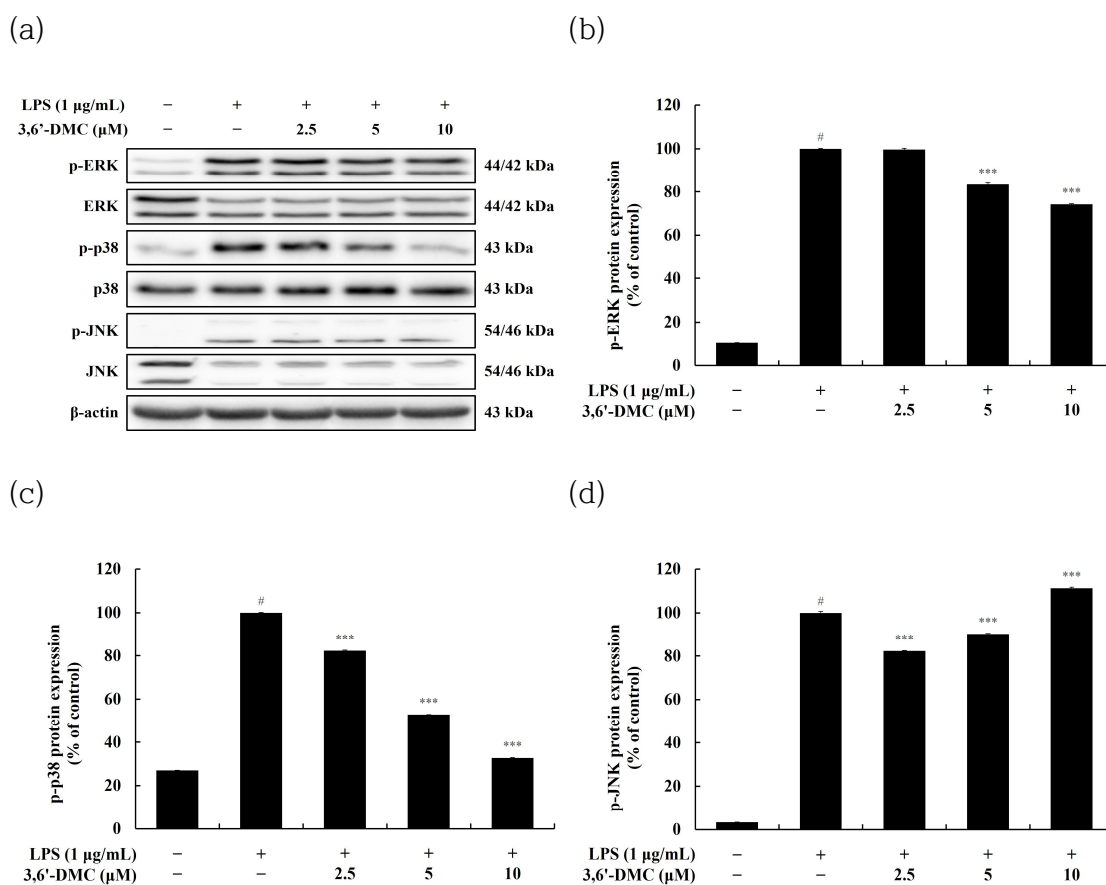


Figure 43. Effect of 3,6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 20 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-ERK/ERK, (c) p-p38/p38, (d) p-JNK/JNK. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

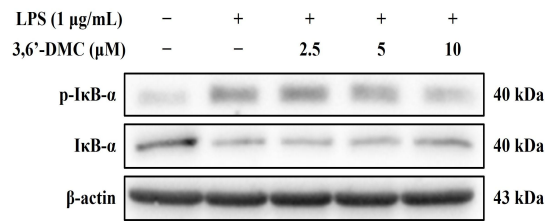
9.4.3. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향

NF- κ B는 I κ B- α 와의 결합을 통해 세포질에서 비활성화 상태로 존재하며 I κ B- α 가 인산화되면서 분해된 후 LPS로 자극된 대식세포에서 NF- κ B의 활성화가 일어난다. 활성화된 NF- κ B는 세포질에서 핵으로 이동하여 다양한 염증성 cytokine 및 염증 전사 인자의 구성원을 활성화한다고 보고되었다[123-126]. 따라서 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 3,6'-DMC의 전염증성 cytokine 및 염증성 매개체 생성의 억제가 NF- κ B 신호 전달 경로에 의한 것인지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 유도된 I κ B- α 의 인산화는 3,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 억제되었다. 이러한 결과와 일치하게, 3,6'-DMC는 농도 의존적으로 세포질에서 I κ B- α 의 분해를 억제하였다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 10 μ M에서 인산화된 I κ B- α 를 약 51.89% 감소시켰으며, NF- κ B와 결합된 I κ B- α 를 약 40.6% 증가시켰다(Fig. 44). 따라서 3,6'-DMC가 I κ B- α 의 인산화 조절을 통해 I κ B- α 의 분해를 억제함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

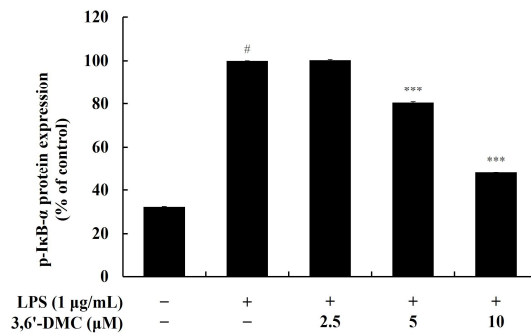
9.4.4. RAW 264.7 세포에서 NF- κ B 핵 전위에 대한 3,6'-DMC 영향

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 p65가 세포질에서 핵으로의 전위를 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, 세포질에서 p65의 생성은 3,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 증가하였다. 이러한 결과와 일치하게, 3,6'-DMC는 핵에서 p65의 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. LPS (1 μ g/mL) 단독 처리 군에 대비하여 10 μ M에서 세포질에서의 p65를 약 29.33% 증가시켰으며, 핵에서의 p65를 약 57.80% 감소시켰다(Fig. 45) 따라서 3,6'-DMC가 NF- κ B의 핵 전위를 방지함으로써 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

(a)



(b)



(c)

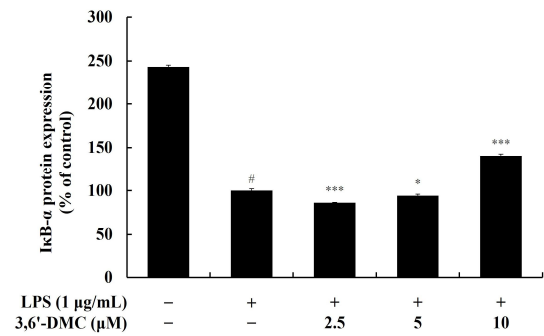
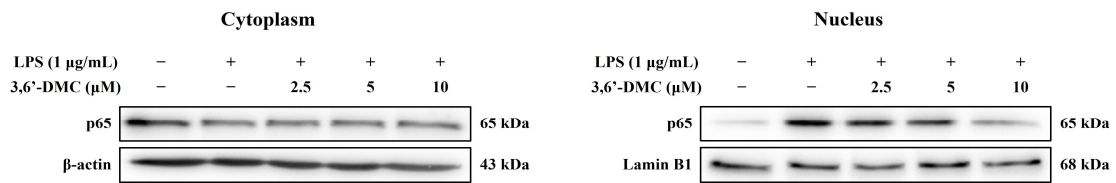
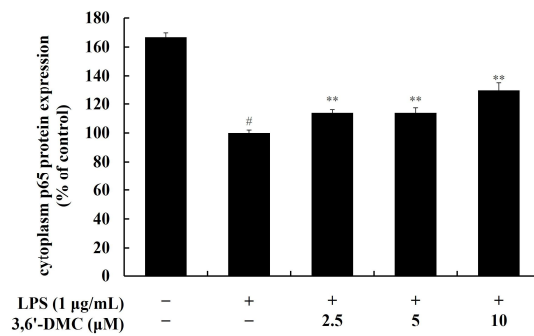


Figure 44. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of p-IκB-α and IκB-α in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 15 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-IκB-α/β-actin, (c) IκB-α/β-actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{*}*p* < 0.1, ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

(a)



(b)



(c)

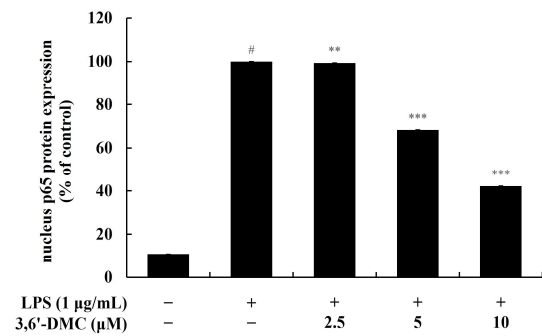


Figure 45. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of NF-κB (p65) in LPS induced RAW 264.7 cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (2.5, 5 and 10 µM) in the presence of LPS (1 µg/mL) stimulation for 15 m. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p65/β-actin in cytoplasm, (c) p65/Lamin B1 in nucleus. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β-actin and Lamin B1. Data are expressed as the mean ± SD from single triplicate experiment using Image J software. [#]*p* < 0.001 vs untreated control group. ^{**}*p* < 0.01, ^{***}*p* < 0.001 vs LPS alone group.

10. B16F10 세포에서 3,6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 효과

10.1. B16F10 세포에서 3,6'-DMC의 Cell viability 측정

B16F10 세포에서 3,6'-DMC가 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위해서 MTT assay를 수행하였다. B16F10 세포에서 3,6'-DMC의 다양한 농도 (2.5-40 μ M)를 처리하여 72시간 동안 배양시켰다. 세포 생존 기준은 미처리 대조군에 대비하여 90% 이상일 경우 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다고 판단하였다. 실험 결과, 3,6'-DMC는 5 μ M 이하의 농도에서 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 46).

10.2. Melanin contents 및 Tyrosinase 활성에 대한 3,6'-DMC의 영향

B16F10 melanoma 세포에서 3,6'-DMC가 세포 독성을 보이지 않는 범위인 5 μ M 이하의 농도에서 멜라닌 합성 및 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성 측정 실험을 수행하였다. B16F10 melanoma 세포에서 3,6'-DMC의 다양한 농도를 처리하여 72시간 동안 배양시켰으며 α -MSH(100 nM) 및 arbutin(200 μ M)은 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용되었다. 실험 결과, α -MSH 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 멜라닌 생성을 3,6'-DMC는 약 31.42% 억제하였다(Fig. 47). 또한 α -MSH 단독 처리 군에 대비하여 tyrosinase 활성을 3,6'-DMC는 약 37.97% 억제하였다(Fig. 48). 따라서 3,6'-DMC로 세포독성이 나타나지 않은 5 μ M 이하의 농도에서 추가실험을 진행하였다.

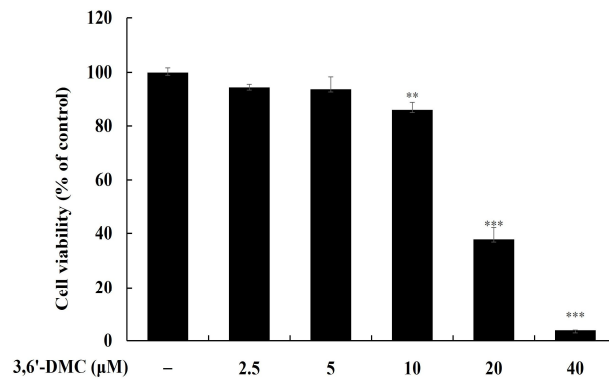


Figure 46. Effect of 3,6'-DMC on the cell viability in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (2.5, 5, 10, 20 and 40 μM) for 72 h. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiment. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs untreated control group.

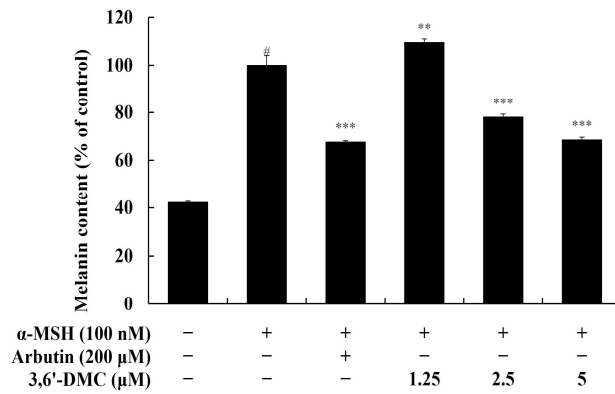


Figure 47. Effect of 3,6'-DMC on the melanin content in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 72 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. Data are expressed as the mean \pm SD from three independent experiment. # p < 0.001 vs untreated control group. ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

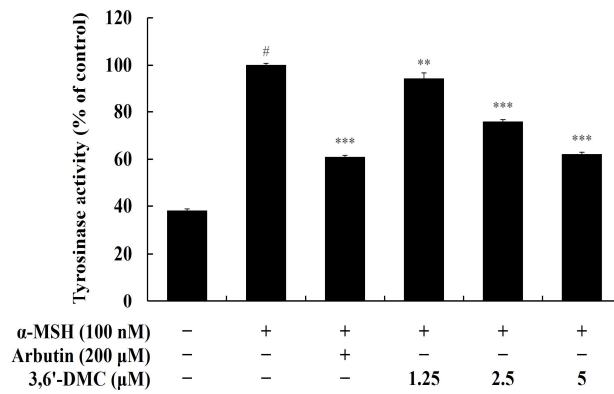


Figure 48. Effect of 3,6'-DMC on the tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 72 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. Data are expressed as the mean \pm SD from three independent experiment. # p < 0.001 vs untreated control group. ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

10.3. Western blot

10.3.1. B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소 및 MITF 발현에 대한 3,6'-DMC 영향

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 멜라닌 합성에 관여하는 효소이며 MITF는 멜라닌 생성 효소들의 전사인자로서 TYR, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 생성에 관여하는 효소를 활성화하여 멜라닌 세포의 성장, 분화 및 기능을 조절하는 역할을 한다[108-109]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 3,6'-DMC가 이러한 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현에 영향을 주는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 TYR, TRP-1 그리고 TRP-2의 발현량은 3,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 TYR, TRP-1, TRP-2를 각각 약 36.26%, 26.36%, 46.50% 감소시켰다(Fig. 49). 이러한 3,6'-DMC의 멜라닌 생성 효소 억제 효과에 대한 MITF의 영향을 조사하기 위해 MITF 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 MITF의 발현량은 농도 의존적으로 유의하게 억제되었으며 α -MSH 단독 처리 군에 대비하여 3,6'-DMC는 5 μ M에서 약 46.62% 감소시켰다(Fig. 50). 따라서 3,6'-DMC의 멜라닌 생성 효소의 발현이 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 멜라닌 생성이 억제되는 것을 알 수 있다.

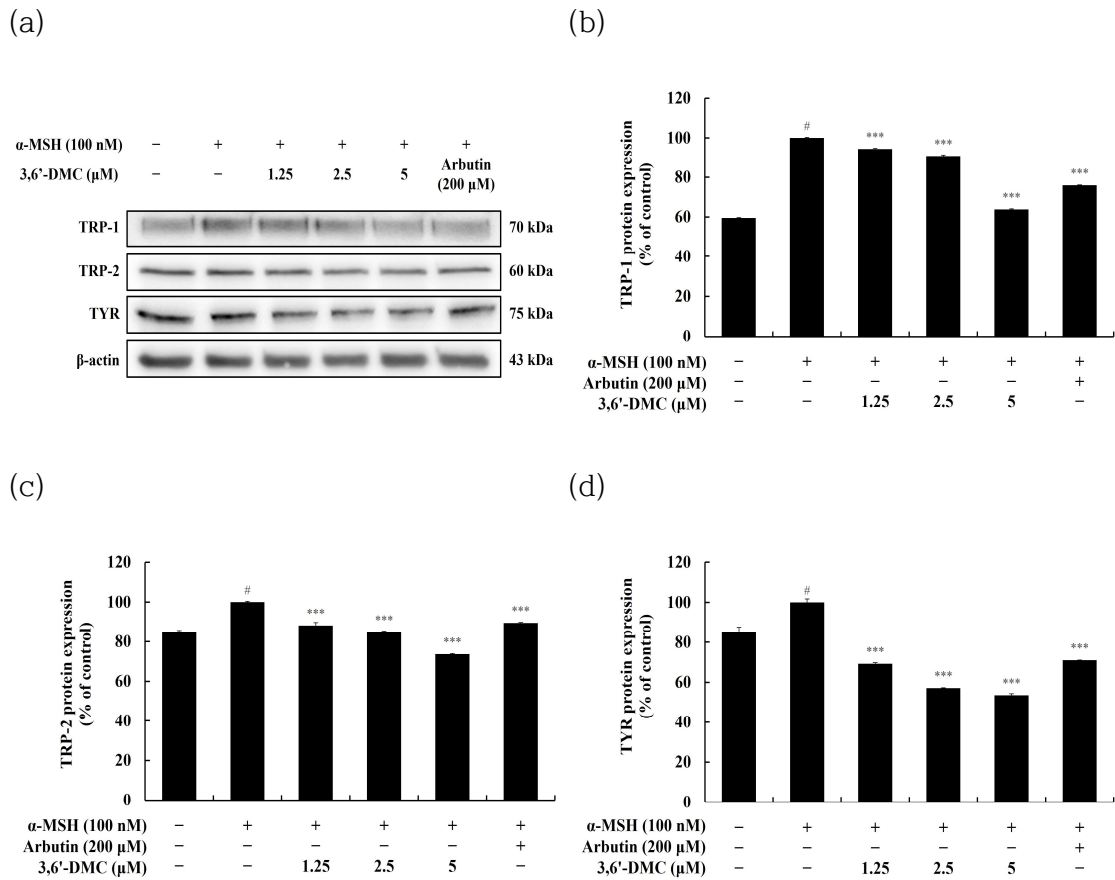


Figure 49. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of TRP-1, TRP-2 and TYR in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) TRP-1/ β -actin, (c) TRP-2/ β -actin, (d) TYR/ β -actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are presented as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J. # p < 0.001 vs untreated control group. *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

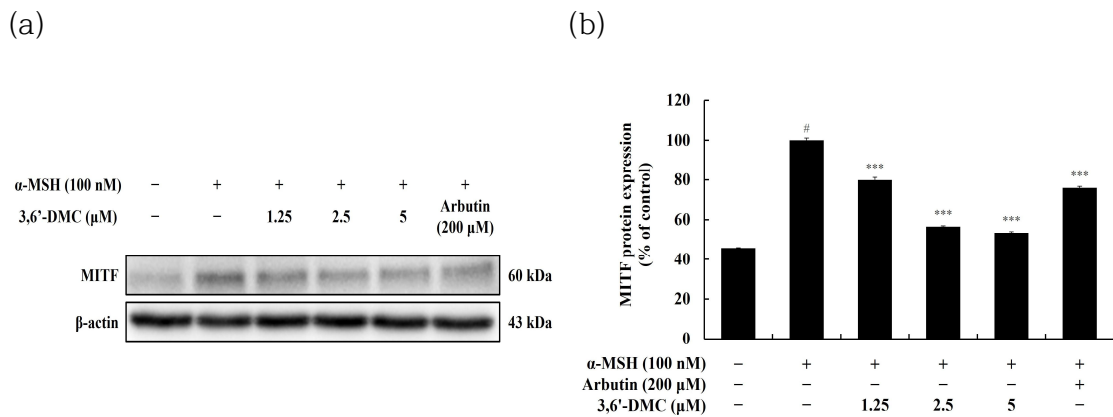


Figure 50. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of MITF in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) MITF/ β -actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # p < 0.001 vs untreated control group. *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

10.3.2. B16F10 세포에서 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향

Wnt/ β -catenin 경로에서 막 수용체 단백질인 Frizzled가 Wnt 리간드와 결합하여 활성화되면 serine 9번 잔기에서 인산화 및 비활성화된 GSK3 β 는 세포질에서 β -catenin을 방출하고 방출된 β -catenin은 핵으로 전위되어 최종적으로 MITF의 발현을 증가시킨다[110-112]. 또한 tyrosine 216번 잔기에서 인산화된 GSK3 β 는 활성화되어 β -catenin의 인산화를 유도하고, 유비퀴틴화 및 분해를 일으킴으로써 MITF의 발현을 감소시킨다[70-72]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 3,6'-DMC가 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 β -catenin의 발현량과 GSK3 β 의 인산화는 3,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 α -MSH에 의해 유도된 β -catenin의 인산화는 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 β -catenin과 인산화된 GSK3 β 를 각각 약 17.55%, 56.03% 감소시켰고, 인산화된 β -catenin을 약 23.98% 증가시켰다(Fig. 51). 따라서 3,6'-DMC가 Wnt/ β -catenin 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

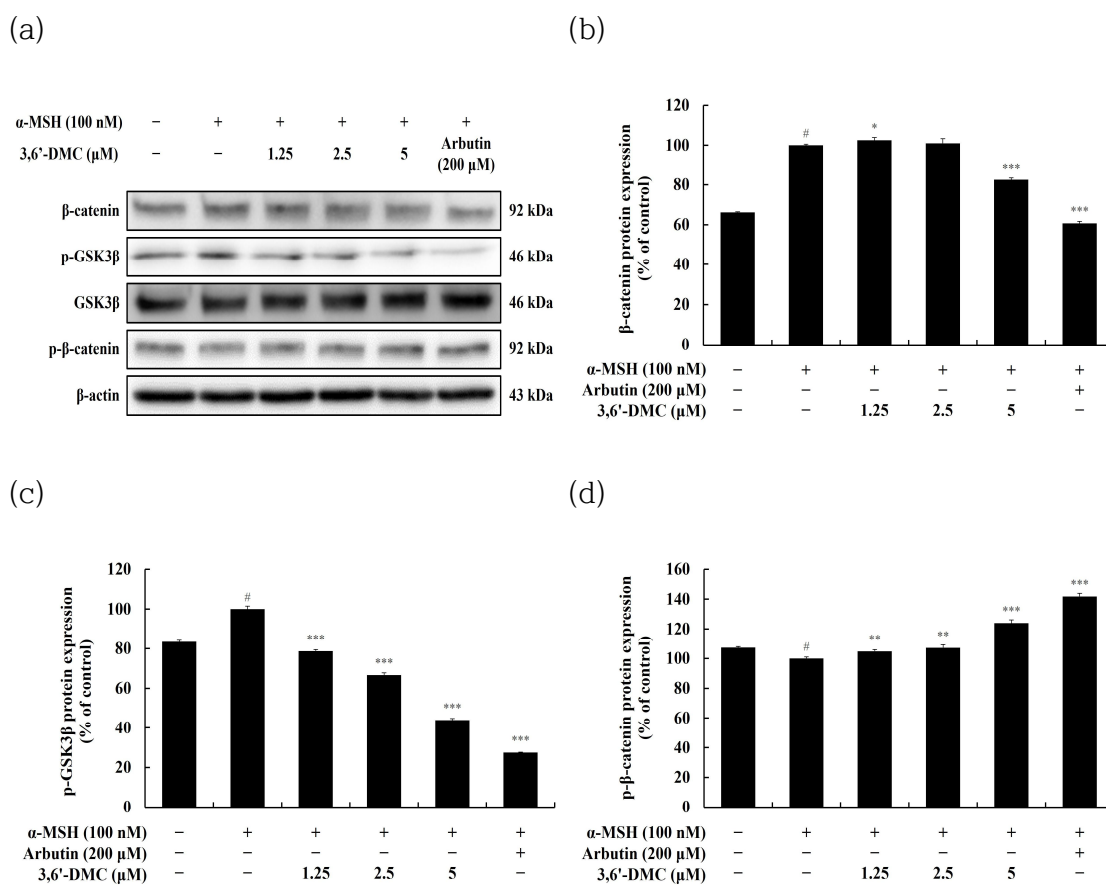


Figure 51. Effect of 3,6'-DMC on protein expression of β -catenin, p-GSK3 β and p- β -catenin in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) β -catenin/ β -actin, (c) p-GSK3 β /GSK3 β , (d) p- β -catenin/ β -actin. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # p < 0.001 vs untreated control group. * p < 0.1, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

10.3.3. B16F10 세포에서 PI3K/AKT 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향

PI3K/AKT 경로는 이전 연구에서 GSK3 β 와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 활성화된 AKT는 Ser 9에서 GSK3 β 를 인산화하여 GSK3 β 를 비활성화하고 β -catenin의 분해를 억제할 수 있는 것으로 여겨진다[113-115]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 3,6'-DMC가 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 AKT의 인산화는 3,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 AKT를 약 65.45% 감소시켰다(Fig. 52). 따라서 3,6'-DMC가 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

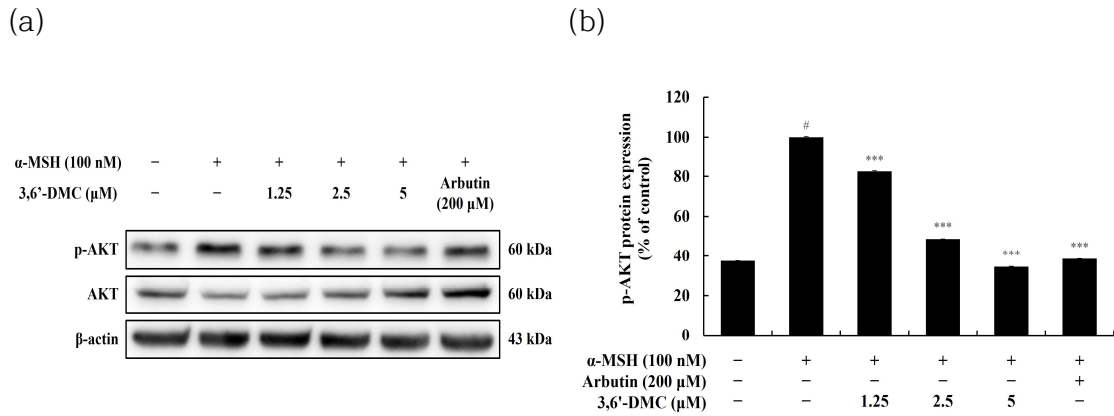


Figure 52. Effect of 3,6'-DMC on on phosphorylation expression of AKT in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 4 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-AKT/AKT. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] p < 0.001 vs untreated control group. ^{***} p < 0.001 vs α -MSH alone group.

10.3.4. B16F10 세포에서 MAPK 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향

MAPK 경로에서 ERK는 음성 신호전달 경로로, ERK의 인산화는 MITF의 인산화를 유도하여 분해됨으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 하향 조절한다. 이와 반대로 p38 및 JNK의 인산화는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 상향 조절한다 [116-118]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 3,6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, 3,6'-DMC의 농도가 증가함에 따라 음성 신호 전달 경로인 ERK의 인산화는 유의하게 증가하는 것으로 나타났고, 양성 신호 전달 경로인 p38과 JNK의 인산화는 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 ERK를 약 78.15% 증가시켰고, 인산화된 p38, JNK를 각각 약 28.17%, 53.10% 감소시켰다(Fig. 53). 따라서 3,6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

10.3.5. B16F10 세포에서 cAMP/PKA 신호 전달 경로에 대한 3,6'-DMC 영향

cAMP/PKA 경로에서 α -MSH는 MC1R과 직접 결합하여 MC1R을 활성화하고 세포 내 cAMP의 축적을 유발한다. cAMP에 의해 PKA가 인산화되고 핵 안으로 전위되어 CREB의 인산화 및 활성화를 촉진하여 MITF의 전사를 상향 조절한다 [119]. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 3,6'-DMC가 PKA/CREB 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과, α -MSH에 의해 유도된 CREB과 PKA의 인산화는 3,6'-DMC에 의해 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. α -MSH (100 nM) 단독 처리 군에 대비하여 5 μ M에서 인산화된 CREB과 PKA를 각각 약 24.22%, 24.77% 감소시켰다(Fig. 54). 따라서 3,6'-DMC가 cAMP/PKA 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

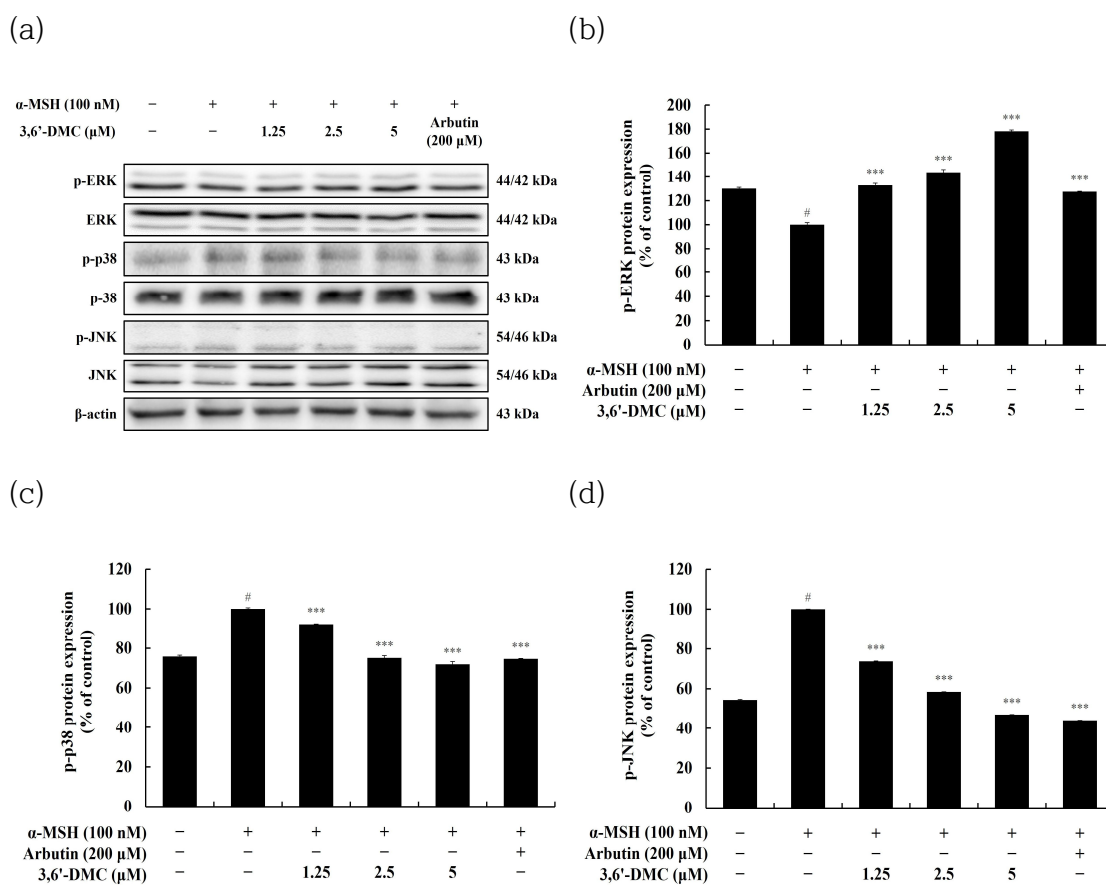
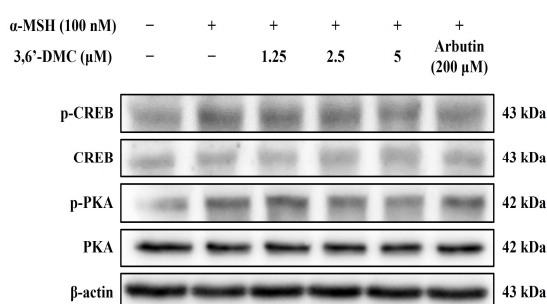
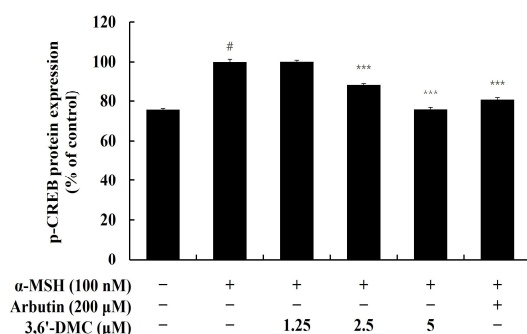


Figure 53. Effect of 3,6'-DMC on phosphorylation expression of MAPK in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 4 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-ERK/ERK, (c) p-p38/p38, (d) p-JNK/JNK. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. [#] $p < 0.001$ vs untreated control group. ^{***} $p < 0.001$ vs α -MSH alone group.

(a)



(b)



(c)

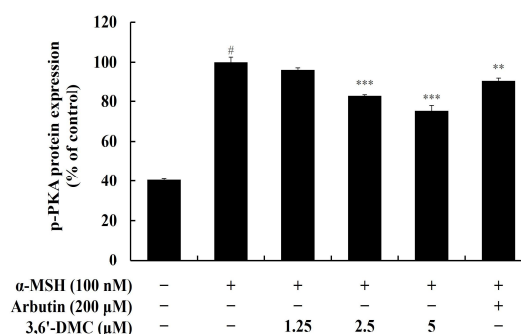


Figure 54. Effect of 3,6'-DMC on phosphorylation expression of CREB and PKA in α -MSH induced B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 3,6'-DMC (1.25, 2.5 and 5 μ M) in the presence of α -MSH (100 nM) stimulation for 24 h. Arbutin (200 μ M) was used as the positive control. (a) Western blotting results, and protein expression of (b) p-CREB/CREB, (c) p-PKA/PKA. Equal amounts of protein loadings were confirmed by using β -actin. Data are expressed as the mean \pm SD from single triplicate experiment using Image J software. # p < 0.001 vs untreated control group. *** p < 0.001 vs α -MSH alone group.

11. 인체피부 일차자극 시험

본 시험은 제외기준 및 선정기준에 준하는 여성 피시험자 34명이 본 시험에 참여하였다. 피시험자들의 평균연령은 41.56 ± 7.37 세였으며, 최고 연령자는 51세, 최저 연령자는 25세였다. 시험 결과 4',6'-DMC와 3,6'-DMC는 인체 피부에 대한 일차 자극 측면에서 저자극 점주의 물질로 판단되었다(Table. 3).

No.	Test Samples	No. of Responde r	20 min after patch removal				24 hr after patch removal				Reaction Grade (R)		
			+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4	20 m	24 h	Mean
1	3,6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone 10 μ M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
2	3,6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone 5 μ M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
3	4',6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone 10 μ M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
4	4',6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone 5 μ M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

Table 3. Results of 4',6'-DMC and 3,6'-DMC on human skin primary irritation test.

본 시험은 제외기준 및 선정기준에 준하는 여성 피시험자 33명이 본 시험에 참여하였다. 피시험자들의 평균연령은 45.82 ± 7.84 세였으며, 최고 연령자는 53세, 최저 연령자는 25세였다. 시험 결과 2,6'-DMC는 인체 피부에 대한 일차 자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판단되었다(Table. 4).

No.	Test Samples	No. of Responde r	20 min after patch removal				24 hr after patch removal				Reaction Grade (R)		
			+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4	20 m	24 h	Mean
1	2,6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone 10 μ M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
2	2,6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone 5 μ M	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

Table 4. Results of 2,6'-DMC on human skin primary irritation test.

IV. 고찰

Chalcone과 그 유도체들은 식용 및 약용 식물에 풍부하게 함유되어 있으며 여러 생물학적 활성이 있다고 연구되어 왔다. Chalcone 골격을 기반으로 다양한 약리학적 특성을 가진 화합물들이 개발되었지만 2'-hydroxy-dimethoxychalcone의 항멜라닌 및 항염증에 미치는 영향은 완전히 조사되지 않았다. 따라서 RAW 264.7 및 B16F10 melanoma 세포에서 2'-hydroxy-dimethoxychalcone 유도체들의 구조적 차이에 따른 생물학적 활성을 알아보고자 하였다.

염증은 외부에서 유입된 유해 물질에 대항하기 위한 인체의 생화학적 반응이다. 그러나 과도하고 지속적인 염증은 동맥경화, 알레르기, 천식, 만성폐쇄성폐질환, 염증성 장질환, 건선, 류마티스 관절염 등 여러 장기에 심각한 염증성 질환을 유발할 수 있다. 현재 진통제, 항염증제로 널리 사용되고 있는 비스테로이드 항염증제(NSAIDs)는 다양한 부작용과 NSAIDs를 과다복용한 일부 환자에게서는 위장장애, 혼수, 급성 신부전, 심혈관 장애 등과 같은 심각한 임상 후유증이 보고되고 있다. 따라서 인체에 안전하며 효과적인 항염증제를 찾기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다. 이에 따라 2'-hydroxy-dimethoxychalcone 유도체가 항염증제로서의 활성을 확인하기 위해 실험을 진행하였으며 그 효과를 입증하였다.

2'-hydroxy-dimethoxychalcone의 항염증 효과를 확인하기 위해 먼저 MTT 분석을 통해 세포 생존 농도를 조사하였다. 세포 생존율은 미처리군에 대비하여 90% 이상인 농도를 사용하였다. 그 후, 세포 독성이 나타나지 않은 농도에서 NO 생성량 측정 실험을 진행하였다. 실험 결과, 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones 중에서 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (4',6'-DMC), 2'-hydroxy-2'-methoxy-chalcones 중에서 2'-hydroxy-2,6'-dimethoxychalcone (2,6'-DMC)의 NO 생성 억제 활성이 가장 우수하였으며 흥미롭게 6' 위치에 methoxy기가 붙은 2'-hydroxychalcone 화합물의 NO 생성 억제 활성이 우수하다는 것을 확인하였다. 따라서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 2'-hydroxy-3,6'-dimethoxychalcone (3,6'-DMC)에 대한 항염증 추가 실험을 진행하였다.

LPS 자극에 의해 활성화된 대식세포는 전염증성 효소인 iNOS를 생성한 후 L-arginine의 산화를 촉매하여 NO를 생성한다. NO의 발현은 다양한 염증을 촉진

하여 패혈성 쇼크, 류미티스 관절염 등을 포함하는 많은 염증성 질환의 원인이 된다. 따라서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC가 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였으며 그 결과, 4',6'-DMC 20 μ M에서 LPS 단독 처리 군에 대비하여 83.95% 감소시켰으며 2,6'-DMC 10 μ M에서 LPS 단독 처리 군에 대비하여 61.95% 감소시켰고, 3,6'-DMC 10 μ M에서 LPS 단독 처리 군에 대비하여 72.58% 감소시켰다. 이는 모두 양성 대조군 L-NIL보다 NO 생성 억제 활성이 우수했다.

4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 염증 반응을 매개하는 인자인 PGE₂와 전염증성 cytokine의 생성량을 억제하는지 조사하기 위해서 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 그 결과 LPS 자극으로 유도된 PGE₂와 전염증성 cytokine인 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 생성이 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC에 의해 억제되는 것을 확인하였다.

4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 RAW 264.7 세포에서 어떤 신호전달 경로를 통해 염증성 매개체를 억제 함으로써 염증 반응을 억제하는지 확인하기 위해 western blot 실험을 진행하였다. 염증 반응의 지표물질인 NO는 iNOS에 의해 생성되고, 염증 매개체인 PGE₂는 arachidonic acid에서 COX-2에 의해 생성된다. 따라서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 의한 NO 및 PGE₂의 생성 억제가 iNOS와 COX-2의 감소에 의한 것인지 알아본 결과, 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC는 iNOS와 COX-2의 생성을 저해함으로써 NO와 PGE₂의 생성을 저해하는 것으로 확인하였다.

LPS 자극으로 활성화된 대식세포는 EKR, p38, JNK로 구성되어 있는 MAPK 경로를 활성화함으로써 다양한 염증성 cytokine 및 염증 매개체의 생성을 증가시킨다. MAPK 신호 전달 경로가 염증성 활성화에 미치는 영향을 확인한 결과, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 ERK 및 p38의 인산화가 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 MAPK 신호 전달 경로를 통해 다양한 염증성 cytokine 및 염증 매개체의 생성 수준을 하향 조절하는 것을 알 수 있다.

NF- κ B는 I κ B- α 와의 결합을 통해 세포질에서 비활성화 상태로 존재하며 I κ B- α 가 인산화되면서 분해된 후 LPS로 자극된 대식세포에서 NF- κ B의 활성화가 일어난다. 활성화된 NF- κ B는 세포질에서 핵으로 이동하여 다양한 염증성 cytokine 및

염증 전사 인자의 구성원을 활성화한다고 보고되었다. NF- κ B 신호 전달 경로가 감염증 활성화에 미치는 영향을 확인한 결과, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 IkB- α 의 인산화가 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 의해 감소하였고 3,6'-DMC에 의해 IkB- α 의 분해가 억제되어 NF- κ B와 결합된 IkB- α 가 증가하는 것을 확인하였다. 또한 p65가 세포질에서 핵으로의 전위를 조사한 결과, 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC는 세포질에서 p65의 생성을 증가시켰고 이러한 결과와 일치하게, 핵에서 p65의 생성을 억제하였다. 이는 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 IkB- α 의 인산화 및 분해를 억제하고, p65가 세포질에서 핵으로 전위되는 것을 막아 최종적으로 염증을 억제한다는 것을 알 수 있다.

멜라닌은 피부, 모발, 눈의 색을 결정하는 주요 구성 요소이며 유해한 자외선을 흡수하여 자외선으로부터 인체를 보호하고 피부 면역 반응을 조절하는 중요한 역할을 한다. 하지만 멜라닌이 과도하게 생성되어 피부에 축적되면 기미, 주근깨, 검버섯, 반점 등과 같은 과색소 침착증(hyperpigmentation)을 유발할 수 있다. 이전에 개발되었던 Kojic acid, Hydroquinone, Arbutin 등은 과색소 침착에 대한 멜라닌 생성억제제로 사용되었다. Kojic acid는 부작용으로 접촉성 피부염, 민감성 피부염, 홍반을 유발할 수 있으며 보관 중 불안정으로 인해 사용이 제한되었고, Hydroquinone은 세포의 돌연변이 유발 가능성과 발암성의 우려가 존재하며 광독성 반응, 접촉성 피부염, 자극 등 여러 부작용을 일으킨다. 또한 Arbutin은 hydroquinone에 포도당이 붙은 성분으로 tyrosinase를 억제하여 멜라닌 합성을 감소시키거나 억제한다. 하지만 자연 형태의 arbutin은 화학적으로 불안정하여 hydroquinone과 포도당으로 분리가 되면 독성이 있는 hydroquinone을 방출할 수 있다. 따라서 인체에 잠재적 위험과 부작용이 적고 효과적으로 멜라닌 생성을 억제하는 멜라닌 생성 억제제 개발이 필요하다는 것을 시사한다. 이에 따라 2'-hydroxy-dimethoxychalcone 유도체의 멜라닌 생성 억제 활성을 확인하기 위해 실험을 진행하였으며 그 효과를 입증하였다.

2'-hydroxy-dimethoxychalcone의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하기 위해 B16F10 세포에서 MTT 분석을 통해 세포 생존 농도를 조사하였다. 세포 생존율은 미처리군에 대비하여 90% 이상인 농도를 사용하였다. 그 후, 세포 독성이 나타나지 않은 농도에서 melanin contents 및 세포 내 tyrosinase 활성 측정 실험을

진행하였다. 실험 결과, 2'-hydroxy-4'-methoxychalcones 중에서 4',6'-DMC, 2'-hydroxy-2'-methoxychalcones 중에서 2,6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 활성이 가장 우수하였으며 흥미롭게 6' 위치에 methoxy기가 붙은 2'-hydroxy-dimethoxychalcone 화합물의 멜라닌 생성 억제 활성이 우수하다는 것을 확인하였다.

세포 독성이 나타나지 않은 범위 내에서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하였으며 그 결과, 5 μ M에서 α -MSH 단독 처리 군에 대비하여 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC의 멜라닌 함량이 각각 32.58%, 36.62%, 31.42% 감소하였다. 마찬가지로 세포 독성이 나타나지 않은 범위 내에서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC의 세포 내 tyrosinase activity 실험을 진행하였다. 그 결과, 5 μ M에서 α -MSH 단독 처리 군에 대비하여 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, 3,6'-DMC의 세포 내 tyrosinase 활성이 각각 40.18%, 46.83%, 37.97% 감소하였다. 따라서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 대한 항 멜라닌 추가 실험을 진행하였다.

4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 B16F10 melanoma 세포에서 다양한 신호전달 경로를 통해 최종적으로 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해 western blot 실험을 진행하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 합성을 촉진하는 효소는 멜라닌 생성 과정에 중요한 역할을 하며 MITF는 멜라닌 생성 효소들의 전사인자로서 TYR, TRP-1, TRP-2와 같은 멜라닌 생성에 관여하는 효소를 활성화하여 멜라닌 세포의 성장, 분화 및 기능을 조절하는 역할을 한다. 따라서 멜라닌 생성 효소 및 MITF의 발현량을 확인하였다. 그 결과 B16F10 세포에서 멜라닌 생성 효소의 발현량은 α -MSH 단독 처리 군에 대비하여 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 의해 감소하였다. 이러한 멜라닌 생성 효소 억제 효과에 대한 MITF의 영향을 조사한 결과, α -MSH에 의해 유도된 MITF의 발현량은 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 의해 억제되었다. 따라서 MITF의 발현이 감소함으로써 멜라닌 생성 효소의 발현이 감소되고 결론적으로 멜라닌 생성이 하향 조절한다는 것을 확인하였다.

Wnt/ β -catenin 경로에서 막 수용체 단백질인 Frizzled가 Wnt 리간드와 결합하여 활성화되면 Ser 9에서의 인산화 및 비활성화된 GSK3 β 는 세포질에서 β

-catenin을 방출하고 방출된 β -catenin은 핵으로 전위되어 최종적으로 MITF의 발현을 증가시킨다. 또한 tyrosine 216번 잔기에서 인산화된 GSK3 β 는 활성화되어 β -catenin의 인산화를 유도하고, 유비퀴틴화 및 분해를 일으킴으로써 MITF의 발현을 감소시킨다. Wnt/ β -catenin 경로가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인해본 결과, B16F10 세포에서 α -MSH에 의해 유도된 β -catenin과 인산화된 GSK3 β 의 발현량은 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 의해 감소되었다. 이는 GSK3 β (Ser 9)의 인산화를 억제하고 β -catenin이 축적되어 핵으로 옮겨지는 것을 막아 최종적으로 MITF의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있다. 또한 4',6'-DMC 및 3,6'-DMC는 인산화된 β -catenin을 증가시켰고 이는 GSK3 β (Tyr 216)의 인산화에 의한 β -catenin의 인산화를 유도함으로써 MITF의 발현을 감소시키는 것을 알 수 있다.

PI3K/AKT 경로는 이전 연구에서 GSK3 β 와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, 활성화된 AKT는 Ser 9에서 GSK3 β 를 인산화하여 GSK3 β 를 비활성화하고 β -catenin의 분해를 억제할 수 있는 것으로 여겨진다. PI3K/AKT 경로가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인해본 결과 B16F10 세포에서 α -MSH에 의해 유도된 AKT의 인산화는 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 의해 감소되었다. 따라서 PI3K/AKT 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

MAPK 경로에서 ERK는 음성 신호전달 경로로, ERK의 인산화는 MITF의 인산화를 유도하여 분해시킴으로써 최종적으로 멜라닌 생성을 하향 조절한다. 이와 반대로 p38 및 JNK의 인산화는 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 상향 조절한다. α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 MAPK 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사한 결과 음성 신호 전달 경로인 ERK의 인산화는 유의하게 증가하였고, 양성 신호 전달 경로인 p38과 JNK의 인산화는 감소하였다. 이는 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 ERK의 활성화와 p38 및 JNK의 분해를 통해 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

cAMP/PKA 경로에서 α -MSH는 MC1R과 직접 결합하여 MC1R을 활성화하고 세포 내 AC를 활성화하여 cAMP의 축적을 유발한다. cAMP에 의해 PKA가 인산화되고 핵 안으로 전위되어 CREB의 인산화 및 활성화를 촉진하여 MITF의 전사를

상향 조절한다. 따라서 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 PKA/CREB 신호 전달 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하는지 조사한 결과 α -MSH에 의해 유도된 CREB과 PKA의 인산화는 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC에 의해 감소되었다. 이를 통해 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 cAMP/PKA 신호 전달 경로를 통해 전사조절 인자인 MITF의 발현 수준을 하향 조절함으로써 궁극적으로 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 알 수 있다.

마지막으로 인체피부 일차 자극테스트를 통해 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 잠재적인 국소 성분으로 적용될 수 있는지 평가하였다. 5 μ M과 10 μ M의 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC를 33 또는 34명의 피시험자의 등 부위에서 시험하였다. 그 결과 시험물질은 인체피부 일차자극 측면에서 저자극 범주의 물질로 판단되었다. 따라서 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC가 국소 적용에 안전한 성분임을 시사한다.

본 연구에서는 2'-hydroxy-dimethoxychalcone 유도체의 구조적 차이에 따른 생물학적 차이에 대해 알아보았다. 2'-hydroxy-dimethoxychalcone 구조에서 methoxy기의 위치에 따라 생물학적인 특성이 다르게 나타났다. LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과를 확인한 결과, NO 생성 억제 활성 실험에서 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone의 6'번 위치에 methoxy기가 붙은 4',6'-DMC와 2'-hydroxy-2-methoxychalcone의 6'번 위치에 methoxy기가 붙은 2,6'-DMC의 활성이 가장 우수했다. 추가적으로 3,6'-DMC의 NO 생성 억제 활성이 우수하여 3가지 시료를 통해 항염증 효과를 조사하였다. 4',6'-DMC, 2,6'-DMC 및 3,6'-DMC는 염증성 매개체인 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켰으며 MAPK와 NF- κ B 신호전달 경로를 통해 염증성 매개체와 전염증성 cytokine의 생성을 억제시켰다. 이러한 결과를 바탕으로 항염증 치료제 및 염증성 질환의 개선을 위한 유망한 전략으로 여길 수 있다.

α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 멜라닌 생성 억제 효과를 확인한 결과, 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone의 6'번 위치에 methoxy기가 붙은 4',6'-DMC와 2'-hydroxy-2-methoxychalcone의 6'번 위치에 methoxy기가 붙은 2,6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 활성이 가장 우수했다. 추가적으로 3,6'-DMC의 멜라닌 생성 억제 활성이 우수하여 3가지 시료를 통해 항멜라닌 효과를 조사하였다. 4',6'-DMC,

2,6'-DMC 및 3,6'-DMC는 TRP-1, TRP-2, tyrosinase 와 같은 멜라닌 생성 효소의 발현을 감소시켰으며 Wnt/ β -catenin, PI3K/AKT, MAPK 그리고 cAMP/PKA 신호전달 경로를 통해 MITF의 발현을 감소시켰으므로 궁극적으로 멜라닌 생성을 억제시켰다. 이러한 결과를 바탕으로 과색소침착증 치료를 위한 국소 치료제 및 미백제 성분 개발을 위한 유망한 전략으로 여길 수 있다.

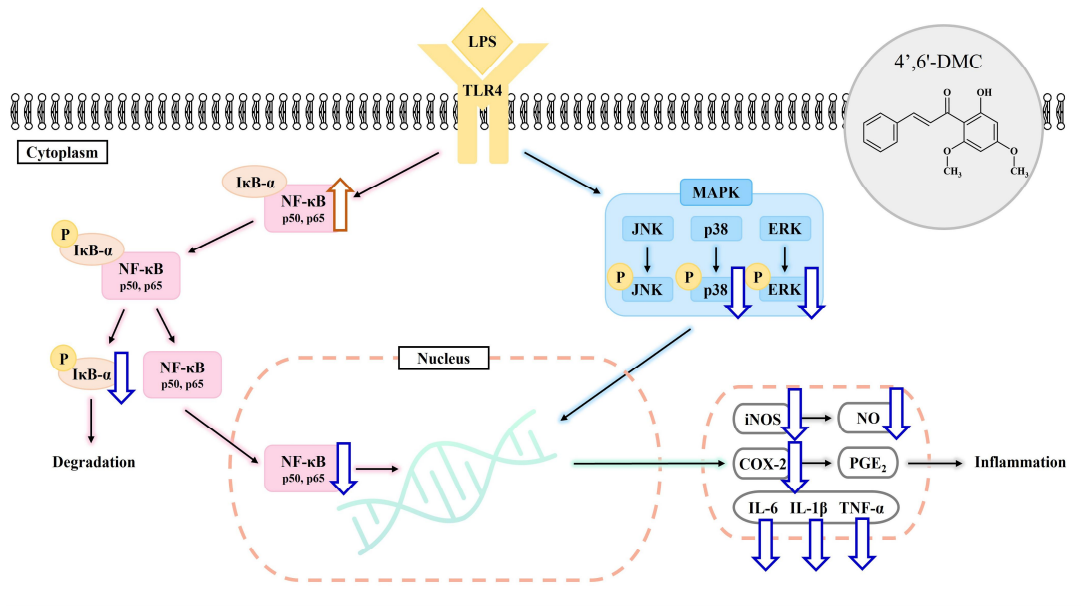


Figure 55. Inflammatory signaling pathways regulated by 4',6'-DMC.

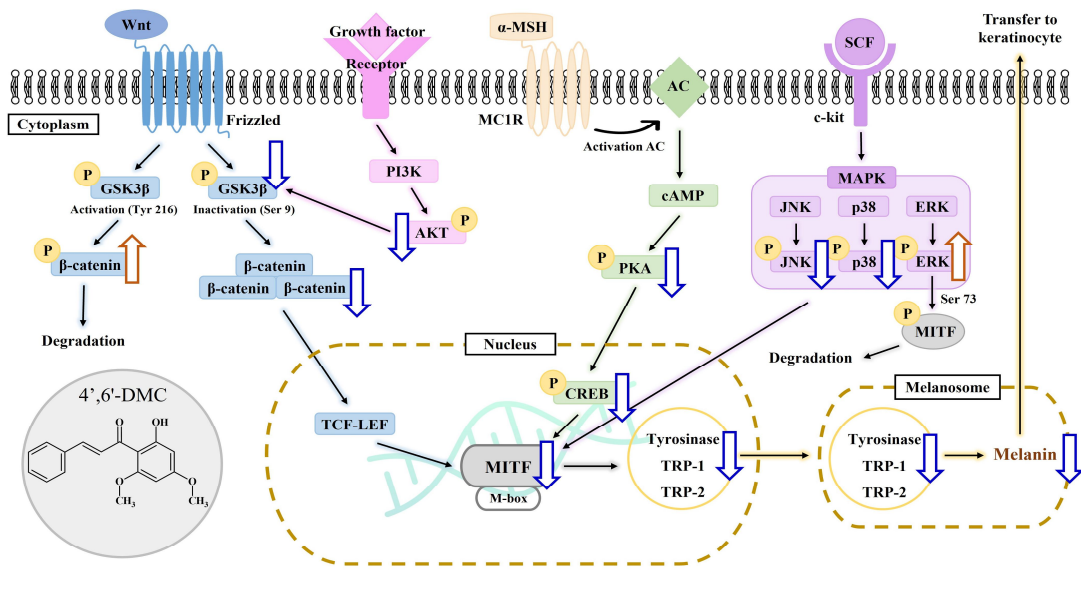


Figure 56. Melanogenesis signaling pathways regulated by 4',6'-DMC.

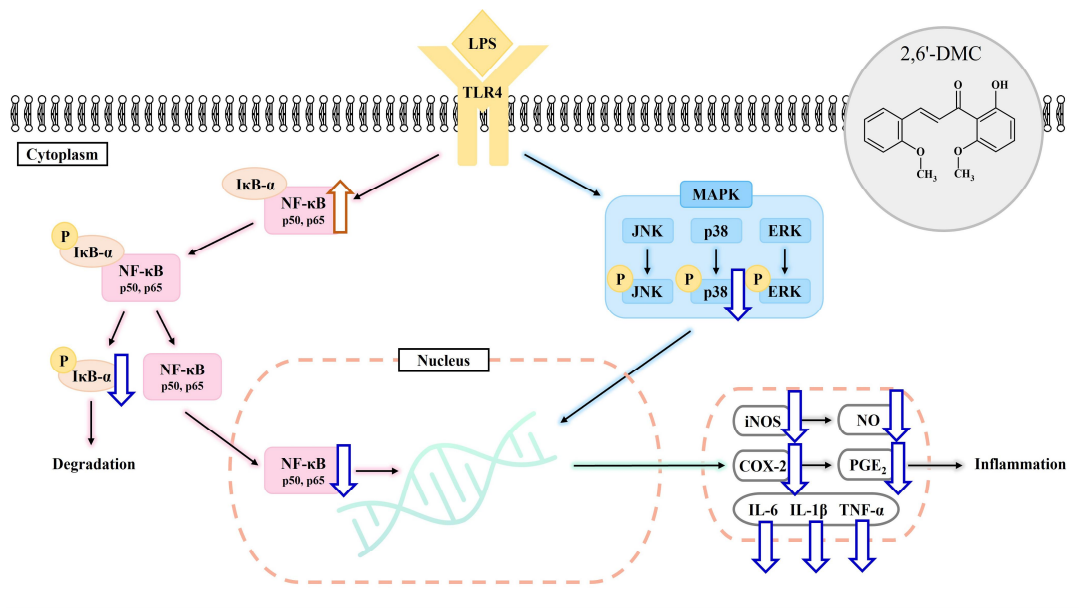


Figure 57. Inflammatory signaling pathways regulated by 2,6'-DMC.

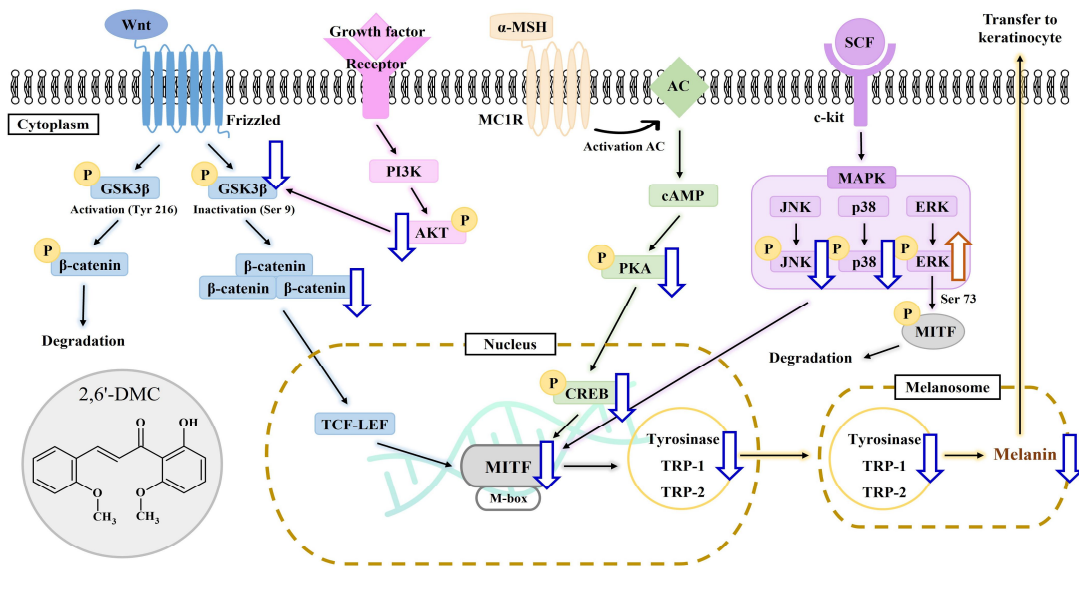


Figure 58. Melanogenesis signaling pathways regulated by 2,6'-DMC.

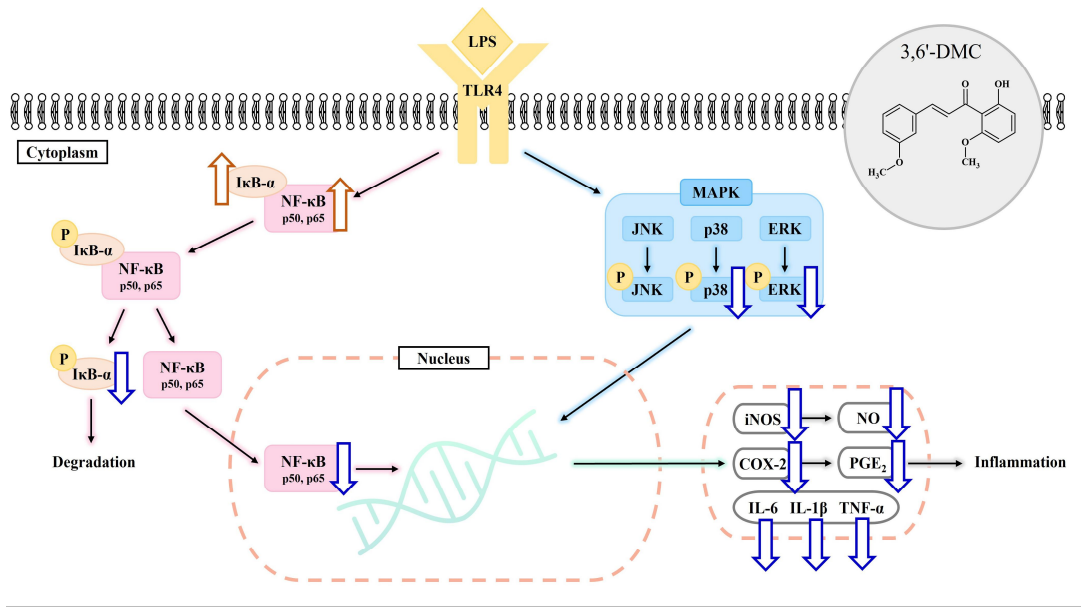


Figure 59. Inflammatory signaling pathways regulated by 3,6'-DMC.

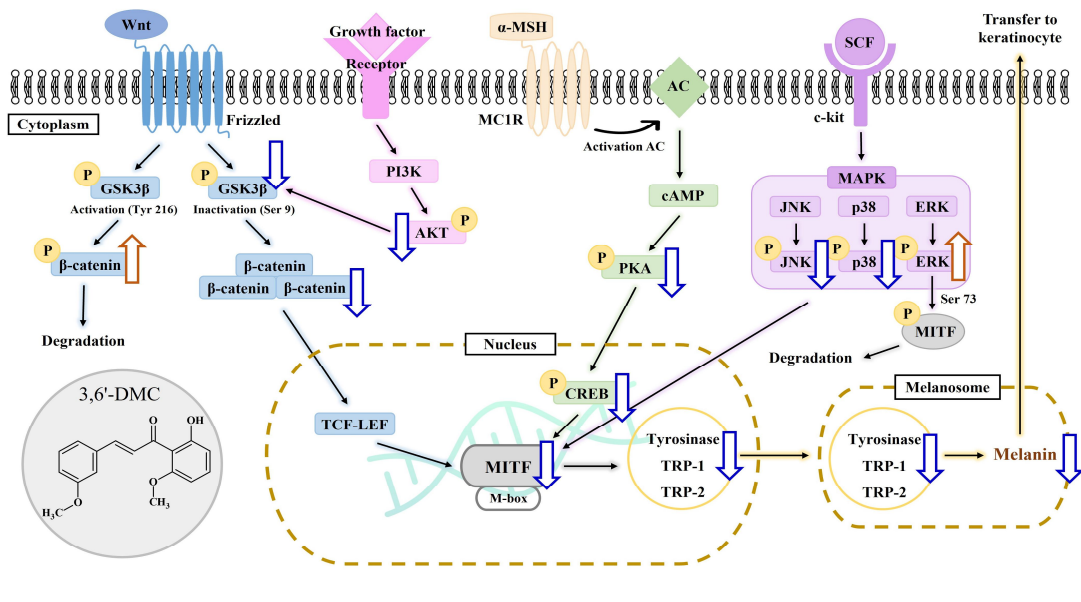


Figure 60. Melanogenesis signaling pathways regulated by 3,6'-DMC.

V. 참고 문헌

1. Chen, Linlin, et al. "Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs." *Oncotarget* 9.6 (2018): 7204.
2. Akpor, Oghenerobor Benjamin, et al. "Pollutants in wastewater effluents: impacts and remediation processes." *International Journal of Environmental Research and Earth Science* 3.3 (2014): 050-059.
3. Chung, Hwa-Jin, et al. "Modulation of acute and chronic inflammatory processes by a traditional medicine preparation GCSB-5 both in vitro and in vivo animal models." *Journal of Ethnopharmacology* 130.3 (2010): 450-459.
4. Khansari, Nemat, Yadollah Shakiba, and Mahdi Mahmoudi. "Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer." *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery* 3.1 (2009): 73-80.
5. Bessa, Juliana, et al. "Altered subcellular localization of IL-33 leads to non-resolving lethal inflammation." *Journal of autoimmunity* 55 (2014): 33-41.
6. White, Gemma E., Asif J. Iqbal, and David R. Greaves. "CC chemokine receptors and chronic inflammation—therapeutic opportunities and pharmacological challenges." *Pharmacological reviews* 65.1 (2013): 47-89.

7. Wei, Shanshan, et al. "Anti-inflammatory effects of Torin2 on lipopolysaccharide-treated RAW264. 7 murine macrophages and potential mechanisms." *Heliyon* 8.7 (2022): e09917.
8. Davis Jr, Michael R., and Joanna B. Goldberg. "Purification and visualization of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 63 (2012): e3916.
9. Schlundt, Claudia, et al. "The multifaceted roles of macrophages in bone regeneration: A story of polarization, activation and time." *Acta biomaterialia* 133 (2021): 46-57.
10. Navegantes, Kely Campos, et al. "Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity." *Journal of translational medicine* 15.1 (2017): 1-21.
11. Fujiwara, Nagatoshi, and Kazuo Kobayashi. "Macrophages in inflammation." *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy* 4.3 (2005): 281-286.
12. Kawahara, Miho, et al. "Anti-inflammatory properties of fermented soy milk with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S-SU2 in murine macrophage RAW264. 7 cells and DSS-induced IBD model mice." *International Immunopharmacology* 26.2 (2015): 295-303.
13. McCoy, Claire E., and Luke AJ O'Neill. "The role of toll-like receptors in macrophages." *Frontiers in Bioscience-Landmark* 13.1 (2008): 62-70.

14. Heo, Soo-Jin, et al. "Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages." *Food and Chemical Toxicology* 48.8-9 (2010): 2045-2051.
15. Ramirez, Dario C., and Maria Sofia Gimenez. "Induction of redox changes, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages." *Toxicology letters* 145.2 (2003): 121-132.
16. Shirato, Ken, and Takako Kizaki. "SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages." *Heliyon* 7.2 (2021): e06187.
17. Wang, Qiang-Song, et al. "Dietary blue pigments derived from genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the NF- κ B inactivation." *PloS one* 7.3 (2012): e34122.
18. Sun, Zhengwu, and Roland Andersson. "NF- κ B activation and inhibition: a review." *Shock* 18.2 (2002): 99-106.
19. Fuseler, John W., et al. "Analysis and quantitation of NF- κ B nuclear translocation in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) activated vascular endothelial cells." *Microscopy and Microanalysis* 12.3 (2006): 269-276.

20. Park, Sun Young, et al. "Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264. 7 cells." *International Immunopharmacology* 19.2 (2014): 253-261.
21. Chen, Zhijian J., Lana Parent, and Tom Maniatis. "Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity." *Cell* 84.6 (1996): 853-862.
22. Deng, Li, et al. "Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." *Cell* 103.2 (2000): 351-361.
23. Jeong, Jin Boo, Yong Kyu Shin, and Seong-Ho Lee. "Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol in RAW264. 7 and HT-29 cells." *Food and Chemical Toxicology* 55 (2013): 229-233.
24. Abraham, Edward. "Nuclear factor- κ B and its role in sepsis-associated organ failure." *The Journal of infectious diseases* 187.Supplement_2 (2003): S364-9.
25. Chang, Alice YW. "Pro-life role for c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase at rostral ventrolateral medulla in experimental brain stem death." *Journal of biomedical science* 19.1 (2012): 1-12.
26. Bi, Decheng, et al. "Immune activation of RAW264. 7 macrophages by low molecular weight fucoidan extracted from New Zealand *Undaria pinnatifida*." *Journal of agricultural and food chemistry* 66.41 (2018): 10721-10728.

27. Liu, Yusen, Edward G. Shepherd, and Leif D. Nelin. "MAPK phosphatases—regulating the immune response." *Nature Reviews Immunology* 7.3 (2007): 202-212.
28. Nishida, Eisuke, and Yukiko Gotoh. "The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways." *Trends in biochemical sciences* 18.4 (1993): 128-131.
29. Lee, Sook-Hyun, et al. "Anti-inflammatory effect of ascochlorin in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells is accompanied with the down-regulation of iNOS, COX-2 and proinflammatory cytokines through NF- κ B, ERK1/2, and p38 signaling pathway." *Journal of cellular biochemistry* 117.4 (2016): 978-987.
30. Cho, Woong, et al. "Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages." *International immunopharmacology* 9.9 (2009): 1049-1057.
31. Akimoto, Makio, et al. "Skin Color Measurements: Usefulness of the Metric Hue Angle of Uniform Color Spaces for Dermatological Treatment." *PIERS Proceedings*. 2014.
32. Yamaguchi, Yuji, and Vincent J. Hearing. "Melanocytes and their diseases." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4.5 (2014): a017046.

33. Jung, Yu-Jin, Woo-Shin Ko, and Hwa-Jung Yoon. "A Study on Correlation of Melanin & Pigmentation Disorder and Viscera and Bowels (臟腑)." *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology* 29.3 (2016): 27-41.

34. Manvar, Dinesh, et al. "Identification and evaluation of anti hepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*." *Journal of ethnopharmacology* 144.3 (2012): 545-554.

35. Mavridi-Printezi, Alexandra, et al. "The Photophysics and Photochemistry of Melanin-Like Nanomaterials Depend on Morphology and Structure." *Chemistry-A European Journal* 27.66 (2021): 16309-16319.

36. Ito, Shosuke, and Kazumasa Wakamatsu. "Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review." *Pigment cell research* 16.5 (2003): 523-531.

37. Costin, Gertrude-E., and Vincent J. Hearing. "Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress." *The FASEB journal* 21.4 (2007): 976-994.

38. Yamaguchi, Yuji, Janusz Z. Beer, and Vincent J. Hearing. "Melanin mediated apoptosis of epidermal cells damaged by ultraviolet radiation: factors influencing the incidence of skin cancer." *Archives of Dermatological Research* 300 (2008): 43-50.

39. Briganti, Stefania, Emanuela Camera, and Mauro Picardo. "Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation." *Pigment cell research* 16.2 (2003): 101-110.

40. Yamaguchi, Yuji, and Vincent J. Hearing. "Physiological factors that regulate skin pigmentation." *Biofactors* 35.2 (2009): 193-199.
41. Kim, Y-J., and H. Uyama. "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future." *Cellular and molecular life sciences CMLS* 62 (2005): 1707-1723.
42. Ando, Hideya, Mary S. Matsui, and Masamitsu Ichihashi. "Quasi-drugs developed in Japan for the prevention or treatment of hyperpigmentary disorders." *International Journal of Molecular Sciences* 11.6 (2010): 2566-2575.
43. Peng, Chi-Chung, et al. "The functional property of royal jelly 10-hydroxy-2-decenoic acid as a melanogenesis inhibitor." *BMC complementary and alternative medicine* 17.1 (2017): 1-8.
44. Cichorek, Mirosława, et al. "Skin melanocytes: biology and development." *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii* 30.1 (2013): 30-41.
45. Costin, Gertrude-E., and Vincent J. Hearing. "Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress." *The FASEB journal* 21.4 (2007): 976-994.
46. Serre, C., V. Busuttill, and J-M. "Botto. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation." *International journal of cosmetic science* 40.4 (2018): 328-347.

47. Lee, Ayeong, et al. "The inhibition of melanogenesis via the PKA and ERK signaling pathways by *Chlamydomonas reinhardtii* extract in B16F10 melanoma cells and artificial human skin equivalents." (2018): 2121-2132.
48. Su, Tzu-Rong, et al. "Inhibition of melanogenesis by gallic acid: Possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells." *International journal of molecular sciences* 14.10 (2013): 20443-20458.
49. Sansinenea, Estibaliz, and Aurelio Ortiz. "Melanin: a photoprotection for *Bacillus thuringiensis* based biopesticides." *Biotechnology letters* 37 (2015): 483-490.
50. Han, Hye Ju, et al. "Anti-melanogenic effect of ethanolic extract of *Sorghum bicolor* on IBMX-induced melanogenesis in B16/F10 melanoma cells." *Nutrients* 12.3 (2020): 832.
51. Fatibello-Filho, Orlando, and Iolanda da Cruz Vieira. "Flow injection spectrophotometric determination of L-Dopa and carbidopa in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] as enzymatic source." *Analyst* 122.4 (1997): 345-350.
52. Jeon, Nam-Joo, et al. "Inhibitory effect of carvacrol on melanin synthesis via suppression of tyrosinase expression." *Journal of Functional Foods* 45 (2018): 199-205.

53. Nappi, A. J., and B. M. Christensen. "Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity." *Insect biochemistry and molecular biology* 35.5 (2005): 443-459.
54. Sato, Kazuomi, and Masaru Toriyama. "Effect of pyrroloquinoline quinone (PQQ) on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma." *Journal of dermatological science* 53.2 (2009): 140-145.
55. Sato, Kazuomi, and Masaru Toriyama. "Depigmenting effect of catechins." *Molecules* 14.11 (2009): 4425-4432.
56. Oh, Taek-In, et al. "Inhibition of NAT10 suppresses melanogenesis and melanoma growth by attenuating microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression." *International journal of molecular sciences* 18.9 (2017): 1924.
57. Hsiao, Jennifer J., and David E. Fisher. "The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma." *Archives of biochemistry and biophysics* 563 (2014): 28-34.
58. Zaidi, K. U., et al. "Natural melanogenesis stimulator a potential tool for the treatment of hypopigmentation disease." *Int. J. Mol. Biol. Open Access* 2.1 (2017): 37-40.
59. Truong, Xuan T., et al. "Protocatechuic acid from pear inhibits melanogenesis in melanoma cells." *International journal of molecular sciences* 18.8 (2017): 1809.

60. Levy, Carmit, Mehdi Khaled, and David E. Fisher. "MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene." *Trends in molecular medicine* 12.9 (2006): 406-414.
61. Yasumoto, Ken-ichi, et al. "Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes." *Journal of Biological Chemistry* 272.1 (1997): 503-509.
62. Bertolotto, Corine, et al. "Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia." *Molecular and cellular biology* 18.2 (1998): 694-702.
63. Yokoyama, Kouji, et al. "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* 1217.3 (1994): 317-321.
64. Larue, Lionel, and Véronique Delmas. "The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma." *Frontiers in Bioscience-Landmark* 11.1 (2006): 733-742.
65. Bellei, Barbara, et al. "GSK3 β inhibition promotes melanogenesis in mouse B16 melanoma cells and normal human melanocytes." *Cellular signalling* 20.10 (2008): 1750-1761.
66. Molagoda, Ilandarage Menu Neelaka, et al. "GSK-3 β -targeting fisetin promotes melanogenesis in B16F10 melanoma cells and zebrafish larvae through β -catenin activation." *International Journal of Molecular Sciences* 21.1 (2020): 312.

67. Wu, Jinling, Jean-Pierre Saint-Jeannet, and Peter S. Klein. "Wnt-frizzled signaling in neural crest formation." *Trends in neurosciences* 26.1 (2003): 40-45.
68. Yasumoto, Ken-ichi, et al. "Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling." *The EMBO journal* 21.11 (2002): 2703-2714.
69. Burke, Janice M. "Epithelial phenotype and the RPE: is the answer blowing in the Wnt?." *Progress in retinal and eye research* 27.6 (2008): 579-595.
70. Frame, Sheelagh, and Philip Cohen. "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery." *Biochemical Journal* 359.1 (2001): 1-16.
71. Liu, Jiaqi, et al. "Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities." *Signal transduction and targeted therapy* 7.1 (2022): 3.
72. Lopez-Bergami, Pablo, Boris Fitchman, and Ze'ev Ronai. "Understanding signaling cascades in melanoma." *Photochemistry and photobiology* 84.2 (2008): 289-306.
73. Ahn, Yong Min, et al. "Increased phosphorylation of Ser473-Akt, Ser9-GSK-3 β and Ser133-CREB in the rat frontal cortex after MK-801 intraperitoneal injection." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 8.4 (2005): 607-613.

74. Endo, Hidenori, et al. "Activation of the Akt/GSK3 β signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26.12 (2006): 1479-1489.
75. Krishnankutty, Ambika, et al. "In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 β activity in neurons and brains." *Scientific Reports* 7.1 (2017): 8602.
76. Wagner, Erwin F., and Angel R. Nebreda. "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development." *Nature Reviews Cancer* 9.8 (2009): 537-549.
77. Frame, Sheelagh, and Philip Cohen. "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery." *Biochemical Journal* 359.1 (2001): 1-16.
78. Cargnello, Marie, and Philippe P. Roux. "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." *Microbiology and molecular biology reviews* 75.1 (2011): 50-83.
79. Widlund, Hans R., and David E. Fisher. "Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival." *Oncogene* 22.20 (2003): 3035-3041.
80. Chang, Kai-Chih, et al. "Cadmium induces apoptosis in pancreatic β -cells through a mitochondria-dependent pathway: the role of oxidative stress-mediated c-Jun N-terminal kinase activation." *PloS one* 8.2 (2013): e54374.

81. Wu, Li-Chen, et al. "Antimelanogenic effect of c-phycoerythrin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways." *Journal of Biomedical Science* 18.1 (2011): 1-11.
82. Englaro, Walter, et al. "Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation." *Journal of Biological Chemistry* 273.16 (1998): 9966-9970.
83. Ullah, Sana, You Chul Chung, and Chang-Gu Hyun. "Induction of melanogenesis by fosfomycin in B16F10 cells through the upregulation of P-JNK and P-p38 signaling pathways." *Antibiotics* 9.4 (2020): 172.
84. Kadekaro, Ana Luisa, et al. "Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival." *Annals of the New York Academy of Sciences* 994.1 (2003): 359-365.
85. Chan, Chin-Feng, et al. "Fermented broth in tyrosinase-and melanogenesis inhibition." *Molecules* 19.9 (2014): 13122-13135.
86. Serezani, Carlos H., et al. "Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 39.2 (2008): 127-132.
87. Busca, Roser, and Robert Ballotti. "Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation." *Pigment Cell Research* 13.2 (2000): 60-69.

88. Rodríguez, Carlos Iván, and Vijayasaradhi Setaluri. "Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma." *Archives of biochemistry and biophysics* 563 (2014): 22-27.
89. Jung, Eunsun, et al. "Phloridzin-induced melanogenesis is mediated by the cAMP signaling pathway." *Food and chemical toxicology* 47.10 (2009): 2436-2440.
90. Rudrapal, Mithun, et al. "Chalcone scaffolds, bioprecursors of flavonoids: Chemistry, bioactivities, and pharmacokinetics." *Molecules* 26.23 (2021): 7177.
91. Wong, Edmon. "The role of chalcones and flavanones in flavonoid biosynthesis." *Phytochemistry* 7.10 (1968): 1751-1758.
92. Salehi, Bahare, et al. "Pharmacological properties of chalcones: a review of preclinical including molecular mechanisms and clinical evidence." *Frontiers in Pharmacology* 11 (2021): 592654.
93. Nowakowska, Zdzisława. "A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones." *European journal of medicinal chemistry* 42.2 (2007): 125-137.
94. De Mélo, J. F., et al. "O and C prenylated chalcones with antineoplastic and antibiotic activities isolated from *Lonchocarpus neuroscapha* Benth." *Revista do Instituto de Antibioticos, Universidade Federal de Pernambuco* 14.1-2 (1974): 39-50.

95. Ramanathan, R., N. P. Das, and C. H. Tan. "Inhibitory effects of 2-hydroxy chalcone and other flavonoids on human cancer cell-proliferation." *International Journal of Oncology* 3.1 (1993): 115-119.
96. Lopez, Silvia N., et al. "In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall." *Bioorganic & medicinal chemistry* 9.8 (2001): 1999-2013.
97. Yit, Chin C., and Nagaratnam P. Das. "Cytotoxic effect of butein on human colon adenocarcinoma cell proliferation." *Cancer letters* 82.1 (1994): 65-72.
98. De Vincenzo, R., et al. "Effect of synthetic and naturally occurring chalcones on ovarian cancer cell growth: structure-activity relationships." *Anti-cancer drug design* 10.6 (1995): 481-490.
99. Barnard, Dale L., et al. "Antiherpesvirus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid." *Chemotherapy* 39.3 (1993): 203-211.
100. Hsieh, Hsin-Kaw, et al. "Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds." *Pharmaceutical research* 15 (1998): 39-46.
101. Satomi, Yoshiko. "Inhibitory effects of 3'-methyl-3-hydroxy-chalcone on proliferation of human malignant tumor cells and on skin carcinogenesis." *International journal of cancer* 55.3 (1993): 506-514

102. Batovska, Daniela I., and Iva Todorova Todorova. "Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones." *Current clinical pharmacology* 5.1 (2010): 1-29.
103. Gomes, Marcelo N., et al. "Chalcone derivatives: promising starting points for drug design." *Molecules* 22.8 (2017): 1210.
104. Kamiloglu, Senem, et al. "Guidelines for cell viability assays." *Food Frontiers* 1.3 (2020): 332-349.
105. Gerlier, Denis, and Nicole Thomasset. "Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation." *Journal of immunological methods* 94.1-2 (1986): 57-63.
106. Simons, Richard K., et al. "ACUTE LUNG INJURY IN ENDOTOXEMIC RATS IS ASSOCIATED WITH SUSTAINED CIRCULATING IL-6 LEVELS AND INTRAPULMONARY CINC ACTIVITY AND NEUTROPHIL RECRUITMENT—ROLE OF CIRCULATING TNF- α AND IL- α ?." *Shock* 6.1 (1996): 39-45.
107. Wang, Peng, et al. "Inhibitory effects of geraniin on LPS-induced inflammation via regulating NF- κ B and Nrf2 pathways in RAW 264.7 cells." *Chemico-Biological Interactions* 253 (2016): 134-142.
108. Bentley, N. J., T. Eisen, and C. R. Goding. "Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator." *Molecular and Cellular Biology* 14.12 (1994): 7996-8006.

109. Sun, Min, et al. "G protein-coupled estrogen receptor enhances melanogenesis via cAMP-protein kinase (PKA) by upregulating microphthalmia-related transcription factor-tyrosinase in melanoma." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 165 (2017): 236-246.
110. Kavinda, Mirissa Hewage Dumindu. Anti-inflammatory and anti-osteoporotic effects of 2, 4'-dihydroxybenzophenone. Diss. Jeju National University Graduate School, 2023.
111. Takeda, Kazuhisa, et al. "Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance." *Human molecular genetics* 9.1 (2000): 125-132.
112. Bellei, Barbara, et al. "Wnt/ β -catenin signaling is stimulated by α -melanocyte-stimulating hormone in melanoma and melanocyte cells: implication in cell differentiation." *Pigment cell & melanoma research* 24.2 (2011): 309-325.
113. Rommel, Christian, et al. "Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways." *Nature cell biology* 3.11 (2001): 1009-1013.
114. Kim, Hyun Jung, et al. "Curcumin suppresses migration and proliferation of Hep3B hepatocarcinoma cells through inhibition of the Wnt signaling pathway." *Molecular medicine reports* 8.1 (2013): 282-286.

115. Hu, Yuan-Shih, et al. "Molecular mechanisms of environmental enrichment: impairments in Akt/GSK3 β , neurotrophin-3 and CREB signaling." *PloS one* 8.5 (2013): e64460.
116. Shirasugi, Ichiro, et al. "Sulforaphane inhibited melanin synthesis by regulating tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 74.3 (2010): 579-582.
117. Oh, So-Yeon, and Chang-Gu Hyun. "Chrysoeriol Enhances Melanogenesis in B16F10 Cells Through the Modulation of the MAPK, AKT, PKA, and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathways." *Natural Product Communications* 17.1 (2022): 1934578X211069204.
118. Han, Joon-Seung, Jong Hwan Sung, and Seung Kwon Lee. "Antimelanogenesis activity of hydrolyzed ginseng extract (GINST) via inhibition of JNK mitogen-activated protein kinase in B16F10 cells." *Journal of food science* 81.8 (2016): H2085-H2092.
119. Lee, Ayeong, et al. "The inhibition of melanogenesis via the PKA and ERK signaling pathways by *Chlamydomonas reinhardtii* extract in B16F10 melanoma cells and artificial human skin equivalents." (2018): 2121-2132.
120. Shi, Qinghai, et al. "Geniposide suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and inflammatory cytokine by downregulating NF- κ B, MAPK and AP-1 signaling pathways in macrophages." *International immunopharmacology* 20.2 (2014): 298-306.

121. Hwang, Daniel, et al. "Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF- κ B signaling pathways in macrophages." *Biochemical pharmacology* 54.1 (1997): 87-96.
122. Thalhamer, T., M. A. McGrath, and M. M. Harnett. "MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation." *Rheumatology* 47.4 (2008): 409-414.
123. Hwang, Daniel, et al. "Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF- κ B signaling pathways in macrophages." *Biochemical pharmacology* 54.1 (1997): 87-96.
124. Reddy, D. Bharat, and Pallu Reddanna. "Chebulagic acid (CA) attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF- κ B and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381.1 (2009): 112-117.
125. Pahl, H. L. "Activators and target genes of Rel/NF κ B transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-66."
126. Cogswell, John P., et al. "NF- κ B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF- κ B binding site and a nonconsensus CRE-like site." *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 153.2 (1994): 712-723.

Abbreviations

AC	adenylate cyclase
AKT	protein kinase B
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
COX-2	cyclooxygenase-2
CREB	cAMP response element-binding protein
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
DHICA	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FBS	fetal bovine serum
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 β
IKK	inhibitor κ B kinase
IL	interleukin
I κ B- α	inhibitor κ B- α
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LEF	lymphoid-enhancing factor
LPS	lipopolysaccharide
L-DOPA	3,4-dihydroxy-L-phenylalanine
L-NIL	L-N ⁶ -(1-iminoethyl)lysine dihydrochloride
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MC1R	melanocortin receptor 1
MITF	microphthalmia-associated transcription factor

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NO	nitric oxide
NS-398	N-[2-cyclohexyloxy]-4-nitrophenyl]methane sulfonamide
PBS	phosphate buffered saline
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	protein kinase A
P/S	penicillin-streptomycin
p38	p38 MAPK
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
ROS	reactive oxygen species
SCF	stem cell factor
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	serine
TBS	tris-buffered saline
TCF	T-cell factor
TLR4	toll-like receptor 4
TLRs	toll-like receptors
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRP-1	tyrosinase related protein-1
TRP-2	tyrosinase related protein-2
TYR	tyrosinase
α -MSH	α -melanocortin-stimulating hormone

Inhibitory Effects of 2'-Hydroxy-Dimethoxychalcones on Inflammation and Melanogenesis in Mouse Cell Lines

Sung-Min Bae

Department of Chemistry
The Graduate School
Jeju National University

Abstract

Chalcones are flavonoid precursors that are abundant in edible plants and exhibit a wide range of biological activities, including anticancer, antimicrobial, and antioxidant. As success stories concerning the synthesis and biological evaluation of chalcones analogs are steadily being reported, interest in these compounds and their potential use in medicinal applications is increasing. However, the effect of 2'-hydroxy-dimethoxychalcone on anti-inflammation and anti-melanogenic has not been fully investigated. The aims of this study were to evaluate

the anti-inflammatory and anti-melanogenic effect of 2'-hydroxy-3,4'-dimethoxychalcone (3,4'-DMC), 2'-hydroxy-4,4'-dimethoxychalcone (4,4'-DMC), 2'-hydroxy-3',4'-dimethoxychalcone (3',4'-DMC), 2'-hydroxy-4',6'-dimethoxychalcone (4',6'-DMC), 2'-hydroxy-2,4-dimethoxychalcone (2,4-DMC), 2'-hydroxy-2,5'-dimethoxychalcone (2,5'-DMC), 2'-hydroxy-2,6'-dimethoxychalcone (2,6'-DMC), and 2'-hydroxy-3,6'-dimethoxychalcone (3,6'-DMC). Among the 2'-hydroxy-dimethoxychalcone derivatives, 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, and 3,6'-DMC had the potent anti-inflammatory and anti-melanogenic effect. As confirmed by multiple biological assays, 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, and 3,6'-DMC exhibited no cytotoxicity and the results demonstrated that treatment with 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, and 3,6'-DMC profoundly attenuated the lipopolysaccharide (LPS) stimulated levels of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines, and protein expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Collectively, 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, and 3,6'-DMC treatment notably weakened LPS-induced damage by reducing the phosphorylation of NF-kB, p38, JNK, ERK proteins, and NF-kB/p65 nuclear translocation. In addition, significantly reduced the expression of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 enzymes as well as intracellular tyrosinase activity and melanin content in B16F10 melanoma cells via MITF, GSK-3 β , β -catenin, AKT, PKA, CREB, p38 and JNK-dependent downregulation, and upregulating ERK and p- β -catenin cascades. Finally, we tested the topical applicability of 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, and 3,6'-DMC through primary human skin irritation experiments and found that 4',6'-DMC, 2,6'-DMC and 3,6'-DMC did not induce any adverse effects. These results suggest that 4',6'-DMC, 2,6'-DMC, and 3,6'-DMC may provide new insights into the development of therapies for skin diseases.