

## B16 흑색종세포에서 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진효과에 미치는 칼륨-염소이온수송체의 역할

이 용 수<sup>#</sup>

덕성여자대학교 약학대학

(Received November 5, 2008; Revised November 21, 2008)

### Role of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-cotransporter in the Apigenin-induced Stimulation of Melanogenesis in B16 Melanoma Cells

Yong Soo Lee<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132714, Korea

**Abstract** — Apigenin, a natural flavonoid found in a variety of vegetables and fruits, has been shown to possess many biological functions. In this study we found that apigenin stimulated melanin synthesis in a dose-dependent manner in B16 murine melanoma cells. Since in our previous study K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-cotransport (KCC) has been shown to mediate the mechanism of action of apigenin in neuronal cells, we further investigated the role of KCC in the melanogenesis-stimulating effect of apigenin in B16 cells. At nontoxic concentrations apigenin induced Cl<sup>-</sup>-dependent K<sup>+</sup> efflux, a hallmark of KCC activity, which was markedly prevented by a specific KCC inhibitor R-(+)-[(2-n-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]acetic acid (DIOA). These results indicate that KCC is functionally present, and activated by apigenin in the B16 cells. In addition, the apigenin-induced stimulation of melanogenesis was also significantly inhibited by DIOA. N-Ethylmaleimide (NEM), a known KCC activator, induced Cl<sup>-</sup> efflux and stimulated melanogenesis in a concentration-dependent fashion. Both effects of NEM were significantly inhibited by DIOA. Taken together, these results suggest that apigenin can modulate melanogenesis through the activation of a membrane ion transporter, KCC in B16 cells. These results further suggest that apigenin may be a good candidate in the therapeutic strategy for hypopigmentation disorders, such as vitiligo.

**Keywords** □ K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-cotransport, apigenin, B16 melanoma cell, melanogenesis, vitiligo

아피제닌은 자연에 존재하는 플라보노이드류로서 피슬리, 박하, 레몬, 들깨, 딸기류 및 여러 과일에 다량 함유되어 있다.<sup>1)</sup> 아피제닌은 본 연구실 및 다른 연구실의 실험결과로서 여러 조직에서 항염,<sup>2,3)</sup> 항발암<sup>4)</sup> 및 항암작용<sup>5-7)</sup>을 가진다는 사실이 밝혀졌다. 지금까지의 연구에서 보편 식물성 플라보노이드류는 세포 실험에서 활성산소종의 발생을 억제하는 항산화효과를 나타낸다는 사실이 알려지고 있다.<sup>8-11)</sup> 하지만, 최근 아피제닌은 전립선암 세포 및 간암세포의 사멸을 유도하고 이 작용기전에 활성산소종이 관여한다는 연구결과가 발표되었다.<sup>7,12)</sup> 또한 신경아세포종에서는 아피제닌이 세포막 칼륨-염소이온수송체를 활성화시키며 이 작용은 활성산소종에 의해 매개된다는 새로운 사실이 발표되

었다.<sup>13)</sup>

피부의 색은 피부 속에 존재하는 멜라닌의 함량에 의해 결정되며 피부의 기저층에 존재하는 멜라닌생성세포에 의해 합성된 멜라닌은 세포질 돌기를 통하여 각질형성세포의 각화과정에 의해 각질층으로 이동한다.<sup>14)</sup> 멜라닌은 태양광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하여 피부를 보호하는 역할을 담당하고 있지만 만일 국소적으로 과도하게 생성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 또는 다양한 색소 침착을 유발하게 된다.<sup>15)</sup> 멜라닌생성 세포에서 멜라닌 합성은 멜라노솜에서 일어나며 여기에 존재하는 여러 cascade 효소 반응에 의해 생성된다.<sup>16,17)</sup> 이들 효소 중 tyrosinase는 멜라닌합성의 속도를 결정하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanin(DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성화와 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 가지고 있다. Tyrosinase-related protein(TRP)-1은 5,6-

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-901-8396 (팩스) 02-901-8386  
(E-mail) yongslee@duksung.ac.kr

dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이며 dopachrome tautomerase (DCT)는 초기에 TRP-2로 불려졌던 효소로서 dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 멜라닌은 흑·갈색의 eumelanin과 적·노랑색의 pheomelanin으로 나뉘는데 tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 melanin 합성에 필요하며, TRP1과 DCT는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>18)</sup> 최근 다양한 식물추출물이 tyrosinase 활성저해나 활성산소종의 발생억제 등을 통하여 멜라닌 합성을 저해함으로써 미백기능성 화장품의 원료물질로 개발되고 있다.<sup>19,20)</sup>

칼륨-염소이온수송체는 적혈구에서 팽창-의존성 칼륨유출 기전을 매개하는 기능이 있다는 사실<sup>21,22)</sup>이 처음 밝혀진 이래 기능적 및 생리적인 실험적 증명을 통하여 여러 조직에 존재하고 있다는 것이 밝혀졌다. 즉, 칼륨-염소이온수송체는 상피,<sup>23,24)</sup> 내피,<sup>25)</sup> 혈관평활근,<sup>26)</sup> 심장,<sup>27)</sup> 골격근<sup>28)</sup> 및 신경<sup>29)</sup>에 그 존재가 확인되었다. 칼륨-염소이온수송체는 여러 생리활성을 나타내는데 조절체적감소(regulatory volume decrease),<sup>30)</sup> 상피세포간 염류 흡수,<sup>23)</sup> 허혈 심근에서 칼륨손실,<sup>27)</sup> 신경에서 염소농도 조절<sup>29)</sup> 및 신장에서 칼륨분비<sup>31)</sup> 등의 기능을 가지고 있다. 또한 최근 본 연구실에서도 칼륨-염소이온수송체가 사람 간암세포의 사멸기전에 중요한 매개체로 작용하고 있음을 박힌 바 있다.<sup>32)</sup>

본 연구에서는 이러한 기존 연구결과를 바탕으로 하여 아피제닌이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 관찰하고 이에 미치는 세포막 칼륨-염소이온수송체의 역할을 규명하고자 하였다.

## 실험 방법

### 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT), apigenin, Nethylmaleimide(NEM) 및 각종 용매와 염류는 Sigma Chemical Co.(미국)에서 구입하였고, R-(+)-(2-n-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-1,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)oxy]acetic acid(DIOA)는 Alexis Biochemicals(미국)에서 fetal bovine serum(FBS)와 penicillin-streptomycin 혼합액은 GIBCO(미국)에서 구입하였으며, N-(6-methoxyquinolyl) acetoethyl ester(MQAE) 및 potassium-binding benzofuran isophthalate/aceoxymethyl ester(PBFI/AM)은 Molecular Probes, Inc.(미국)에서 구입하여 사용하였다.

### 세포 배양

B16 흑색종 세포는 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 10% FBS와 penicillin 100 IU/ml와 streptomycin 50 µg/ml을 함유한 DMEM 용액으로 37°C로 유지되는

5% CO<sub>2</sub> 배양기(Forma, 미국)에서 배양하였다.

### 세포 생존율 측정

살아있는 세포는 미토콘드리아에 존재하는 탈수소 효소에 의해 MTT가 MTT-formazan으로 전환되므로 이것의 양을 재면 살아있는 세포의 수를 측정할 수 있다. 세포는 1 ml 배지에 여러 가지 약물 또는 약물을 녹인 용매만을 처리하여 24 well plate에서 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 MTT 용액(2.5 mg/ml H<sub>2</sub>O) 100 µl를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 생성된 MTT-formazan 결정체를 분리하기 위하여 세포 현탁액을 eppendorf tube에 옮겨 원심분리하였다(1500 rpm, 4분). 상정액을 조심스럽게 제거하고 DMSO 100 µl를 첨가하여 결정체를 용해시킨 후 540 nm에서 ELISA reader(Molecular Device, 미국)로 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군과 비교하여 흡광도의 백분율로 나타내었다.

### 멜라닌 정량

B16 세포에서 멜라닌을 측정할 때에는 phenol red가 없는 DMEM을 사용하여 24 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/ml로 분주하고 12시간이 지난 뒤 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 후 시료를 처리하고 48시간 지난 뒤에 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 ml homogenization buffer(50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 세포 pellet을 1 N NaOH(+10% DMSO) 200 µl를 첨가하고 vortex 후 멜라닌을 완전히 녹인 다음 96 well plate에 옮긴 후 ELISA reader(Molecular Device, 미국)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품을 이용한 표준 검량선을 이용하여 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌 생성량은 단위세포(10<sup>4</sup> cells)에서의 멜라닌 생성량으로 비교하였다.

### 세포내 염소이온 농도의 측정

세포내 염소이온 농도의 변화는 염소이온에 민감한 형광탐침인 MQAE를 사용해 조사하였다. 세포를 두 번 Hank 용액으로 씻은 후 4×10<sup>5</sup> cells/ml 되게 현탁시킨 후 MQAE를 세포 내로 봉입시키기 위해 최종농도가 5 mM로 하여 실온에서 밤새 배양하였다. 형광(excitation wavelength=365 nm; emission wavelength=450 nm)을 교반을 한 상태의 cuvette을 이용하여 측정하였다. 실험을 실온에서 시행하여 형광탐침이 새어 나오는 것을 최소화 하였다. 실험 결과는 세포내 염소이온과 비례하는 값인 상대적 형광(Fo/F; Fo=염소이온이 없을 때 형광치; F=시간에 따른 형광치)으로 나타내었다. 모든 형광 값은 MQAE 이온 선택적 신호를 최대로 제거하는 5 µM valinomycin을 포함하는 HEPES-buffered KSCN 용액을 이용하여 따로 측정한 배경 형광치

(background fluorescence)에 대하여 보정하였다. 다른 실험으로  $F_0$  값은  $10 \mu\text{M}$  tributyltin 및  $10 \mu\text{M}$  nigericin을 포함한 염소-제거  $\text{KNO}_3$  용액에 세포를 현탁시켜 측정하였다.

#### 세포내 칼륨농도의 측정

세포내 칼륨농도는 형광탐침인 PBFI/AM을 이용하여 측정하였다. 비이온성 계면활성제인 0.02% pluronic F-127을 포함한 Hank 용액의 세포현탁액에  $5 \mu\text{M}$ 의 PBFI/AM을 가해  $37^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동안 진탕 배양하여 세포내로 봉입시킨 후, 봉입되지 않은 PBFI/AM은 원심분리하여 제거시켰다. 다시 세포를 Krebs-Ringer 완충액( $125 \text{ mM NaCl}$ ,  $5 \text{ mM KCl}$ ,  $12 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $12 \text{ mM MgSO}_4$ ,  $5 \text{ mM NaHCO}_3$ ,  $25 \text{ mM HEPES}$ ,  $6 \text{ mM glucose}$ , pH 7.4)에 현탁시킨 후 cuvette에 옮겨  $340 \text{ nm}$  및  $380 \text{ nm}$  파장에서 excitation 시켜,  $500 \text{ nm}$  파장에서 나오는 형광을 형광분석기로 측정하였다. 이 때 cuvette 내의 세포 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하였다. 세포내 칼륨농도는 두 파장에서 나온 형광세기의 비로써 나타내었다.

#### 자료분석 및 통계적 검증

모든 실험은 네 번 반복해서 실시하고 실험 결과는 대조군의 조건에 대한 백분율로 나타내었다. Data는 평균값 $\pm$ SEM으로 표시하고 ANOVA로 분석하며 각각의 유의성 비교는 Student-Newman-Keul's test를 이용하여 실시하였다. P값이 0.05 이하인 경우에만 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### 아피제닌의 세포 독성

아피제닌이 세포 독성에 미치는 농도를 조사하여 향후 실험에 사용될 농도 범위를 결정하기 위해서 MTT 분석을 시행하였다. B16 흑색종 세포에 대한 아피제닌의 세포독성을 측정한 결과, 아피제닌은  $50 \mu\text{M}$  이하의 농도로 처리했을 때 세포생존율이 90% 이상으로 나타났으며,  $70 \mu\text{M}$ 을 처리했을 때 생존율이 유의성 있게 저하되었다(Fig. 1). 따라서 향후 실험에서 아피제닌은  $50 \mu\text{M}$  이하의 농도로 사용하였다. 아피제닌은 다른 세포에서도 본 실험에서 사용한 B16 세포에서의 결과와 비슷한 양상을 보이고 있으며<sup>33)</sup> 특히 고농도에서 다른 플라보노이드 화합물도 세포독성을 나타낸다.<sup>34)</sup>

#### 아피제닌의 멜라닌 생성 촉진 효과

B16 세포를 이용하여 아피제닌이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하였다. 준비된 세포에 아피제닌을 농도별로 처리하고 48 시간 동안 배양하였다. 48시간을 선택한 이유는 이 시간대에서 대조군, 즉 약물을 가하지 않은 상태에서 분석이 가능한 멜라닌

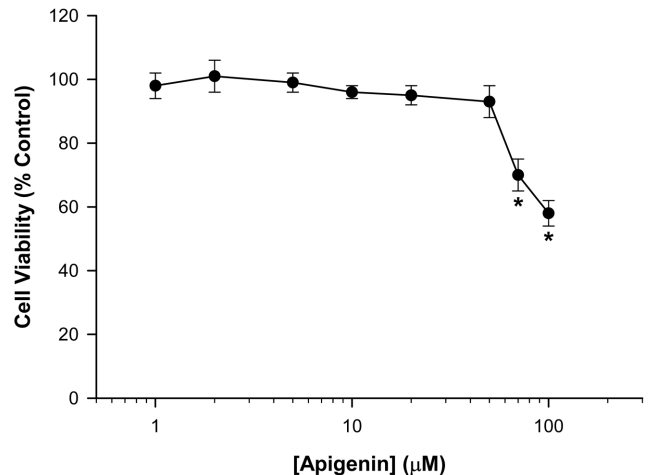


Fig. 1 - Effect of apigenin on cell viability in B16 melanoma cells. Cells were incubated with or without each concentration of apigenin for 48 hr. Cell viability assay was done by the MTT staining method. Results are expressed as percent change of control condition in which cells were grown in medium without apigenin. Each point represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. \* $p < 0.05$  compared to control.

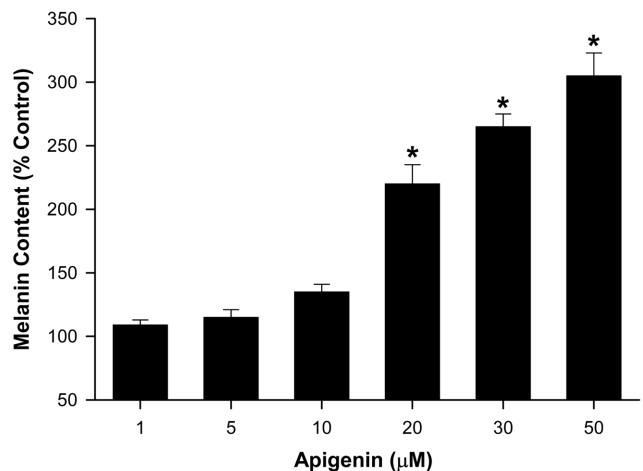


Fig. 2 - Effects of apigenin on the production of melanin in B16 melanoma cells. Melanin content was measured by the method described in the Method section. The cells were initially grown for 12 hr in order to attach them to the bottom of the culture flasks. Then, the cells were incubated with or without apigenin at each designated concentration for 48 hr. Each column represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. \* $p < 0.05$  compared to control.

합성이 이루어지기 때문이다. 배양 후 B16 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정한 결과, 아피제닌 처리군에서 농도의존적으로 멜라닌 합성이 증가되었으며  $20 \mu\text{M}$  농도 처리군에서 대조군에 비해 약 2.2배가 증가하여 통계적으로 유의한 촉진 효과를 나타내었다(Fig. 2). 식물유래 플라보노이드 화합물들이 멜라닌 합성을

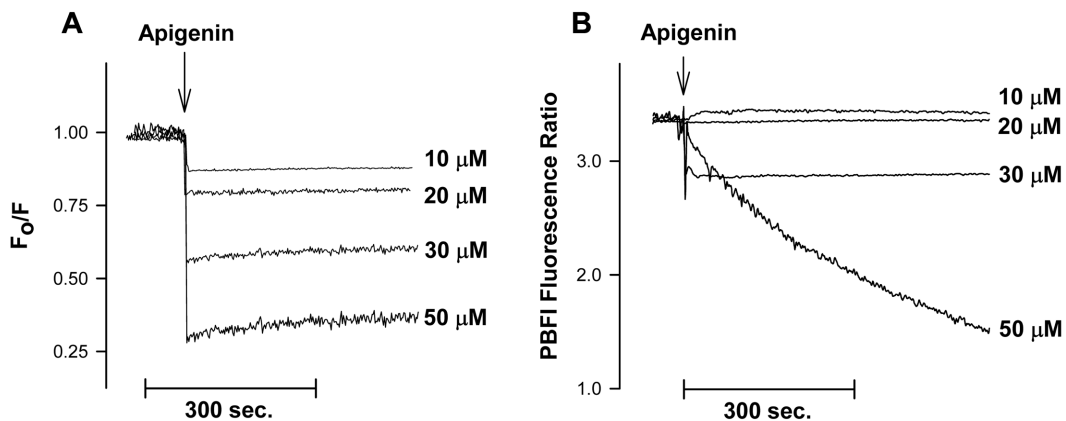
저해한다는 연구결과는 많이 발표되었다.<sup>35,36)</sup> 그러나 최근 이와 반대로 켈세틴과 몇몇 플라보노이드는 오히려 멜라닌 합성을 증가한다는 연구결과도 발표되었다.<sup>37-41)</sup> 본 연구결과에서 보여준 아피제닌의 멜라닌 합성촉진작용은 후자에 속하는 경우로서 흥미로운 결과이나 플라보노이드 화합물의 구조적 특성과 멜라닌 합성에 미치는 영향 사이에 어떤 상관성이 존재하는 지에 대한 연구는 전무한 실정이고 향후 좀 더 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

**아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진에 미치는 칼륨-염소이온수송체의 역할**

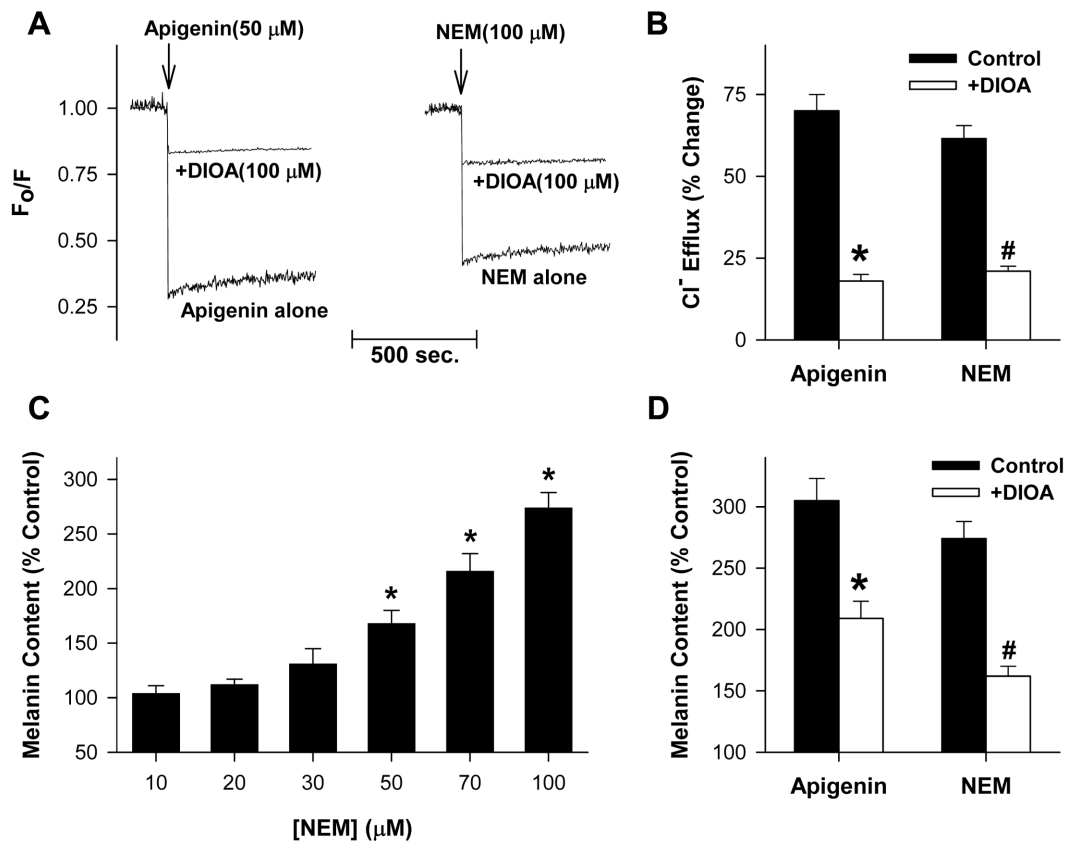
본 연구실에서는 신경아세포종을 이용한 실험에서 아피제닌이 활성산소종을 발생시키고 그 작용기전에 세포막에 존재하는 칼륨-염소이온수송체가 연루되어 있다는 사실을 보고한 바 있다.<sup>13)</sup> 따라서 후속연구는 본 연구에서 확인한 멜라닌 합성촉진작용에 미치는 칼륨-염소이온수송체의 역할에 대한 검정을 시도하였다. 실험결과에서 아피제닌은 B16 세포에서 칼륨-염소이온수송체 활성 유무를 검정하는 지표인 염소이온 및 칼륨이온의 유출을 농도의존적으로 나타내었고(Fig. 3), 이 작용은 칼륨-염소이온수송체를 선택적으로 억제한다고 알려진 약물인 DIOA<sup>42)</sup>에 의해 유의성 있게 차단되었다(Figs. 4A 및 4B). 50  $\mu\text{M}$  아피제닌을 투여했을 때 나타나는 칼륨 유출 양상은 30  $\mu\text{M}$  투여시에 비해 최대 유출은 더 증가했지만 좀 더 느리고 완만한 경향을 보였다(Fig. 3B). 이런 양상을 보이는 이유에 대해서는 명확히 알 수 없으나 농도가 다른 아피제닌에 대한 칼륨-염소이온수송체의 활성화 기전이 다른 때문일 가능성이 있다. 하지만 이 추측을 명확히 하기 위해서는 좀 더 체계적인 연구가 필요할 것이다. 그럼에도 불구하고

하고 이들 결과로부터 B16 세포에는 칼륨-염소이온수송체가 기능적으로 존재하고 있으며 플라보노이드인 아피제닌에 의해 활성화된다는 사실을 알 수 있었다. 칼륨-염소이온수송체의 존재에 대한 확증을 위해 칼륨-염소이온수송체를 직접적으로 활성화시킨다고 알려진 약물인 NEM<sup>30)</sup>에 의한 칼륨-염소이온수송체의 활성화 작용을 확인하였다. 결과에서 NEM이 100  $\mu\text{M}$  농도에서 현저한 염소이온 유출을 나타내었으며(Fig. 4A), 이 작용은 100  $\mu\text{M}$  DIOA에 의해 통계적으로 유의성있게 억제되었다(Fig. 4B). 또한, NEM은 농도의존적으로 멜라닌 합성을 촉진하였는데 50  $\mu\text{M}$  농도에서 대조군에 비해 유의성있게 증가시켰다(Fig. 4C). NEM에 의한 멜라닌합성 촉진작용도 칼륨-염소이온수송체 억제제인 DIOA(100  $\mu\text{M}$ )에 의해 유의성있게 차단되었다(Fig. 4D). 이와 더불어 50  $\mu\text{M}$  아피제닌에 의해 증가된 멜라닌 합성도 DIOA(100  $\mu\text{M}$ )에 의해 유의성있게 차단되었다(Fig. 4D). 종합적으로 이 결과는 B16 세포에서 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진작용은 칼륨-염소이온수송체의 활성화를 통해서 일어난다는 사실을 시사한다.

멜라닌 합성은 세포내 여러 신호 전달 경로를 통하여 일어나는데 멜라닌 합성관련 실험에서 흔히 사용되는 양성 대조군 화합물인  $\alpha$ -melanocyte stimulating factor( $\alpha$ -MSH)에 의한 멜라닌 합성 촉진작용은 cAMP 경로를 통하여 일어난다고 알려져 있다. 멜라닌 합성에 있어 율속단계에 관여하는 tyrosinase의 발현은 cAMP에 의해 증가되고, 이러한 tyrosinase 생성에는 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor(MITF)의 발현에 의해 조절된다고 알려져 있다.<sup>43)</sup> 또한 MITF는 extracellular signal-regulated kinase(ERK)에 의해 인산화되면 그 발현이 저해된다.<sup>44)</sup> 따라서 본 연구의 결과에서 보여준 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진작용은 칼륨-염소이온수송체의 활성화를 통한



**Fig. 3** – Effects of apigenin on the Cl<sup>-</sup> (A) and K<sup>+</sup> (B) fluxes in B16 melanoma cells. In figure (A) the data show changes in intracellular Cl<sup>-</sup> concentration as a function of time, measured by using the Cl<sup>-</sup>-sensitive indicator MQAE. In the data, F<sub>0</sub>/F values are directly proportional to intracellular Cl<sup>-</sup> concentration. The arrow shows the time point for addition of apigenin at a designated concentration. In figure (B) the data show changes in intracellular K<sup>+</sup> concentration as a function of time, measured by using the K<sup>+</sup>-sensitive indicator PBFI/AM. In the data, PBFI fluorescence ratios are directly proportional to intracellular K<sup>+</sup> concentration. The arrow shows the time point for addition of apigenin at a designated concentration.



**Fig. 4** – Effects of DIOA, a specific KCC inhibitor, on the apigenin and NEM, a KCC activator-induced  $\text{Cl}^-$  efflux (A and B) and melanin production (B) in B16 melanoma cells. In figure (A) the data show changes in intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration as a function of time, measured by using the  $\text{Cl}^-$ -sensitive indicator MQAE. In the data,  $\text{Fo}/\text{F}$  values are directly proportional to intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration. The arrow shows the time point for addition of apigenin ( $50 \mu\text{M}$ ) and NEM ( $100 \mu\text{M}$ ). In figure (C) melanin content was measured by the method described in the Method section. The cells were initially grown for 12 hr in order to attach them to the bottom of the culture flasks. Then, the cells were incubated with or without NEM at each designated concentration for 48 hr. Each column represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. \* $p < 0.05$  compared to control. Quantitative changes (figures B and D) were expressed as percent changes of the maximum decrease in  $\text{Fo}/\text{F}$  values (B) and of melanin content (D) induced by the drug compared to control condition in which the cells were treated with a drug-free vehicle. In these experiments apigenin ( $50 \mu\text{M}$ ), NEM ( $100 \mu\text{M}$ ) and DIOA ( $100 \mu\text{M}$ ) were used. Each column represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. \* $p < 0.05$  compared to apigenin alone. # $p < 0.05$  compared to NEM alone.

칼륨 또는 염소이온의 세포내 농도 변화가 멜라닌 합성에 관여하는 여러 신호전달인자(cAMP, MITE, ERK)의 발현 또는 활성을 조절함으로써 일어날 것으로 추측할 수 있다. 하지만 정확히 어느 신호전달 과정에 연관이 있는지를 밝히기 위해서는 향후 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

그럼에도 불구하고 본 연구에서 밝힌 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진작용은 백반과 같은 멜라닌 합성장애에 의한 저색소 질환의 치료용도로 활용될 가치가 충분하다고 판단된다.

## 결론

다양한 채소와 과일에 함유되어 있는 플라보노이드인 아피제닌은 여러 생리활성을 나타내는데 본 연구에서 처음으로 B16 흑

색종 세포에서 멜라닌 합성을 증가시키는 작용이 있음을 확인하였다. 본 연구실에서는 신경세포에서 아피제닌의 작용이 세포막에 존재하는 칼륨-염소이온수송체에 의하여 매개된다는 사실을 밝혔는데 본 연구에서 확인한 멜라닌 합성 촉진작용에 미치는 이온수송체의 역할을 검증하였다. 실험결과에서 아피제닌은 B16 세포에서 칼륨-염소이온수송체 활성 유무를 검증하는 지표인 염소이온-의존성 칼륨이온 유출을 농도의존적으로 나타내었고 이 작용은 칼륨-염소이온수송체를 선택적으로 억제하는 약물인 DIOA에 의해 유의성 있게 차단되었다. 이 결과는 B16 세포에는 칼륨-염소이온수송체가 기능을 하고 있으며 아피제닌에 의해 활성화된다는 것을 의미한다. 칼륨-염소이온수송체를 직접적으로 활성화시킨다고 알려진 약물인 NEM은 농도의존적으로 염소이온 유출과 멜라닌 합성을 촉진하였고 이 작용 역시 칼륨-염소이온수

송체 억제제인 DIOA에 의해 유의성있게 차단되었다. 종합적으로 이 결과는 아피제닌은 B16 세포에서 칼슘-염소이온수송체의 활성화를 통해서 멜라닌합성을 촉진한다는 사실을 시사하며 백반과 같은 멜라닌 합성장애에 의한 저색소 질환의 치료용도로 활용될 가치가 있다고 판단된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 덕성여자대학교 2007년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

### 문헌

- Peterson, J. and Dwyer, J. : Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.* **18**, 1995 (1988).
- Lee, J. H., Zhou, H. Y., Cho, S. Y., Kim, Y. S., Lee, Y. S. and Jeong, C. S. : Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 1318 (2007).
- Rezaei-Zadeh, K., Ehrhart, J., Bai, Y., Sanberg, P. R., Bickford, P., Tan, J. and Shytle, R. D. : Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J. Neuroinflammation* **5**, 41 (2008).
- Psotová, J., Chlopčíková, S., Miketová, P., Hrbác, J. and Simánek, V. : Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part III. Apigenin, baicalein, kaempferol, luteolin and quercetin. *Phytother. Res.* **18**, 516 (2004).
- Caltagirone, S., Rossi, C., Poggi, A., Ranelletti, F. O., Natali, P. G., Brunetti, M., Aiello, F. B. and Piantelli, M. : Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int. J. Cancer* **87**, 595 (2000).
- Wang, W., Heideman, L., Chung, C. S., Pelling, J. C., Koehler, K. J. and Birt, D. F. : Cell-cycle arrest at G<sub>2</sub>/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol. Carcinog.* **28**, 102 (2000).
- Choi, S. I., Jeong, C. S., Cho, S. Y. and Lee, Y. S. : Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 1328 (2007).
- Shindo, K., Saito, E., Sekiya, M., Matsui, T. and Koike, Y. : Antioxidative activity of the flower of *Torenia fournieri*. *Nat. Med. (Tokyo)* **62**, 247 (2008).
- Ma, X., Li, Y. F., Gao, Q., Ye, Z. G., Lu, X. J., Wang, H. P., Jiang, H. D., Bruce, I. C. and Xia, Q. : Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. *Life Sci.* **83**, 110 (2008).
- Panda, S. and Kar, A. : Apigenin (4,5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**, 1543 (2007).
- Sim, G. S., Lee, B. C., Cho, H. S., Lee, J. W., Kim, J. H., Lee, D. H., Kim, J. H., Pyo, H. B., Moon, D. C., Oh, K. W., Yun, Y. P. and Hong, J. T. : Structure activity relationship of antioxidative property of flavonoids and inhibitory effect on matrix metalloproteinase activity in UVA-irradiated human dermal fibroblast. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 290 (2007).
- Shukla, S. and Gupta, S. : Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1833 (2008).
- Kim, M. H., Jeong, C. S., Yoon, H. R., Kim, G. H. and Lee, Y. S. : Involvement of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-cotransport in the apigenin-Induced generation of reactive oxygen species in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J. Appl. Pharmacol.* **14**, 137 (2006).
- Seiberg, M. : Keratinocyt melanocyte interaction during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* **14**, 236 (2001).
- Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Mitchell, D. L. : Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**, 158 (1997).
- Cabanes, J., Chazarra, S. and GarciaCarmona, E. : Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slowbinding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 982 (1994).
- Marmol, V. and Beermann, F. : Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation. *FEBS Letters* **381**, 165 (1996).
- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 24 (1999).
- Lee, K. E., Sim, G. S., Kim, J. H., Park, S. M., Lee, B. C., Yun, Y. P., Zhang, Y. H. and Pyo, H. B. : Effects of the Scirpi rhizoma on antixodiation and melanogenesis. *Yakhak Hoeji* **48**, 323 (2004).
- Cho, Y. H., Lee, B. C., Kim, J. H., Kim, J. H., Pyo, H. B., Zhang, Y. H. and Park, H. D. : Effect of *Aetemisias anomala* S. Moore on antioxidant activity and melanogenesis. *Kor. J. Pharmacognosy* **36**, 273 (2005).
- Cossins, A. R. and Gibson, J. S. : Volume-sensitive transport systems and volume homeostasis in vertebrate red blood cells. *J. Exp. Biol.* **200**, 343 (1997).
- Lauf, P. K., Bauer, J., Adragna, N. C., Fujise, H., Zade-Oppen, A. M., Ryu, K. H. and Delpire, E. : Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation. *Am. J. Physiol.* **263**, C917 (1992).
- Amlal, H., Paillard, M. and Bichara, M. : Cl<sup>-</sup>-dependent NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport mechanisms in medullary thick ascending limb cells.

- Am. J. Physiol.* **267**, C1607 (1994).
- 24) Greger, R. and Schlatter, E. : Properties of the basolateral membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Pflugers Arch.* **396**, 325 (1983).
- 25) Perry, P. B. and O'Neill, W. C. : Swelling-activated K fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K-Cl cotransport and K channels. *Am. J. Physiol.* **265**, C763 (1993).
- 26) Adragna, N. C., White, R. E., Orlov, S. N. and Lauf, P. K. : K-Cl cotransport in vascular smooth muscle and erythrocytes: possible implication in vasodilation. *Am. J. Physiol.* **278**, C381 (2000).
- 27) Yan, G. X., Chen, J., Yamada, K. A., Kleber, A. G. and Corr, P. B. : Contribution of shrinkage of extracellular space to extracellular K<sup>+</sup> accumulation in myocardial ischaemia of the rabbit. *J. Physiol. (London)* **490**, 215 (1996).
- 28) Weil-Maslansky, E., Gutman, Y. and Sasson, S. : Insulin activates furosemide-sensitive K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> uptake system in BC3H1 cells. *Am. J. Physiol.* **267**, C932 (1994).
- 29) Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Latinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarna, M. and Kaila, K. : The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251 (1999).
- 30) Lauf, P. K., Bauer, J., Adragna, N. C., Fujise, H., Zade-Oppen, A. M., Ryu, K. H. and Delpire, E. : Erythrocyte K-Cl cotransport: properties and regulation. *Am. J. Physiol.* **263**, C917 (1992).
- 31) Ellison, D. H., Velazquez, H. and Wright, F. S. : Stimulation of distal potassium secretion by low lumen chloride in the presence of barium. *Am. J. Physiol.* **248**, F638 (1985).
- 32) Kim, J. A., Kang, Y. S. and Lee, Y. S. : Involvement of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransport in the apoptosis induced by N-ethylmaleimide in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **418**, 1 (2001).
- 33) Wisman, K. N., Perkins, A. A., Jeffers, M. D. and Hagerman, A. E. : Accurate assessment of the bioactivities of redox-active polyphenolics in cell culture. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7831 (2008).
- 34) Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieris, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P. and Scheller, C. : Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **460**, 1 (2007).
- 35) Choi, M. Y., Song, H. S., Hur, H. S. and Sim, S. S. : Whitening activity of luteolin related to the inhibition of cAMP pathway in alpha-MSH-stimulated B16 melanoma cells. *Arch. Pharm. Res.* **31**, 1166 (2008).
- 36) Kim, Y. J., Kang, K. S. and Yokozawa, T. : The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2466 (2008).
- 37) Nitoda, T., Isobe, T. and Kubo, I. : Effects of phenolic compounds isolated from *Rabdosia japonica* on B16-F10 melanoma cells. *Phytother. Res.* **22**, 867 (2008).
- 38) Ohguchi, K., Akao, Y. and Nozawa, Y. : Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1499 (2006).
- 39) Finn, G. J., Creaven, B. S. and Egan, D. A. : Activation of mitogen activated protein kinase pathways and melanogenesis by novel nitro-derivatives of 7-hydroxycomarin in human malignant melanoma cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **26**, 16 (2005).
- 40) Takeyama, R., Takekoshi, S., Nagata, H., Osamura, R. Y. and Kawana, S. : Quercetin-induced melanogenesis in a reconstituted three-dimensional human epidermal model. *J. Mol. Histol.* **35**, 157 (2004).
- 41) Nagata, H., Takekoshi, S., Takeyama, R., Homma, T. and Yoshiyuki Osamura, R. : Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **17**, 66 (2004).
- 42) Fujii, T., Ohira, Y., Itomi, Y., Takahashi, Y., Asano, S., Morii, M., Takeguchi, N. and Sakai, H. : Inhibition of P-type ATPases by [(dihydroindenyl)oxyl]acetic acid (DIOA), a K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* **560**, 123 (2007).
- 43) Bentley, N. J., Eisen, T. and Goding, C. R. : Melanocytespecific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7996 (1994).
- 44) Molina, D. M., Grewal, S. and Bardwell, L. : Characterization of an ERK-binding domain in microphthalmia-associated transcription factor and differential inhibition of ERK2-mediated substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 42051 (2005).