

B16 흑색종세포에서 아피제닌에 의한 멜라닌 합성에 미치는 NADPH 산화효소-유래 활성산소종의 역할

이 용 수[#]

덕성여자대학교 약학대학

(Received November 30, 2011; Revised December 13, 2011; Accepted December 15, 2011)

Role of NADPH Oxidase-mediated Generation of Reactive Oxygen Species in the Apigenin-induced Melanogenesis in B16 Melanoma Cells

Yong Soo Lee[#]

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract — Previously, we have reported that apigenin, a natural flavonoid found in a variety of vegetables and fruits, stimulated melanogenesis through the activation of K^+ - Cl^- -cotransport (KCC) in B16 melanoma cells. In this study we investigated the possible involvement of reactive oxygen species (ROS) in the mechanism of apigenin-induced melanogenesis in B16 cells. Apigenin elevated intracellular ROS level in a dose-dependent manner. Treatment with various inhibitors of NADPH oxidase, diphenylene iodonium (DPI), apocynin (Apo) and neopterin (NP) significantly inhibited both the generation of ROS and melanogenesis induced by apigenin. In addition these inhibitors profoundly inhibited apigenin-induced Cl^- -dependent K^+ efflux, a hallmark of KCC activity. However, the apigenin-induced ROS generation was not significantly affected by treatment with 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 the ROS production may be a upstream regulator of the apigenin-induced KCC stimulation, and in turn, melanogenesis in the B16 cells. Taken together, these results suggest that the NADPH oxidase-mediated ROS production may play an important role in the apigenin-induced melanogenesis in B16 cells. These results further suggest that NADPH oxidase may be a good target for the management of hyperpigmentation disorders.

Keywords □ NADPH oxidase, reactive oxygen species, K^+ - Cl^- -cotransport, apigenin, B16 melanoma cell, melanogenesis

피부의 색은 피부 속에 존재하는 멜라닌의 함량에 의해 결정되며 피부의 기저층에 존재하는 멜라닌생성세포에 의해 합성된 멜라닌은 세포질 돌기를 통하여 각질형성세포의 각화과정에 의해 각질층으로 이동한다.¹⁾ 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.²⁾ 멜라닌생성세포에서 멜라닌 합성은 멜라노솜에서 일어나며 여기에 존재하는 여러 cascade 효소 반응에 의해 생성된다.³⁾ 이들 효소 중 티로시나아제(tyrosinase)는 멜라닌합성의 속도를 결정하는 효소로서,

티로신(tyrosine)을 3,4-dihydroxyphenylalanin(DOPA)로 전환하는 티로신 티로신수산화효소(tyrosine hydroxylase) 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA 산화제 활성을 가지고 있다. Tyrosinase-related protein(TRP)-1은 5,6-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 유멜라닌(eumelanin)과 적·노랑색 갈색멜라닌(phaeomelanin)으로 나뉘는데 티로시나아제는 이들 두 가지 타입의 멜라닌 합성에 필요하며, TRP-1과 DCT는 유멜라닌의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근 다양한 식물추출물이 tyrosinase 활성저해나 활성산소종의 발생억제 등을 통하여 멜라닌 합성을 저해함으로써 미백 기능성 화장품의 원료물질로 개발되고 있다.⁴⁾

아피제닌은 자연에 존재하는 플라보노이드류로서 파슬리, 박

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8396 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) yongslee@duksung.ac.kr

하, 레몬, 들깨, 딸기류 및 여러 과일에 다량 함유되어 있다.⁵⁾ 아피제닌은 여러 조직에서 항염,⁶⁾ 암예방⁷⁾ 및 항암작용⁸⁾을 가진다는 사실이 밝혀졌다. 아피제닌은 세포실험에서 활성산소종의 발생을 억제하는 항산화 효과를 나타낸다는 사실이 알려지고 있다.⁹⁾ 이와는 반대로, 아피제닌은 전립선암세포의 사멸을 유도하고 이 작용은 활성산소종의 발생에 기인한다는 연구결과가 발표되었다.¹⁰⁾ 본 연구실에서도 신경아세포종에서 아피제닌이 세포막 칼륨-염소이온수송체를 활성화시키고 이 작용에 활성산소종이 관여한다는 사실을 밝힌 바 있다.¹¹⁾

칼륨-염소이온수송체는 적혈구에서 팽창-의존성 칼륨유출 기전을 매개하는 기능이 있다는 사실¹²⁾이 처음 밝혀진 이래 실험적 증명을 통하여 여러 조직에 존재하고 있다는 것이 밝혀졌다. 즉, 칼륨-염소이온수송체는 상피,¹³⁾ 내피,¹⁴⁾ 혈관평활근,¹⁵⁾ 심장,¹⁶⁾ 골격근¹⁷⁾ 및 신경¹⁸⁾에 그 존재가 확인되었다. 칼륨-염소이온수송체는 여러 생리활성을 나타내는데 조절체적감소(regulatory volume decrease),¹⁹⁾ 상피세포간 염류흡수,¹³⁾ 허혈 심근에서 칼륨손실,¹⁶⁾ 신경에서 염소농도 조절¹⁸⁾ 및 신장에서 칼륨분비²⁰⁾ 등의 기능을 가지고 있다. 또한 최근 본 연구실에서도 칼륨-염소이온수송체가 사람 간암세포의 사멸기전²¹⁾ 및 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진작용을 매개한다는 사실을 밝힌 바 있다.²²⁾

NADPH 산화제는 중성구에서 호흡폭발(respiratory burst) 중 발생하는 활성산소종의 원인이 된다는 사실이 처음으로 알려졌다.²³⁾ 이 효소는 또한 내피세포,²⁴⁾ 혈관평활근 세포,²⁵⁾ 폐의 신경상피체,²⁶⁾ 경동맥체의 제 1형 세포²⁷⁾ 및 흑색종 세포²⁸⁾ 등 비식세포에서도 존재하고 있으며 중요한 역할을 담당하고 있음이 밝혀졌다. 이 효소의 활성화는 세포막에 존재하는 여러 인자, 즉 cytochrome b558(p22^{phox} 및 gp91^{phox}), GTP-결합단백(Rac 및 Rap1A)과 세포질 인자(p40^{phox}, p47^{phox} 및 p67^{phox})가 관여하고 있다.²⁹⁾ NADPH oxidase는 특히 HepG2 간암세포에서 아피제닌에 의한 세포사멸의 중요한 기전으로 작용하고 있으며,³⁰⁾ 칼륨-염소이온수송체의 활성화 기전에도 깊이 관여하고 있다는 사실이 밝혀졌다.³¹⁾

본 연구에서는 이러한 기존 연구결과를 바탕으로 하여 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진작용의 기전에 미치는 NADPH 산화제에 의해 생성된 활성산소종의 역할을 밝히고 칼륨-염소이온수송체와의 상호관계를 규명하고자 하였다.

실험방법

시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), apigenin, diphenylene iodonium(DPI), apocynin(Apo), neopterin(NP) 및 각종 용매와 염류는 Sigma Chemical Co.(미국)에서 구입하였고, R-(+)-(2-n-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-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, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA) 및 potassium-binding benzofuran isophthalate/aceoxymethyl ester(PBFI/AM)은 Molecular Probes, Inc.(미국)에서 구입하여 사용하였다.

세포 배양

B16 흑색종 세포는 서울대학교 한국세포주은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 10% FBS와 penicillin 100 IU/ml와 streptomycin 50 µg/ml을 함유한 DMEM 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기(Forma, 미국)에서 배양하였다.

세포내 활성산소종 측정

세포내 활성산소종은 형광침탐인 DCFH-DA를 이용하여 측정하였다. DCFH-DA는 세포막을 통하여 쉽게 세포내로 들어가서 세포내에 존재하는 여러 에스터라제에 의해 가수분해되어 형광을 발생하지 못하는 2',7'-dichlorofluorescein(DCFH)로 바뀐 후, 활성산소종이 존재할 경우 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)로 빠르게 산화되어 형광을 나타낸다. DCF 형광세기는 세포내에서 발생하는 활성산소종의 양과 비례하는 값이다. 세포를 두 번 세척하고 Hank 용액에 4×10⁵ cells/ml 밀도로 현탁시킨 후 5 µM의 DCFH-DA를 가해 37°C에서 2시간 동안 진탕 배양하여 세포내로 봉입시켰다. 세포 현탁액을 cuvette에 옮겨 485 nm 파장에서 여기(excitation)시켜, 530 nm 파장에서 나오는 형광을 형광분석기(Hitachi F4500, 일본)로 측정하였다.

멜라닌 정량

B16 세포에서 멜라닌을 측정할 때에는 phenol red가 없는 DMEM을 사용하여 24 홈판(well plate)에 5×10⁴ cells/ml로 분주하고 12시간이 지난 뒤 세포가 홈판에 완전히 부착된 것을 확인한 후 시료를 처리하고 48시간 지난 뒤에 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 ml 균질화 완충액(50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)으로 용해시켰다. 여기서 얻은 세포 알갱이(pellet)을 1 N NaOH(+10% DMSO) 200 µl를 첨가하고 vortex 후 멜라닌을 완전히 녹인 다음 96 홈판에 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(10⁴ cells)에서의 멜라닌 생성량으로 비교하였다.

세포내 칼륨농도의 측정

세포내 칼륨농도는 형광침탐인 PBFI/AM을 이용하여 측정하

였다. 비이온성 계면활성제인 0.02% pluronic F-127을 포함한 Hank 용액의 세포현탁액에 5 μM 의 PBFI/AM을 가해 37°C에서 2시간 동안 진탕 배양하여 세포내로 봉입시킨 후, 봉입되지 않은 PBFI/AM은 원심분리하여 제거시켰다. 다시 세포를 Krebs-Ringer 완충액(125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 5 mM NaHCO_3 , 25 mM HEPES, 6 mM glucose, pH 7.4)에 현탁시킨 후 cuvette에 옮겨 340 nm 및 380 nm 파장에서 여기시켜, 500 nm 파장에서 나오는 형광을 형광분석기(Hitachi F4500, 일본)로 측정하였다. 이 때 cuvette 내의 세포 현탁액을 계속 교반하여 세포가 가라앉는 것을 방지하였다. 세포내 칼륨 농도는 두 파장에서 나온 형광세기의 비로써 나타내었다.

자료분석 및 통계적 검정

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

아피제닌에 의한 활성산소종의 생성 및 이에 미치는 NADPH 산화제의 역할

이전 본 연구실에서 발표한 논문²²에 의하면 B16 흑색종 세포에서 아피제닌은 50 μM 이하의 농도로 처리했을 때 세포생존율이 90% 이상으로 나타났으며, 70 μM 을 처리했을 때 생존율이 유의성 있게 저하되었다.²² 따라서 본 실험에서는 아피제닌을 50 μM 이하의 농도로 사용하였다. B16 세포에서 아피제닌은 농

도 의존적으로 세포내 활성산소종의 농도를 증가시켰다(Fig. 1). 이전 많은 연구에서 아피제닌을 비롯한 식물성 플라보노이드 성분은 활성산소종의 발생을 방해하는 항산화 효과를 나타낸다고 보고되고 있다.^{9,32} 본 연구 결과에서는 이와 반대로 아피제닌은 흑색종 세포에서 오히려 활성산소종의 발생을 유도하는 효과를 나타내었다. 이와 같은 상반된 연구결과의 정확한 이유에 대해선 아직 잘 모르지만 아피제닌을 비롯한 여러 플라보노이드 성분은 많은 세포에서 활성산소종의 발생을 유도한다는 결과도 발표되었다.^{10,33} 따라서 세포 또는 조건에 따라 플라보노이드 성분은 활성산소종의 발생을 유도하거나 방해하는 이중 효과를 가지고 있는 것으로 생각되며 이러한 종류의 연구에서는 이점을 항상 고려해야 할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 이러한 아피제닌에 의한 활성산소종의 발생이 세포막에 존재하는 NADPH 산화제에 의한 것인지를 조사하였는데 왜냐하면 본 연구실의 이전 연구에서 간암세포에서 NADPH 산화제가 아피제닌에 의한 활성산소종의 증가에 중요한 역할을 한다는 사실을 밝힌 바 있기 때문이다.³⁰ NADPH 산화제 억제제인 DPI(50 μM), Apo(100 μM) 및 NP(50 μM)를 처리하였을 때 아피제닌에 의한 활성산소종의 발생이 유의성 있게 억제되었다(Fig. 2). 이 결과는 아피제닌에 의한 활성산소종의 증가가 NADPH 산화제에 의해 매개된다는 사실을 시사한다. 최근 세포막에 존재하는 NADPH 산화제에 의한 활성산소종의 발생이 혈관질환,³⁴ 폐 섬유화,³⁵ 당뇨병성 신증³⁶ 등 여러 질환의 원인으로 인식되고 있다.

아피제닌에 의한 멜라닌 생성에 미치는 NADPH 산화제의 역할

본 연구실의 이전 연구에서 밝혀진 B16 세포에서 아피제닌의 멜라닌합성 촉진작용²²에 미치는 NADPH 산화제의 역할을 조사하였다. NADPH 산화제 억제제인 DPI(50 μM), Apo(100 μM)

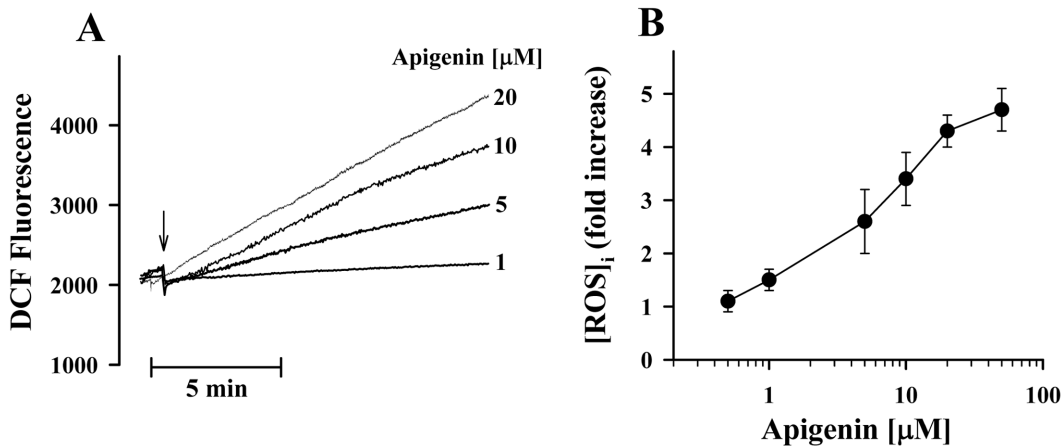


Fig. 1 – Effect of apigenin on the ROS generation in B16 melanoma cells. The data (A) show changes in ROS levels as a function of time, which was measured by DCF fluorescence method. The arrow shows the time point for addition of apigenin at each designated concentration. In the data (B) results are expressed as fold increase compared to the initial DCF fluorescence intensity. Data points represent the mean values of four replications with bars indicating SEM.

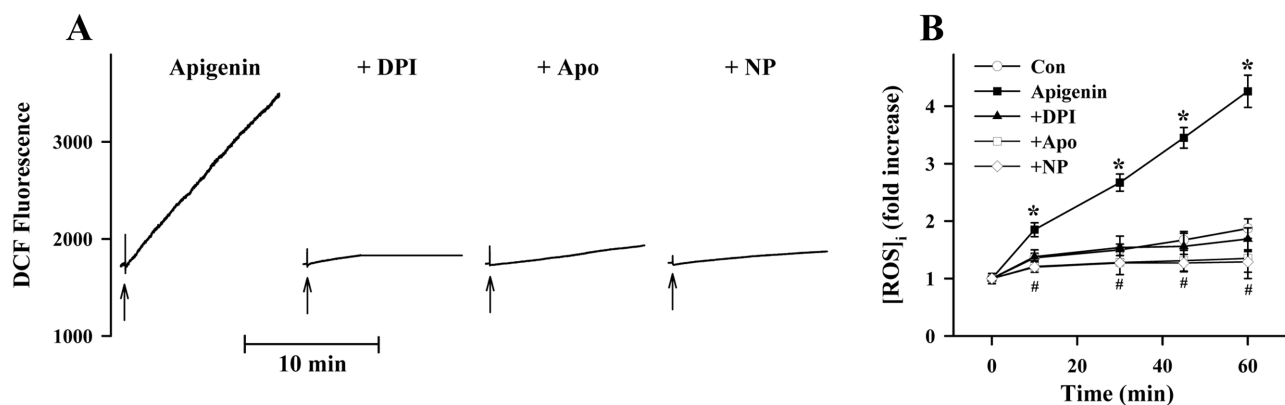


Fig. 2 – NADPH oxidase mediates the ROS production induced by apigenin in B16 melanoma cells. Data presentation is the same as Fig. 1. In the data (A), the arrows show the time point for addition of apigenin (20 μ M). In these experiments, DPI (50 μ M), Apo (100 μ M) and NP (50 μ M) were used as an inhibitor of NADPH oxidase. These drugs were given 10 min before apigenin application. In the data (B), results are expressed as fold increase compared to the initial DCF fluorescence intensity. Data points represent the mean values of four replications with bars indicating SEM. * $P < 0.05$ compared to control in which the cells were incubated with apigenin-free medium. # $P < 0.05$ compared to apigenin alone.

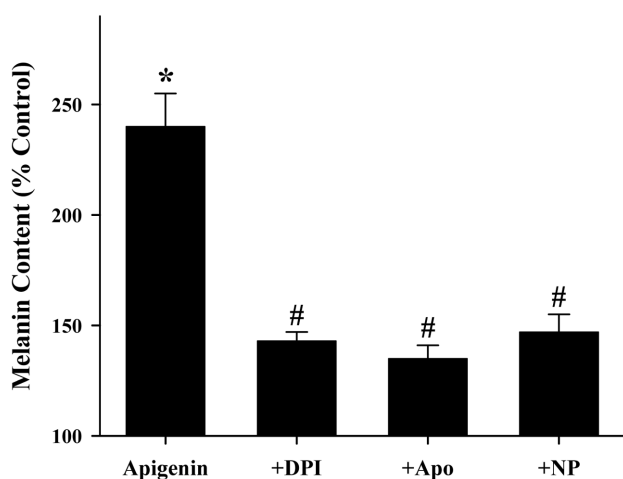


Fig. 3 – Effects of NADPH oxidase inhibitors on the apigenin-induced production of melanin in B16 melanoma cells. Melanin content was measured by the method described in the Method section. Briefly, the cells were initially grown for 12 hr in order to attach them to the bottom of the culture flasks. Then, the cells were incubated with apigenin (20 μ M) for 48 hr. The NADPH oxidase inhibitors, DPI (50 μ M), Apo (100 μ M) and NP (50 μ M) were added 30 min before apigenin application. Each column represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. * $P < 0.05$ compared to control in which the cells were incubated with apigenin-free medium. # $P < 0.05$ compared to apigenin alone.

및 NP(50 μ M)를 전처리하였을 때 아피제닌에 의한 멜라닌 생성이 유의성 있게 억제되었다(Fig. 3). 이 실험결과로 미루어 보아 NADPH 산화제는 아피제닌에 의한 멜라닌 합성기전에 깊이 연루되어 있다고 판단된다. 플라보노이드 물질들이 멜라닌 합성에 미치는 영향에 대한 연구를 보면 멜라닌 합성을 억제하거나³⁷⁾ 또

는 촉진하는³⁸⁾ 상반된 결과들이 발표되고 있다. 하지만 이러한 멜라닌 합성에 미치는 플라보노이드 화합물의 작용기전에 대한 연구는 미비한 실정이며 향후 좀 더 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이런 관점에서 본 연구결과는 플라보노이드의 멜라닌 합성 촉진 효과를 설명하는 하나의 기전을 제시하고 있다 하겠다.

아피제닌의 작용에 연루된 신호체계로서 칼륨-염소이온수송체와 NADPH 산화제의 관계

본 연구실에서는 B16 세포에서 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진작용이 칼륨-염소이온수송체의 활성화를 통해서 일어난다는 사실을 확인한 바 있다.²²⁾ 본 연구에서는 이러한 아피제닌의 효과에 연루된 신호체계로서 칼륨-염소이온수송체와 NADPH 산화제와의 상호작용을 규명하기 위하여 먼저 아피제닌에 의한 칼륨-염소이온수송체 활성화에 미치는 NADPH 산화제 저해제의 영향을 조사하였다. NADPH 산화제 저해제인 DPI(50 μ M), Apo(100 μ M) 및 NP(50 μ M)는 아피제닌에 의한 칼륨이온의 유출을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 4). 하지만 칼륨-염소이온수송체 억제제인 DIOA(100 μ M)를 전처리했을 때 아피제닌에 의한 활성산소종의 발생에는 유의성 있는 영향을 미치지 않았다(Fig. 5). 이 결과로 미루어 보아 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진 작용은 먼저 NADPH 산화제를 통한 활성산소종이 발생하고 이 때 생성된 활성산소종에 의해 칼륨-염소이온수송체가 활성화되어 최종적으로 멜라닌이 합성되는 순서로 일어날 것으로 추측된다.

멜라닌 합성은 세포내 여러 신호 전달 경로를 통하여 일어나며 멜라닌 합성에 직접적으로 관여하는 티로시나제의 활성화에 cAMP³⁹⁾와 산화질소(nitric oxide)⁴⁰⁾ 등이 중요하게 연루되어 있다고 알려져 있다. 본 연구의 결과에서 보여준 NADPH 산화제 및 칼륨-염소이온수송체와 티로시나제의 활성화 및 이를 조절하는

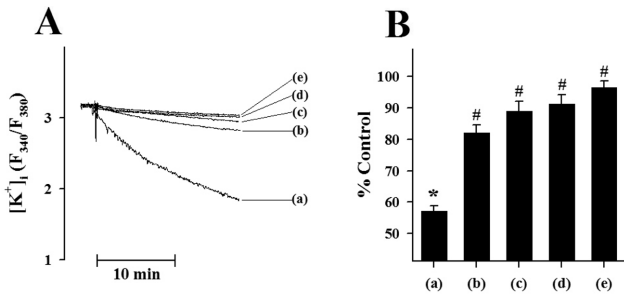


Fig. 4 – Effects of NADPH oxidase inhibitors on the KCC activation induced by apigenin in B16 melanoma cells. In all figures (a), (b), (c), (d) and (e) represent (apigenin alone), (apigenin + DPI), (apigenin+Apo), (apigenin+NP) and (apigenin+Cl-free solution), respectively. The data (A) shows changes in $[K^+]_i$ as a function of time, measured by using the K^+ -sensitive fluorescent dye PBF1/AM as described in Method section. In the figure (A) the arrow shows the time point for addition of apigenin (20 μ M). In these experiments DPI (50 μ M), Apo (100 μ M) and NP (50 μ M) were used as an NADPH oxidase inhibitor. In these experiments these drugs were added 10 min before apigenin application. For extracellular Cl-free buffer solution, external Cl⁻ was replaced with gluconate. Quantitative changes (B) were expressed as percent changes of the maximum decrease in PBF1 fluorescence ratio induced by the drug compared to control condition in which the cells were treated with a drug-free vehicle. Each column represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. *P<0.05 compared to control. #P<0.05 compared to apigenin alone.

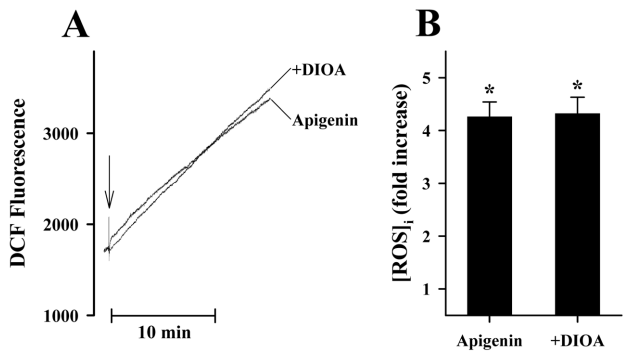


Fig. 5 – Effect of DIOA, a KCC inhibitor on the ROS production induced by apigenin in B16 melanoma cells. Data presentation is the same as Fig. 2. In figure (A) the arrow shows the time point for addition of apigenin (20 μ M). In these experiments, DIOA (100 μ M) was used as an inhibitor of KCC. The drug was given 10 min before apigenin application. In figure (B) the data represent the mean values of four replicates with bars indicating SEM. *P<0.05 compared to control in which the cells were incubated with apigenin-free medium.

된다는 사실이 보고되었다.⁴¹⁾ 또한 티로시나제의 활성화와 멜라닌 합성은 칼륨이온⁴²⁾ 및 염소이온⁴³⁾에 의해 조절된다는 사실도 알려졌다. 식도선암세포에서 cAMP의 하위신호인 cAMP-response element-binding protein(CREB)과 NADPH 산화제 활성이 서로 연관되어 있다는 사실이 보고된 바 있으며,⁴⁴⁾ 내피세포에서 산화질소 생성기전에 NADPH 산화제가 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다.⁴⁵⁾ 산화질소는 또한 칼륨-염소이온수송체 활성화와도 밀접한 연관성이 있음이 밝혀졌다.⁴⁶⁾ 따라서 본 연구에서 밝힌 NADPH 산화제 및 칼륨-염소이온수송체는 티로시나제의 활성화에 관여하는 여러 신호체계와 연계하여 멜라닌 합성을 조절할 것으로 추측할 수 있으나 정확한 기전을 밝히기 위해서는 향후 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

그럼에도 불구하고 본 연구에서 밝힌 아피제닌에 의한 멜라닌 합성 촉진에 NADPH 산화제가 중요한 매개체로 작용하고 있다는 사실은 멜라닌의 과합성에 의한 색소질환의 치료용도로 활용될 가치가 충분하다고 판단된다.

결론

본 연구실에서는 B16 흑색종 세포에서 플라보노이드 화합물인 아피제닌이 칼륨-염소이온수송체의 활성을 통해 멜라닌 합성을 촉진한다는 사실을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 이러한 아피제닌의 작용기전에 미치는 NADPH 산화제-매개성 활성산소종의 역할을 조사하였다. 실험결과에서 아피제닌은 B16 세포에서 농도의존적으로 NADPH 산화제-매개성 활성산소종을 증가시켰다. 또한 아피제닌에 의한 멜라닌 합성작용이 여러 NADPH 산화제 저해제에 의해 유의성 있게 차단되었다. 아피제닌에 의한 칼륨-염소이온수송체의 활성화는 이들 NADPH 산화제 저해제에 의해 유의성 있게 차단되었으나 활성산소종의 발생은 칼륨-염소이온수송체 저해제에 의해서 영향을 받지 않았다. 종합적으로 이 결과는 B16 세포에서 아피제닌에 의한 멜라닌합성은 NADPH 산화제-매개성 활성산소종이 칼륨-염소이온수송체를 활성화시켜 일어난다는 사실을 시사한다. 또한 이 결과는 멜라닌의 합성장애에 의한 과색소질환의 치료제 개발연구에 기초자료로 활용될 충분한 가치가 있다고 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 덕성여자대학교 2010년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1) Seiberg, M. : Keratinocyte-melanocyte interaction during

여러 신호들과의 상호관계는 아직 확실히 밝혀진 바 없다. 하지만 최근 연구에서 멜라닌 합성을 촉진시킨다고 잘 알려진 자외선 A에 의한 활성산소종의 발생이 NADPH 산화제에 의해 매개

- melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* **14**, 236 (2001).
- 2) Coelho, S. G., Choi, W., Brenner, M., Miyamura, Y., Yamaguchi, Y., Wolber, R., Smuda, C., Batzer, J., Kolbe, L., Ito, S., Wakamatsu, K., Zmudzka, B. Z., Beer, J. Z., Miller, S. A. and Hearing, V. J. : Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **14**, 32 (2009).
 - 3) Kondo, T. and Hearing, V. J. : Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev. Dermatol.* **6**, 97 (2011).
 - 4) Wang, H. M., Chen, C. Y. and Wen, Z. H. : Identifying melanogenesis inhibitors from *Cinnamomum subavenium* with *in vitro* and *in vivo* screening systems by targeting the human tyrosinase. *Exp. Dermatol.* **20**, 242 (2011).
 - 5) Peterson, J. and Dwyer, J. : Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.* **18**, 1995 (1988).
 - 6) Li, R. R., Pang, L. L., Du, Q., Shi, Y., Dai, W. J. and Yin, K. S. : Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **32**, 364 (2010).
 - 7) Shukla, S. and Gupta, S. : Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm. Res.* **27**, 962 (2010).
 - 8) Long, X., Fan, M., Bigsby, R. M. and Nephew, K. P. : Apigenin inhibits antiestrogen-resistant breast cancer cell growth through estrogen receptor- α -dependent and estrogen receptor- α -independent mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2096 (2008).
 - 9) Valdameri, G., Trombetta-Lima, M., Worfel, P. R., Pires, A. R., Martinez, G. R., Noleto, G. R., Cadena, S. M., Sogayar, M. C., Winnischofer, S. M. and Rocha, M. E. : Involvement of catalase in the apoptotic mechanism induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.* **193**, 180 (2011).
 - 10) 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).
 - 11) Kim, M. H., Jeong, C. S., Yoon, H. R., Kim, G. H. and Lee, Y. S. : Involvement of K^+ -Cl⁻-cotransport in the apigenin-Induced generation of reactive oxygen species in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J. Appl. Pharmacol.* **14**, 137 (2006).
 - 12) 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).
 - 13) Amlal, H., Paillard, M. and Bichara, M. : Cl⁻-dependent NH₄⁺ transport mechanisms in medullary thick ascending limb cells. *Am. J. Physiol.* **267**, C1607 (1994).
 - 14) 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).
 - 15) 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).
 - 16) Yan, G. X., Chen, J., Yamada, K. A., Kleber, A. G. and Corr, P. B. : Contribution of shrinkage of extracellular space to extracellular K⁺ accumulation in myocardial ischaemia of the rabbit. *J. Physiol. (London)* **490**, 215 (1996).
 - 17) Weil-Maslansky, E., Gutman, Y. and Sasson, S. : Insulin activates furosemide-sensitive K⁺ and Cl⁻ uptake system in BC3H1 cells. *Am. J. Physiol.* **267**, C932 (1994).
 - 18) Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvoori, E., Latineen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M. and Kaila, K. : The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251 (1999).
 - 19) 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).
 - 20) 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).
 - 21) Kim, J. A., Kang, Y. S. and Lee, Y. S. : Involvement of K⁺-Cl⁻-cotransport in the apoptosis induced by N-ethylmaleimide in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* **418**, 1 (2001).
 - 22) Lee, Y. S. : Role of K⁺-Cl⁻-cotransporter in the apigenin-induced stimulation of melanogenesis in B16 melanoma cells. *Yakhak Hoeji* **52**, 500 (2008).
 - 23) Babior, B. M. : The respiratory burst oxidase. *Curr. Opin. Hematol.* **2**, 55 (1995).
 - 24) Jones, S. A., O'Donnell, V. B., Wood, J. D., Broughton, J. P., Hughes, E. J. and Jones, O. T. : Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **271**, H1626 (1996).
 - 25) Marshall, C., Mamary, A. J., Verhoeven, A. J. and Marshall, B. E. : Pulmonary artery NADPH oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 633 (1996).
 - 26) Youngson, C., Nurse, C., Yeger, H., Curnutte, J. T., Vollmer, C., Wong, V. and Cutz, E. : Immunocytochemical localization on O₂-sensing protein (NADPH oxidase) in chemoreceptor cells. *Microsc. Res. Tech.* **37**, 101 (1997).
 - 27) Kummer, W. and Acker, H. : Immunohistochemical demonstration of four subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body. *J. Appl. Physiol.* **78**, 1904 (1995).
 - 28) Zhao, Y., Liu, J. and McMartin, K. E. : Inhibition of NADPH oxidase activity promotes differentiation of B16 melanoma cells. *Oncol. Rep.* **19**, 1225 (2008).
 - 29) Babior, B. M. : NADPH oxidase: an update. *Blood* **93**, 1464 (1999).

- 30) 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).
- 31) Kim, J. A. and Lee, Y. S. : Role of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase in the mechanism of activation of K^+ - Cl^- -cotransport by N-ethylmaleimide in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic. Res.* **35**, 43 (2001).
- 32) Queen, B. L. and Tollefsbol, T. O. : Polyphenols and aging. *Curr. Aging Sci.* **3**, 34 (2010).
- 33) Ullah, M. F., Ahmad, A., Zubair, H., Khan, H. Y., Wang, Z., Sarkar, F. H. and Hadi, S. M. : Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 553 (2011).
- 34) Ago, T., Kuroda, J., Kamouchi, M., Sadoshima, J. and Kitazono, T. : Pathophysiological roles of NADPH oxidase/nox family proteins in the vascular system. Review and perspective. *Circ. J.* **75**, 1791 (2011).
- 35) Crestani, B., Besnard, V. and Boczkowski, J. : Signalling pathways from NADPH oxidase-4 to idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1086 (2011).
- 36) Tojo, A., Asaba, K. and Onozato, M. L. : Suppressing renal NADPH oxidase to treat diabetic nephropathy. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**, 1011 (2007).
- 37) 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).
- 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) Busca, R. and Ballotti, R. : Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment. Cell Res.* **13**, 60 (2000).
- 40) Dong, Y., Wang, H., Cao, J., Ren, J., Fan, R., He, X., Smith, G. W. and Dong, C. : Nitric oxide enhances melanogenesis of alpaca skin melanocytes in vitro by activating the MITF phosphorylation. *Mol. Cell. Biochem.* **352**, 255 (2011).
- 41) Valencia, A. and Kochevar, I. E. : Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 214 (2008).
- 42) Ginger, R. S., Askew, S. E., Ogborne, R. M., Wilson, S., Ferdinando, D., Dadd, T., Smith, A. M., Kazi, S., Szerencsei, R. T., Winkfein, R. J., Schnetkamp, P. P. and Green, M. R. : SLC24A5 encodes a trans-Golgi network protein with potassium-dependent sodium-calcium exchange activity that regulates human epidermal melanogenesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 5486 (2008).
- 43) Han, H. Y., Lee, J. R., Xu, W. A., Hahn, M. J., Yang, J. M. and Park, Y. D. : Effect of Cl^- on tyrosinase: complex inhibition kinetics and biochemical implication. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **25**, 165 (2007).
- 44) Fu, X., Beer, D. G., Behar, J., Wands, J., Lambeth, D. and Cao, W. : cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 20368 (2006).
- 45) Craige, S. M., Chen, K., Pei, Y., Li, C., Huang, X., Chen, C., Shibata, R., Sato, K., Walsh, K. and Keaney, J. F. Jr. : NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation. *Circulation* **124**, 731 (2011).
- 46) Di Fulvio, M., Lauf, P. K. and Adragna, N. C. : Nitric oxide signaling pathway regulates potassium chloride cotransporter-1 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 44534 (2001).