

B16 흑색종세포에서 싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 합성 촉진효과에 미치는 칼슘-활성 염소 통로의 역할

이 용 수[#]

덕성여자대학교 약학대학

(Received July 1, 2015; Revised July 21, 2015; Accepted July 22, 2015)

Role of Ca^{2+} -activated Cl^- Channels in the Stimulation of Melanin Synthesis Induced by Cyclosporin A in B16 Melanoma Cells

Yong Soo Lee[#]

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

Abstract — The mechanism of melanogenesis induced by cyclosporin A (CsA) was investigated in B16 melanoma cells. CsA stimulated the production of melanin in a dose-dependent manner in the cells. In addition, CsA increased intracellular Ca^{2+} concentration in a dose-related fashion. Treatment with BAPTA/AM, an intracellular Ca^{2+} chelator significantly inhibited the CsA-induced intracellular melanin synthesis. CsA profoundly induced Cl^- efflux, which was significantly blocked by niflumic acid (NFA) and flufenamic acid (FFA), specific and nonspecific inhibitors of Ca^{2+} -activated Cl^- channels (CaCCs), respectively. Furthermore, these inhibitors of CaCCs significantly inhibited the CsA-induced stimulation of melanin synthesis. Taken together, these results suggest that the activation of CaCCs may play an important role in the CsA-induced stimulation of melanin synthesis in B16 cells. These results further suggest that CaCCs may be a good target for the management of hyperpigmentation of the skin reported in the patients treated with CsA.

Keywords □ cyclosporin A, melanogenesis, Ca^{2+} signal, Ca^{2+} -activated Cl^- channel, hyperpigmentation, B16 melanoma cell

멜라닌은 사람 피부색을 결정하는 색소로서 피부 기저층의 멜라닌세포(melanocytes)에 의해 합성된 후 각질형성세포(keratinocytes)의 각화과정에 의해 세포질 돌기를 통하여 각질층으로 이동된다.¹⁾ 멜라닌은 태양광선으로부터 나오는 자외선의 피부 투과를 억제하여 피부를 보호하는 좋은 기능도 하지만 국소적으로 너무 많이 생성되거나, 노화 등에 의해 피부의 기능이 감소하면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 등의 과색소침착증(hyperpigmentation)을 일으킬 수 있다.²⁾ 멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜(melanosomes)에 존재하는 여러 가지 효소에 의해 합성되는데 멜라닌 합성 속도를 결정하는 효소는 티로시나제(tyrosinase)로 알려져 있다.³⁾ 티로시나제의 활성을 억제하는

효과를 지닌 식물유래 다양한 물질을 미백 기능성 화장품의 원료로 개발하려는 연구가 많이 이루어지고 있다.⁴⁾

싸이클로스포린 A는 강력한 면역억제제로 이식편거부반응(graft rejection)의 예방⁵⁾과 건선 및 아토피성 피부염 등 면역피부질환⁶⁾의 치료에 널리 사용되고 있다. 싸이클로스포린 A의 흔한 피부 부작용으로 다모증(hypertrichosis),⁷⁾ 치육과형성(gingival hypertrophy),⁸⁾ 여드름양발진(acneiform eruption) 및 모공각화증(keratosis pilaris)⁹⁾ 등이 보고되고 있다.

드물게는 피부 착색과 관련한 부작용도 보고되고 있는데, Brady 등¹⁰⁾은 싸이클로스포린 A가 과색소침착증을 유발한 증례를 보고하였다. 여기에서 보면 신장이식을 받은 환자에게 싸이클로스포린 A를 3개월간 투여하였는데 그 중간에 환자의 피부에 과색소침착증이 발현되었고 싸이클로스포린 A 치료를 중단한 후에는 이 현상이 사라졌다. Ozkaya-Bayazit 등¹¹⁾도 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia) 환자에게 싸이클로스포린 A, daunorubicin 및 cytarabine으로 치료하는 동안 얼굴과 피부에 과색소침착증이 나타났다고 보고하였다. 하지만 어떤 약물이 과색

[#]Corresponding Author

Yong Soo Lee

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

Tel.: 02-901-8396 Fax.: 02-901-8386

E-mail: yongslee@duksung.ac.kr

소침착증을 유발했는지는 분명하게 밝히지 못했다. Szepietowski 등¹²⁾도 신장이식 환자에게서 멜라닌세포성 모반(melanocytic nevi) 숫자의 증가가 일어났음을 보고 하였다. 싸이클로스포린 A는 모발 암화(hair darkening)¹³⁾나 백모증(poliosis)¹⁴⁾을 유발한다는 결과도 발표되었다. 이외는 대조적으로 강 등¹⁵⁾은 싸이클로스포린 A가 사람 멜라닌세포에서 멜라닌 합성과 티로시나제 활성을 오히려 감소시킨다는 반대의 결과를 발표하였다.

이처럼 아직까지 싸이클로스포린 A의 투여에 의한 피부 과색 소침착증 발현 기전은 정확히 이해되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 멜라닌세포에서 싸이클로스포린 A가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보고 그 기전을 규명하고자 하였다.

실험방법

시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), cyclosporin A(CsA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), niflumic acid(NFA), flufenamic acid(FFA), valinomycin, tributyltin, nigericin 및 각종 용매와 염류는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)와 penicillin-streptomycin 혼합액은 GIBCO(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 1-(2,5-carboxyoxazol-2-yl-6-aminobenzofuran-5-oxyl)-2-(2'-amino-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetoxymethyl ester(Fura-2/AM), bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid/acetoxyethyl ester(BAPTA/AM) 및 N-(6-methoxyquinolyl) acetoethyl ester(MQAE)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 형광탐침은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 농축액으로 만든 후 물로 희석하여 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, Marietta, OH, USA)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 H₂O) 100 µl를 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 생성된 MTT-formazan 결정체를 분리하기 위하여 세포 현탁

액을 eppendorf tube에 옮겨 원심분리하였다(1500 rpm, 4분). 상등액을 조심스럽게 제거하고 DMSO 100 µl를 첨가하여 결정체를 용해시킨 후 540 nm에서 ELISA reader(Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군과 비교하여 흡광도의 백분율로 나타내었다.

멜라닌 정량

B16 세포에서 멜라닌을 측정할 때에는 phenol red가 없는 DMEM을 사용하여 24 well plate에 ml 당 5×10⁴개로 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 균질완충액(50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)으로 용해시켰다. 여기서 얻은 세포 pellet을 1 N NaOH, 10% DMSO 용액 200 µl를 첨가하고 vortex 후 멜라닌을 완전히 녹인 다음 96 well plate에 옮긴 후 ELISA reader(Molecular Device)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품을 이용한 표준 검량선을 이용하여 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌 생성량은 단위세포(10⁴개)에서의 멜라닌 생성량으로 비교하였다.

세포내 칼슘이온 농도 측정

B16 세포를 5 µM Fura-2/AM을 가해 37°C에서 30분간 배양하였고 비봉입 Fura-2/AM은 150 g에서 30분간 원심분리하여 제거하였다. 세포를 Krebs-Ringer 완충액(125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 5 mM NaHCO₃, 25 mM HEPES, 6 mM glucose 및 2.5 mM probenecid, pH 7.4)에 세포밀도가 ml당 2×10⁶개가 되도록 현탁시켰다. Fura-2가 봉입된 세포를 형광측정 전까지 25°C에서 90분간 유지시킨 후 교반봉이 들어있는 quartz cuvette에 0.5 ml 세포현탁액을 주입하여 Hitachi F-4500 형광분석기를 사용하여 여기파장을 340 및 280 nm에서 반복하게 하고 형광발광을 510 nm에서 측정하였다. 세포내 칼슘농도는 340 : 380 nm 형광비로 나타내었다.

세포내 염소이온 농도 측정

세포내 염소이온 농도의 변화는 염소이온에 민감한 형광탐침인 MQAE를 사용해 조사하였다. 세포를 두 번 Hank 용액으로 씻은 후 4×10⁵ cells/ml 되게 현탁시킨 후 MQAE를 세포 내로 봉입시키기 위해 최종농도가 5 mM로 하여 실온에서 밤새 배양하였다. 세포를 cuvette에 넣고 침전을 막기 위해 교반을 한 상태에서 365 nm에서 여기시키고 발생하는 형광세기를 450 nm에서 Hitachi F-4500 형광분석기를 사용하여 측정하였다. 실험은 실온에서 시행하여 형광탐침이 새어 나오는 것을 최소화 하였다. 실험 결과는 세포내 염소이온과 비례하는 값인 상대적 형광값

(F_0/F ; F_0 =염소이온이 없을 때 형광치; F =시간에 따른 형광치)으로 나타내었다. 이렇게 구한 F_0/F 값은 세포내 염소이온 농도와 비례 관계에 있다.¹⁶⁾ 모든 형광값은 배경 형광치(background fluorescence)를 보정하여 나타내었으며 배경 형광치는 MQAE의 이온-선택적 신호를 최대로 제거하기 위하여 5 μM valinomycin을 포함하는 HEPES-buffered KSCN 용액을 이용하여 따로 측정하였다.¹⁶⁾ F_0 값은 10 μM tributyltin 및 10 μM nigericin을 포함한 염소-제거 KNO_3 용액을 이용하여 측정하였다.¹⁶⁾

자료분석 및 통계적 검정

모든 실험은 네 번 반복해서 실시하고 실험 결과는 대조군의 조건에 대한 백분율로 나타내었다. 실험 결과는 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

싸이클로스포린 A의 세포 독성

싸이클로스포린이 세포 독성에 미치는 농도를 조사하여 향후 실험에 사용될 농도 범위를 결정하기 위해서 MTT 분석을 시행하였다. B16 흑색종 세포에 대한 싸이클로스포린의 세포독성을 측정한 결과, 50 μM 이하의 농도로 처리했을 때 세포생존율은 85% 이상으로 나타났으며, 100 μM 이상을 처리했을 때 생존율

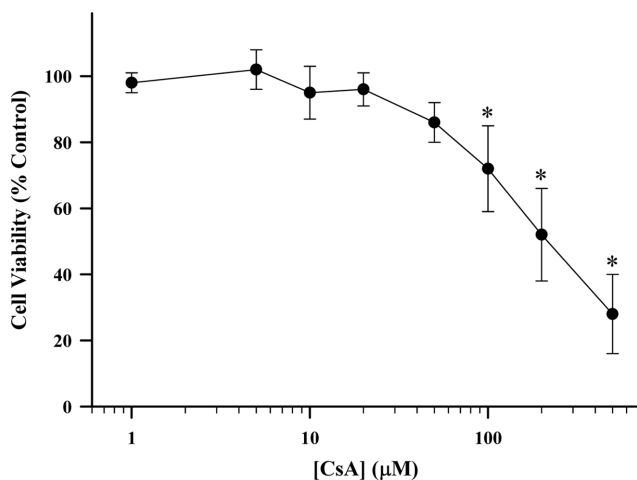


Fig. 1 – Effects of cyclosporin A (CsA) on cell viability in B16 melanoma cells. Cells were incubated with or without each concentration of CsA for 48 hr. Cell viability assay was done by the MTT staining method. Results are expressed as percent of control condition in which cells were grown in medium without drugs. 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 CsA-free medium.

이 유의성 있게 저하되었다(Fig. 1). 따라서 향후 실험에서 싸이클로스포린은 50 μM 이하의 농도로 사용하였다. 싸이클로스포린의 세포 독성에 대한 민감도는 세포의 종류에 따라 다소 차이는 있지만 대체로 본 실험에서 사용한 B16 세포에서의 결과와 비슷하게 10~50 μM 범위에서 유의성 있는 세포 독성을 나타내었다.^{17,18)}

싸이클로스포린 A의 멜라닌 생성 촉진 효과

B16 세포를 이용하여 싸이클로스포린이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하였다. 싸이클로스포린을 처리하고 48시간 동안 배양 후 그 효과를 관찰하였는데 그 이유는 이 시간대에서 대조군, 즉 약물을 가하지 않은 상태에서 분석이 가능한 멜라닌 합성이 이루어지기 때문이다. 배양 후 B16 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정된 결과, 싸이클로스포린을 처리한 군에서 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 증가되었으며 10 μM 농도 처리군에서 대조군에 비해 약 1.5배가 증가하여 통계적으로 유의한 촉진 효과를 나타내었다(Fig. 2).

앞에서 기술한 바와 같이 신장을 이식받은 환자에게 면역억제제로서 싸이클로스포린 A를 투여했을 때 피부에 과색소침착증을 발현하고¹⁰⁻¹²⁾ 본 연구에서 사용한 같은 종류의 세포에서도 싸이클로스포린 A는 멜라닌 합성을 촉진하는 효과를 나타내었다.¹⁹⁾

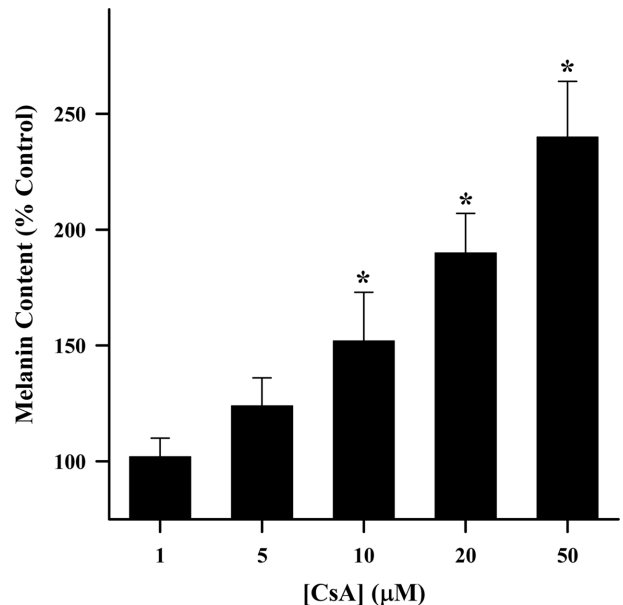


Fig. 2 – Effect of cyclosporin A (CsA) on the production of melanin in B16 melanoma cells. Melanin content was measured by the method described in the Method section. Briefly, the cells were initially grown for 12 hr in order to attach them to the bottom of the culture flasks. Then, the cells were incubated with each concentration of CsA for 48 hr. 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 CsA-free medium.

하지만 사람유래 멜라닌세포를 이용한 실험에서는 오히려 멜라닌 합성 억제 효과를 보였다.¹⁵⁾ 이러한 상반된 결과가 실험에 사

용한 세포 종류의 차이에 기인하는 지 또는 다른 이유에 의한 것인지는 현재로서는 정확히 알 수 없으며 추후 연구에서 밝혀야 할 과제이다.

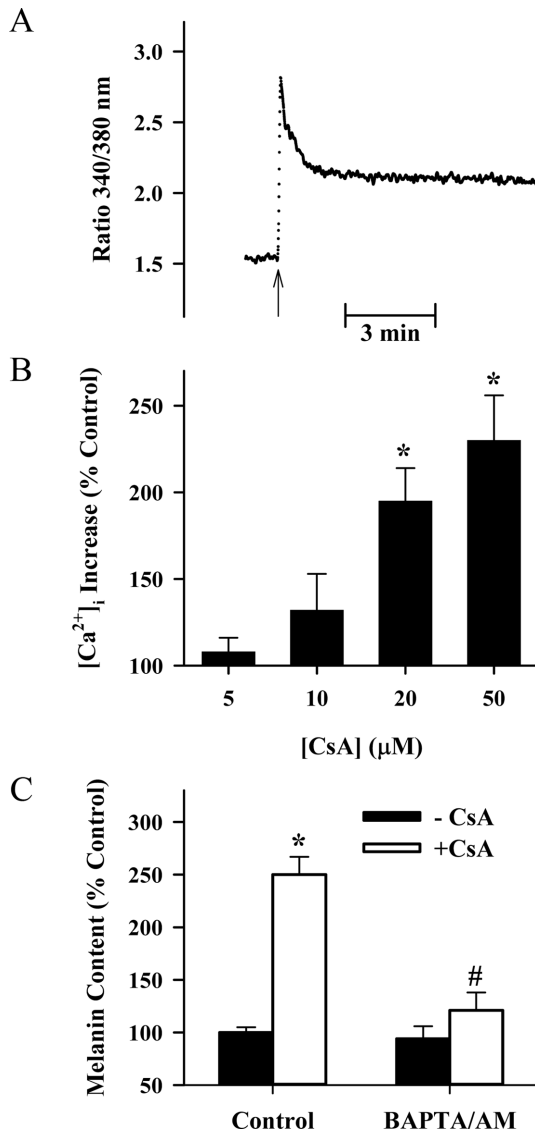


Fig. 3 – Role of intracellular Ca^{2+} in the cyclosporin A (CsA)-induced production of melanin in B16 melanoma cells. Intracellular Ca^{2+} concentration was assessed by Fura-2 fluorescence technique, and the data (A) represent intracellular Ca^{2+} changes with time. The arrow shows the time point for addition of CsA (20 μM). In the data (B) intracellular Ca^{2+} increases are expressed as percent of control condition in which the cells were incubated with CsA-free medium. Each column represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. * $P < 0.05$ compared to control. The data (C) represent the effect of BAPTA/AM, an intracellular Ca^{2+} chelator, on the production of melanin induced by CsA. BAPTA/AM (1 μM) was added 30 min before treatment with CsA (50 μM). Each column represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. * $P < 0.05$ compared to negative control. # $P < 0.05$ compared to CsA alone.

싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 생성 촉진 효과에 미치는 칼슘 신호의 역할

본 연구실에서는 멜라닌 합성 기전에 칼슘신호가 중요한 역할을 담당하고 있다는 사실을 밝힌 바 있다.²⁰⁾ 또한 간세포를 이용한 실험에서 싸이클로스포린 A는 세포사멸 작용을 나타내며 이 과정에 칼슘신호가 관여되어 있음을 보고하였다.²¹⁾ 따라서 본 연구에서는 싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 합성 촉진 작용에 미치는 칼슘신호의 역할을 알아보려 하였다.

Fura-2 형광법을 통한 세포내 칼슘 측정에서 싸이클로스포린 A는 20 μM 농도에서 빠르게 세포내 칼슘 농도를 증가시켰으며 (Fig. 3A), 이 작용은 농도 의존적으로 나타났다(Fig. 3B). 또한 세포내 칼슘 킬레이트인 BAPTA/AM(1 μM)의 전처리에 의해 싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 합성을 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 3C). 이 결과는 싸이클로스포린 A의 멜라닌 합성 촉진 작용은 세포내 칼슘 신호에 의해 매개되고 있다는 사실을 시사한다.

세포의 분열, 분화 및 사멸은 물론 근육 수축과 호르몬이나 신경전달물질의 외포작용 등 세포 기능에 중요한 역할을 담당하고 있는 세포내 칼슘신호는 최근 몇몇 연구에서 멜라닌 합성 기전에도 관여하고 있음이 밝혀지고 있다. 자외선의 조사²²⁾ 및 스타틴 계열 약물인 로바스타틴²⁰⁾에 의한 멜라닌 합성 촉진 작용에 세포내 칼슘신호가 중요한 역할을 담당하고 있다는 사실이 밝혀졌다.

싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 생성 촉진 효과에 미치는 칼슘-활성 염소통로의 역할

흥미롭게도 멜라닌 합성에 관여하는 티로시나제의 활성이 염소이온에 의해 조절된다는 사실이 보고된 바 있다.²³⁾ 본 연구실에서 발표한 논문에서도 싸이클로스포린 A의 약리작용에 칼슘-활성 염소통로가 칼슘 신호의 하위 신호로서 중요한 역할을 담당하고 있다는 사실을 밝힌 바 있다.²¹⁾ 따라서 본 연구에서는 증가된 세포내 칼슘이 칼슘-활성 염소통로를 활성화시켜 세포내 염소이온의 농도를 감소시킴으로써 멜라닌 합성을 촉진한다고 가정하고 이를 조사하였다.

MQAE 형광법을 이용한 세포내 염소이온 측정에서 싸이클로스포린 A는 50 μM 농도에서 빠르게 세포내 염소이온 농도를 감소시켰다(Fig. 4A). 이 작용은 칼슘-활성 염소통로의 선택적 억제제로 알려진 100 μM niflumic acid(NFA)와 비선택적 억제제인 100 μM flufenamic acid(FFA)²⁴⁾의 전처리에 의해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4B).

분비선 세포(acinar cells)로부터 체액 분비, 심장과 신경

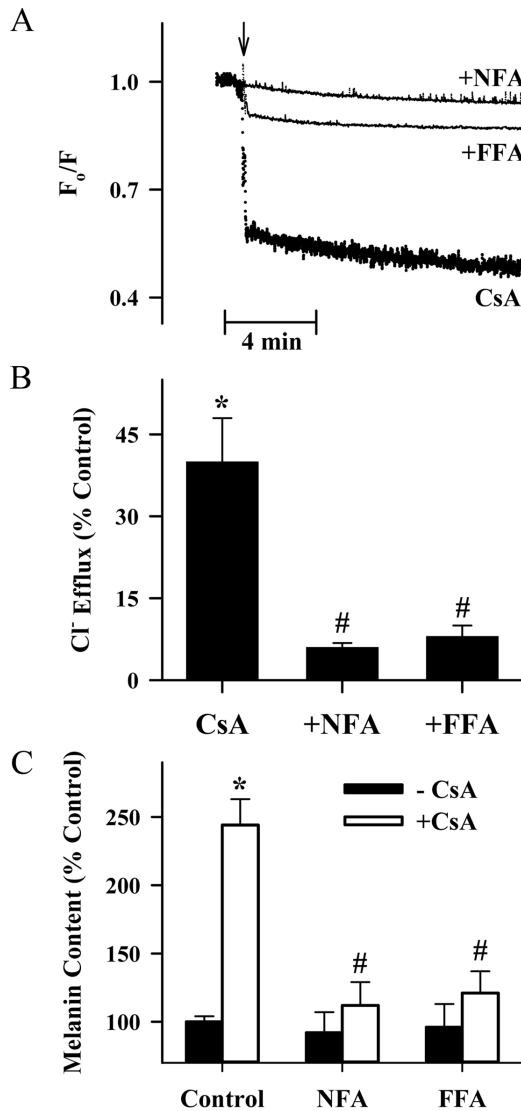


Fig. 4 – Effects of inhibitors of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels (CaCCs) on the cyclosporin A (CsA)-induced Cl⁻ efflux and production of melanin in B16 melanoma cells. In these experiments niflumic acid (NFA) and flufenamic acid (FFA) were used as specific and nonspecific inhibitors of CaCCs, respectively. Intracellular Cl⁻ concentration was assessed by MQAE fluorescence technique, and the data (A) represent intracellular Cl⁻ changes with time. The arrow shows the time point for addition of CsA (50 μM). NFA (100 μM) and FFA (100 μM) were given 10 min before CsA treatment. Quantitative changes (B) are expressed as percent of the F₀/F values induced by the designated condition compared to that of control, 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 CsA alone. The data (C) represent the effect of inhibitors of CaCCs on the production of melanin induced by CsA. NFA (100 μM) and FFA (100 μM) were added 30 min before treatment with CsA (50 μM). Each column represents the mean value of four replications with bars indicating SEM. *P<0.05 compared to negative control. #P<0.05 compared to CsA alone.

세포의 흥분성 및 혈관 긴장도의 조절 등 다양한 생리활성을 가진²⁵⁾ 칼슘-활성 염소통로는 평활근세포,²⁶⁾ 카할간질세포(interstitial cell of Cajal),²⁷⁾ 기관지상피세포²⁸⁾ 및 신경세포²⁹⁾ 등 여러 종류의 세포에서 그 존재가 확인되었으나 본 실험에 사용한 B16 흑색종세포에서는 아직까지 그 존재여부가 확인된 바 없다. 본 실험결과는 흑색종세포에서도 칼슘-활성 염소통로가 존재할 가능성을 시사해 주고 있지만 확증을 위해서는 분자생물학적 방법을 통한 단백질의 존재와 발현여부에 대한 연구가 필요하다.

싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 합성에 미치는 칼슘-활성 염소통로의 역할을 규명하기 위하여 칼슘-활성 염소통로 억제제 (100 μM NFA 및 100 μM FFA)의 영향을 조사하였다. 이들 억제제의 전처리로 싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 합성이 유의성 있게 감소되었다(Fig. 4C). 이 결과는 싸이클로스포린 A의 멜라닌 합성 촉진 작용의 분자 기전에 칼슘-활성 염소통로가 관여하고 있음을 시사한다.

염소이온은 멜라닌 합성에 중요한 효소인 티로시나제의 활성을 억제하는 기능을 가지고 있다는 사실이 밝혀졌는데,^{23,30,31)} 그 기전은 염소이온이 이 효소의 기질과 경쟁적으로 작용하여 효소 작용을 억제하거나,³⁰⁾ 또는 티로시나제에 기질과는 비경쟁적으로 결합하여 그 작용을 억제하는 것으로³¹⁾ 알려져 있다. 따라서 세포내 염소이온 농도에 영향을 줄 수 있는 세포막 염소수송체나 염소통로가 멜라닌 합성을 조절하는 기능을 나타낼 수 있을 것으로 추측된다. 이와 관련하여 염소이온 통로인 GABA 수용체³²⁾와 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)³³⁾이 멜라닌 합성에 연루되어 있다는 보고가 있으나 칼슘-활성 염소통로의 작용에 대한 것은 아직까지 보고된 바 없다. 본 연구결과로서 칼슘-활성 염소통로가 세포내 염소이온 농도를 변화시켜 멜라닌 합성을 조절한다는 사실이 제시된 만큼 이를 뒷받침하는 후속 연구가 필요하다고 생각된다.

결론

본 연구에서는 싸이클로스포린 A가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보고 그 기전을 규명하고자 하였다. 실험결과에서 싸이클로스포린 A는 B16 세포에서 농도의존적으로 멜라닌 합성을 증가시켰다. 싸이클로스포린 A는 세포내 칼슘 농도를 용량의존적으로 증가시켰으며 세포내 칼슘 킬레이트인 BAPTA/AM의 전처리에 의해 싸이클로스포린 A에 의한 세포내 칼슘증가와 멜라닌 합성촉진 작용이 유의성있게 감소되었다. 싸이클로스포린 A는 세포내 염소이온 농도를 감소시켰으며 이 작용은 칼슘-활성 염소통로에 대한 억제제인 NFA와 FFA에 의해 차단되었다. 또한 이들 약물은 싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 합성 증가 작용도 유의성 있게 감소시켰다. 이 결과는 싸이클로스포린 A에 의한 멜라닌 합성 촉진 작용은 세포내 칼슘 증가로 인한 칼슘-활

성 염소통로의 활성화에 의해 매개된다는 사실을 시사한다. 또한 이 연구결과로서 칼슘-활성 염소통로는 멜라닌 합성 이상에 의한 피부 색소 질환의 치료제 개발에 있어 중요한 표적분자(target molecule)로서 가치가 있다고 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 덕성여자대학교 2014년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

References

- 1) Simon, J. D., Peles, D., Wakamatsu, K. and Ito, S. : Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 563 (2009).
- 2) Speeckaert, R., Van Gele, M., Speeckaert, M. M., Lambert, J. and van Geel, N. : The biology of hyperpigmentation syndromes. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 512 (2014).
- 3) Casanola-Martin, G. M., Le-Thi-Thu, H., Marrero-Ponce, Y., Castillo-Garit, J. A., Torrens, F., Rescigno, A., Abad, C. and Khan, M. T. : Tyrosinase enzyme: an overview on a pharmacological target. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1494 (2014).
- 4) Alexis, A. F. : New and emerging treatments for hyperpigmentation. *J. Drugs Dermatol.* **13**, 382 (2014).
- 5) Page, E. H., Wexler, D. M. and Guenther, L. C. : Cyclosporin A. *J. Am. Acad. Dermatol.* **14**, 785 (1986).
- 6) Mueller, W. and Herrmann, B. : Cyclosporin A for psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **301**, 555 (1979).
- 7) Bencini, P. L., Montagnino, G., Sala, F., De Vecchi, A., Crosti, C. and Tarantino, A. : Cutaneous lesions in 67 cyclosporin-treated renal transplant recipients. *Dermatologica* **172**, 24 (1986).
- 8) Wysocki, G. P. and Daley, T. D. : Hypertrichosis in patients receiving cyclosporine therapy. *Clin. Exp. Dermatol.* **12**, 191 (1987).
- 9) Daley, T. D., Wysocki, G. P. and Day, C. : Clinical and pharmacologic correlations in cyclosporine-induced gingival hyperplasia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **62**, 417 (1986).
- 10) Brady, A. J. and Wing, A. J. : Hyperpigmentation due to cyclosporin therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **4**, 309 (1989).
- 11) Ozkaya-Bayazit, E., Diz-Kucukkaya, R., Akasya, E., Buyukbabani, N., Oncu, S. and Pekcelen, Y. : Bullous acral erythema and concomitant pigmentation on the face and occluded skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **14**, 139 (2000).
- 12) Szepietowski, J., Wasik, F., Szepietowski, T., Wlodarczyk, M., Sobczak-Radwan, K. and Czyz, W. : Excess benign melanocytic naevi in renal transplant recipients. *Dermatology* **194**, 17 (1997).
- 13) Rebora, A., Delmonte, S. and Parodi, A. : Cyclosporin A-induced hair darkening. *Int. J. Dermatol.* **38**, 229 (1999).
- 14) Asensio, V., del Pozo, L. J., Asensio, M. and Lerida, M. T. : Megalotrichiasis and poliosis caused by cyclosporin A. *Med. Clin. (Barc)* **97**, 39 (1991).
- 15) Lee, J. Y. and Kang, W. H. : Effect of cyclosporin A on melanogenesis in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **16**, 504 (2003).
- 16) Kaneko, H., Nakamura, T. and Lindemann, B. : Noninvasive measurement of chloride concentration in rat olfactory receptor cells with use of a fluorescent dye. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C1387 (2001).
- 17) Cebrian, C., Areste, C., Nicolas, A., Olive, P., Carceller, A., Piulats, J. and Meseguer, A. : Kidney androgen-regulated protein interacts with cyclophilin B and reduces cyclosporine A-mediated toxicity in proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 29410 (2001).
- 18) Roy, M. K., Takenaka, M., Kobori, M., Nakahara, K., Isobe, S. and Tsushida, T. : Apoptosis, necrosis and cell proliferation-inhibition by cyclosporine A in U937 cells (a human monocytic cell line). *Pharmacol. Res.* **53**, 293 (2006).
- 19) Lee, Y. S., Kim, D. W., Kim, S., Choi, H. I., Lee, Y., Kim, C. D., Lee, J. H., Lee, S. D. and Lee, Y. H. : Downregulation of NFAT2 promotes melanogenesis in B16 melanoma cells. *Anat. Cell. Biol.* **43**, 303 (2010).
- 20) Lee, Y. S. : Role of intracellular Ca²⁺ in the lovastatin-induced stimulation of melanin synthesis in B16 melanoma cells. *Yakhak Hoeji* **57**, 24 (2013).
- 21) Kim, J. A., Kang, Y. S. and Lee, Y. S. : Role of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in the mechanism of apoptosis induced by cyclosporin A in a human hepatoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 291 (2003).
- 22) Carsberg, C. J., Jones, K. T., Sharpe, G. R. and Friedmann, P. S. : Intracellular calcium modulates the responses of human melanocytes to melanogenic stimuli. *J. Dermatol. Sci.* **9**, 157 (1995).
- 23) 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).
- 24) Frings, S., Reuter, D. and Kleene, S. J. : Neuronal Ca²⁺-activated Cl⁻ channels-homing in on an elusive channel species. *Prog. Neurobiol.* **60**, 247 (2000).
- 25) Hartzell, H. C., Yu, K., Xiao, Q., Chien, L. T. and Qu, Z. : Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J. Physiol.* **587**, 2127 (2009).
- 26) Elble, R. C., Ji, G., Nehrke, K., DeBiasio, J., Kingsley, P. D., Kotlikoff, M. I. and Pauli, B. U. : Molecular and functional

- characterization of a murine calcium-activated chloride channel expressed in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **277**, 18586 (2002).
- 27) Gomez-Pinilla, P. J., Gibbons, S. J., Bardsley, M. R., Lorincz, A., Pozo, M. J., Pasricha, P. J., Van de Rijn, M., West, R. B., Sarr, M. G., Kendrick, M. L., Cima, R. R., Dozois, E. J., Larson, D. W., Ordog, T. and Farrugia, G. : Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G1370 (2009).
- 28) Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O. and Galiotta, L. J. : TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* **322**, 590 (2008).
- 29) Rasche, S., Toetter, B., Adler, J., Tschapek, A., Doerner, J. F., Kurtenbach, S., Hatt, H., Meyer, H., Warscheid, B. and Neuhaus, E. M. : Tmem16b is specifically expressed in the cilia of olfactory sensory neurons. *Chem. Senses* **35**, 239 (2010).
- 30) Peñafiel, R., Galindo, J. D., Solano, F., Pedreño, E., Iborra, J. L. and Lozano, J. A. : Kinetic study of the interaction between frog epidermis tyrosinase and chloride. *Biochim. Biophys. Acta* **788**, 327 (1984).
- 31) Park, Y. D., Kim, S. Y., Lyou, Y. J., Lee, J. Y. and Yang, J. M. : A new type of uncompetitive inhibition of tyrosinase induced by Cl⁻ binding. *Biochimie* **87**, 931 (2005).
- 32) Matthew, E., Laskin, J. D., Zimmerman, E. A., Weinstein, I. B., Hsu, K. C. and Engelhardt, D. L. : Benzodiazepines have high-affinity binding sites and induce melanogenesis in B16/C3 melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 3935 (1981).
- 33) Kim, N. H., Cheong, K. A., Lee, T. R. and Lee, A. Y. : PDZK1 upregulation in estrogen-related hyperpigmentation in melasma. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2622 (2012).