

B16 흑색종세포에서 로바스타틴에 의한 멜라닌 합성 촉진효과에 미치는 산화질소의 역할

이 용 수[#]

덕성여자대학교 약학대학

(Received September 6, 2013; Revised October 23, 2013; Accepted October 23, 2013)

Role of Nitric Oxide in the Lovastatin-Induced Stimulation of Melanin Synthesis in B16 Melanoma Cells

Yong Soo Lee[#]

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

Abstract — Previously, we have reported that lovastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, increased melanin synthesis through intracellular Ca^{2+} release in B16 cells. In this study we investigated the possible involvement of nitric oxide (NO) in the mechanism of lovastatin-induced melanogenesis. Lovastatin elevated NO formation in a dose-dependent manner. Treatment with mevalonate, farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), precursors of cholesterol, did not significantly alter the lovastatin-induced NO production, suggesting that inhibition of cholesterol metabolism may not be involved in the mechanism of this action of lovastatin. Both NO formation and melanogenesis induced by lovastatin was significantly suppressed by treatment with N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and 2-(4-carboxy-2-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (cPTIO), an inhibitor of NO synthase and a NO scavenger, respectively. The lovastatin-induced NO production was significantly affected not by EGTA, an extracellular Ca^{2+} chelator, but by an intracellular Ca^{2+} chelator (BAPTA/AM) and intracellular Ca^{2+} release blockers (dantrolene and TMB-8). Taken together, these results suggest that lovastatin may induce melanogenesis through NO formation mediated by intracellular Ca^{2+} release in B16 cells. These results further suggest that lovastatin may be a good candidate for the therapeutic application of various hypopigmentation disorders.

Keywords □ lovastatin, melanogenesis, nitric oxide, Ca^{2+} signal, hypopigmentation, B16 melanoma cell

태양광선으로부터 나오는 자외선 B를 피부에 조사하면 멜라닌이 합성되어 피부 표면에 침착된다. 자외선에 의한 멜라닌 합성 촉진작용에 관여하는 인자는 피부의 멜라닌 생성세포 주위에 존재하는 각질세포 등에서 유리되며 이러한 인자로는 산화질소,¹⁾ 부신피질자극호르몬,²⁾ 멜라닌세포자극호르몬,³⁾ endothelin-1,⁴⁾ 프로스타글란딘,⁵⁾ 히스타민⁶⁾과 티미딘 이염기(thymidine dinucleotide)⁷⁾ 등이 있다. 멜라닌 합성은 멜라닌생성세포의 멜라노솜에 존재하는 여러 가지 효소의 연쇄적인 반응에 의해 일어난다.⁸⁾ 이 중 티로시나제(tyrosinase)는 멜라닌의 합성 속도를 결정하는 중요한 효소로서 microphthalmia-associated transcription

factor(MITF)에 의해 조절을 받는다고 알려져 있다.⁹⁾

산화질소가 자외선에 의한 과색소침착에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다.^{1,10)} 산화질소는 L-arginine으로부터 세 가지 형태의 산화질소합성효소(NO synthase; NOS), 즉 신경성 산화질소합성효소(nNOS, NOS1), 유도성 산화질소합성효소(iNOS, NOS2) 및 내피성 산화질소합성효소(eNOS, NOS3)의 촉매작용에 의해 생성된다.¹¹⁾ 멜라닌형성세포에서 산화질소의 하위신호가 아직 확실히 밝혀지지는 않았지만 산화질소는 guanylyl cyclase 및 cGMP-dependent protein kinase(PKG)의 활성화를 통한 티로시나제의 활성화에 핵심적 역할을 할 것이라고 추측된다.¹⁾ 산화질소 공여체(NO donor)를 처리하면 2시간 내에 티로시나제 mRNA를 유도하고,¹⁰⁾ 산화질소는 산소 존재 하에서 멜라닌 대사체인 5,6-dihydroxyindole 및 그 2-carboxylic acid(DHICA)와 반응하여 멜라닌-유사 색소의 침착을 유발하기도 한다.¹²⁾ 또한 다른 세포에서 산화질소는 inositol triphosphate(IP₃)의 합성과 이를 통한 세포내 칼슘유리 과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다.¹³⁾

[#]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

스타틴 약물은 3-hydroxy-3-glutaryl-coenzyme A(HMG-CoA) 환원효소의 억제제를 통하여 콜레스테롤의 합성을 저해하는 작용을 가지고 있어 고콜레스테롤혈증 등 심혈관계 질환의 치료에 주로 활용되고 있으나 최근 암과 자가면역질환 등 다른 질환의 치료에도 응용할 수 있다는 결과가 많이 보고되고 있다.¹⁴⁾ 멜라닌 합성세포에서도 HMG-CoA 환원효소를 촉매로 하여 콜레스테롤이 합성될 수 있고 이렇게 합성된 콜레스테롤은 cAMP 경로를 통하여 멜라닌 합성을 촉진한다는 연구결과가 발표되었다.¹⁵⁾ 이와는 반대로 스타틴 계열 약물인 플루바스타틴은 멜라닌 합성을 촉진한다는 결과도 발표되었다.¹⁶⁾ 본 연구실에서도 로바스타틴이 콜레스테롤의 대사와는 상관없이 세포내 칼슘 유리를 통하여 멜라닌 합성을 촉진시킨다는 사실을 밝힌 바 있다.¹⁷⁾ 하지만 아직까지 멜라닌 합성에 관여하는 스타틴 약물의 작용 및 그 기전에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 로바스타틴에 의한 멜라닌 합성 촉진 작용에 관여하는 산화질소의 역할을 규명하고자 하였다.

실험방법

시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), mevalonolactone (mevalonate), geranylgeranyl pyrophosphate ammonium salt (GGPP), farnesyl pyrophosphate ammonium salt(FPP), N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME), dantrolene, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid-8-(diethylamino)-octyl ester(TMB-8), ethylene glycol-bis-(aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) 및 각종 용매와 염류는 Sigma-Aldrich(미국)로부터, 2-(4-carboxy-2-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide(CPTIO)는 Tocris Bioscience(영국)에서 구입하였으며 lovastatin은 WAKO(일본)에서 구입하여 비활성 lactone형을 에탄올에 녹인 후 0.4 M NaOH 에탄올용액에 50°C에서 2시간 동안 방치한 후 1 M HCl로 pH 7.2로 하여 dihydroxy open acid의 활성형으로 전환하여 농축액(10 mM)을 -20°C에서 보관하였다. Fetal bovine serum(FBS)와 penicillin-streptomycin 혼합액은 GIBCO(미국)에서, 4,5-diaminofluorescein diacetate(DAF-2 DA)는 Alexis Biochemicals(미국)에서, bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid/acetoxymethyl ester(BAPTA/AM)은 Molecular Probes(미국)에서 구입하였다.

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.

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)로 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, 미국)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품을 이용한 표준 검량선을 이용하여 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌 생성량은 단위세포(10⁴개)에서의 멜라닌 생성량으로 비교하였다.

산화질소 측정

살아있는 세포에서 산화질소의 형성을 측정하는 방법으로 DAF 형광법을 사용하였다. DAF-2 DA는 형광 색소로서 세포를 투과할 수 있는 DAF-2의 유도체이며 세포 내에 존재하는 에스트라제에 의해 가수분해 되어 산화질소에 민감한 색소인 DAF-2를 유리한다.¹⁸⁾ 산화질소가 DAF-2와 반응하면 녹색 형광을 방출하는 triazolofluoresceins으로 변하므로 이 색소에 특이적인 여기-발광(각각 485 및 535 nm)을 이용하여 이 물질에 의한 형광세기를 측정할 수 있다. 이 실험을 위하여 세포를 검정색 96-well plate에 48시간 동안 배양시킨 후 L-arginine(10 µM)을 포함하는 DPBS 및 HEPES(500 µM)에서 25분간 방치하고 DAF-2 DA(10 µM)를 가해 30분간 더 방치한 후 완충용액으로 세척하였다. 새로운 완충용액을 가한 후 세포에 약물을 가하고 형광세기를 fluorescent plate reader(BMG technologies, 미국)로 관찰하여 10분 동안 그 변화를 측정하였다. 형광 세기의 증가는 세포에서 발생한 산화질소의 양과 비례한다.¹⁸⁾

자료분석 및 통계적 검정

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

로바스타틴의 산화질소 생성 촉진 효과

B16 세포를 이용하여 로바스타틴이 산화질소 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 산화질소는 DAF 형광법을 사용하여 측정하

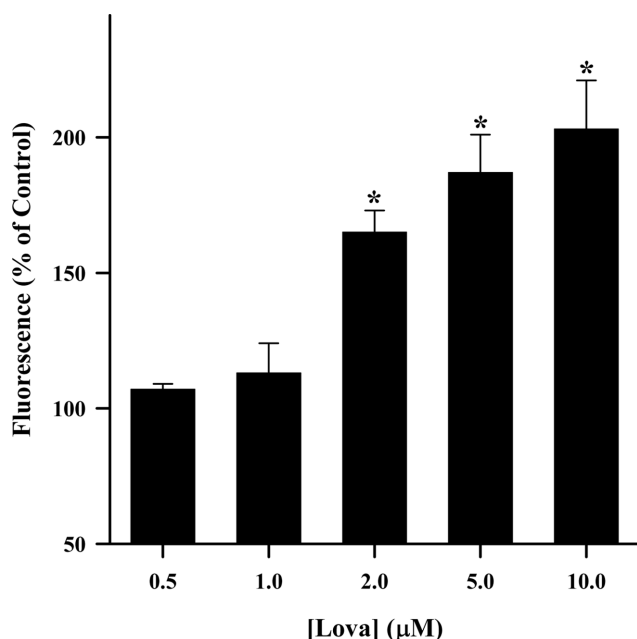


Fig. 1 – Effect of lovastatin (Lova) on the generation of NO in B16 melanoma cells. NO production was measured as an increase in DAF-2 fluorescence in the cells exposed to Lova at designated concentrations for 10 min. The data are expressed as percent changes of fluorescence compared to the control condition in which the cells were incubated with Lova-free medium. 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 Lova-free medium.

었다. 로바스타틴은 산화질소를 빠르게 증가시켰는데 투여 후 10분 정도에서 최대 증가 효과를 나타내었다(데이터는 보여주지 않음). 따라서 실험 결과는 로바스타틴을 10분간 처리했을 때의 형광세기를 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다. 로바스타틴은 산화질소의 생성을 농도 의존적으로 증가시켰으며 2 μM 농도 처리군에서 대조군에 비해 약 1.7배가 증가하여 통계적으로 유의한 효과를 나타내었다(Fig. 1). 이 농도는 로바스타틴이 실제 사람에게 투여하는 용량의 범위에 속한다.¹⁹⁾

흥미롭게도 최근 연구에서 스타틴 약물이 여러 종류의 세포, 즉 내피세포,²⁰⁾ 조골세포,²¹⁾ 간세포,²²⁾ 및 혈소판²³⁾ 등에서 산화질소생성효소의 발현을 증가시킴으로써 산화질소의 생성을 촉진한다는 사실이 밝혀졌다.

로바스타틴에 의한 산화질소 생성 촉진 효과에 미치는 콜레스테롤 대사의 역할

본 연구실의 연구에서 로바스타틴에 의한 멜라닌 합성 촉진 작용은 콜레스테롤의 대사과정과는 상관관계가 없음이 밝혀졌다.¹⁷⁾ 본 연구에서 밝혀진 로바스타틴의 산화질소 합성 촉진 작용에 미치는 콜레스테롤 대사의 역할을 알아보기 위하여 HMG-CoA 환

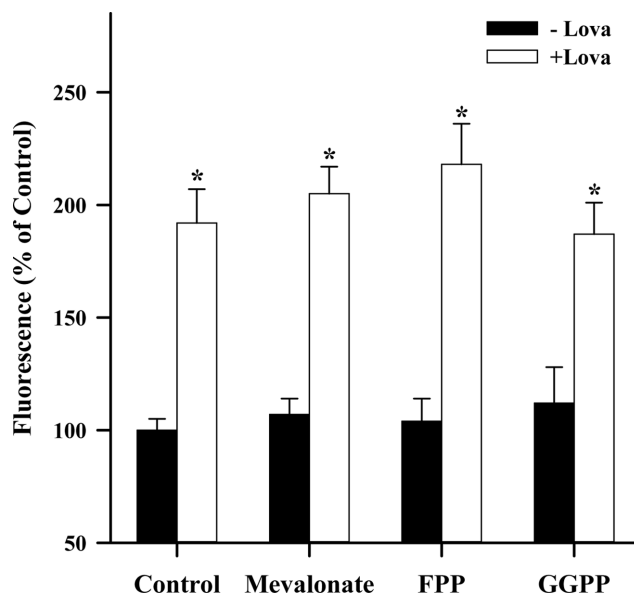


Fig. 2 – Role of cholesterol metabolism in the lovastatin (Lova)-induced generation of NO in B16 melanoma cells. NO production was measured as an increase in DAF-2 fluorescence in the cells exposed to Lova (5 μM) for 10 min. In these experiments mevalonate (100 μM), FPP (10 μM), and GGPP (10 μM) were used as a cholesterol metabolite. These drugs were added 30 min before Lova application. The data are expressed as percent changes of fluorescence compared to the control condition in which the cells were incubated with Lova-free medium. 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 Lova-free medium.

원 효소의 대사물질인 mevalonate, FPP 및 GGPP를 첨가하여 로바스타틴의 효과가 상쇄되는지를 확인하였다. 실험 결과에서 mevalonate(100 μM), FPP(10 μM), 또는 GGPP(10 μM)의 첨가는 로바스타틴(5 μM)의 산화질소 생성 촉진 효과에 유의한 영향을 끼치지 못했으며, 이 물질 자체도 산화질소의 생성에 유의한 변화를 초래하지 않았다(Fig. 2). 이 결과는 로바스타틴의 산화질소 생성 촉진 효과가 HMG-CoA 환원효소의 억제를 통한 콜레스테롤의 합성 방해 작용과는 서로 상관관계가 없음을 시사한다.

최근 내피세포를 이용한 실험에서 로바스타틴에 의한 산화질소 생성 촉진 효과가 HMG-CoA 환원효소의 억제와는 무관하다고 보고된 바 있다.²⁴⁾ 이 결과는 본 연구의 결과와 일치한다. 하지만 간세포에서는 스타틴 약물에 의한 산화질소생성효소의 발현 증가가 mevalonate에 의해 완전히 차단되어 콜레스테롤 대사와 연관이 있음을 보여 주고 있다.²²⁾ 이처럼 서로 상반된 결과의 이유에 대해서는 현재 정확히 알 수 없으나 각 연구에서 사용한 세포의 종류가 다르기 때문일 가능성이 있으며 이에 대해선 향후 좀 더 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

로바스타틴에 의한 멜라닌 생성 촉진 효과에 미치는 산화질소의 역할

멜라닌 합성은 세포내 복잡한 신호 전달 경로를 통하여 일어나는데 멜라닌 합성관련 실험에서 흔히 사용되는 양성 대조군 화합물인 멜라닌세포자극호르몬은 유도성 산화질소생성효소의 활성화를 통하여 산화질소의 생성을 촉진한다는 보고가 있었다.²⁵⁾ 또한 Datar 등은 내피세포를 이용한 실험에서 로바스타틴이 산화질소의 생성을 유발하며 이러한 효과는 산화질소생성효소를

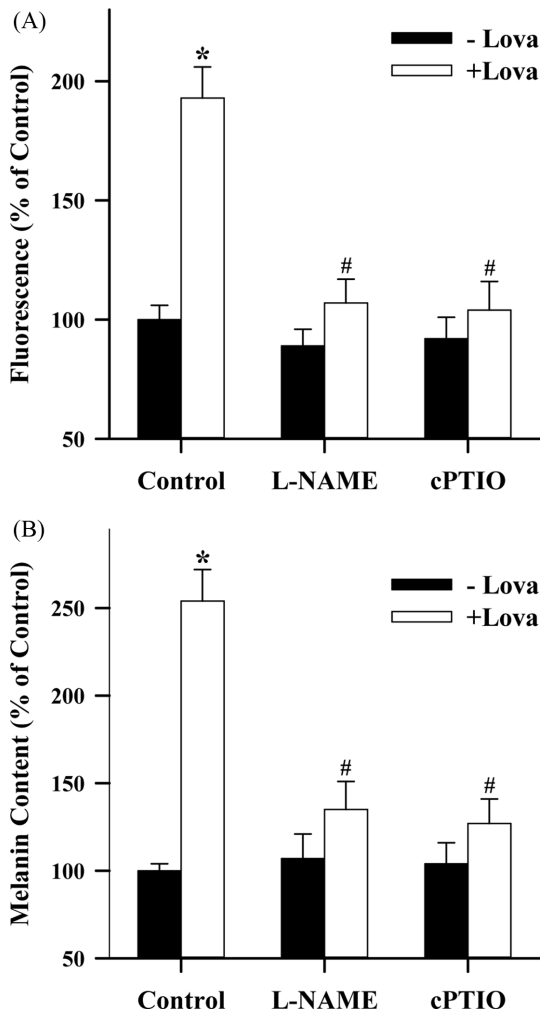


Fig. 3 – Role of NO pathway in the lovastatin (Lova)-induced production of melanin in B16 melanoma cells. In the data (A) and (B) represent the effects of Lova (5 μM) on NO and melanin production, respectively. In these experiments L-NAME (100 μM) and cPTIO (100 μM) were used as a NOS inhibitor and a NO scavenger, respectively. These drugs were added 30 min before Lova application. The data are expressed as percent changes compared to the control condition in which the cells were incubated with Lova-free medium. 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 Lova-free medium. #P<0.05 compared to Lova alone.

강력히 억제하는 약물인 L-NAME에 의해 완전히 차단되는 것을 확인하였다.²⁴⁾

따라서 다음은 로바스타틴에 의한 멜라닌 합성 촉진 작용의 기전에 관여하는 산화질소의 역할을 조사하였다. 산화질소생성 효소 억제제인 L-NAME(100 μM)와 생성된 산화질소를 제거하는 약물인 cPTIO(100 μM)를 전처리한 군에서 로바스타틴(5 μM)에 의한 산화질소 생성(Fig. 3A)과 멜라닌 합성(Fig. 3B)이 통계적으로 유의성 있게 감소되었다. 이 결과는 로바스타틴에 의한 멜라닌 합성 촉진 작용의 기전에 산화질소가 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

멜라닌합성세포는 산화질소의 생성을 촉매하는 산화질소생성 효소를 발현하고 있다고 알려지고 있다.²⁶⁾ 최근 연구에서 특정 화합물의 멜라닌 생성 억제작용 기전에 산화질소가 관여한다는 사실이 밝혀졌고²⁷⁾ 비타민 C가 자외선에 의한 멜라닌 합성을 억제하는 작용 기전에 산화질소가 연루되어 있다는 사실도 밝혀졌다.²⁸⁾

로바스타틴에 의한 산화질소 생성 촉진 효과에 미치는 Ca²⁺ 신호의 역할

본 연구실의 지난 연구 결과에서 로바스타틴에 의한 멜라닌 합성 촉진에 세포내 칼슘유리가 중요한 매개 신호로 작용하고 있

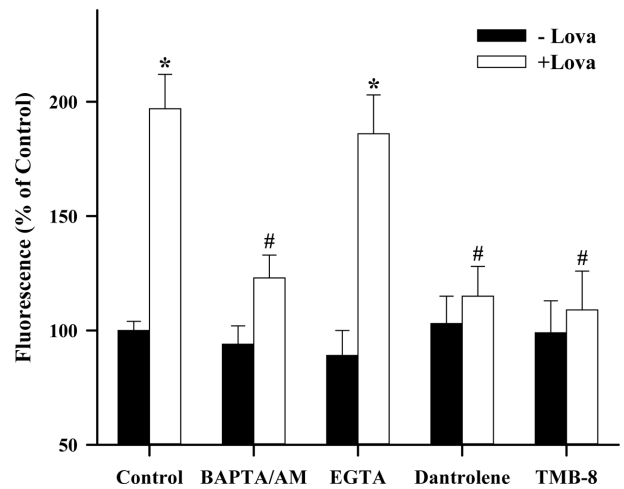


Fig. 4 – Role of intracellular Ca²⁺ signal in the lovastatin (Lova)-induced production of NO in B16 melanoma cells. NO production was measured as an increase in DAF-2 fluorescence in the cells exposed to Lova (5 μM) for 10 min. In these experiment intracellular Ca²⁺ release blockers (50 μM dantrolene and 20 μM TMB-8), an intracellular Ca²⁺ chelator (1 μM BAPTA/AM) and an extracellular Ca²⁺ chelator (100 μM EGTA) were added 30 min before Lova (5 μM) application. The data are expressed as percent changes of fluorescence compared to the control condition in which the cells were incubated with Lova-free medium. Each column represents the mean values of four replications with bars indicating SEM. *p<0.05 compared to control. #P<0.05 compared to Lova alone.

음이 밝혀졌으므로¹⁷⁾ 본 연구에서는 산화질소와 칼슘신호와의 상관관계를 알아보고자 하였다.

증가된 세포내 칼슘을 제거할 수 있는 BAPTA/AM(1 μ M)을 전처리한 결과 로바스타틴(5 μ M)에 의한 산화질소의 생성이 유의성 있게 차단되었다(Fig. 4). 이 결과는 로바스타틴에 의한 산화질소 생성이 칼슘 신호에 의해 매개됨을 시사한다. 다음은 세포내 칼슘 증가의 특정 경로와 산화질소의 생성과의 연관성을 알아보기 위해 세포외로부터 칼슘 유입을 차단하는 세포외 칼슘 킬레이트인 EGTA(1 mM)과 소포체막에 존재하는 ryanodine 수용체 및 IP₃ 수용체를 각각 억제함으로써 소포체로부터 세포내 칼슘 유리를 방해하는 약물인 dantrolene(50 μ M) 및 TMB-8(20 μ M)을 전처리하여 로바스타틴(5 μ M)에 의한 산화질소 생성의 변화를 관찰하였다. 결과에서 EGTA는 유의성 있는 변화를 보이지 않았으나, dantrolene 및 TMB-8은 유의성 있게 로바스타틴의 작용을 차단하였다(Fig. 4). 이 결과는 칼슘 유리가 로바스타틴에 의한 산화질소 생성 촉진 작용을 매개하는 중요한 신호라는 사실을 입증한다.

산화질소생성효소 중 내피세포형(eNOS)은 그 활성화에 칼슘을 필요로 하기 때문에²⁹⁾ 본 연구의 결과에서 나타난 로바스타틴에 의한 세포내 칼슘증가가 산화질소의 생성에 매개 신호로 작용할 것이라는 사실은 예측이 가능하다. 하지만 내피세포를 이용한 실험의 결과를 보면 외부로부터 칼슘 유입도 로바스타틴에 의한 산화질소의 생성에 영향을 끼치는 것으로 나타났다.²⁴⁾ 이 결과는 본 연구의 결과와 일치하지 않는데 그 이유는 현재 알 수 없으나 좀 더 확실한 결론을 도출하기 위해서는 이를 입증하는 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

그럼에도 불구하고 지난 연구와 더불어 본 연구에서 밝힌 로바스타틴의 멜라닌 합성 촉진작용에 관여하는 산화질소의 역할에 대한 결과는 멜라닌 합성 이상에 의한 저색소질환의 치료에 활용될 충분한 가치가 있다고 판단된다.

결 론

본 연구실에서는 HMG-CoA 환원 효소 억제제인 로바스타틴이 세포내 칼슘 유리를 통하여 멜라닌 합성을 촉진한다는 사실을 밝힌 바 있다. 본 연구에서는 이러한 로바스타틴의 작용에 미치는 산화질소의 역할을 규명하고자 하였다. 로바스타틴은 B16 세포에서 농도의존적으로 산화질소의 생성을 증가시켰다. 로바스타틴에 의한 산화질소 생성 촉진작용은 mevalonate, FPP 및 GGPP와 같은 콜레스테롤의 전구체의 전처리에 의해 유의성 있는 변화를 보이지 않았으므로 이러한 로바스타틴의 작용은 콜레스테롤 대사 과정과는 무관한 것으로 생각된다. 하지만 로바스타틴에 의한 멜라닌 합성 증가와 산화질소의 생성은 산화질소 생성 효소 억제 약물인 L-NAME 및 생성된 산화질소를 제거하는

능력을 지닌 cPTIO의 전처리에 의해 현저히 감소하였다. 이 결과는 로바스타틴의 멜라닌 합성 촉진 효과에 산화질소가 중요한 매개 신호로 작용하고 있음을 시사한다. 또한 로바스타틴에 의한 산화질소의 생성은 세포내 칼슘 킬레이트인 BAPTA/AM와 세포내 칼슘 유리 억제 약물인 dantrolene 및 TMB-8에 의해 유의성 있게 차단되었다. 이 결과로 미루어 보아 로바스타틴의 멜라닌 합성 촉진 효과는 세포내 칼슘 유리를 통한 산화질소의 생성에 의해 매개된다고 추측된다. 이 결과는 또한 로바스타틴이 저색소 질환의 치료에 활용될 수 있는 후보 물질로 가치가 있음을 시사한다.

감사의 말씀

본 연구는 덕성여자대학교 2013년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabni, W., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. : Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 28052 (1996).
- Schauer, E., Trautinger, F., Kock, A., Schwarz, A., Bhardwaj, R., Simon, M., Ansel, J. C., Schwarz, T. and Luger, T. A. : Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* **93**, 2258 (1994).
- Thody, A. J. and Graham, A. : Does α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans. *Pigment Cell Res.* **11**, 265 (1998).
- Imokawa, G., Miyagishi, M. and Yada, Y. : Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 32 (1995).
- Nordlund, J. J., Collins, C. E. and Rheins, L. A. : Prostaglandin E₂ and D₂ but not MSH stimulate the proliferation of pigment cells in the pinnal epidermis of the DBA/2 mouse. *J. Invest. Dermatol.* **86**, 433 (1986).
- Yoshida, M., Takahashi, Y. and Inoue, S. : Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H₂ receptors in human normal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 334 (2000).
- Eller, M. S., Yaar, M. and Gilchrist, B. A. : DNA damage and melanogenesis. *Nature* **372**, 413 (1994).
- Schallreuter, K. U., Kothari, S., Chavan, B. and Spencer, J. D. : Regulation of melanogenesis-controversies and new concepts.

- Exp. Dermatol.* **17**, 395 (2008).
- 9) Abdel-Malek, Z., Swope, V. B., Suzuki, I., Akcali, C., Harriger, M. D., Boyce, S. T., Urabe, K. and Hearing, V. J. : Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1789 (1995).
 - 10) Sasaki, M., Horikoshi, T., Uchiwa, H. and Miyachi, Y. : Upregulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **13**, 248 (2000).
 - 11) Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. : Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593 (2001).
 - 12) Novellino, L., d'Ischia, M. and Protta, G. : Nitric oxide-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid under aerobic conditions: non-enzymatic route to melanin pigments of potential relevance to skin (photo)protection. *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 27 (1998).
 - 13) Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M. and Wilm, M. : Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP₃ receptor and cGMP kinase I β . *Nature* **404**, 197 (2000).
 - 14) Lopez-Pedraza, C., Ruiz-Limon, P., Valverde-Esteva, A., Barbarroja, N. and Rodriguez-Ariza, A. : To cardiovascular disease and beyond: new therapeutic perspectives of statins in autoimmune diseases and cancer. *Curr. Drug Targets* **13**, 829 (2012).
 - 15) Schallreuter, K. U., Hasse, S., Rokos, H., Chavan, B., Shalhaf, M., Spencer, J. D. and Wood, J. M. : Cholesterol regulates melanogenesis in human epidermal melanocytes and melanoma cells. *Exp. Dermatol.* **18**, 680 (2009).
 - 16) Galus, R., Niderla, J., Sladowski, D., Sajjad, E., Wlodarski, K. and Jozwiak, J. : Fluvastatin increases tyrosinase synthesis induced by α -melanocyte-stimulating hormone in B16F10 melanoma cells. *Pharmacol. Rep.* **62**, 164 (2010).
 - 17) Lee, Y. S. : Role of intracellular Ca²⁺ in the lovastatin-induced stimulation of melanin synthesis in B16 melanoma cells. *Yakhak Hoeji* **57**, 24 (2013).
 - 18) Lampiao, F., Strijdom, H. and Plessis, S. S. : Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *Int. J. Androl.* **29**, 564 (2006).
 - 19) Pentikainen, P. J., Saraheimo, M., Schwartz, J. I., Amin, R. D., Schwartz, M. S., Brunner-Ferber, F. and Rogers, J. D. : Comparative pharmacokinetics of lovastatin, simvastatin and pravastatin in humans. *J. Clin. Pharmacol.* **32**, 136 (1992).
 - 20) Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J. and Liao, J. K. : Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* **97**, 1129 (1998).
 - 21) Yin, H., Shi, Z. G., Yu, Y. S., Hu, J., Wang, R., Luan, Z. P. and Guo, D. H. : Protection against osteoporosis by statins is linked to a reduction of oxidative stress and restoration of nitric oxide formation in aged and ovariectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.* **674**, 200 (2012).
 - 22) Habara, K., Hamada, Y., Yamada, M., Tokuhara, K., Tanaka, H., Kaibori, M., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Ito, S. and Okumura, T. : Pitavastatin upregulates the induction of iNOS through enhanced stabilization of its mRNA in proinflammatory cytokine-stimulated hepatocytes. *Nitric Oxide* **18**, 19 (2008).
 - 23) Chou, T. C., Lin, Y. F., Wu, W. C. and Chu, K. M. : Enhanced nitric oxide and cyclic GMP formation plays a role in the anti-platelet activity of simvastatin. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 1281 (2008).
 - 24) Datar, R., Kaesemeyer, W. H., Chandra, S., Fulton, D. J. and Caldwell, R. W. : Acute activation of eNOS by statins involves scavenger receptor-B₁, G protein subunit G_i, phospholipase C and calcium influx. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 1765 (2010).
 - 25) Tsatmali, M., Graham, A., Szatkowski, D., Ancans, J., Manning, P., McNeil, C. J., Graham, A. M. and Thody, A. J. : α -melanocyte-stimulating hormone modulates nitric oxide production in melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 520 (2000).
 - 26) Sowden, H. M., Naseem, K. M. and Tobin, D. J. : Differential expression of nitric oxide synthases in human scalp epidermal and hair follicle pigmentary units: implications for regulation of melanogenesis. *Br. J. Dermatol.* **153**, 301 (2005).
 - 27) Choi, Y. J., Uehara, Y., Park, J. Y., Chung, K. W., Ha, Y. M., Kim, J. M., Song, Y. M., Chun, P., Park, J. W., Moon, H. R. and Chung, H. Y. : Suppression of melanogenesis by a newly synthesized compound, MHY966 via the nitric oxide/protein kinase G signaling pathway in murine skin. *J. Dermatol. Sci.* **68**, 164 (2012).
 - 28) Panich, U., Tangsupa-a-nan, V., Onkoksoong, T., Kongtaphan, K., Kasetsinsombat, K., Akarasereenont, P. and Wongkajornsilp, A. : Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 811 (2011).
 - 29) Venema, R. C., Sayegh, H. S., Kent, J. D. and Harrison, D. G. : Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J. Biol. Chem.* **271**, 6435 (1996).