

## NF- $\kappa$ B 조절을 통한 오매추출물의 항염효과 및 작용기작에 관한 연구

서원상<sup>1,2</sup>, 오한나<sup>2</sup>, 박우정<sup>2</sup>, 엄상용<sup>2</sup>, 이대우<sup>3</sup>, 강상모<sup>1\*</sup>

### Study on the Anti-inflammatory Effect and Mechanism of *Prunus mume* Extract Regarding NF- $\kappa$ B

Won-Sang Seo<sup>1,2</sup>, Han-Na Oh<sup>2</sup>, Woo-Jung Park<sup>2</sup>, Sang-Young Um<sup>2</sup>, Dae-Woo Lee<sup>3</sup>, and Sang-Mo Kang<sup>1\*</sup>

접수: 2013년 12월 16일 / 게재승인: 2014년 1월 22일  
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** NF- $\kappa$ B is a transcriptional factor which is involved in many biological processes including immunity, inflammation, and cell survival. Many investigators studied on the mechanism involved in activation of NF- $\kappa$ B signalling pathway via ubiquitination and degradation of I $\kappa$ B regarding skin disease. Some specific molecules including Akt, MEK, p38 MAP Kinase, Stat3, et al. represent convergence points and key regulatory proteins in signaling pathways controlling cellular events such as growth and differentiation, energy homeostasis, and the response to stress and inflammation. Ultraviolet (UV) irradiation has many adverse effects on skin, including inflammation, alteration in the extracellular matrix, cellular senescence, apoptosis and skin cancer. *Prunus mume*, a naturally derived plant extract, has beneficial biological activities as blood fluidity improvement, anti-fatigue action, antioxidative and free radical scavenging activities, inhibiting the motility of *Helicobacter pylori*. Previous reports on various beneficial function prompted us to investigate UVB-induced or other immunostimulated biological marker regarding *P. mume*

extract. *P. mume* extract suppresses UVB-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in mouse skin epidermal JB6 P+ cells. The activation of activator protein-1 and nuclear factor- $\kappa$ B induced by UVB was dose-dependently inhibited by *P. mume* extract treatment. This results suggest that *P. mume* extracts might be used as a potential agents for protection of inflammation or UVB induced skin damage.

**Keywords:** *Prunus mume*, Nuclear factor- $\kappa$ B, Cyclooxygenase-2, Activator protein-1

#### 1. 서론

피부는 사람의 장기 중 가장 외곽에 존재하며 외부환경, 세균, 바이러스 등으로부터 인체를 보호해주는 중요한 역할을 하고 있다. 이런 중요한 역할에도 불구하고 현대사회에는 난치성 피부 질환이 점점 증가하고 있으며, 공해로 인하여 Atopic dermatitis, Psoriasis 와 같은 난치성 피부질환으로부터 자외선에 의한 염증악화까지 그 증상은 매우 다양하다. 이중 중요 요인 중 하나가 염증에 의한 피부질환이다 [1,2]. 이들의 공통점은 염증악화에 의한 병변이 증가된다는 점인데, 공통적으로 발견되는 염증 원인이 NF- $\kappa$ B 과활성화로 인한 피부 증상 악화이다.

NF- $\kappa$ B는 B 림프구에서  $\kappa$  chain enhancer protein이란 이름으로 발견되었으며, Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)라는 검사 방법을 통해 유전 인자의 enhancer element에 결합하여 전사 (transcription)를 조절하는 새로운 종류의 생체분자로 확인되었다 [3]. 이 물질은 Lipopolysaccharide

<sup>1</sup>건국대학교 생물공학과  
<sup>1</sup>Department of Microbial Engineering, Konkuk university, Seoul 143-701, Korea  
Tel: +82-2-450-3524, Fax: +82-2-3437-8360  
e-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

<sup>2</sup>참존화장품 기술원  
<sup>2</sup>Charmzone R&D Center, Charmzone Cosmetic, Ltd., Korea

<sup>3</sup>(주)더마랩 기술연구소  
<sup>3</sup>R&D Center, DERMALAB Co. Ltd., Korea

(LPS), Tumor necrosis factor (TNF), Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 자외선 등 각종 자극에 의해 활성화되며, 생체 세포 내 어디에서나 존재한다. NF- $\kappa$ B의 구성 성분은 p65 (RelA), C-rel, RelB, NF-B1 (p50/105), NF-B2 (p52/100)이 존재하며, 공통적으로 Rel homology domain (RHD)란 영역을 가지는데 이 영역은 DNA 결합, 이합체화 (dimerization), I $\kappa$ B (inhibitor of NF- $\kappa$ B)와의 상호작용과 같은 기능을 수행한다. NF- $\kappa$ B의 활성화 경로는 오랫동안 의문으로 남아 있었으나, IKK (I $\kappa$ B kinase)가 발견됨으로써 기작이 알려지기 시작하였다 [4].

현재 NF- $\kappa$ B의 상위 kinase인 IKK complex는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  3개의 성분으로 구성되어 있다고 알려졌으며,  $\alpha$ ,  $\beta$  2개의 촉매아단위 (catalytic subunit) 중에서 IKK $\beta$  아단위는 NF- $\kappa$ B의 정규 (canonical) 활성화 경로에서 필수적인 역할을 하고, IKK $\alpha$ 는 비정규 (noncanonical) 활성화 경로에 관여하며, 비촉매 아단위 (noncatalytic subunit)인 IKK $\gamma$  (NEMO)는 조절역할을 한다고 생각된다 [5]. 즉 NF- $\kappa$ B는 다양한 경로로 염증반응에 관여한다는 것을 유추할 수 있다. 이러한 NF- $\kappa$ B의 조절은 광범위한 피부병변의 예방에 매우 중요한 인자가 되는 것으로 생각된다.

이러한 NF- $\kappa$ B의 시그널을 잘 이해하기 위해서는 관련 신호가 잘 제어되는지 그리고 정확한 기작이 무엇인지를 알아야 한다. 이 기작을 이해하기 위해서는 관련 신호전달물질의 상관관계를 알아야 하는데 여기에는 Akt, MEK, p38 MAPK, Stat3 등이 있다.

Akt, MEK, p38 MAPK, Stat3와 같은 신호전달물질은 세포 성장, 에너지대사 뿐만 아니라 생체외부 스트레스와 염증신호에 있어 매우 중요하다. 이들은 외부 염증에 의한 스트레스에 의해 변화가 일어난다는 것을 의미한다. Akt는 세포성장, 생존, 그리고 세포주기 조절과 같은 다양한 세포 기작을 수행하는 역할을 하고 있다. 또한 insulin 신호전달 및 glucose metabolism의 중요 요인으로 작용한다 [6]. Akt는 PI3 kinase signaling에 의해 활성화되면서 외부신호를 생체내로 전달한다.

MEK1와 MEK2는 세포의 성장과 분화를 조절하는 일련의 protein kinase 군이다. MEK는 p44와 p42 MAP kinase를 활성화시킨다 [7]. p38 MAP kinase는 MAPK라고 불리우며 염증 관련 신호인자와 세포 내 스트레스 신호전달에 사용된다 [8-10].

Stat3 전사인자는 많은 성장인자 수용체와 사이토카인에 있어 매우 중요한 역할을 하고 있다 [11]. 즉 후보물질은 NF- $\kappa$ B 뿐만 아니라 관련된 각종 신호전달물질을 잘 제어해야 한다.

NF- $\kappa$ B의 과활성화되는 또하나의 요인은 자외선이다. 자외선은 피부에 조사되면 피부에서 비타민 D 합성 증가와 같은 유익한 현상뿐만 아니라 홍반, 일광화상, 광노화 및 피부암 그리고 만성피부질환 발생의 원인이 되는 것으로 알려져 있다 [2]. UV는 3가지 type으로 분류되는데, 3가지 타입은 생물학적으로 영향을 미치는 부분이 다르다. UVA는 320~400 nm, UVB는 280~320 nm이며, UVC는 200~280 nm이다 [2]. UVC

는 오존층에서 흡수되어 인간이 살고있는 대기권내로 진입이 불가능하지만 UVB와 UVA는 지구의 지표면에 도달하여 DNA 손상, 홍반, 면역억제, 햇빛 화상등을 일으켜서 점차적으로 피부암으로 이행하게 한다 [12].

사람은 대부분의 환경에서 UVA에 노출되는데 UVA는 광노화와 피부의 주름의 원인이 된다 [13,14]. UVB에 의해 유도되는 세포신호전달과정 및 그 신호전달물질을 조절한다면 피부 염증조절에 있어 매우 효과적인 전략으로 생각할 수 있다.

자외선은 COX-2나 AP-1의 양을 늘어나게 하는 주요 요인인데, Cyclooxygenase (COX)은 Arachidonic acid를 Prostaglandin으로 바꿔주는 효소이며, 2개의 형태가 존재하는데 COX-1과 COX-2으로 나뉜다. COX-1은 항상 발현되고 있으며, COX-2는 유도형이다 [15]. 사람과 설치류의 세포에서는 UVB의 급성 혹은 만성 조건에서 발현된다 [16].

오매의 원재료인 매실 (*Prunus mume* Siebold and Zucc.)은 Rosaceae에 속하며 중국, 한국, 일본과 같은 동아시아 지역에 널리 분포한다. 전통한국 의약품에는 기침과 설사와 같은 질환 치료에 사용되어 왔다. 혈행 촉진효과 [17] 항산화효능과 자유라디칼 제거효과 [18] *Helicobacter pylori*의 이동 억제효과 [19] 그리고 *Helicobacter pylori*로부터 장관 보호효과가 있다 [20,21]. 또한 면역조절효과도 가지고 있다 [22].

본 연구진에서는 스크리닝을 통하여 4종의 한약재를 선별하였고 그 중 오매의 NF- $\kappa$ B 억제능을 확인하였고 또한 NF- $\kappa$ B와 관련된 신호전달물질인 Akt, MEK, p38 MAPK, Stat3의 시간에 따른 증감을 확인하였다. 부가적으로 오매추출물의 UVB에 의한 COX-2, NF- $\kappa$ B, AP-1의 발현 억제 효과를 확인하였다.

## 2. 연구방법

### 2.1. 실험재료

Eagle's MEM, gentamicin, L-glutamine은 Life Technologies-Bethesda Research Laboratories 사 제품을 이용하였다. Fetal bovine serum (FBS)는 Gemini Bio-Products에서 구입하였고, COX-2에 대한 Antibody는 Cayman으로부터 구입하였다. p-p38 alpha (Thr180/Tyr182), p-Akt-1 (Ser473), p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), p-MEK1/2 (Ser217/221), p-stat3 (Tyr705), p-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536), p-I $\kappa$ B-alpha (Ser32)에 대한 Antibody는 Cell Signaling Biotechnology으로부터 구입하였다. Hygromycin B는 Roche사 제품을 사용하였고 Luciferase reporter system은 Promega 사 제품을 사용하였다.

### 2.2. *Prunus mume* 및 후보물질의 추출법

*Prunus mume* (오매) 및 *Atractylodes japonica* Koidz (창출), *Cimicifuga heracleifolia* (승마), *Sophora flavescens* (고삼)을 1차 Screening을 통하여 선별하였으며 (Data not shown), 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 자세하게 말하자면, 1 kg을 분

쇄한 후, 70% 에탄올 (w/w) 10 kg을 넣은 후 실온에서 3일간 추출하였으며, 매일 오전, 오후 각 30분씩 교반하였다. 이후 추출액을 여과한 후 Evaporator (회전증발농축기)를 사용하여 농축하였고, 이를 동결건조하여 분말화 하여 이를 실험물질로 사용하였다.

### 2.3. 후보물질의 NF-κB 억제능 측정

세포주는 마우스로부터 유래한 Signosis 사의 NF-κB Luciferase Reporter NIH 3T3 Stable Cell Line을 사용하였으며, Signosis 사의 manual을 참고하여 NF-κB를 유도하고 후보물질을 넣어서 NF-κB 억제능을 확인하였다. 자세하게 말하자면, Hygromycin (100 µg/mL)이 함유된 DMEM media에 세포를 키워서 Luciferase가 삽입되어 있는 vector의 소실을 방지하였다. 실험전  $5 \times 10^4$  cell/100 µL로 맞춘 후 96 well에 넣어 하루 overnight 한다. 이때 후보물질도 같이 처리한다. TNF-α 20 ng을 처리한 뒤 8시간 후 세포를 완전히 녹이고 세포 내의 Luciferase를 추출한 후 Luminometer (Luminoskan Ascent; Thermo Electron, USA)를 이용하여 활성을 측정하였다. 상용화되어 있는 Botanpi (Ichimaru Pharos, Japan)와 활성 비교를 위해서 오메, 창출, 승마, 고삼을 Botanpi Liquid 제조방법과 동일하게 하였다. 자세하게 설명하자면, 각 원료를 50% 에탄올 용매로 추출하여 용매를 날리고 잔존물을 얻는다. 1 g의 잔존물에 물 49 g을 넣고 50 g의 1,3 butylene glycol을 넣어 녹여내어 필터링을 한 후 나온 여액과 Botanpi (Bot)와 비교하였다. Inhibition rate는 다음과 같이 정의한다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = (C_s - C_n / C_p - C_n) \times 100$$

Cn : 사이토카인 (IL-4 or IFN-γ)의 음성대조군 생성량

Cp : 사이토카인 (IL-4 or IFN-γ)의 양성대조군 생성량

Cs : 사이토카인 (IL-4 or IFN-γ)의 처리군 생성량

### 2.4. NF-κB 관련 사이토카인 정량

세포주는 순수 NIH 3T3 cell line을 사용하였으며, 하루전 96-well에 seed 하였고 이때 오메 추출물과 대조군인 목단피 추출물을 50 µg/mL로 동량 사용하였다. 이후 20 ng/mL의 TNF-α를 처리하였고 5, 10, 20, 40, 80분 후 p-p38α (Thr180/Tyr182), p-Akt-1 (Ser473), p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), p-MEK1/2 (Ser217/221), p-stat3 (Tyr705), p-NF-κB p65 (Ser536), p-IκB-alpha (Ser32)의 변화를 확인하였다. 1 Fold는 0시간에서 대조군 사이토카인의 양을 의미한다.

### 2.5. UVB 처리후 AP-1, NF-κB, COX-2 변화 측정

UVB 처리실험 세포주는 마우스로부터 유래한 JB6 P+ mouse epidermal cell line을 사용하였으며, 2 mmol/L L-glutamine과 25 µg/mL gentamicin이 첨가된 5% FBS-MEM을 배지로 배양하였으며, 배양조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 사용하였다. 이후 activator protein-1 (AP-1), nuclear factor-κB (NF-κB), 그리고 COX-2 luciferase reporter plasmid로 transfection하였고 200

µg/mL G418이 함유된 5% FBS MEM으로 전배양을 실시하였다. AP-1, NF-κB, COX-2 luciferase plasmid으로 transfection된 JB6 P+ cells은 Confluent monolayer 상태에서 Trypsin 처리 후 세포수를  $8 \times 10^3$  Cell/mL로 조정하여 이 중 100 uL는 5% FBS/MEM (96-well plate)에 넣었다. 이후 37°C 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에 키웠다. 세포가 80~90%의 confluence를 가질 때, 0.1% FBS-MEM에 24 H 동안 키웠다. 세포는 UVB (0.05 J/cm<sup>2</sup>)에 처리되기 전에 다양한 농도의 오메추출물로 처리되었다. 이후 세포는 lysis buffer [0.1 mol/L potassium phosphate buffer (pH 7.8), 1% Triton X-100, 1 mmol/L DTT, and 2 mmol/L EDTA] 100 µL로 처리하고 Luciferase 활성도는 Luminometer (Luminoskan Ascent; Thermo Electron, USA)으로 측정하였다. 실험통계는 Student t-test를 사용하였다.

## 3. 연구결과 및 고찰

### 3.1. TNFα 처리후 오메에 의한 NF-κB 변화

NF-κB 조절물질 탐색: Fig. 1(a)은 Luciferase vector가 삽입된 NIH3T3 세포주에서의 NF-κB 활성도를 비교한 결과이다. 유도원에 의해 약 20배 증가율을 보였으며 4종의 후보물질 모두 NIH3T3 cell에서 NF-κB 억제능을 나타내고 있다. Fig. 1(b)은 일반 ELISA법으로 NF-κB를 정량한 경우이며, ELISA의 특성상 유도율은 약 2.5배 증가에 그친다. 위 두 개의 결과치에서 모두 오메는 상당한 NF-κB 억제능을 보이며, 모두 유의적 차이를 나타내었다.

### 3.2. TNFα 처리후 오메에 의한 IL-4, IFN-γ 변화

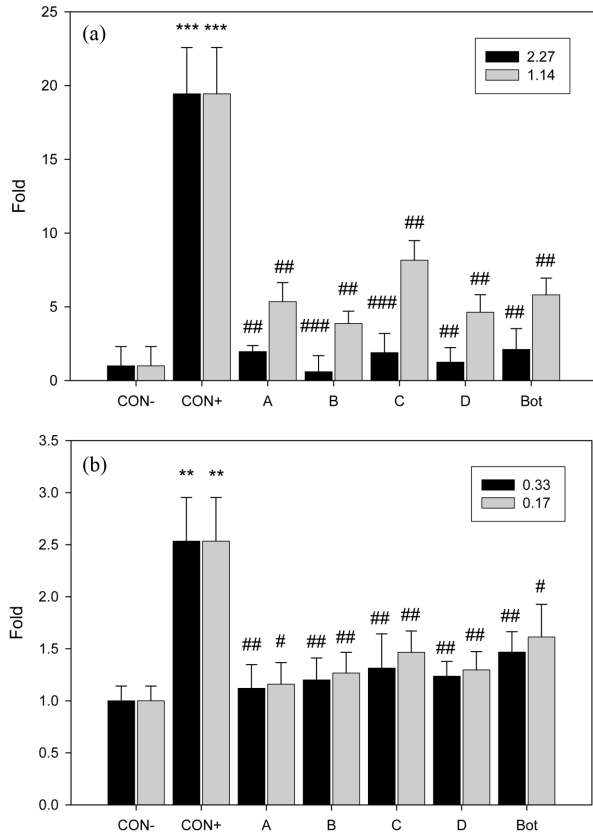
IL-4와 IFN-γ는 만성염증질환인 아토피, 건선에 있어 매우 중요한 인자이며, 대표적인 피부염증 질환인 아토피의 pathogenesis를 살펴보면 급성과 만성에 따라 증가하는 사이토카인이 다름을 알 수 있다. 초기에는 IL-4가 늘어나고, 만성화되면 IFN-γ가 늘어난다. 따라서 효과적인 아토피 치료제를 개발하기 위해서는 IL-4/IFN-γ를 동시에 억제하는 것이 바람직하다. 따라서 이들의 활성 또한 조절되는 약제가 잠재적으로 피부염증질환 개선에 필수적이다.

Fig. 2에서와 같이 4종의 후보물질이 상용화된 추출물인 목단피 (Bot, botanpi)보다 IL-4, IFN-γ의 억제능이 뛰어나다는 것을 보여준다. 특히 오메추출물의 경우 강력한 IL-4, IFN-γ 억제능을 보여주므로 좋은 후보물질이란 것으로 사료된다.

### 3.3. TNFα 처리후 오메에 의한 p38, p-Akt-1 SAPK/JNK, MEK-1 변화

지금까지 오메의 NF-κB 억제효능을 살펴보았으며, 정확한 NF-κB 억제 메커니즘을 확인하게 위해서는 유관된 사이토카인의 시간에 따른 증감을 보아야 한다. 즉 유도원이 세포에 처리된 후 시간의 변화에 따라 유관된 사이토카인 (p38, Akt, SAPK/JNK, MEK1/2)의 증감을 확인할 필요가 있다.

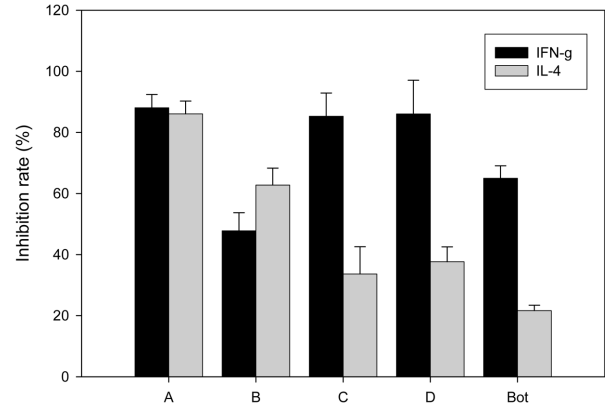
p38은 p38 MAP kinase (MAPK)이며, 세포내 사이토카인



**Fig. 1.** NF-κB inhibitory comparison data (using Luciferase (a), using ELISA (b)) among commercial anti-inflammatory cosmetic agents and putative reagents. CON-: Negative control CON+: Positive control A: *Prunus mume*, B: *Atractylodes japonica* Koidz (창출), C: *Cimicifuga heracleifolia*, D: *Sophora flavescens* (고삼), Bot: *Paeonia suffruticosa* Andrews extract product from Ichimaru Pharcos (Japan) 2.27 means treated with 2.27% putative solution (V/V) 1.14 means treated with 1.14% putative solution (V/V) \*\*\* $p < 0.001$  compared with CON- in the same time. \*\* $p < 0.01$  compared with CON- in the same time. # $p < 0.05$  compared with CON+ in the same time. ### $p < 0.01$  compared with CON+ in the same time. #### $p < 0.001$  compared with CON+ in the same time.

과 스트레스를 제어하는 기능을 가진다 [8]. 이성질체 형태가 4개 존재하며(p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (ERK6, SAPK3),  $\delta$  (SAPK4)), p38 MAP kinase는 다양한 세포 내 스트레스 (Osmotic shock, 염증 사이토카인, Lipopoly saccharides, UV, 성장인자)에 의해 활성화된다 [8]. Fig. 3(a)와 같이 유도원에 의해 5분후 p38의 양이 최대가 되고 시간이 지남에 따라 가라앉는 경향을 보인다. 목단피는 p38의 활성을 저해하지는 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 즉 목단피의 경우 p38이 아닌 다른 경로로 NF-κB를 억제한다는 것을 의미한다. 오매의 경우 일부 저해하였으므로 목단피와는 다른 경로로 p38을 억제함을 확인할 수 있다.

Akt는 p-Akt으로 변환되어 IKK-alpha, beta, gamma에 영향을 미쳐 최종적으로 NF-κB의 활성화에 영향을 미친다고 알려져있다 [6]. p-Akt-1의 경우 오매 추출물로 인하여 억제 가 됨을 Fig. 3(b)과 같이 확인할 수 있었다. 오매추출물은



**Fig. 2.** Screening procedure of immunomodulator from oriental herb A: *Prunus mume*, B: *Atractylodes japonica* Koidz (창출), C: *Cimicifuga heracleifolia*, D: *Sophora flavescens* (고삼), Bot: *Paeonia suffruticosa* Andrews extract product from Ichimaru Pharcos (Japan) IL-4 means interleukin 4, IFN-g means IFN- $\gamma$ .

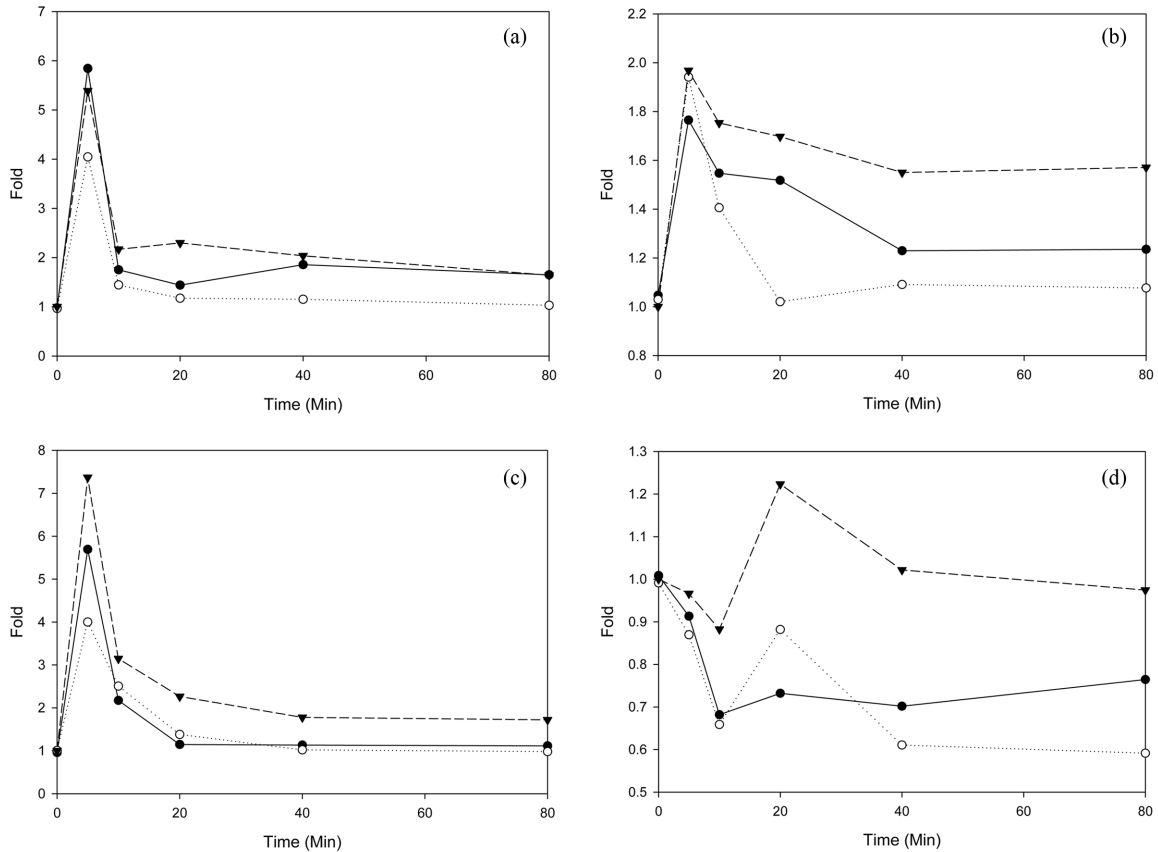
Akt 시그널을 조절함으로써 NF-κB의 활성화를 억제하는 경향을 확인할 수 있었다. 반면 대조군으로 사용된 목단피 추출물도 p-Akt-1 활성을 억제하나 오매보다 다소 낮은 억제율을 보여주었다.

Stress-activated protein kinase / Jun amino terminal kinase (SAPK/JNK)는 환경 스트레스(UV, gamma radiation)에 의해 직접적 혹은 간접적으로 활성화된다. 이러한 환경 스트레스는 NF-κB와 AP-1 (c-Fos and c-Jun)의 활성화를 유발하며, ERK, JNK (SAPK) 와 같은 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)를 활성화시켜 각종 스트레스 (활성산소종, UV, 금속이온, 허혈성 질환)에 의해 JNK가 발현되게 하는 기작을 가지고 있다. Fig. 3(c)와 같이 오매는 SAPK/JNK의 인산화도 초기에 일부 억제함으로써 염증시그널을 억제함을 알 수 있었다.

MEK1, MEK2는 MAPK 혹은 Erk kinases라고 불리며, Mitogen에 의해 활성화되는 세포의 성장과 분화를 제어하는 protein kinase cascade의 역할을 하는 이중활성 protein kinase 이다 [7]. MEK1/2는 다양한 growth factor와 cytokine에 의해 활성화되고 세포막 탈극 (membrane depolarization)과 칼슘 전달 (calcium influx)에 의해도 활성화된다 [7]. Fig. 3(d)와 같이 MEK1/2는 자극 20분후 최대치를 나타내었으며 시간에 지남에 따라 내려가는 양상을 확인할 수 있었다. 오매는 MEK1/2의 활성을 후반부인 40~80 min에서 대조군인 목단피 추출물보다 다소 억제하는 양상을 확인할 수 있었다.

### 3.4. TNF $\alpha$ 처리후 오매에 의한 Stat3, NF-κB p65, I $\kappa$ B-alpha 변화

Stat3 전사인자는 많은 신호전달물질과 신호전달물질 수용체에 있어 매우 중요하다. Stat3는 많은 사람의 종양에서 증가된다는 사실에서, 암유전자적 성질, 항세포자살 특징을 보유하고 있다고 보고되었다 [11]. 그동안 Stat3의 역할은 암유전자



**Fig. 3.** *In Vitro* p38 (a), p-Akt-1 (b), SAPK/JNK (c), MEK1/2 (d) Inhibitory effect treated with *Prunus mume* extract by time-lapse basis (5, 10, 20, 40 80 min). Symbols: ▼, control; ●, treated with *Paeonia suffruticosa* extract; ○, treated with *Prunus mume* extract.

조절관련 부분으로 초점이 맞춰졌지만, 최근들어 1차 염증반응에 의한 세포의 방어기구로 보고되고 있다 [23]. 일례로 stat3가 만성폐질환 (COPD, Chronic obstructive pulmonary disease)에서 염증반응 (inflammation)을 조절함으로써 폐조직손상을 감소시키는 역할을 한다는 보고가 있으며 [24], NF-κB 뿐만 아니라 Stat3의 억제제는 건선과 같은 피부염증치료에 있어 매우 중요한 타겟이라고 보고되었다 [25]. Fig. 4(a)와 같이 면역유도원이 처리된 후 Stat3가 40분에서 최대값을 나타냈으며, 이는 염증 신호에 의해 Stat3가 발현된다는 것을 의미한다. 이때 오메는 대조군대비 약 50%의 Stat3 발현을 억제시키는 것으로 확인되었다. 이런 이유로 오메는 Stat3의 면역반응을 억제함으로써 건선과 같은 만성피부질환 예방에 도움을 줄 것으로 사료된다.

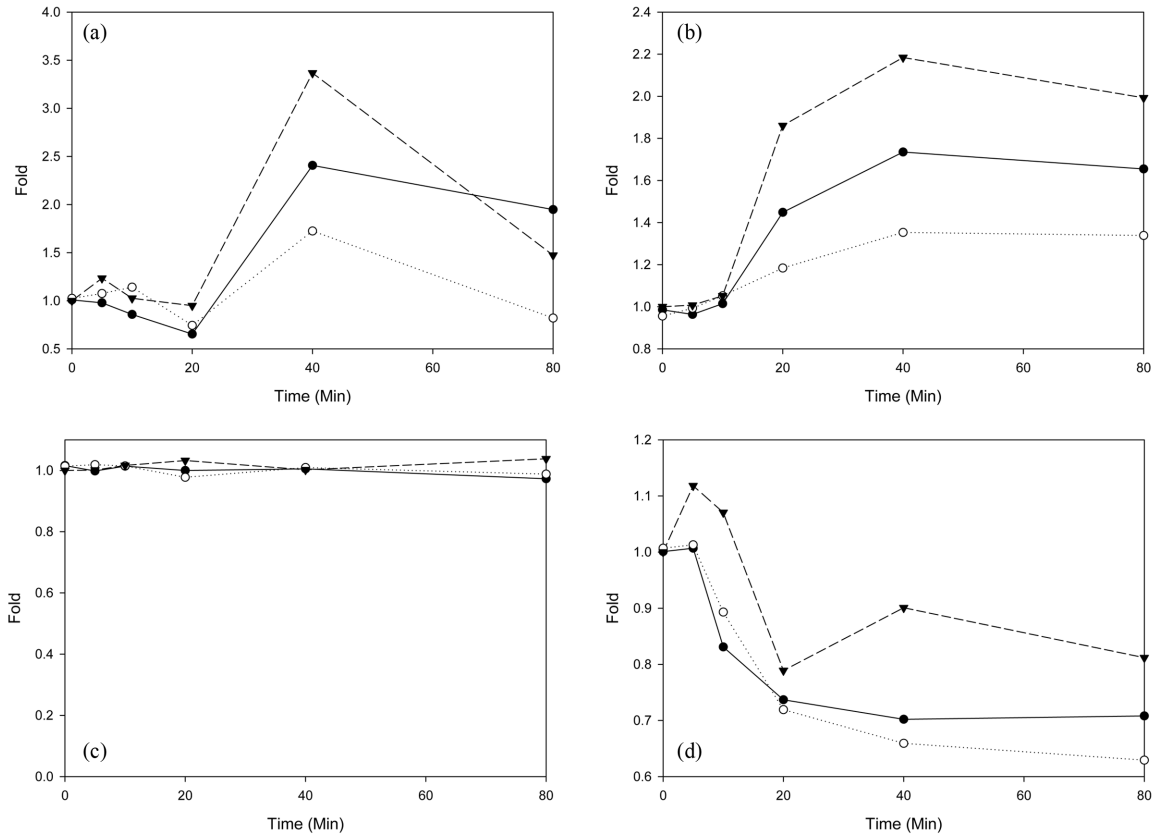
Fig. 4(b)와 같이 NF-κB시그널이 활성화되면서 IκB-α의 경우 20 min 이후에서 증가되고 오메추출물에 의해 억제되는 결과를 얻을 수 있었다. Fig. 4(c)와 같이 인산화되지 않은 NF-κB p65 subunit의 양의 시간에 따른 증감은 없을 것으로 사료되었고, 결과와 같이 자체 양의 증감은 없는 것으로 확인되었다.

Akt는 GSK-3β, caspase 9, BAD, Forkhead 전사인자등과 같은 단백질질을 인산화시켜 대사의 조절, 세포의 생사 관련 신호

를 전달하는 중요 역할을 한다고 보고되었다 [6]. Akt는 PDK 1에 의해 threonine 308이 인산화되고, PDK2에 의해 serine 473 잔기가 인산화되는 과정을 거치는데, serine 473 잔기의 인산화는 Akt의 활성화를 위해 매우 중요하다고 보고되었다 [26-28]. Akt는 IKK-α, β, γ에 영향을 미치어 최종적으로 NF-κB의 활성화에 영향을 미치는 것으로 보인다 [6]. 유도원에 의해 Akt-1의 특이적인 양상은 확인되지 않았으나 Fig. 4(d)와 같이 유도원 처리후 80분일 때 오메 추출물에 의해 Akt-1의 양이 줄어들음을 확인할 수 있었다. Akt-1의 양이 유도원에 의해 줄어드는 이유는 p-Akt-1으로 변환되서 상대적으로 줄어드는 것으로 사료된다.

### 3.5. UVB 처리후 오메에 의한 NF-κB 억제효과

자외선은 특히 피부암의 근원이며, 피부암은 북미지역 발생하는 암 중 흔한 형태로 나타나며, 출현빈도는 온난화가 진행되면서 높게 나타나고 있다[12]. 역학조사 및 분자생물학적 연구결과 등에 따르면 nonmelanoma 피부암은 햇빛에 함유되어있는 자외선에 많이 노출될수록 출현빈도가 많아진다 [29,30]. NF-κB는 단백질복합체이며, 전염증성 사이토카인의 유전자발현을 조절하는 인자로서 두 개의 서브유닛으로 구성된다. 이들은 DNA에 결합하여 특정한 유전자의 발현을 조



**Fig. 4.** *In Vitro* p-Stat3 Inhibitory effect (a), p-IκB-α (ser32) Modulation effect (b), NF-κB p65 Modulation effect (c), Akt-1 Modulation effect (d) treated with *Prunus mume* extract by time-lapse basis (5, 10, 20, 40 80 min). Symbols: ▼, control; ●, treated with *Paeonia suffruticosa* extract; ○, treated with *Prunus mume* extract.

절하는데, 이 복합체는 분자스위치처럼 작동하여 세포가 공격을 받을 때는 스위치를 켜고, 위험이 사라진 경우에는 스위치를 끈다. 활성화된 NF-κB 복합체는 신속히 핵 안으로 들어가 일련의 염증유발단백질을 가동시킨다. 즉 NF-κB가 발현되어 있는 상황은 생체세포 혹은 피부세포가 염증상황에 노출되어 있다는 것을 의미한다. 이런 이유로 NF-κB와 COX-2의 발현량을 조절할 수 있다면 장기적으로 피부병변과 관련된 질환의 예방에 도움을 줄 수 있을 것이라고 생각된다.

우리는 오매의 UVB에 의한 NF-κB 발현과 프로모터 활성도를 NF-κB luciferase plasmid가 transfection된 JB6 P+ cell을 이용하여 측정하였다. 오매추출물은 기본적으로 UVB에 의해 유도되는 NF-κB 활성을 농도의존적으로 억제한다. 즉 오매는 농도의존적으로 NF-κB를 억제함으로써 UVB에 의한 NF-κB 활성 억제 효과를 확인할 수 있었다.

**3.6. UVB 처리후 오매에 의한 AP-1 억제효과**

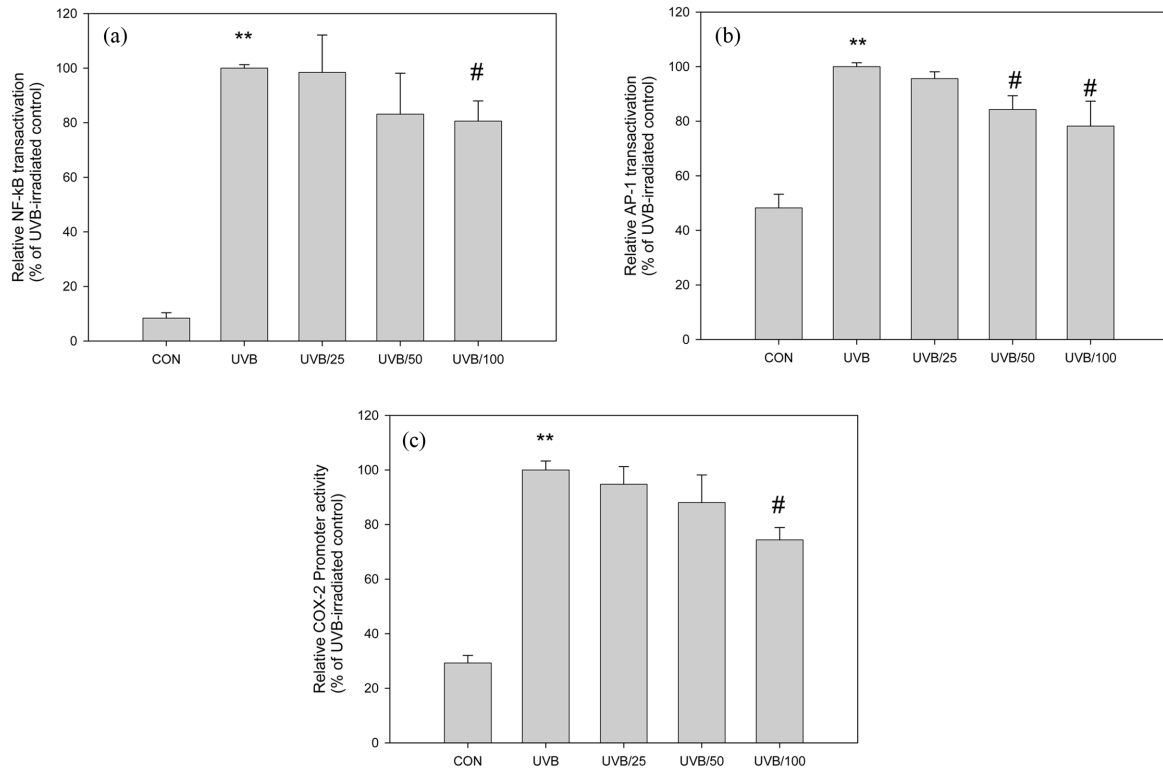
AP-1은 전사인자이며 c-Fos, c-Jun, ATF, JDP family에 속하는 단백질로 이루어진 heterodimeric protein 이다. 사이토카인, 성장인자, 스트레스, 미생물 혹은 바이러스 감염에 대응하여 특히 TPA DNA response element (TRE; 5'-TGAG/CTCA-3')를 조절함으로써 유전자 발현을 조절한다 [31]. 이러한 일련

의 결과로써 AP-1은 세포분화, 증식 그리고 세포자살에 이르기까지 다양한 세포 신호전달을 매개한다 [32]. 즉 AP-1이 발현된다는 것은 세포내에 이상신호가 감지되었다는 것을 의미한다. UVB에 의해 활성화된 AP-1, NF-κB는 순차적으로 COX-2를 발현시키고 피부병변을 유발한다 [14].

우리는 오매의 UVB에 의한 AP-1 발현과 프로모터 활성도를 AP-1 luciferase plasmid가 transfection된 JB6 P+ cell을 이용하여 측정하였다. 오매추출물은 기본적으로 UVB에 의해 유도되는 AP-1 promoter 활성을 농도의존적으로 억제한다.

COX-2는 이미 알려진 피부염증 이외에도 광범위하게 작용한다. COX-2 억제제인 Celecoxib은 mouse skin을 포함한 여러 동물 모델에서 종양생성 억제능을 보여주는데 [33], 즉 COX-2 발현은 비정상적인 종양생성과 깊은 연관이 있다는 것을 의미하며, 비정상적인 COX-2 발현은 UV에 의해 생성되는 피부암의 발현에 중요한 역할을 한다고 알려졌다 [14, 34-36]. 그러므로 COX-2의 발현을 억제하는 약제의 개발은 단순 피부염증 뿐만 아니라 피부암, 피부병변 등을 예방하기 위한 전략이란 것을 깊이 이해할 수 있다.

우리는 오매의 UVB에 의한 COX-2 단백질 발현과 프로모터 활성도를 COX-2 luciferase plasmid가 transfection된 JB6 P+ cell을 이용하여 측정하였다. 오매추출물은 기본적으로



**Fig. 5.** *In Vitro* NF- $\kappa$ B Inhibitory effect (a), AP-1 Inhibitory effect (b), COX-2 Inhibitory effect (c) induced by UVB light and treated with *Prunus mume* extract. UVB/25: treated with *Prunus mume* 25  $\mu$ g/mL, UVB/50: treated with *Prunus mume* 50  $\mu$ g/mL UVB/100: treated with *Prunus mume* 100  $\mu$ g/mL. \*\* $p$ <0.01 compared with CON in the same time. # $p$ <0.05 compared with UVB in the same time.

UVB에 의해 유도되는 COX-2 promoter 활성을 농도의존적으로 억제한다. 즉 오매는 농도의존적으로 COX-2를 억제하고 더 나아가 피부암과 같은 피부병변 예방이 가능한 약재라는 것을 의미한다.

#### 4. 결론

현대사회는 많은 피부 병변이 나타나고 있으며, 이들의 대부분은 염증에 의한 피부질환이다. 이런 면에서 염증에 있어 중요한 인자인 NF- $\kappa$ B의 조절은 매우 중요하며, 정상적인 피부를 영위하기 위해서는 매우 필요하며, 건강한 삶에 있어서도 필수불가결한 인자이다.

이런 면에서 NF- $\kappa$ B를 조절, 억제할 수 있는 약재를 찾았으며 이 중 하나가 오매이다. 오매는 TNF- $\alpha$  처리시 매우 높은 NF- $\kappa$ B 억제 효능을 보여주었다. NF- $\kappa$ B를 중심으로 관련된 세포신호물질 정량을 진행하였다. 사용된 대조군인 목단피 추출물과 같이 p38은 미약하게 억제되었으나, p-Akt-1과 SAPK/JNK를 억제하는 양상을 확인할 수 있었고, MEK1/2, p-stat3 모두 억제하는 양상을 확인할 수 있었다. 또한 p65와 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화도 억제하는 경향을 확인하였다.

자외선은 피부에 조사되면서 피부세포의 사멸, 세포의 노화 뿐만 아니라 피부암을 유발한다. 오매를 파쇄, 추출하여

내부의 유효성분을 모은 후 transfection 된 JB6 P+ cell에 자외선을 조사한 실험에서 COX-2, NF- $\kappa$ B, AP-1 모두 농도의존적으로 억제되는 양상을 확인할 수 있었다. 즉 한방훈증추출물인 오매에서 추출한 성분이 자외선으로부터 피부를 보호할 수 있는 새로운 원료로서의 가능성을 보여주었다.

종합적으로 한방유래 추출물인 오매는 기본적으로 NF- $\kappa$ B를 조절하고 다양한 부위의 시그널을 억제하고 UV에 의한 염증의 악화도 완화하는 것으로 생각되므로 최종적으로 만성피부염증을 억제하여 아토피, 건선 뿐만 아니라 다양한 염증 자극원으로부터 피부를 지키는 피부병변 예방물질로 기대된다.

#### 참고문헌

1. Beissert, S. and R. Granstein (1996) UV-induced cutaneous photobiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31: 381-404.
2. Matsumuram Y. and H. Ananthaswamy (2002) Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev. Mol. Med.* 26: 1-22.
3. Sen, R. and D. Baltimore (1988) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47: 921-928.

4. DiDonato, J. A., M. Hayakawa, D. M. Rothwarf, E. Zandi, and M. A. Karin (1997) cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcriptional factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 388: 548-554.
5. Lin, A. and M. Karin (2003) NF- $\kappa$ B in cancer: a marked target. *Semin. Cancer Biol.* 13: 107-114.
6. Kim, D. and J. Chung (2002) Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35: 106-115.
7. Alessi, D. R., Y. Saito, D. G. Campbell, P. Cohen, G. Sithanandam, and U. Rapp (1994) Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S, Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74 raf-1. *EMBO J.* 13:1610-1619.
8. Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch, and R. J. Davis (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* 270: 7420-7426.
9. Zarubin, T. and J. Han (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15: 11-18.
10. Roux, P. P. and J. Blenis (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 320-344.
11. O'Shea, J. J., M. Gadina, and R. D. Schreiber (2002) Cell. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. 109: S121-S131.
12. Melnikova, V. O. and H. N. Ananthaswamy (2005) Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutation Research* 571: 91-106.
13. Matsumura Y. and H. N. Ananthaswamy (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Applied Pharmacol* 195: 298-308.
14. Bode, A. M. and Z. Dong (2003) Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE* RE2.
15. Smith, W. L., D. L. DeWitt, and R. M. Garavito (2002) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Ann. Rev. Biochem.* 69: 145-182.
16. Chen, W., Q. Tang, M. S. Gonzales, and G. T. Bowden (2001) Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*. 20: 3921-3926.
17. Chuda, Y., H. Ono, M. Ohnishi-Kameyama, K. Matsumoto, T. Nagata, and Y. Kikuchi (1999) Mumefural, citric acid derivative improving blood fluidity from fruit-juice concentrate of Japanese apricot (*Prunus mume Sieb. et Zucc.*). *J. Agric. Food Chem.* 47: 828-831.
18. Kim, B. J., J. H. Kim, H. P. Kim, and M. Y. Heo (1997) Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. *Int. J. Cosmet. Sci.* 19: 299-307.
19. Miyazawa, M., H. Utsunomiya, K. Inada, T. Yamada, Y. Okuno, H. Tanaka, and M. Tatematsu (2006) Inhibition of *Helicobacter pylori* motility by (+)-Syringaresinol from unripe Japanese apricot. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 172-173.
20. Nakajima, S., K. Fujita, Y. Inoue, M. Nishio, and Y. Seto (2006) Effect of the folk remedy, Bainiku-ekisu, a concentrate of *Prunus mume* juice, on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Helicobacter*. 11: 589-591.
21. Enomoto, S., K. Yanaoka, H. Utsunomiya, T. Niwa, K. Inada, H. Deguchi, K. Ueda, C. Mukoubayashi, I. Inoue, T. Maekita, K. Nakazawa, M. Iguchi, K. Arii, H. Tamai, N. Yoshimura, M. Fujishiro, M. Oka, and M. Ichinose (2010) Inhibitory effects of Japanese apricot (*Prunus mume Siebold et Zucc.*; Ume) on *Helicobacter pylori*-related chronic gastritis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64: 714-719.
22. Tsuji, R., H. Koizumi, and D. Fujiwara (2011) Effects of a plum (*Prunus mume Siebold and Zucc.*) ethanol extract on the immune system in vivo and in vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 2011-2013.
23. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9: 798-809.
24. Gao, H. and P. A. Ward (2007) STAT3 and suppressor of cytokine signaling 3: potential targets in lung inflammatory responses. *Expert Opin. Ther. Targets* 11: 869-880.
25. Andrs, R. M., M. C. Montesinos, P. Navaln, M. Pay, and M. C. Terencio (2013) NF- $\kappa$ B and STAT3 Inhibition as a Therapeutic Strategy in Psoriasis: *In Vitro* and *In Vivo* Effects of BTH. *J. Invest. Dermatol.* doi: 10.1038/jid.2013.182.
26. Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B. A. Hemmings (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15: 6541-6551.
27. Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
28. Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin, and B. Su (2006) SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127: 125-137.
29. Setlow, R. B. (1974) The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 3363-3366.
30. Ley, R. D. (1974) Photoreactivation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4337.
31. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.* 117: 5965-5973.
32. Ameyar, M., M. Wisniewska, and J. B. Weitzman (2003) A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85: 747-752.
33. Fischer, S. M., H. H. Lo, and G. B. Gordon (1999) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 25: 231-240.
34. Lee, J. L., H. Mukhtar, D. R. Bickers, L. Kopelovich, and M. Athar (2003) Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 192: 294-306.
35. Karin, M. (1998) Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann. NY Acad. Sci.* 851: 139-146.
36. Ding, M., R. Feng, and S. Y. Wang (2006) Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J. Biol. Chem.* 281: 17359-17368.