

각질형성세포에서 ROS로 유도된 염증반응에 대한 능실 추출물 및 그 분획물의 항염 효과

남진주·김연준[†]

코스맥스 R&I center

(2014년 12월 15일 접수, 2015년 2월 4일 수정, 2015년 3월 12일 채택)

Fractionated *Trapa japonica* Extracts Inhibit ROS-induced Skin Inflammation in HaCaT keratinocytes

Jin-Ju Nam and Youn Joon Kim[†]

Cosmax R&I Center, Pangyo innovaValley E 602, 255, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea
(Received December 15, 2014; Revised February 4, 2015; Accepted March 12, 2015)

요약: 자외선은 외부적인 스트레스 자극인자로 작용하여 사람 각질형성세포에서 reactive oxygen species (ROS)와 비활성 코르티손을 활성 코르티솔로 전환시키는 효소인 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1)의 발현 및 활성을 증가시킨다고 알려져 있다. 또한, ROS가 증가된 피부에서는 염증 유발 사이토카인과 염증 매개 인자의 발현이 증가되어 결과적으로 염증반응을 일으키게 되는 원인이 된다. 본 연구에서는 각질형성세포(HaCaT)에서 11 β -HSD1 억제제가 ROS 분해효소인 catalase의 생성을 회복시킴에 착안하여, 11 β -HSD1의 발현을 저해함과 동시에 ROS로부터 유도되는 염증 반응을 억제하는 천연물 소재를 발굴하고자 하였다. 그 중 능실 추출물과 그 분획물은 각각 11 β -HSD1의 발현과 ROS 생성 증가를 억제하고, 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 α , -1 β 의 발현을 억제하였다. 또한, 자외선에 의해 유도되는 염증 매개인자인 cyclooxygenase (COX)-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성을 저해하였다. 따라서 본 연구 결과로부터 능실 추출물 및 그 분획물은 11 β -HSD1의 발현을 억제함과 동시에 ROS에 의해 유발된 피부 염증 반응을 효과적으로 저해함을 확인하였다.

Abstract: Ultraviolet B (UVB) irradiation induces both production of reactive oxygen species (ROS) and glucocorticoids (GCs)-mediated stress responses such as an increase of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) activity in skin. In addition, ROS-induced inflammatory mediators and proinflammatory cytokines trigger skin inflammation. In this study, as 11 β -HSD1 inhibitor recovered a decrease of catalase expression, we investigated whether *Trapa japonica* (TJ) extract and its fractions could inhibit 11 β -HSD1/ROS-induced skin inflammation in HaCaT keratinocytes. TJ extract and its fractions inhibited expressions of 11 β -HSD1 as well as the increase of ROS in UVB-exposed HaCaT keratinocytes. Moreover, proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)- α , - β and tumor necrosis factor (TNF)- α , and cyclooxygenase (COX)-2 and inducible NO synthase (iNOS) as inflammatory mediators were also inhibited in both mRNA and protein levels. Finally, prostaglandin E₂ (PGE₂) produced by COX-2 was inhibited effectively by TJ extract and its fractions. Taken together, these results suggest that TJ extract could be a potential anti-inflammatory ingredient to inhibit UVB-induced inflammation in skin.

Keywords: *Trapa japonica* extract, reactive oxygen species, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, ultraviolet B, skin inflammation

[†] 주 저자 (e-mail: kimyj@cosmax.com)
call: 031)789-3253

1. 서 론

염증은 체내의 세포가 인체를 보호하기 위하여 외부 자극에 의한 피부 손상에 대응하여 반응하는 현상을 말한다[1]. 이러한 현상은 피부 손상을 회복하기 위해 세포내 물질을 분비하여 나타나는 일종의 면역 반응이며, 크게 자외선 손상에 의한 피부염과 자극성 물질에 의한 접촉피부염, 특이 물질에 의한 알레르기성 피부염으로 구분할 수 있다[2,3]. 염증이 일어난 부위에서는 홍반, 부종, 수포 및 열감과 소양증 등의 증상이 관찰되며 특히, 자외선에 의한 손상은 일광화상 등의 급성적인 염증 증상을 유발할 뿐만 아니라 세포 내에서의 DNA 손상과 피부암 및 피부 노화를 초래한다[4].

자외선 자극에 의해 염증성 사이토카인의 농도가 높아진 피부 조직은 염증세포들을 유인하여 손상된 세포를 제거하고 회복시킨다[4]. 이러한 과정에서 염증세포는 손상받은 조직이나 세포를 제거하기 위해 염증 유발 사이토카인과 염증 매개인자와 같은 다양한 물질들을 분비한다[5-8]. 이와 같이 염증반응은 자외선을 비롯한 외부 자극으로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 하지만 이러한 과정이 반복되거나 정도가 과도할 경우 피부에 2차적인 손상을 입힐 수 있다. 예를 들어 자외선 손상에 의한 염증반응 과정에서 생성된 효소인 cyclooxygenase (COX)-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 각각 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 nitric oxide (NO)를 생성하여 조직 손상 및 유전자 변이를 일으킴과 동시에[9-12], 피부 속에 존재하는 콜라겐 섬유와 탄력 섬유를 분해하여 염증반응에 의한 광노화를 촉진시킨다[13].

각질형성세포는 자외선에 의한 염증 및 면역 반응에 중요한 타겟이 되는 세포주으로써 염증성 사이토카인과 염증 매개인자들을 발현시킨다[14]. 이러한 물질들이 각질형성세포 내에서 발현되는 과정에서 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 비롯한 다양한 체내 인자들이 생성되고 활성화된다[15]. ROS에는 O₂⁻ (과산화물), H₂O₂ (과산화수소), OH⁻ (하이드록실 라디칼) 등이 있으며, 정상상태의 피부에서는 카탈라아제 등에 의해 물과 산소로 돌아오지만, 비정상상태로 증가할 경우, 주위의 단백질이나 지질, 그리고 DNA들을 공격하여 전자를 빼앗으며, 전자를 빼앗긴 세포의 성분들은 산화되어 기능을 잃어버리거나 기능에 손상을

받게 된다[16]. UVB에 노출된 피부에서는 이러한 ROS 생성이 증가하게 되며 급성 염증반응을 일으키는 원인이 된다[17].

최근 스트레스 호르몬인 코르티솔 생성 및 활성을 조절하는 효소로서 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1)을 타겟으로 하는 질병 치료에 대한 연구가 진행되어왔다[18,19]. Itoi 등은 자외선에 의해 손상 받은 사람 각질형성세포에서 11 β -HSD1의 발현이 증가함을 보고하였다[20]. 게다가 사람 각질형성세포에서 염증성 사이토카인을 처리하였을 때 11 β -HSD1의 발현이 증가한다는 것과 11 β -HSD1 siRNA를 처리하였을 때 염증성 사이토카인의 발현이 감소한다는 것을 확인하였다[20].

따라서, 본 저자 등은 자외선에 의한 피부 염증 반응의 새로운 원인으로 11 β -HSD1에 주목하고, 11 β -HSD1 억제제가 UVB에 의해 감소된 catalase의 발현을 회복시킨다는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 본 연구자들은 11 β -HSD1의 발현 억제에 효능이 있는 능실(*Trapa japonica*) 추출물을 분획하여 각 분획물별로 자외선으로 유도된 ROS의 생성 증가 및 염증 반응에 주는 영향을 확인함으로써 항염 효능을 갖는 기능성 소재로서의 이용 가능성에 대해 알아보려고 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 능실 추출물의 제조 및 분획

능실 추출물은 건조된 능실을 메탄올(Methanol; MeOH)에 담구어 3 h 동안 초음파 추출하고 이를 3회 반복한 후 감압 농축한 후 건조하여 26.5%의 수율로 얻었다. 또한, 추출물을 증류수에 현탁시키고 계통학적 분획방법에 따라 동량의 메틸렌 클로라이드(Methylene Chloride; MC), 에틸아세테이트(Ethyl Acetate; EA), 부탄올(n-Butanol; n-BuOH)을 각각 3회씩 추출하여 분획한 후 감압 농축하여 메틸렌 클로라이드층, 에틸아세테이트층, 부탄올층을 획득하여 각 MC 분획, EA 분획, n-BuOH 분획으로 하였다. 양성 대조 물질로서 11 β -HSD1 특이 억제제인 PF915275 (PF)를 사용하였다.

2.2. 세포 배양

사람 각질형성세포주인 HaCaT은 Cell Lines Service (CLS, Germany)에서 구매하였으며 10%의 Fetal bovine

serum (FBS)와 1%의 Antibiotic/antimycotic (AA)을 첨가한 DMEM (Hyclone, USA)을 이용하여 37 °C, 5% CO₂조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세포 배양 배지는 48 h마다 새로운 배지로 교체하였고, 2 - 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2.3. 자외선 조사

자외선 조사는 302 nm 파장의 UV Crosslinker (UVP, USA)를 이용하여 UVB 15 mJ/cm²를 사람 각질형성세포에 조사하였다.

2.4. MTT 분석을 이용한 세포 생존율 측정

능실 추출물 및 분획물의 HaCaT cell에 대한 독성 평가를 위해 MTT assay를 수행하였다. HaCaT cell은 96well plate에 2 × 10⁴ cells/well로 분주하여 24 h 후에 혈청제거 배지로 교환한 후, 각각의 추출물과 분획물을 1, 10 µg/mL 처리하거나, UVB 15 mJ/cm²로 처리 후 각각의 추출물과 분획물을 1, 10 µg/mL 처리하여 24 h 배양하였다. 이후에 0.5 µg/mL 농도의 MTT (Sigma, USA) 용액 20 µL을 각각의 well에 첨가하고 4 h 동안 결정화한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, sigma, USA)에 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. mRNA 발현 조사(Real time RT-PCR)

사람 각질형성세포인 HaCaT을 6well plate에 4 × 10⁵ cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 배양하였다. 그 후 UVB 15 mJ/cm²로 조사하고 능실 추출물 및 분획물을 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24 h 동안 추가 배양하였다. Total RNA를 추출하기 위해 각 well에 RNA iso (TAKARA, Japan) 1 mL을 첨가하고 얼음 위에서 5 min을 방치하여 세포를 용해시키고 chloroform 200 µL를 첨가하여 14,000 rpm에서 15 min 동안 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮기고 같은 양의 isopropanol을 첨가한 후 14,000 rpm에서 10 min 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 99% ethanol을 이용하여 7,500 rpm에서 원심분리하여 2회 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate (DEPC) water에 녹였다. Nanodrop 2000 (Thermo, USA)를 이용해 RNA를 정량하였고 total RNA 2 µg을 DEPC와 함께 70 °C에서 5 min 동안 가열시킨 후 Reverse Transcription

Premix (ELPIS-Biotech, Korea)에 넣고 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였다. 42 °C 에서 55 min, 70 °C에서 15 min 동안 반응시켜 cDNA를 합성하여 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. 얻어진 cDNA로부터 catalase, 11β-HSD1, TNF-α, IL-1α, -1β, COX-2, iNOS을 증폭시키기 위해 5배 희석시킨 cDNA 2 µL를 primer 1 µL, DEPC 6 µL, SYBR Green master mix (Invitrogen Life Technology, USA) 10 µL와 함께 StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 반응 조건은 50 °C 2 min, 95 °C 10 min에서 반응 후 95 °C 10 s와 60 °C 1 min을 40회 반복하여 증폭시켰다. 증폭하고자 하는 유전자들의 primer 염기서열은 Table 1과 같다.

2.6. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)

사람 각질형성세포인 HaCaT을 12well plate에 2 × 10⁵ cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 배양하였다. 그 후 UVB 15 mJ/cm²로 조사하고 능실 추출물 및 분획물을 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24 h 동안 추가 배양하였다. 배양이 끝난 배지의 상층액을 이용하여 효소결합면역흡착법을 PGE₂ ELISA kit (R&D system, USA)의 시료로 사용하여 시행한 후 450 nm에서 측정하였다.

2.7. Western blot

사람 각질형성세포인 HaCaT을 6well plate에 4 × 10⁵ cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 동안 배양하였다. 그 후 UVB 15 mJ/cm²로 조사하고 능실 추출물 및 분획물을 처리한 FBS가 첨가되지 않은 배지를 사용하여 24 h - 72 h 동안 추가 배양하였다. 배양한 세포를 회수하여 ripa buffer를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 Bradford assay 방법에 따라 정량한 후, Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)하여 분리하였다. 전기영동 후 단백질을 gel에서 PVDF 막으로 transfer한 뒤, 항체를 결합하여 타겟 단백질을 표지하고 사진 촬영하였다.

2.8. Fluorescence microscopy

사람 각질형성세포인 HaCaT을 glass slide에 2 × 10⁵

Table 1. Primers Used for RT-PCR

Gene	Direction	Sequence (5'-3')	Size (bp)
Catalase	Forward	AGCTTAGCGTTCATCCGTGT	210
	Reverse	TCCAATCATCCGTCAAAACA	
11 β -HSD1	Forward	AAGCAGAGCAATGGAAGCAT	108
	Reverse	GAAGAACCCATCCAAAGCAA	
TNF- α	Forward	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	335
	Reverse	GGAAGACCCCTCCCAGATAG	
IL-1 α	Forward	TGGCTCATTTTCCCTCAAAAGTTG	171
	Reverse	AGAAATCGTGAAATCCGAAGTCAAG	
IL-1 β	Forward	GTCATTCGCTCCCACATTCT	105
	Reverse	ACTTCTTGCCCCCTTTGAAT	
COX-2	Forward	TGAGCATCTACGGTTTGCTG	158
	Reverse	TGCTTGTCTGGAACAACCTGC	
iNOS	Forward	CATGCTACTGGAGGTGGGTG	197
	Reverse	CATTGATCTCCGTGACAGCC	
β -actin	Forward	GGCCATCTCTTGCTCGAAGT	312
	Reverse	GAGACCTTCAACACCCAGC	

cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 동안 배양하였다. 그 후 능실 추출물 및 분획물을 전처리한 FBS가 첨가되지 않은 배지를 사용하여 20 h 동안 배양하고 UVB 15 mJ/cm²로 조사하고 3 h 후에 ROS detection solution (Enzo Life science, USA)을 0.5 μ M을 첨가하여 1 h 동안 추가배양하였다. glass slide의 세포들을 washing buffer (Enzo Life science, USA)를 사용하여 세척한 후 cover glass로 고정하여 형광현미경으로 촬영하였다.

2.9. 통계처리

모든 통계분석은 *t*-test를 실시하여 평가하였다. 두 군 간의 차이에 의한 통계적 검정 후 *p*값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미있는 차이가 있다고 판단하였다.

3. 결과

3.1. 각질형성세포에 대한 능실 추출물 및 분획물의 영향

능실 MeOH 추출물(M), Methylene Chloride 분획물(MC), Ethyl Acetate 분획물(EA), n-BuOH 분획물(nB)

이 각질형성세포에 주는 영향을 보기 위해 UVB 조사 여부에 따른 세포 생존율을 평가하였다.

UVB를 조사하지 않고 MeOH 추출물, MC 분획, EA 분획, n-BuOH 분획을 각질형성세포에 처리한 경우에 처리 농도 1, 10 μ g/mL에 대해서 세포 독성을 나타내지 않았으며, M, MC, EA의 경우 오히려 농도 의존적으로 각질형성세포의 증식을 활성화시켰다(Figure 1a). 이어 UVB를 조사한 후 MeOH 추출물, MC 분획, EA 분획, n-BuOH 분획을 처리하였을 때, 모든 시료에서 UVB에 의해 감소된 세포 활성이 농도 의존적으로 회복됨을 보였다(Figure 1b).

3.2. Catalase 생성 회복 효과

먼저, UVB에 의해 감소되는 catalase에 대한 회복 효과를 보기 위해, UVB를 조사한 각질형성세포에 11 β -HSD1 저해제인 PF915275와 능실 MeOH 추출물(M)을 처리하여 catalase의 발현량을 측정하였다.

각질형성세포에 대한 UVB 조사가 catalase의 발현을 유의하게 감소시킴을 확인하였다. 이어 PF915275 1 μ M과 M을 10 μ g/mL의 농도로 24 h 처리하였을 때, catalase의 mRNA와 단백질 수준에서 자외선에 의한

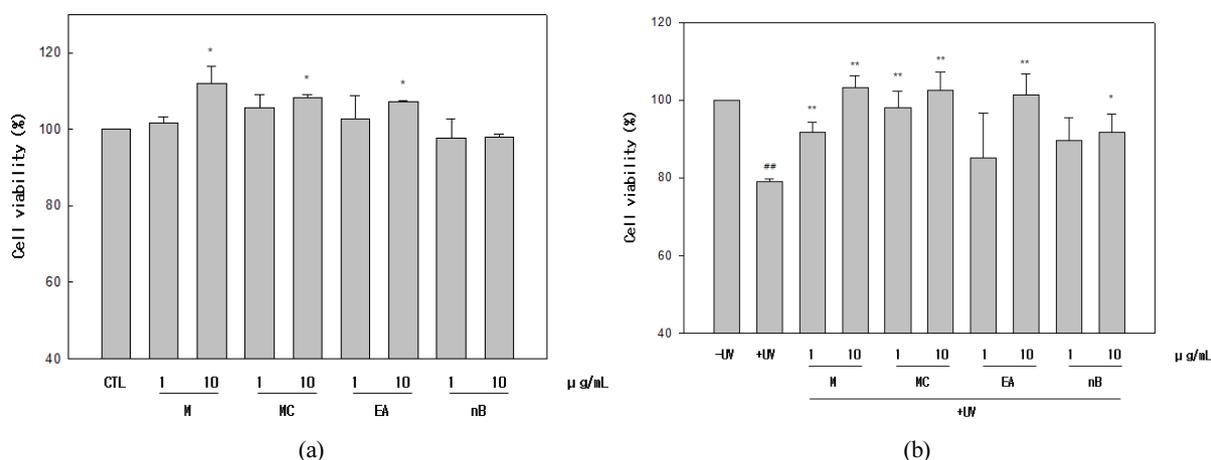


Figure 1. Effect of fractionated TJ extracts on cell proliferation. (a) HaCaT cells were treated with 1, 10 µg/mL of fractionated TJ extracts for 24 h. (b) HaCaT cells were exposed to UVB (15 mJ/cm²), and then were treated with 1, 10 µg/mL of fractionated TJ extracts for 24 h. The cell viability was measured by MTT assay. M: MeOH extract 1, 10 µg/mL, MC: methylene chloride fraction 1, 10 µg/mL, EA: ethyl acetate fraction 1, 10 µg/mL, nB: n-BuOH fraction 1, 10 µg/mL. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 indicate a significant difference from the control (CTL) (a) or UVB-exposed control (b).

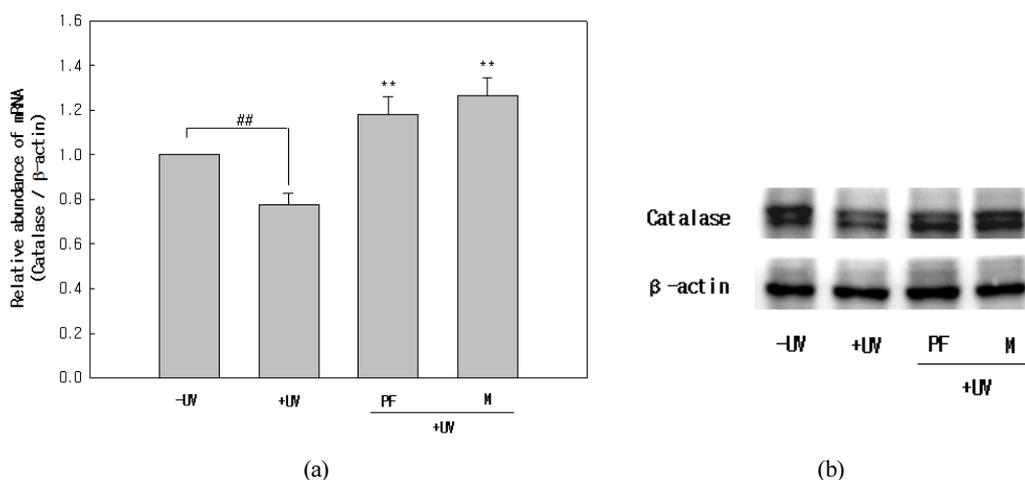


Figure 2. TJ extracts inhibited the decrease of catalase in UVB-exposed HaCaT cells. (a) mRNA and (b) protein levels of catalase were measured by real-time RT-PCR and western blot respectively. HaCaT cells were exposed to UVB (15 mJ/cm²), and then were treated with 10 µg/mL of TJ MeOH extracts for 24 h. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

발현 감소를 회복시킴을 보였다 (Figure 2a, b).

3.3. 11β-HSD1 발현 억제 효과

UVB에 의해 증가되는 11β-HSD1에 대한 조절 효과를 보기 위해, UVB를 조사한 각질형성세포에 능실 MeOH 추출물(M), Methylene Chloride 분획물(MC), Ethyl Acetate 분획물(EA), n-BuOH 분획물(nB)을 처리

하여 11β-HSD1의 발현량을 측정하였다.

각질형성세포에 대한 UVB 조사가 11β-HSD1의 mRNA 및 단백질 모두 유의하게 증가시킴을 확인하였다. 이어 각 시료 별로 10 µg/mL의 농도로 24 h 처리하였을 때, 11β-HSD1의 mRNA와 단백질 수준에서 자외선에 의한 발현 증가를 억제시킴을 보였다(Figure 3a, b). 특히, MeOH 추출물, EA 분획, n-BuOH 분획에

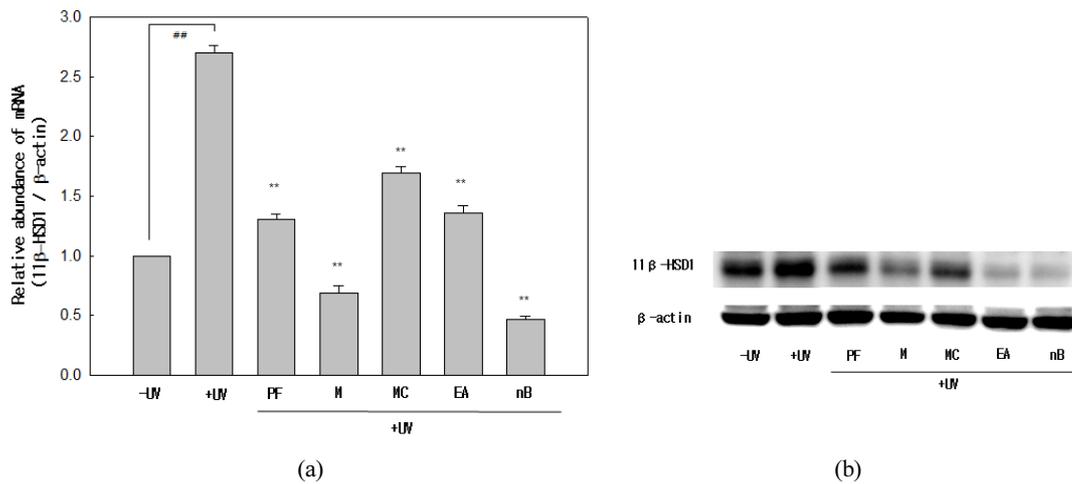


Figure 3. Fractionated TJ extracts inhibited the increase of 11β-HSD1 in UVB-exposed HaCaT cells. (a) mRNA and (b) protein levels of 11β-HSD1 were measured by real-time RT-PCR and western blot respectively. HaCaT cells were exposed to UVB (15 mJ/cm²), and then were treated with 10 μg/mL of fractionated TJ extracts for 24 h (mRNA) or 72 h (protein). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

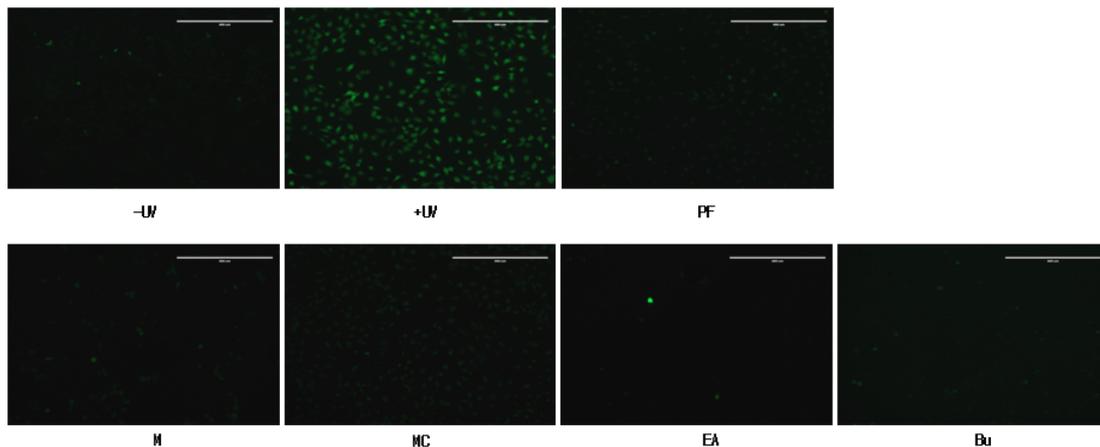


Figure 4. Fractionated TJ extracts inhibited the increase of total ROS in UVB-exposed HaCaT cells. Total ROS were measured by fluorescence microscopy. HaCaT cells were pretreated with each extract (10 μg/mL) for 20 h, and then were exposed to UVB (15 mJ/cm²) for 3 h.

서 11β-HSD1 발현 억제 효과가 높게 나타났다.

3.4. ROS 소거능

UVB에 의해 증가되는 ROS에 대한 소거능을 확인하기 위해, 농실 MeOH 추출물(M), Methylene Chloride 분획물(MC), Ethyl Acetate 분획물(EA), n-BuOH 분획물(nB)을 처리한 각질형성세포에 UVB를 조사한 후 fluorescence microscopy를 통해 ROS 소거능을 측정하였다.

각질형성세포에 대한 UVB 조사가 ROS 생성을 증

가시킴을 확인하였다. 이어 각 시료 별로 10 μg/mL의 농도로 20 h 처리하였을 때, ROS의 자외선에 의한 생성 증가를 억제시킴을 보였다(Figure 4).

3.5. 염증성 사이토카인 발현 억제 효과

UVB에 의해 증가되는 염증성 사이토카인의 발현 억제 효능을 알아보기 위해 UVB를 조사한 각질형성세포에 농실 MeOH 추출물(M), Methylene Chloride 분획물(MC), Ethyl Acetate 분획물(EA), n-BuOH 분획물

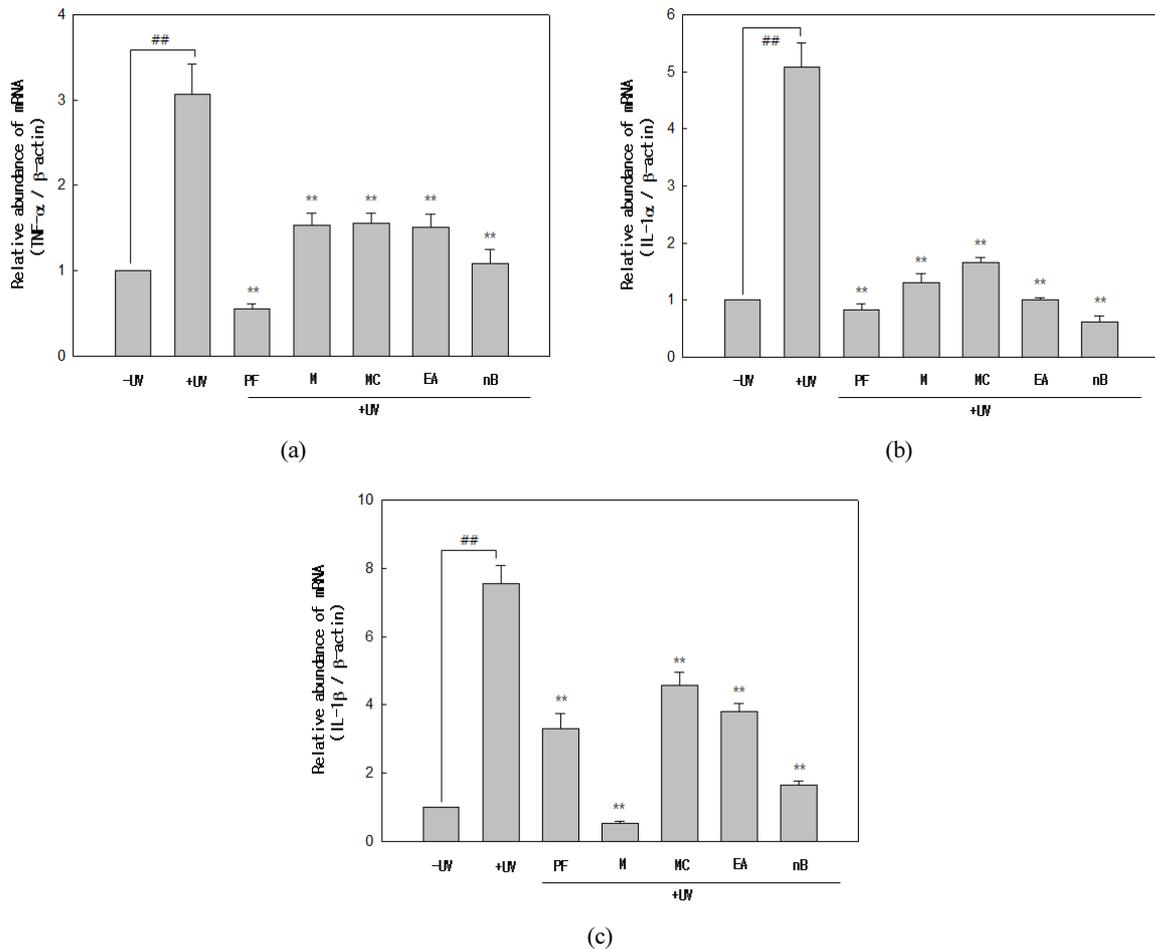


Figure 5. Fractionated TJ extracts inhibited the increase of (a) TNF- α , (b) IL-1 α and (c) IL-1 β in UVB-exposed HaCaT cells. mRNA levels were measured by real-time RT-PCR. HaCaT cells were exposed to UVB (15 mJ/cm²), and then were treated with 10 μ g/mL of fractionated TJ extracts for 24 h. * p < 0.05, ** p < 0.01 indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

(nB)을 처리하여 TNF- α 와 IL-1 α , -1 β 에 대한 mRNA 발현량을 측정하였다.

UVB 조사에 따라 TNF- α 와 IL-1 α , -1 β 의 mRNA 발현 증가를 확인하였고, 각 시료 모두에서 해당 염증성 사이토카인의 증가를 유의하게 억제시킴을 나타냈다(Figure 5a, b, c).

3.6. 염증매개인자 발현 억제 효과

다음으로 자외선에 의해 활성화되는 염증 매개인자의 발현에 주는 영향을 보기 위해, UVB를 조사한 각질형성세포에 능실 MeOH 추출물(M), Methylene Chloride 분획물(MC), Ethyl Acetate 분획물(EA), n-BuOH

분획물(nB)을 처리하여 COX-2, iNOS와 PGE₂에 대한 발현량을 측정하였다.

UVB 조사에 따라 COX-2, iNOS 모두에서 현저한 mRNA와 단백질의 발현 증가를 확인하였고, 각 시료 모두에서 UVB에 의한 COX-2와 iNOS의 증가를 유의하게 억제시킴을 나타냈다(Figure 6a, b, c).

한편, COX-2에 의해 증가되는 피부 염증 유발 물질인 PGE₂[16,17]에 대해서 단백질의 발현량을 ELISA법을 이용하여 평가하였다. 그 결과, COX-2의 발현양과 동일한 양상으로 높은 발현 억제 효과를 보였다(Figure 6d).

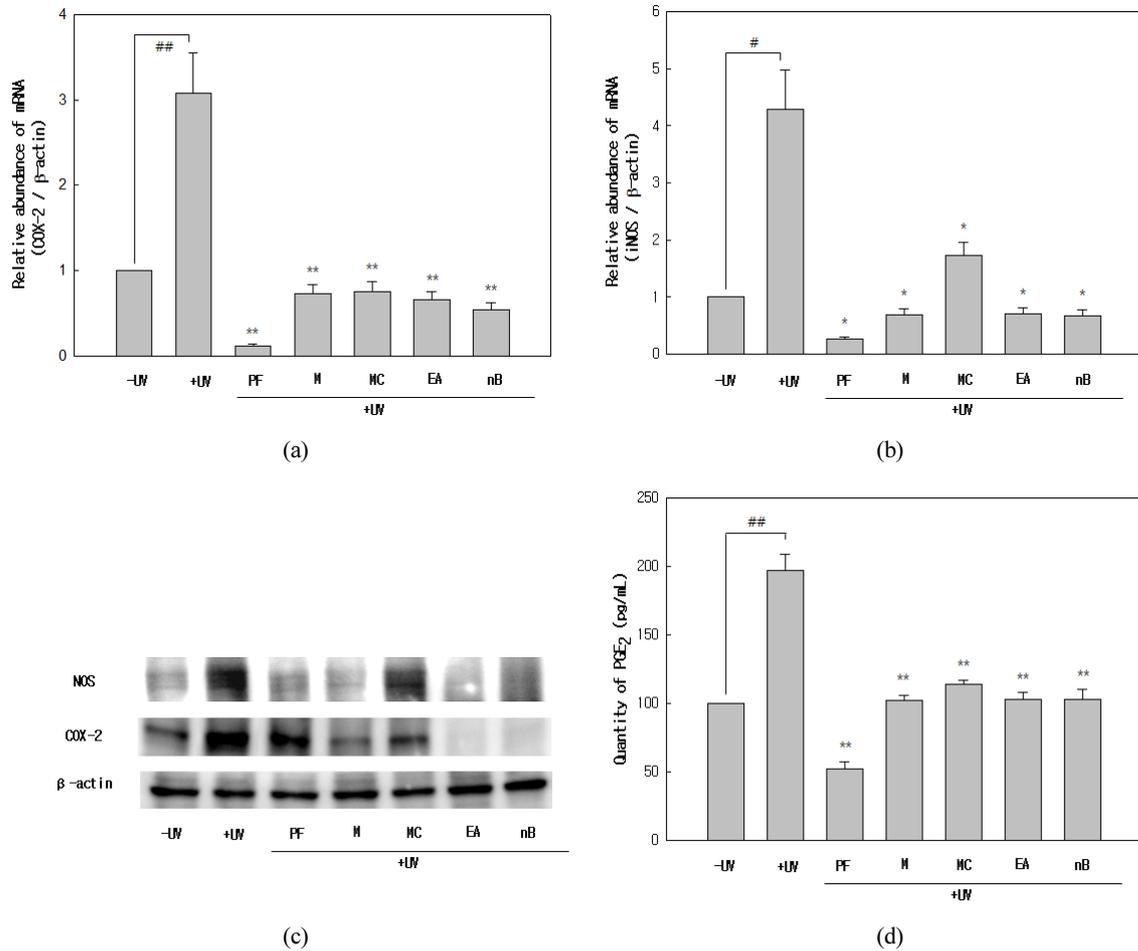


Figure 6. Fractionated TJ extracts inhibited the increase of mRNA levels of (a) COX-2 and (b) iNOS, and protein levels of (c) COX-2, NOS and (c) PGE₂ in UVB-exposed HaCaT cells. mRNA levels were measured by real-time RT-PCR. Also protein levels were measured by western blot (COX-2 and NOS) or ELISA (PGE₂). HaCaT cells were exposed to UVB (15 mJ/cm²), and were treated with 10 μ g/mL of fractionated TJ extracts for 24 h. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

4. 결론 및 고찰

코르티솔은 대표적인 글루코코르티코이드 호르몬으로서 인체 내에서 다양한 스트레스 인자에 의해 활성화된다[20]. 외부적 스트레스 자극은 비활성 코르티손을 활성 코르티솔로 바꾸어 인체 내의 다양한 기관에 영향을 미치며, 체내 항상성 유지를 위해 다시 일정량의 코르티손으로 전환된다[18-20]. 이러한 과정에서 11 β -HSD1은 글루코코르티코이드의 활성 및 비활성에 영향을 주게 되며, 외부 자극 스트레스에 의해 발현 및 활성이 증가하여 체내 코르티손을 코르티솔로 전환시켜 대사과정에 관여한다[18-20]. 하지만 코

르티솔의 양이 과도하게 증가되면 다양한 질병을 일으키는 원인이 되기도 한다. 더욱이 피부에서는 11 β -HSD1의 발현이 피부 노화와 염증 반응에 관여하며, 피부 항상성 조절에도 영향을 미친다고 보고되었다[20-23]. 특히 Itoi 등은 사람 각질형성세포에서 11 β -HSD1에 의한 코르티솔 농도 조절이 염증성 사이토카인의 발현에 영향을 미친다는 결과를 확인함으로써 스트레스에 의한 새로운 피부 염증 메커니즘을 제안하였다[20].

한편, 피부에서 11 β -HSD1의 발현 및 활성 증가는 물리적인 손상과 생리화학적 스트레스에서 기인한다 [d]. 그 중 피부에 가장 흔하게 자극을 주는 물리적인

요인으로 자외선을 들 수 있다. 자외선에 노출된 피부에서 11β-HSD1의 발현 및 활성이 증가되었다는 결과가 보고되었으며[22], 자외선, 특히 UVB의 조사량이 증가함에 따라 11β-HSD1의 발현양이 증가한다는 사실이 확인되었다[24]. 이러한 결과는 자외선이 11β-HSD1의 발현 및 활성을 증가시킴으로써 자외선에 의한 피부 변화에 영향을 미친다는 것을 증명한다.

ROS는 호기성 대사과정의 부산물로서 체내 산화적 스트레스를 유도하여 지질, 단백질, DNA 등의 손상을 일으키는 원인이 된다[25]. 생성이 증가한 ROS는 인체 내 항상성 유지를 위해 catalase와 같은 효소에 의해 물과 산소로 분해되는 과정을 거치게 되지만, 생성량이 과도하거나 생성 증가가 자주 일어나게 되면 균형이 깨지게 되어 인체에 악영향을 미치게 된다[26]. 피부에서의 ROS 생성 증가는 외부 환경의 자극에 따라서 증가하게 되는데 특히, 자외선은 다양한 피부 염증 반응과 피부암 형성, 광독성, 광 민감성, 피부 노화 등을 일으키는 궁극적인 원인이 된다[26,27]. 또한, UVB에 노출된 피부는 ROS의 한 형태인 COX-2와 NO를 생성하여 피부 염증 반응의 매개물질인 PGE₂의 발현을 증가시켜 자외선에 의한 홍반 및 화상을 동반한 피부염을 일으키게 된다[16,28].

본 저자 등은 이전 연구에서 능실이 사람 섬유아세포에서 11β-HSD1 발현 억제를 통한 피부 광노화 억제 효능을 확인하고자 하였다. 그 결과, 능실이 자외선으로 유도한 스트레스 인자인 11β-HSD1과 대표적인 광노화 반응인 MMPs 및 procollagen 발현에 주는 영향을 확인한 결과, 두 인자 사이의 변화 양상이 일치함을 보였다. 또한 양성대조군으로 사용된 11β-HSD1 특이 저해제인 PF915275에 의해 광노화 반응이 저해됨을 나타냈다. 이에 사람 각질형성세포에서 ROS로 유도된 피부 염증반응에서도 11β-HSD1의 발현 및 활성이 연관이 있음을 감지하고 능실 추출물과 11β-HSD1 억제제에 대한 catalase 발현 회복능을 확인하였다. 이어 능실 MeOH 추출물(M)과 그의 Methylene Chloride (MC), Ethyl Acetate (EA), n-BuOH (nB) 분획물이 모두 세포 독성 없이 각질형성세포를 활성화시키고 자외선에 의해 감소된 세포 활성을 회복시킴을 보였다. 또한, M, MC, EA, nB는 모두 자외선에 의한 11β-HSD1 발현 및 총 ROS 생성을 효과적으로 감소시켰다. 양성 대조물질로서 사용한 PF915275에서도

MeOH 추출물과 동등한 효과를 보였다.

한편, 초기 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1α, 1β에 대한 평가에서도 능실 M, MC, EA, nB 모두 유의한 mRNA 발현 억제 효과를 보였으며, 염증 매개 인자인 COX-2와 iNOS 또한 mRNA 및 단백질 발현양 평가에서 유의한 억제 효능을 나타냈다. 이어 COX-2에 의해 합성되는 염증 매개 인자인 PGE₂[29]의 발현을 확인한 결과 COX-2의 발현 양상과 일치하는 경향을 보였다.

이러한 결과는 본 저자 등의 이전 연구인 광노화 억제 효능과 일치하는 결과를 나타낸다. 본 연구와 이전 연구의 결과로 미루어 짐작컨대 능실은 자외선에 의해 증가한 사람 섬유아세포 및 각질형성세포의 11β-HSD1 발현을 억제함으로써 그에 수반하는 피부 노화 및 염증 반응을 조절하는 것으로 보인다.

이상의 결과를 통해 능실 추출물 및 분획물은 각질형성세포에서 11β-HSD1의 발현을 억제함과 동시에 자외선에 의한 ROS 생성을 효과적으로 억제함으로써 이에 수반하는 피부 염증 반응을 조절할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 능실 추출물 및 분획물은 11β-HSD1 조절을 통해 피부 염증 반응을 억제하는 기능 소재로서 유용할 것으로 기대된다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제 고유번호: HN12C0061 (A103017)).

Reference

1. D. C. Lebert and A. Huttenlocher, Inflammation and wound repair, *Semin. Immunol.*, **26**(4), 315 (2014).
2. A. Amaro-Ortiz, B. Yan, and J. A. D’Orazio, Ultraviolet radiation, aging and the skin: Prevention of damage by topical cAMP manipulation, *Molecules*, **19**(5), 6202 (2014).
3. H.-Y. Thong and H. I. Maibach, Irritant dermatitis as a model of inflammation, *Drug Discov. Today: Disease Mechanisms*, **5**(2), 221 (2008).
4. Y. Matsumura and H. N. Ananthaswamy, Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicol.*

- Appl. Pharmacol.*, **195**(3), 298 (2004).
5. A. Takashima and P. R. Bergstresser, Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network, *Photochem. Photobiol.*, **63**(4), 397 (1996).
 6. A. Pupe, R. Moison, P. D. Haes, G. Beijersbergen van Henegouwen, L. Rhodes, H. Degreef, and M. Garmyn, Eicosapentaenoic acid, a n-3 polyunsaturated fatty acid differentially modulates TNF- α , IL-1 α , IL-6 and PGE₂ expression in UVB-irradiated human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **118**(4), 692 (2002).
 7. B. Nedoszytko, M. Sokołowska-Wojdyło, K. Ruckemann-Dziurdzińska, J. Roszkiewicz, and R. J. Nowicki, Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis, *Postepy. Dermatol. Alergol.*, **31**(2), 84 (2014).
 8. I. Striz, E. Brabcova, L. Kolesar, and A. Sekerkova, Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy, *Clin. Sci. (Lond.)*, **126**(9), 593 (2014).
 9. F. Giuliano and T. D. Warner, Origins of prostaglandin E₂: involvements of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in human and rat systems, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**(3), 1001 (2002).
 10. M. Schafer and S. Werner, Oxidative stress in normal and impaired wound repair, *Pharmacol. Res.*, **58**(2), 165 (2008).
 11. C. H. Hong, S. K. Hur, O. J. Oh, S. S. Kim, K. A. Nam, and S. K. Lee, Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells, *J. Ethnopharmacol.*, **83**(1-2), 153 (2002).
 12. Y. H. Jean, W. F. Chen, C. Y. Duh, S. Y. Huang, C. H. Hsu, C. S. Lin, C. S. Sung, I. M. Chen, and Z. H. Wen, Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory and analgesic effects of the natural marine compound lemnalol from Formosan soft coral *Lemnalia cervicorni*, *Eur. J. Pharmacol.*, **578**(2-3), 323(2008).
 13. G. Rhie, M. H. Shin, J. Y. Seo, W. W. Choi, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun, and J. H. Chung, Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and noenzyme antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **117**(5), 1212 (2001).
 14. M. M. Suter, K. Schulze, W. Bergman, M. Welle, P. Roosje, and E. J. Muller, The keratinocyte in epidermal renewal and defence, *Vet. Dermatol.*, **20**(5-6), 515 (2009).
 15. T. Bito and C. Nishigori, Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways, *J. Dermatol. Sci.*, **68**(1), 3 (2012).
 16. H. Masaki, Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects, *J. Dermatol. Sci.*, **58**(2), 85 (2010).
 17. R. T. Narendhirakannan and M. A. Hannah, Oxidative stress and skin cancer: an overview, *Indian J. Clin. Biochem.*, **28**(2), 110 (2013).
 18. M. Wamil and J. R. Seckl, Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target, *Drug Discov. Today*, **12**(13-14), 504 (2007).
 19. J. S. Scott, F. W. Goldberg, and A. V. Turnbull, Medicinal chemistry of inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), *J. Med. Chem.*, **57**(11), 4466 (2014).
 20. S. Itoi, M. Terao, H. Murota, and I. Katayama, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 contributes to the pro-inflammatory response of keratinocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **440**(2), 265 (2013).
 21. M. Terao, H. Murota, A. Kimura, A. Kato, A. Ishikawa, K. Igawa, E. Miyoshi, and I. Katayama, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair, *PLoS ONE*, **6**(9), e25039 (2011).
 22. A. Tiganescu, E. A. Walker, R. S. Hardy, A. E. Mayes, and P. M. Stewart, Localization, age- and site-dependent expression, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin, *J. Invest. Dermatol.*, **131**(1), 30 (2011).

23. A. Tiganescu, A. A. Tahrani, S. A. Morgan, M. Otranto, A. Desmouliere, L. Abrahams, Z. Hassan-Smith, E. A. Walker, E. H. Rabbit, M. S. Cooper, K. Amrein, G. G. Lavery, and P. M. Stewart, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase blockade prevents age-induced skin structure and function defects, *J. Clin. Invest.*, **123**(7), 3051 (2013).
24. C. Skobowiat, R. M. Sayre, J. C. Dowdy, and A. T. Slominski, Ultraviolet radiation regulates cortisol activity in a waveband-dependent manner in human skin *ex vivo*, *Br. J. Dermatol.*, **168**(3), 595 (2013).
25. M. Schieber and N. S. Chandel, ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Current biol.*, **24**(10), 453 (2014).
26. G. E. Rhie, J. Y. Seo, and J. H. Chung, Modulation of catalase in human skin *in vivo* by acute and chronic UV radiation, *Mol. Cells*, **11**(3), 399 (2001).
27. J. W. Cha, M. J. Piao, K. C. Kim, C. W. Yao, J. Zheng, S. M. Kim, C. L. Hyun, Y. S. Ahn, and J. W. Hyun, The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes, *Biomol. Ther.* **22**(2), 136 (2014).
28. U. Wolfle, P. R. Esser, B. Simon-Haarhaus, S. F. Martin, J. Lademann, and C. M. Schempp, UVB-induced DNA damage, generation of reactive oxygen species, and inflammation are effectively attenuated by the flavonoid luteolin *in vitro* and *in vivo*, *Free Radic. Biol. Med.*, **50**(9), 1081 (2011).
29. R. E. Maldve, Y. Kim, S. J. Muga, and S. M. Fischer, Prostaglandin E(2) regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors, *J. Lipid. Res.*, **41**(6), 873 (2000).