

Alpinetin의 Dexamethasone으로 유도한 피부 노화 완화 효과

남진주·김연준·강승현[†]

코스맥스(주) R&I Center
(2016년 2월 16일 접수, 2016년 6월 7일 수정, 2016년 6월 24일 채택)

Relievable Effect of Alpinetin on Dexamethasone-Induced Skin Aging

Jin-Ju Nam, Youn Joon Kim, and Seunghyun Kang[†]

Cosmax R&I Center, Pangyo innovalley E903, 255 Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13486, Korea
(Received February 16, 2016; Revised June 7, 2016; Accepted June 24, 2016)

요약: 스테로이드 호르몬인 glucocorticoid (GC)는 glucocorticoid receptor (GR)와 결합하여 염증 유전자의 발현을 억제함으로써 강력한 항염 효과를 준다. 따라서 GR을 활성화하는 GC 제제들이 개발되어 피부염의 치료제로 사용되어 왔다. 그러나 이러한 GC 제제들은 피부 장벽 기능 저하, 진피층 두께 감소 등의 부작용을 유발하여 피부를 손상시키고 피부 노화를 유발한다. 특히 GC 성분은 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1)에 의해 활성화되어 GR의 활성을 높이는 것으로 보고되어 있다. 이에 본 연구에서는 스테로이드 제제인 dexamethasone에 의해 증가된 11 β -HSD1의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 천연 소재를 발굴하고자 하여, 초두구 추출물에서 유래한 alpinetin에서 유의한 효과가 있음을 확인하였다. Alpinetin은 진피 섬유아세포에서 dexamethasone에 의해 발현이 증가한 11 β -HSD1를 억제함과 동시에 GR의 활성 및 cortisol의 생성을 감소시켰다. 또한 사람 섬유아세포 및 3D skin model을 이용한 평가에서, alpinetin은 dexamethasone에 의한 콜라겐 감소와 진피층 두께 감소를 효과적으로 회복시켰다. 따라서, 본 연구 결과로부터 alpinetin은 11 β -HSD1의 발현 증가에 의한 피부 스트레스 및 피부 노화를 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 사료되었다.

Abstract: Steroid hormone, glucocorticoid (GC) has strong anti-inflammatory effects by binding to glucocorticoid receptor (GR) inhibiting the expression of inflammatory genes. Therefore, agents that activate the GR have been used for the treatment of dermatitis. However, the agents have side effects such as skin barrier dysfunction and dermal atrophy, inducing skin damage as well as skin aging. It has been reported that GC is activated by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) to increase the activity of the GR. This study aimed to identify natural materials that can effectively inhibit dexamethasone. We found that alpinetin isolated from *Alpinia katsumadai* extract has a significant effect on this. Alpinetin not only inhibited 11 β -HSD1 expression, but also suppressed the increase of phosphorylated GR and cortisol concentration. Alpinetin also recovered collagen expression in dexamethasone-treated dermal fibroblasts, and the reduction of dermal thickness in dexamethasone-treated 3D skin model. These results suggest that alpinetin prevents skin aging induced by the increase of 11 β -HSD1 expression.

Keywords: alpinetin, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, cortisol, glucocorticoid receptor, skin aging

[†] 주 저자 (e-mail: shyunk@cosmax.com)
call: 031)789-3260

1. 서 론

Glucocorticoid (GC)는 아토피성 피부염 등의 치료에 이용되며 염증 및 면역 반응 감소에 효과적이다[1,2]. 그러나 활성화된 GC는 체내 스트레스 반응을 일으키는 물질로서 작용하고, 피부 장벽 기능 이상과 피부 두께의 변화 등과 같은 스트레스에 의한 여러 가지 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다[3]. 부작용의 조직학적인 증상으로는 표피층이 얇아지고 표피-진피 경계부의 약화, 섬유아세포 수의 감소 및 진피층 섬유 변화 등을 관찰할 수 있다[3]. 특히 GC의 장기간 피부 노출은 체내 콜라겐 대사에 영향을 미치며, 피부에서는 콜라겐 합성이 감소되어 피부 위축에 가장 큰 원인으로 파악할 수 있다[4,5].

Cortisol은 물리적인 손상이나 정신적인 스트레스를 가할 때 사람의 체내에서 분비되는 GC의 일종으로, 인체의 성장과 발달, 대사과정 등을 조절하는 호르몬이다[6]. Cortisol은 hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis에 의해 분비되기도 하지만, 일부는 특정 효소인 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) 활성화에 의해 생성된다[7,8]. 이러한 효소 작용에 의해서 cortisol은 비활성 상태의 cortisone으로부터 활성 상태로 전환되어 체내의 신장, 심장, 폐, 피부 등과 같은 각 기관에서 생성된다[9]. 특히 피부에서 11 β -HSD1의 발현은 콜라겐 합성과 관련이 있는데, 한 예로 11 β -HSD1 억제제를 사용했을 경우에 진피 섬유아세포의 수가 증가하여 콜라겐 대사를 촉진시킨다[10].

콜라겐은 여러 종류가 존재하지만 피부 진피 속 콜라겐은 1형 콜라겐 약 80%와 3형 콜라겐 약 20%로 구성되어 피부 형태를 유지하며 피부 조직을 단단하게 지지한다[11]. 진피층의 섬유아세포가 콜라겐 단백질을 합성하여 전구 콜라겐(procollagen)을 형성한다. 세가닥의 전구 콜라겐이 서로 꼬여서 만들어진 초기 콜라겐 형태는 세포 밖으로 내보내진 후 양 끝부분인 카복시 터미널과 아미노 터미널이 효소 작용에 의해 잘려진 후 서로 결합하여 더 굵고 튼튼한 콜라겐 섬유를 형성하게 된다[12]. 콜라겐 섬유는 피부의 구조와 형태를 유지하는데 필수적인 존재이며, 진피층의 대부분을 차지함으로써 피부에 단단한 강도와 탄력을 제공한다[12]. 따라서 피부 노화가 진행되어 주름이 발생하

거나 탄력이 감소했다는 것은 피부의 주 구성 단백질인 콜라겐의 양이 감소 혹은 변형되었다는 것을 의미한다[13].

노화가 진행된 피부 조직에는 11 β -HSD1의 활성 및 발현이 증가되어 있다[14,15]. 특히 여성의 폐경 후 피부 조직에서는 11 β -HSD1의 발현이 상당히 증가되어 있고, 자외선에 의해 광노화가 진행된 피부에서는 자외선으로부터 보호된 피부에 비해 11 β -HSD1의 활성이 약 4배 이상 증가하는 것으로 나타났다[15]. 또한, 11 β -HSD1 knockout 마우스에서는 노화에 따른 진피 콜라겐 감소가 나타나지 않았다[15].

GC의 피부 도포는 콜라겐 대사를 변화시켜 콜라겐 생성을 감소시켜 피부 위축을 일으키게 되는데[4,16], 이러한 부작용을 완화하기 위해 11 β -HSD1의 선택적 저해제를 이용하면 콜라겐 생성을 유도할 수 있다[10]. 또한 노화가 진행됨에 따라서 11 β -HSD1의 활성 및 발현이 감소한다는 사실과 종합하여 본 결과, 본 저자들은 cortisol과 같은 GC에 의한 콜라겐 소실, 즉 피부 노화의 원인으로서 11 β -HSD1에 주목하였다. 따라서 대표적인 스테로이드 제제인 dexamethasone을 이용하여 11 β -HSD1의 발현을 유도한 후 이를 억제하는 소재를 발굴하고자 하였다. 그 결과, 초두구 추출물 및 그 활성성분인 alpinetin이 11 β -HSD1의 발현 증가를 현저하게 억제함을 확인하였고, 이를 바탕으로 alpinetin이 진피 콜라겐 발현에 주는 영향을 확인함으로써 항노화 기능성 소재로서의 이용 가능성을 알아보하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 시료의 제조

Alpinetin (98%, ChemFaces, Wuhan, China)을 DMSO에 1%로 용해하여 실험에 사용하였다. 또한, 11 β -HSD1의 선택적 저해제로써 PF915275 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 alpinetin의 11 β -HSD1 저해에 의한 피부 노화 완화 효과를 비교 분석하였다.

2.2. 세포 배양

사람 섬유아세포주인 Hs68은 America type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구매하였

Table 1. Primers used for RT-PCR

Gene	Direction	Sequence (5'-3')	Size (bp)
11 β -HSD1	Forward	AAGCAGAGCAATGGAAGCAT	108
	Reverse	GAAGAACCCATCCAAAGCAA	
Type 1 procollagen	Forward	CTCGAGGTGGACACCACCT	372
	Reverse	CAGCTGGATGGCCACATCGG	
β -actin	Forward	GGCCATCTCTTGCTCGAAGT	312
	Reverse	GAGACCTTCAACACCCAGC	

으며 10%의 fetal bovine serum (FBS, ATCC, Rockville, MD, USA)와 1%의 antibiotic/antimycotic (AA, ATCC, Rockville, MD, USA)을 첨가한 DMEM (HyClone, Logan, UT, USA)을 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세포 배양 배지는 48 h 마다 새로운 배지로 교체하였고, 2 ~ 3일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2.3. MTT 분석을 이용한 세포 생존율 측정

Alpinetin의 Hs68 cell에 대한 독성 평가를 위해 MTT assay를 수행하였다. Hs68 cell은 96-well plate에 4×10^4 cells/well로 분주하여 24 h 후에 혈청제거 배지로 교환한 후, dexamethasone 1 μ M과 alpinetin을 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/mL 농도로 처리하여 24 h 배양하였다. 이후에 0.5 μ g/mL 농도의 MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 용액 20 μ L을 각각의 well에 첨가하고 4 h 동안 결정화한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 용해하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. mRNA 발현 조사(Real Time PCR, RT-PCR)

사람 섬유아세포인 Hs68을 6-well plate에 4×10^5 cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 배양하였다. 그 후 1 μ M의 dexamethasone과 PF915275, 혹은 alpinetin을 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24 h 동안 추가 배양하였다. Total RNA를 추출하기 위해 각 well에 RNA iso (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) 1 mL를 첨가하고 얼음 위에서 5 min 방치하여 세포를 용해시키고 chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 200 μ L를 첨가하여 14,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리하였다. 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮기고 같은 양의 isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 첨가한 후 14,000 rpm

에서 10 min 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 99% 에탄올(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 이용하여 7,500 rpm에서 원심분리하여 2회 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate (DEPC) water (Ambion, Austin, TX, USA)에 녹였다. Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용해 RNA를 정량하였고 total RNA 2 μ g을 DEPC와 함께 70 °C에서 5 min 동안 가열시킨 후 reverse transcription premix (ELPIS-Biotech, Daejeon, Korea)에 넣고 최종 부피가 20 μ L가 되도록 하였다. 42 °C 에서 55 min, 70 °C에서 15 min 동안 반응시켜 cDNA를 합성하여 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. 얻어진 cDNA로부터 11 β -HSD1, MMP-1, 3, 9, IL-6, 8을 증폭시키기 위해 5배 희석시킨 cDNA 2 μ L를 primer 1 μ L, DEPC 7 μ L, SYBR Green master mix (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 10 μ L와 함께 StepOne Plus RT-PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, 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.

2.5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

사람 섬유아세포인 Hs68을 12-well plate에 2×10^5 cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 배양하였다. 그 후 1 μ M의 dexamethasone과 PF915275, 혹은 alpinetin을 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24 h 동안 추가 배양하였다. 배양이 끝난 배지의 상층액을 이용하여 효소결합 면역결합 흡착법을 cortisol ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), Type 1 procollagen EIA kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)의 시료로 사용하여 시행한 후 450 nm에서 측정하였다.

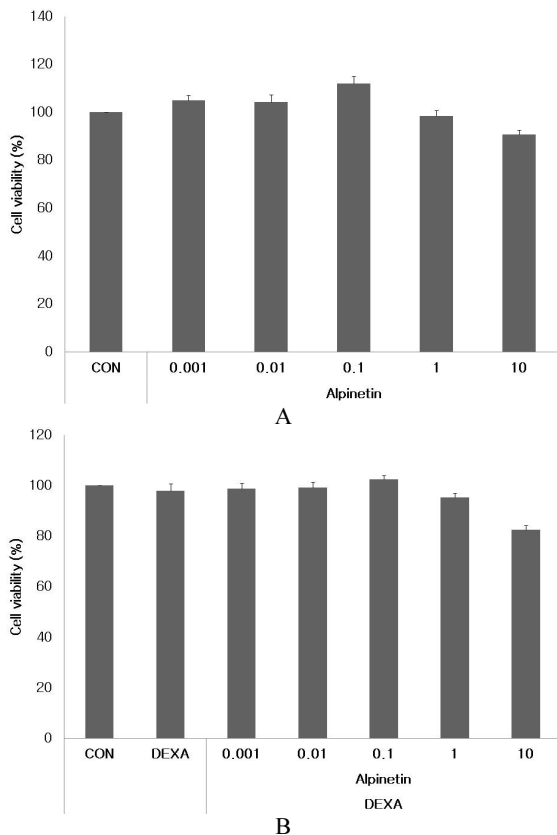


Figure 1. Effect of alpinetin on cell toxicity. (A) Hs68 cells were treated with 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 µg/mL of alpinetin for 24 h. (B) Hs68 cells were treated with dexamethasone (1 µM) and 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 µg/mL of alpinetin for 24 h. The cell viability was measured by MTT assay. CON: non-treated control, DEXA: dexamethasone-treated control

2.6. Western Blot

사람 섬유아세포인 Hs68을 6-well plate에 4×10^5 cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 동안 배양하였다. 그 후 1 µM의 dexamethasone과 PF915275, 혹은 alpinetin을 처리한 FBS가 첨가되지 않은 배지를 사용하여 48 h 동안 추가 배양하였다. 배양한 세포를 회수하여 radioimmuno precipitation assay (RIPA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) buffer를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 Bradford assay 방법에 따라 정량한 후, sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)하여 분리하였다. 전기영동 후 단백질을 gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 PVDF (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)막으

로 transfer한 뒤, 항체를 결합하여 타겟 단백질을 표지하고 사진 촬영하였다.

2.7. 3D 인공피부 조직배양

Normal human 3D model (Epiderm-FT, MatTek Corporation, Ashland, MA, USA)를 gentamicin B (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) 5 µg/mL, amphotericin B (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) 0.25 µg/mL이 포함된 growth media (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA)에 24 h 동안 안정화한 후 UVA 40 J을 조사한 뒤 배지에 dexamethasone과 PF915275, 혹은 alpinetin을 첨가하였다. 48 h 동안 배양 후 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 통해 진피 두께 변화를 확인하였다.

2.8. 11β-HSD1 유전자 Silencing

사람 섬유아세포인 Hs68을 6-well plate에 80% 이상 배양한 후 항생제 무첨가 DMEM을 이용하여 씻어내었다. 3% Lipofectamin 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 1% 11β-HSD1 siRNA (Ambion, Austin, TX, USA)를 함유한 Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 24 h 추가 배양하여 11β-HSD1 유전자를 silencing 하였다. 11β-HSD1 siRNA의 염기서열은 정방향 5'-CCACUCUUCUGAUCAGAAAAtt-3'과 역방향 5'-UUUCUGAUCAGAAGAGUGGtc-3'을 사용하였다.

2.9. 통계처리

결과는 means ± SEM로 나타냈고, 모든 통계분석은 student's *t*-test를 실시하여 평가하였다. 두군 간의 차이에 의한 통계적 검정 후 *p* 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미 있는 차이가 있다고 판단하였다.

3. 결 과

3.1. 세포 독성 평가

Alpinetin이 섬유아세포에 주는 영향을 보기 위해 dexamethasone 처리 여부에 따른 세포 생존율을 평가하였다. Dexamethasone을 처리하지 않고 alpinetin을 섬유아세포에 처리한 경우에 처리 농도 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 µg/mL에 대해서 어떠한 세포 독성을 나타내지 않았다(Figure 1A). 이어 dexamethasone을 처리한 후 al-

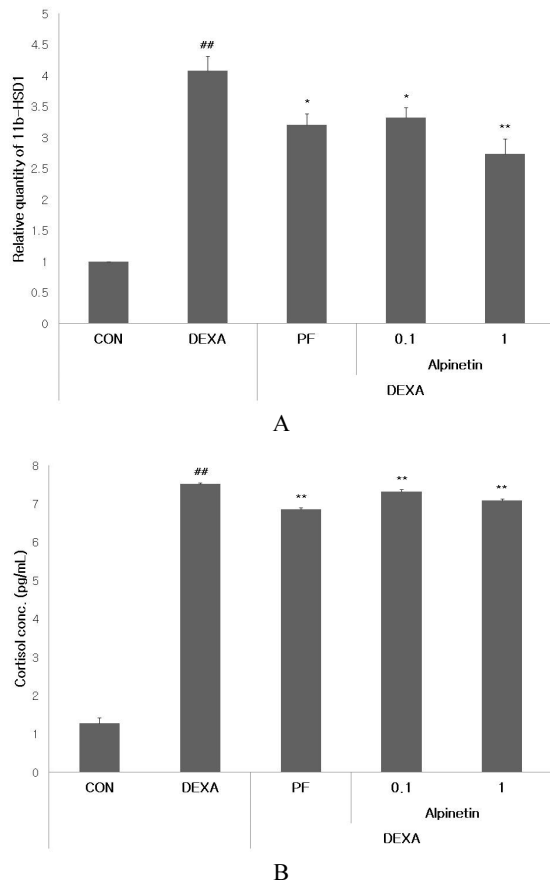


Figure 2. Alpinetin inhibited the increase of 11 β -HSD1 and cortisol in dexamethasone-treated Hs68 cells. (A) mRNA level of 11 β -HSD1 (B) cortisol concentration was measured by RT-PCR and ELISA respectively. Hs68 cells were treated with dexamethasone (1 μ M) and alpinetin (0.1 μ g/mL or 1 μ g/mL) for 24 h. ^{##} $p < 0.01$ indicate a significant difference from the non-treated control. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ indicate a significant difference from the dexamethasone-treated control. CON: non-treated control, DEXA: dexamethasone-treated control, PF: PF915275 (1 μ M), 11 β -HSD1 selective inhibitor

pinetin을 처리하였을 때, dexamethasone에 의한 세포 독성 또한 보이지 않았으며, alpinetin의 모든 처리 농도에서 세포 활성이 정상적임을 확인하였다(Figure 1B).

3.2. 11 β -HSD1 발현 및 Cortisol 생성 억제 효과

Dexamethasone에 의해 증가되는 11 β -HSD1에 대한 조절 효과를 보기 위해, dexamethasone을 처리한 섬유아세포에 alpinetin을 처리하여 11 β -HSD1의 발현량과

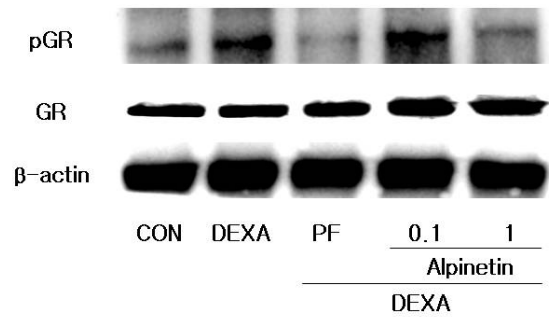


Figure 3. Alpinetin inhibited the phosphorylated GR (pGR) in dexamethasone-treated Hs68 cells. pGR was measured by western blot. Hs68 cells were treated with dexamethasone (1 μ M) and alpinetin (0.1 μ g/mL or 1 μ g/mL) for 24 h. CON: non-treated control, DEXA: dexamethasone-treated control, PF: PF915275 (1 μ M), 11 β -HSD1 selective inhibitor

cortisol 생성량을 측정하였다.

그 결과 섬유아세포에 대한 dexamethasone의 처리가 11 β -HSD1의 mRNA 발현과 cortisol의 생성을 유의하게 증가시킴을 확인하였다. 이어 alpinetin 1, 10 μ g/mL의 농도로 24 h 처리하였을 때, 11 β -HSD1의 mRNA 발현과 cortisol의 생성량이 모든 시료에서 dexamethasone에 의한 발현 증가를 현저히 억제시킴을 보였다(Figure 2A, B).

3.3. Glucocorticoid Receptor 활성 저해 효과

Cortisol과 반응하여 활성화되는 GR에 대해 alpinetin의 조절 효과를 평가하기 위해 dexamethasone을 처리한 섬유아세포에 각 시료를 처리하여 GR의 인산화 정도를 측정하였다. Dexamethasone 처리에 따라 GR의 활성화를 확인하였고, 각 시료는 GR의 활성화를 억제시킴을 나타냈다(Figure 3).

3.4. Type 1 Procollagen 생성 회복 효과

다음으로 dexamethasone에 의해 발현이 저해되는 collagen의 회복 효능을 보기 위해, dexamethasone을 처리한 섬유아세포에 alpinetin을 처리하여 type 1 procollagen에 대한 발현량을 측정하였다.

Dexamethasone을 처리함에 따라 type 1 procollagen의 mRNA 및 단백질 발현의 감소를 확인하였고, alpinetin 1, 10 μ g/mL의 농도로 24 h 처리하였을 때, type 1 procollagen의 발현 저해를 유의하게 회복시킴을 확

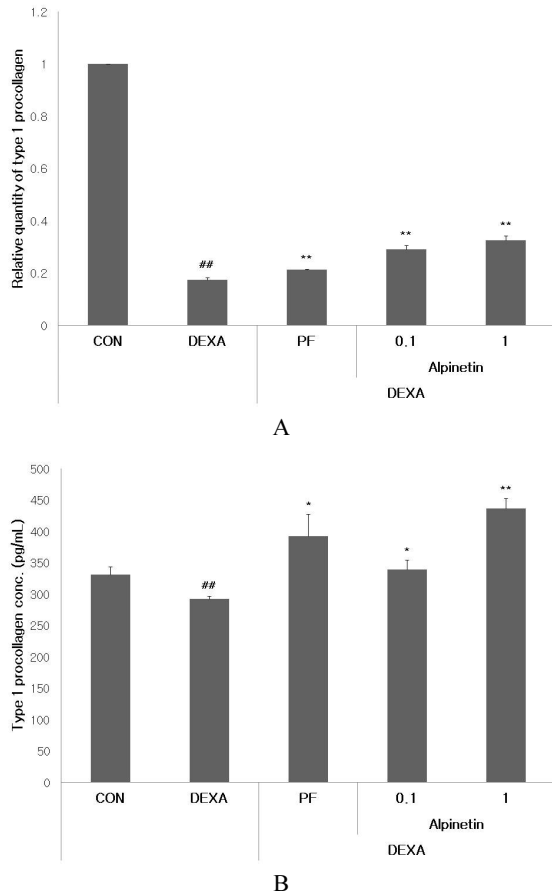


Figure 4. Alpinetin inhibited the decrease of type 1 procollagen in dexamethasone-treated Hs68 cells. (A) mRNA level (B) protein level of type 1 procollagen was measured by RT-PCR and ELISA respectively. Hs68 cells were treated with dexamethasone (1 μ M) and alpinetin (0.1 μ g/mL or 1 μ g/mL) for 24 h. ^{##}*p* < 0.01 indicate a significant difference from the non-treated control. ^{*}*p* < 0.05, ^{**}*p* < 0.01 indicate a significant difference from the dexamethasone-treated control. CON: non-treated control, DEXA: dexamethasone-treated control, PF: PF915275 (1 μ M), 11 β -HSD1 selective inhibitor

인하였다(Figure 4A, B).

3.5. 3D Skin Model에서의 진피두께 회복 효과

동물 실험 대체 실험법으로서 최근 주목되는 3D skin model을 이용하여 초두구와 alpinetin의 노화 억제 효과를 확인하였다. Dexamethasone을 처리한 피부 조직을 H&E 염색하여 진피 두께 변화를 확인하였다. 그 결과, dexamethasone 처리에 의해 두께가 얇아진 진피 층이 alpinetin에 의해 회복됨을 확인하였다(Figure 5).

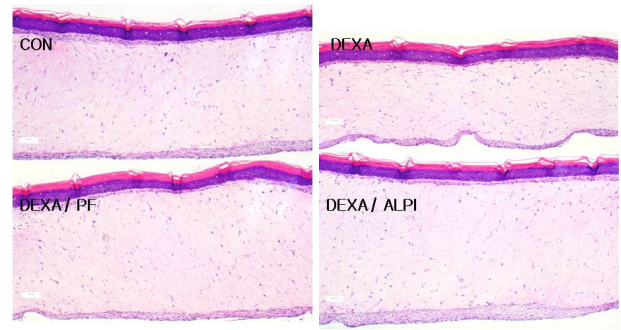


Figure 5. Alpinetin recovered the decrease of dermal thickness in dexamethasone-treated 3D skin. Dermal thickness was measured by H&E staining. 3D skin was treated with dexamethasone (1 μ M) and alpinetin (1 μ g/mL) for 48 h. CON: non-treated control, DEXA: dexamethasone-treated control, PF: PF915275 (1 μ M), 11 β -HSD1 selective inhibitor, ALPI: alpinetin (1 μ g/mL)

3.6. 11 β -HSD1의 Type 1 Procollagen 발현 조절 효과

이상의 실험 결과를 바탕으로 11 β -HSD1이 type 1 procollagen의 발현에 직접적인 영향을 미치는지 알아 보았다. 11 β -HSD1 siRNA를 transfection하여 11 β -HSD1 유전자를 knockout시킨 섬유아세포에서 type 1 procollagen의 발현양을 측정하였다.

그 결과, 11 β -HSD1 유전자가 knockout된 실험군에서 dexamethasone을 처리하였을 때 type 1 procollagen의 mRNA 발현 감소 정도가 미미하였고, alpinetin을 처리하였을 때 또한 그 회복효과가 뛰어나지 않음을 확인하였다(Figure 6A, B).

4. 결론 및 고찰

표피, 진피, 멜라닌 형성세포 및 모공 등의 주요 피부 기관은 스트레스 호르몬인 GC, 대표적으로 cortisol을 합성한다[17]. 또한 피부에서는 11 β -HSD1과 11 β -HSD2가 발현되며, 이 효소들을 통해 cortisol의 활성을 조절한다[9,10,14,15]. GC는 인체 내에서 체내 항상성과 관련된 다양한 대사 질환에도 영향을 미치는데, 피부에서는 염증 반응이 일어날 시에 GC 분비가 증가함으로써 초기 단계의 손상을 예방해주는 역할을 담당하여 항염증 약물로 널리 이용된다[18]. 하지만 GC 제제의 사용은 피부의 형태 및 기능에 해로운 부작용을 일으킬 뿐만 아니라 피부 노화에도 부정적인 영향을 미

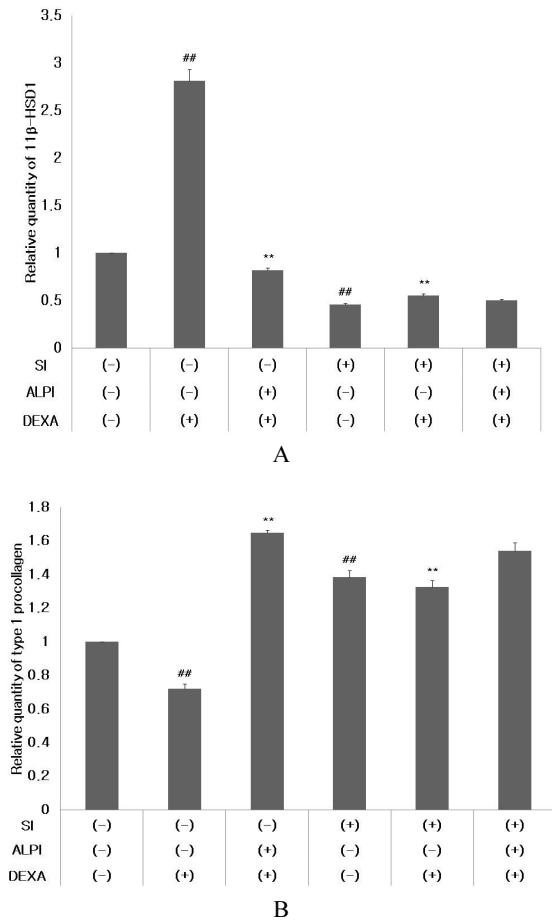


Figure 6. Change of type 1 procollagen mRNA expression in 11β-HSD1 knockout Hs68 cells. mRNA expressions of (A) 11β-HSD1 and (B) type 1 procollagen were measured in 11β-HSD1 knockout Hs68 cells. 11β-HSD1 siRNA was transfected in Hs68 cells for 24 h. Alpinetin (10 μg/mL) slightly increased mRNA expression of type 1 procollagen in dexamethasone treated 11β-HSD1 knockout Hs68 cells. SI: 11β-HSD1 siRNA, ALPI: alpinetin (1 μg/mL), DEXA: dexamethasone (1 μM). ^{##}*p* < 0.01 indicate a significant difference from the non-treated control. ^{**}*p* < 0.01 indicate a significant difference from dexamethasone-treated control.

친다[3-5]. 또한 11β-HSD1의 발현이, 노화된 피부 조직이나 진피 섬유아세포에서 증가되어 있다는 보고를 통해 11β-HSD1에 의해 활성이 증가한 GC가 피부 노화에 악영향을 미친다는 사실을 알 수 있다[14,15].

따라서 본 저자 등은 11β-HSD1을 타겟으로 이를 조절하는 새로운 항노화 소재를 발굴하고자 하였다. 문헌적으로 피부 노화에 효과가 있는 것으로 보고된

약 300여 종의 천연물 소재를 확보한 후 섬유아세포에서 대표적인 스테로이드 제제인 dexamethasone을 이용하여 유발된 11β-HSD1의 발현을 조절하는 소재를 스크리닝하였다. 그 결과, 70%의 에탄올로 추출한 초두구 추출물에서 dexamethasone으로 유도한 11β-HSD1의 발현 증가를 현저히 억제함을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 11β-HSD1의 억제제로 발굴된 초두구 추출물에 대해 활성 성분을 문헌 검색을 해본 결과 [19], 단일물질인 alpinetin을 발굴할 수 있었고, alpinetin에 대해 섬유아세포에서 GC에 의한 피부 노화 반응에 주는 영향을 평가함으로써, 항노화 소재로서 *in vitro* 효능을 확인하고자 하였다.

먼저 dexamethasone으로 11β-HSD1의 발현을 유도한 경우에 alpinetin은 mRNA 수준에서 농도 의존적으로 11β-HSD1를 효과적으로 억제함과 동시에, 분비가 증가된 cortisol의 생성을 억제시켰다. 다음으로 GC와 결합하는 수용체인 GR의 활성에 주는 영향을 확인한 결과, alpinetin은 dexamethasone에 의해 활성화되어 인산화된 GR (pGR)의 단백질 발현을 농도 의존적으로 유의하게 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 다만, 비활성 GR의 발현은 dexamethasone에 의해 증가하거나 alpinetin에 의해 감소됨이 뚜렷하지 않아, GR의 활성화에만 영향을 미치는 경향을 보였다. 한편, GC에 의해 그 생성이 감소하는 콜라겐에 대한 평가에서 alpinetin은 dexamethasone에 의해 감소한 type 1 procollagen의 발현을 mRNA 수준과 단백질 수준 모두에서 농도 의존적으로 유의하게 회복시키는 효과를 보였다. 이상의 결과를 종합해 보면, 먼저 alpinetin은 11β-HSD1을 조절하는 효과가 활성화된 GR을 조절하는 효과와 일치하였고, 이어 type 1 procollagen의 발현 회복에도 효과적인 결과를 보였다. 또한 alpinetin의 dexamethasone에 반한 항노화 효과는 그 농도가 높아짐에 따라 증가하는 것으로 판단되며, 11β-HSD1의 선택적 저해제인 PF915275의 11β-HSD1 발현 저해능 및 11β-HSD1 저해에 의한 type 1 procollagen의 회복능과 동등한 효과를 보였다.

앞서 *in vitro* 결과를 바탕으로 dexamethasone에 의한 피부 노화 반응의 저해 효과가 우수한 alpinetin에 대해 3D skin model을 이용한 노화 억제 효과를 평가하였다. 그 결과, dexamethasone에 의해 진피층의 두께가 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, alpinetin은 11β-HSD1

의 저해제인 PF915275와 대등한 수준으로 진피 두께를 회복시켰다. 본 저자 등은 표피와 진피로 이루어진 3D skin model에서 dexamethasone 처리 시에 노화된 피부와 유사하게 진피층이 소실됨을 확인하고, 본 연구에 활용하였다.

이상의 결과를 통해 alpinetin은 dexamethasone에 의해 증가한 11 β -HSD1의 발현을 억제함과 동시에 피부 노화의 대표적인 반응인 콜라겐 감소를 효과적으로 회복시킬 수 있음을 확인하였다. 아울러 11 β -HSD1을 knockout한 섬유아세포에서 type 1 procollagen의 발현이 유의하게 증가된 것으로 보아 11 β -HSD1의 조절이 collagen 생성을 통한 피부 항노화에 대한 새로운 타겟이 될 수 있음을 확인하였다. 또한, 11 β -HSD1을 knockout한 섬유아세포는 dexamethasone에 의한 type 1 procollagen의 발현 감소가 제대로 일어나지 않을 뿐만 아니라 alpinetin의 type 1 procollagen 발현 회복능도 미미함을 확인하였다. 따라서, 초두구 추출물로부터 파생된 유효성분인 alpinetin은 11 β -HSD1 조절을 통해 피부 노화를 억제하는 기능성 소재로서 활용이 가능하다고 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 중소기업청 월드클래스300 R&D 사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다 (과제 고유번호: S2341055).

Reference

1. L. M. Sevilla, V. Latorre, A. Sanchis, and P. Pérez, Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation, *J. invest. dermatol.*, **133**(2), 361 (2013).
2. R. Jeziorkowska, A. Sysa-Jęrzejowska, and Z. Samochocki, Topical steroid therapy in atopic dermatitis in theory and practice, *Postep. Derm. Alergol.*, **32**(3), 162 (2015).
3. U. R. Hengge, T. Ruzicka, R. A. Schwartz, and M. J. Cork, Adverse effects of topical glucocorticosteroids, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **54**(1), 1 (2006).
4. P. Nuutinen, R. Riekkii, M. Parikka, T. Salo, P. Autio, J. Risteli, and A. Oikarinen, Modulation of collagen synthesis and mRNA by continuous and intermittent use of topical hydrocortisone in human skin, *Br. J. Dermatol.*, **148**(1), 39 (2003).
5. S. J. Choi, A. R. Cho, S. J. Jo, S. T. Hwang, K. H. Kim, and O. S. Kwon, Effects of glucocorticoid on human dermal papilla cells *in vitro*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **135**, 24 (2013).
6. D. Y. Lee, E. Kim, and M. H. Choi, Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress, *BMB Rep.*, **48**(4), 209 (2015).
7. R. W. Hunter and M. A. Bailey, Glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: mechanisms for hypertension, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **21**, 105 (2015).
8. A. Odermatt and P. Klusonova, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1: regeneration of active glucocorticoids is only part of the story, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **151**, 85 (2015).
9. K. Chapman, M. Holmes, and J. Seckl, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gatekeepers of tissue glucocorticoid action, *Physiol. Rev.*, **93**(3), 1139 (2013).
10. M. Terao, M. Tani, S. Itoi, T. Yoshimura, T. Hamasaki, H. Murota, and I. Katayama, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 selective inhibitor increased dermal collagen content and promotes fibroblast proliferation, *PLOS ONE*, **9**(3), e93051 (2014).
11. E. C. Naylor, R. E. B. Watson, and M. J. Sherratt, Molecular aspects of skin ageing, *Maturitas*, **69**(3), 249 (2011).
12. A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, Extracellular matrix structure, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **97**, 4 (2015).
13. J. Varani, P. Perone, S. E. G. Fligiel, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis, *J. Invest. Dermatol.*, **119**(1), 122 (2002).
14. 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).
15. A. Tiganescu, E. A. Walker, R. S. Hardy, A. E. Mayes, and P. M. Stewart, Localization, age- and site-dependent expression, and regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin, *J. Invest. Dermatol.*, **131**(1), 30 (2011).
16. A. Oikarinen, K. M. Haapasaari, M. Sutinen, and K. Tasanen, The molecular basis of glucocorticoid-induced skin atrophy: topical glucocorticoid apparently decreases both collagen synthesis and the corresponding collagen mRNA level in human skin *in vivo*, *Br. J. Dermatol.*, **139**, 1106 (1998).
17. I. Jozic, O. Stojadinovic, R. S. Kirsner, and M. Tomic-Canic, Stressing the steroids in skin: paradox or fine-tuning?, *J. Invest. Dermatol.*, **134**(12), 2869 (2014).
18. C. Surber, P. H. Itin, A. J. Bircher, and H. I. Maibach, Topical corticosteroids, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **32**(6), 1025 (1995).
19. C. Haijin, M. Xiaodong, Y. Jinlong, and H. Zonghai, Alpinetin attenuates inflammatory responses by interfering toll-like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice, *Int. Immunopharmacol.*, **17**(1), 26 (2013).