

각질형성세포에서 Fisetin의 피부장벽 기능 개선 및 항노화 효능 검증

이 경 하¹ · 김 완 일^{2,†}

¹대구한의대학교 화장품공학부, 교수

²대구한의대학교 화장품공학부, 교수

(2020년 10월 5일 접수, 2020년 11월 20일 수정, 2020년 12월 11일 채택)

Roles of Fisetin on Skin Barrier Function and Anti-aging in Epidermal Keratinocyte

Kyung-Ha Lee and Wanil Kim[†]

Department of Cosmetic Science and Technology, Daegu-Haany University, Haany-Daero 1, Gyeongsan 38610, Korea
(Received October 5, 2020; Revised November 20, 2020; Accepted December 11, 2020)

요 약: 플라보노이드(flavonoid)는 식물 등의 대사체에서 유래한 폴리페놀 계열의 화합물이며, 다양한 인체생리작용을 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이중 3,3',3',7-tetrahydroxyflavone (fisetin)은 다양한 과일과 채소에서 발견되며, 최근 노쇠용해(senolytic) 활성을 통해 특정 조직의 기능을 회복시킨다는 것이 알려졌다. 본 연구에서는 인간 표피 각질세포를 대상으로 하여 fisetin의 피부장벽 유전자 발현 조절 및 항노화 효능을 분석하였다. Fisetin은 말단소립 역전사효소(telomerase)의 활성을 증가시켰으며, *CDKN1B* 유전자의 발현을 감소시켰다. 또한 피부장벽을 구성하는 주요 유전자인 *KRT1*, *FLG*, *IVL*, *DSP*의 발현을 증가시켰으며, 세라마이드 합성효소의 일종인 *CerS3*, *CerS4* 유전자의 발현을 증가시켰다. 이러한 결과는 fisetin의 효능이 노쇠용해에 국한되지 않고 인간 각질세포의 다양한 생리학적 조절에도 관여함을 보여준다. 따라서 fisetin은 화장품 및 의약품 등의 생리활성 조절물질로 활용될 수 있다고 사료된다.

Abstract: Flavonoids are polyphenolic compounds derived from plants metabolites and are known to be capable of controlling various human physiological functions. Among them, fisetin (3,3', 3', 7-tetrahydroxyflavone) is found in various fruits and vegetables, and it has been recently known to restore the function of certain tissues through senolytic activity. In this study, targeting human epidermal keratinocytes, control of skin barrier genes and antioxidant efficacy of fisetin were analyzed. Fisetin increased the activity of telomerase and decreased the expression of *CDKN1B*. In addition, it increased the expression of *KRT1*, *FLG*, *IVL*, and *DSP*, which are main genes that make up the skin barrier. The fisetin also increased the expression of *CerS3* and *CerS4* genes, which are forms of ceramide synthases. These results show that the efficacy of fisetin is not limited as senolytics but is also involved in various physiological regulation of human keratinocytes. Therefore, we consider that fisetin could be used as an active ingredient in cosmetics and pharmaceuticals.

Keywords: *fisetin*, *senolytics*, *keratinocyte*, *skin barrier*, *anti-aging*

† 주 저자 (e-mail: wkim@dhu.ac.kr)
call: 053-819-7726

1. 서 론

생물자원탐사(bioprospecting)는 식물 및 미생물을 포함하는 다양한 생물자원에서 유래하는 생리활성 인자를 탐색하는 방법론이다. 화장품에 사용되는 생리활성소재의 다수는 천연물에서 유래하였으며, 천연소재는 합성소재에 비해 다양한 이점을 가지므로 산업계에서 적극적으로 활용된다 [1]. 곰팡이류에서 추출할 수 있는 lactic acid와 ceramide, 세균에서 추출할 수 있는 alpha-cyclodextrin과 surfactin C, 조류에서 추출할 수 있는 카로티노이드계 색소(astaxanthin, β -carotene, fucoxanthin) 등이 대표적이다[2]. 본 연구에서 주목한 소재는 생물자원 유래의 생리활성소재인 피세틴(fisetin, 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone)으로 딸기, 사과, 포도 등을 포함하는 다양한 종류의 과일과 채소에 존재하는 플라보놀(flavonol)의 일종이다.

Fisetin은 항노화 효능을 가지는 것으로 잘 알려져 있는데, 이는 fisetin이 항산화(antioxidant) 활성과 노쇠용해(senolytics) 활성을 가지기 때문이다[3]. 노화는 점진적인 신체 기능의 상실 및 사망률의 증가로 정의할 수 있으며, 모든 생명체가 경험하는 되돌릴 수 없는 현상이다. 개체 혹은 조직의 노화는 노화세포(senescent cells)의 발생으로 진행되며, 따라서 노화세포의 발생을 억제하거나 이미 생성된 노화세포의 제거를 통해 이를 극복할 수 있다. 노화세포는 모든 다세포생물에서 자연스럽게 발생하며 개체의 일부 생리활동에 필수적이다. 특히 상처의 치유 및 조직의 재개편 등의 과정에서 면역세포를 유도하는 기능을 담당하며, 암세포의 생성을 막아주는 근본적인 대책 중의 하나가 체세포 노화가 될 수 있다. 하지만 노화세포의 지속적인 발생은 조직의 완전성을 손상시켜, 지속적인 유해효과를 주변에 가하게 된다(senescence-associated secretory phenotype, SASP). 따라서 노화세포의 존재는 주변 세포의 만성적인 염증반응 유도 및 암세포의 발생 등과 같은 결과를 낳을 수 있으므로 노화세포를 제거하는 것이 항노화의 새로운 전략이 될 수 있다[4]. 노쇠용해물질(senolytics)은 노화세포만을 선별적으로 불활성화시키는 소재로 정의되며, 최근 의약품으로서의 가능성이 활발하게 논의되고 있다. 하지만 이러한 소재를 화장품 기능성 원료로 활용하는 움직임은 미진한 편이며, 본 연구의 수행을 통해 이를 보완하고자 한다.

Fisetin은 사과, 포도, 딸기, 오이 등의 다양한 채소와 과일에 존재하는 플라보노이드의 일종이며 항암, 항산화, 항

염증 등과 같은 다양한 이점을 가지지만 부작용은 거의 없는 것으로 보고된다[5,6]. 2017년 처음으로 노화된 인간 제정맥혈관내피세포(umbilical vein endothelial cells)만을 선별적으로 사멸시킴이 밝혀졌다[7]. 하지만 이러한 활성은 폐의 섬유아세포 및 지방세포에서는 관찰되지 않았으므로 fisetin은 세포의 종류에 특이적인 노쇠용해물질이며, 높은 특이성을 가지고 있다.

Fisetin은 항산화제(antioxidant)로 작용하여 자유라디칼(free radicals)을 소거할 수 있는 능력이 있는 것으로도 잘 알려져 있는데[8, 9], 주로 원형질막에 고르게 분포하여 인지질의 산화를 막아준다. Fisetin은 세포 내 다양한 단백질 및 효소를 표적화하며, 대상은 다음과 같다; TSC1 · TSC2, mTOR, Wnt, ERK, PI3K, AMPK α · β · γ , I κ B α [3]. Fisetin의 잘 알려진 생체 내(*in vivo*) 효능으로는 폐암과 전립선암의 성장억제가 있으며[10-12], 탁월한 신경보호효능(neuroprotective effects)이 보고되었다[13,14].

본 연구에서는 천연물에서 유래한 노쇠용해 후보물질 중의 하나인 fisetin의 피부세포 효능을 분석하였으며, 이를 화장품이나 의약품의 생리활성물질로 활용할 수 있는 방향에 대해 논하고자 한다. 노쇠용해 효능이 있는 fisetin을 피부에 적용하는 방안에 대한 논의는 최근에 증가하고 있으며, 진피 섬유아세포 등에 관한 효능이 일부 밝혀진 바가 있다[15]. 하지만 각질세포를 대상으로 하는 연구는 미진한 편이며, 본 연구에서는 fisetin의 처리에 의한 표피 각질세포의 피부기능 변화 및 노화 관련 유전자 발현의 변화를 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포 배양(Mammalian Cell Culture)

인간 표피각질세포주의 일종인 HaCaT(Fisher Scientific, USA) 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA), 1% penicillin/streptomycin을 배합한 배지에 의해 배양되었으며, 5% CO₂를 지속해서 공급하는 37 °C 배양기(MCO-230AICUVL-PA, PHCbi, USA) 내에서 유지되었다. 세포독성을 시험하기 위해 HaCaT 세포는 96 well plate 위에서 배양되었으며, 90% 이상 성장하였을 때 (90% of visual confluency) fisetin을 처리하였다. Fisetin (Tokyo Chemical Industry Co., Japan)은 48 h 동안 처리하였으며, 이후 배양액을 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS, 인

트론바이오, Korea)로 3 회 세척하였다. 다음으로 CCK-8 용액 (CK04, Dojindo Molecular Technologies, USA)을 10 μ L 추가한 후에 3 h 동안 37 °C에서 반응을 시켰다. 이후 450nm에서의 흡광도(Infinite 200 Pro, Tecan, Switzerland)를 측정하여 세포의 생존율을 결정하였다.

2.2. 말단소립 역전사효소 활성 측정(Telomerase Repeats Amplification Protocol)

1 μ g/mL의 fisetin을 HaCaT 세포에 48 h 동안 처리한 후 수거하여 NP-40 buffer (10 mM tris-HCl pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25 mM sodium deoxycholate, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM AEBSF)에 1,000 cells/ μ L 농도로 세포를 용해했다. 30 min 이후 1 μ L의 반응액을 100 ng/ μ L ACX(5'-GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACCT-3'), 100 ng/ μ L NT(5'-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3')와 반응시킨 후, 다음의 PCR 반응이 수행하였다. 말단소립역전사 효소반응은 25 °C에서 20분간 수행하였으며, 이후 반응물을 95 °C에서 10분 간 불활성화 하였다. 이후 40회의 PCR 반응을 통해 생성물을 증폭하였다. (95 °C - 20 s, 50 °C - 30 s, and 72 °C - 90 s).

2.3. 유전자발현 분석(Quantitative Realtime PCR)

대상 세포의 RNA는 TRIzol (ThermoFisher Scientific, USA)에 의해 제조사에서 권장하는 방법에 의해 정제되었

다. 이후 100ng의 RNA를 iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 cDNA 합성하였으며, TaqMan Universal PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하여 정량 분석하였다. Real-Time PCR System (QuantStudio 3, ThermoFisher Scientific, USA)을 사용하였으며, 각 대상 유전자의 Probe는 Universal Probe Library (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

2.4. Primer 서열정보

본 연구에서 분석한 유전자의 Primer 정보는 다음과 같다. Universal Probe Library의 번호를 병기하였다.

2.5. 통계분석

본 연구를 통해 수집된 결과는 Student's *t*-test를 통해 유의성을 검증하였다. (* *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.005, **** *p* < 0.0001, ns: non-significant)

3. 결과 및 고찰

3.1. Fisetin의 세포독성 분석

Fisetin은 다양한 종류의 과일 및 채소에서 발견되며 높은 생리활성을 가지는 플라보놀(flavonol)의 일종이며, 폴리페놀(polyphenol) 계통의 물질 중 플라보노이드(flavonoid)류에 속한다(Figure 1A). Fisetin을 다량 함유한 식품으로는 딸기(160 μ g/g)와 사과(26.9 μ g/g) 등이 있으며 항산화제와 항

유전자명	UPL	Forward primer	Reverse primer
CDKN1A	#19	CCAGCACTCCCTCTAAGCAG	GCTCCGACATGTGGTCTT
CDKN1B	#60	TTTGACTTGCATGAAGAGAAGC	AGCTGTCTCTGAAAGGGACATT
TERT ex2/3	#17	AAGCATGCCAAGCTCTCG	CAGGATCTCCTCACGCAGAC
TERT ex7/8	#52	GCGTAGGAAGACGTCGAAGA	ACAGTTCGTGGCTCACCTG
TERT ex6/9	#37	CAAGAGCCACGTCCTACGTC	CAAGAAATCATCCACCAAACG
TERT ex15/16	#58	GGGTCACTCAGGACAGCCCAG	GGGCGGGTGGCCATCAGT
EVPL	#78	GGCGAAGCTCAACTCCAA	GCCAGCCGTTTTTCTCT
FLG	#38	GGACTCTGAGAGGCGATCTG	TGCTCCCAGAAAGATCCAT
KRT1	#1	GCCTCCTTATTGACAAGGT	GCTCCCATTTTTGTTTGCAGT
IVL	#36	GGCCCTCAGATCGTCTCATA	CCTAGCGGACCCGAAATAA
DSP	#1	GGAAATTGAGAAATTCAAAAGC	CTGCAGCCTTGCCCTGTGTC
TGM1	#1	ACATCCCTTACCATGGACATCT	GTCGTTCCACACATGGAAGTT
CerS3	#19	TGTACACGATGTGGCTGACA	GCGTCCATCCAGCATAAGA
CerS4	#79	CACCCCAAGACTTGTTG	GGCAGGCCAATGAATCT

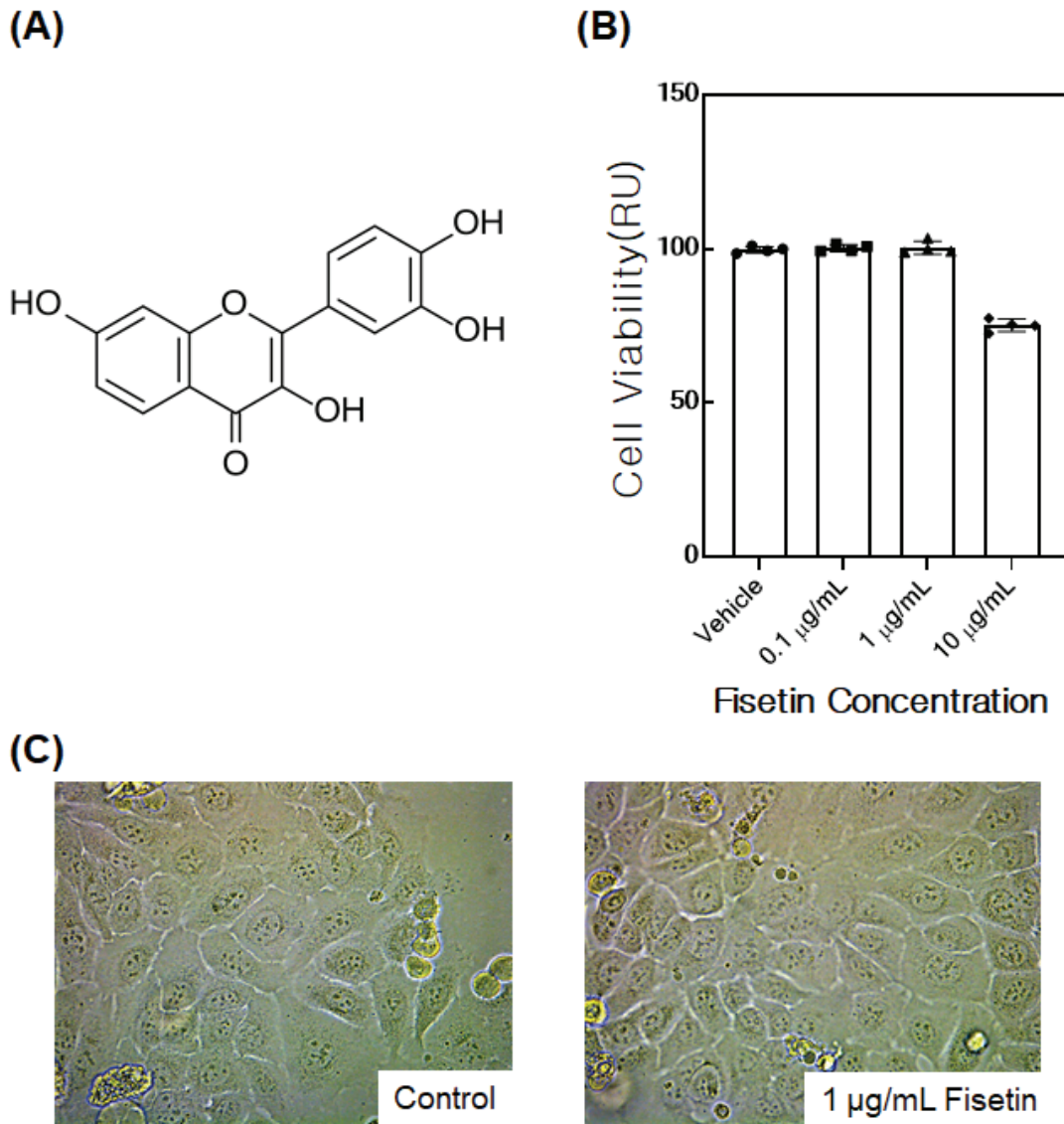


Figure 1. (A) Chemical structure of fisetin. (B) HaCaT cells were treated with the indicated concentration of fisetin for 48 h. Cell viability was determined based on the activity of cytoplasmic dehydrogenases. (C) HaCaT cells were treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of fisetin for 48 h. Images were acquired with phase contrast microscopy for morphological analysis.

암제로의 기능이 널리 알려져 있다[3,16]. 서론에서 제시한 바와 같이 fisetin의 각질세포에 대한 효능을 분석하기에 앞서, 인간 표피 각질세포주인 HaCaT 세포주에 대한 독성과 유효용량 범위 등을 확인하기 위해 다양한 농도의 fisetin에 의한 세포독성을 분석하였다(Figure 1B). 48 h 동안 처리한 결과 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 이하에서는 세포에 영향을 주지 않았다. 또한, 위상차현미경(phase contrast microscope)을 활용한 세포의 형태학적 분석에서도 특이점은 발견되지 않았다(Figure 1C). 하지만 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 25%가

량의 세포사멸을 관찰할 수 있었다. 따라서 이후 모든 실험은 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 진행하였다. 암세포를 대상으로 하는 연구에서 20 ~ 50 μM fisetin의 처리(5.72 ~ 14.31 $\mu\text{g/mL}$)는 유의미한 독성을 나타냈고 유의미한 독성을 나타냈고[17,18] IMR90 섬유아세포를 대상으로 하는 연구에서 연구에서 10 μM (2.87 $\mu\text{g/mL}$) fisetin의 처리가 세포독성에 영향을 주지 않았으므로[7], 1 $\mu\text{g/mL}$ 을 피부세포 효능분석에 적합한 농도로 가정하였다.

3.2. Fisetin의 항노화 효능 분석

말단소립 역전사효소(telomerase)는 염색체 말단소립(telomere)의 신장을 조절하는 핵심효소이다. 말단소립 역전사효소는 체내 다양한 증식세포(transit amplifying cell)와 줄기세포의 분열 및 유지에 관여하며, 복제노화(replicative senescence)를 조절하는 주요한 원인이 된다[19]. 한편 활발

히 분열 중인 각질세포에서도 말단소립 역전사효소의 발현이 관찰되며, 이는 특히 표피줄기세포(epidermal stem cell)의 노화 조절에 중요한 역할을 담당한다[20,21]. Fisetin의 항노화 효능을 알아보기 위해, HaCaT 세포주에 화합물을 48 h 처리 후 말단소립 역전사효소의 활성을 분석한 결과 25%의 활성 증가를 확인할 수 있었다(Figure 2A).

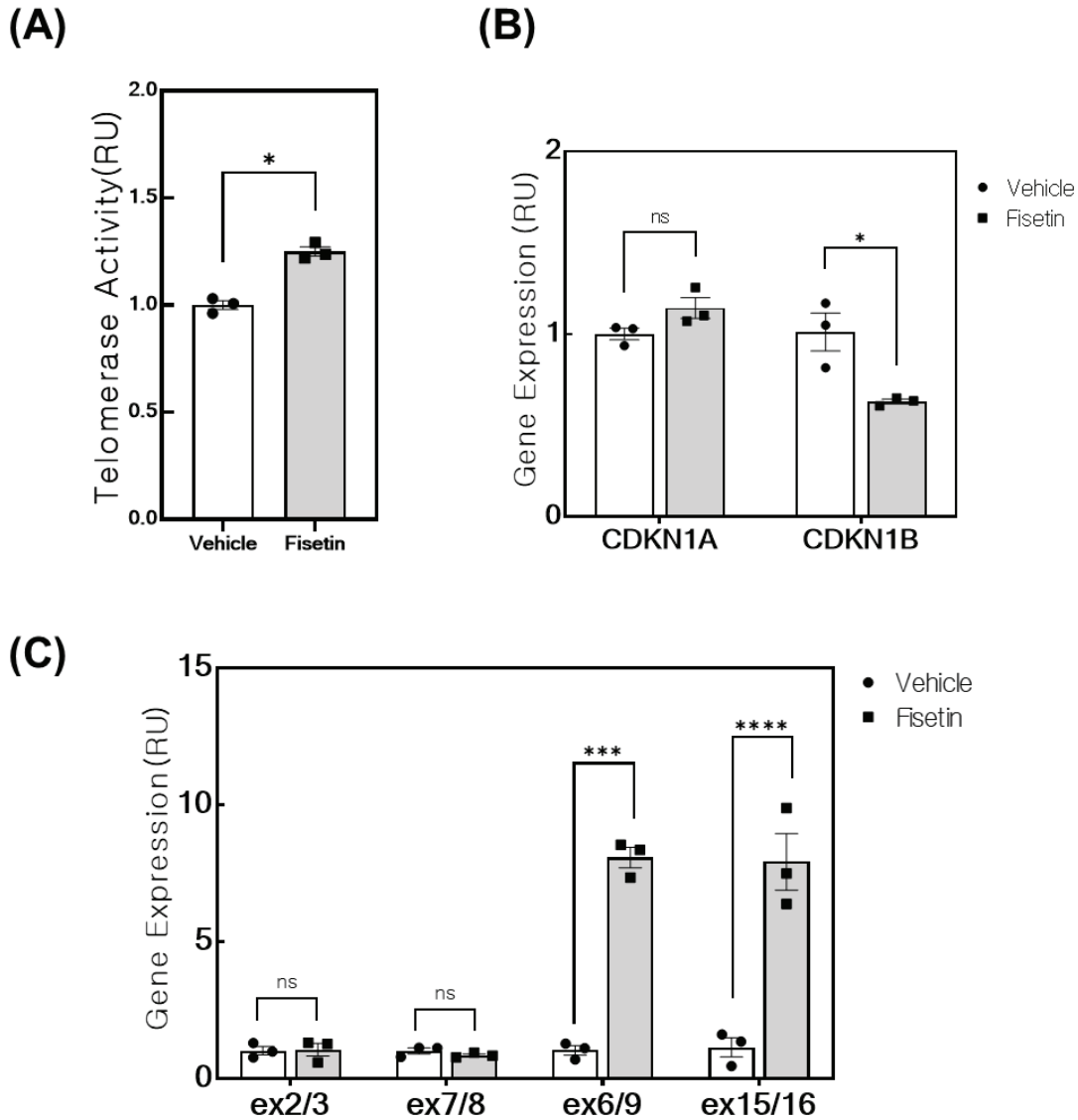


Figure 2. Fisetin shows anti-aging activity in HaCaT cells. HaCaT cells were treated with 1 μg/mL fisetin for 48 h. (A) Treated cells were harvested and disrupted in non-denatured conditions. Telomerase activity was measured based on the relative amplification of external telomerase substrates. (B) Aging-associated genes were analyzed. *CDKN1A*: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (p21), *CDKN1B*: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B (p27). (C) human *TERT* exon junction-specific (or intron-spanning) primers are indicated. *G6PD* was used as a loading control. Student's *t*-test revealed statistical significance(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$, ns: non-significant).

다음으로 세포의 노화를 유도하는 주요 유전자인 *CDKN1A*, *CDKN1B*의 발현을 분석하였다(Figure 2B). *CDKN1A*는 p21^{Cip1} (p21^{Waf1}, cyclin-dependent kinase inhibitor 1) 단백질을 암호화하고 있으며, 해당 단백질은 세포주기의 진행을 억제하여 세포의 노화를 유도하는 특성을 가진다[22]. *CDKN1B*는 p27^{Kip1} (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) 단백질을 암호화하며 p21과 유사한 서열 및 기능을 가진다. 해당 단백질은 세포주기의 진행을 억제하며 종양억제인자(tumor suppressor)로의 기능이 잘 알려져 있다[23]. Fisetin의 처리는 *CDKN1B* 발현의 억제를 유도하였으므로, 기존에 알려진 신호전달경로에 따르면 CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) 및 Rb (Retinoblastoma) 단백질의 활성을 통해 노화를 억제할 가능성이 있다[24]. *CDKN1B*는 종양억제인자(tumor suppressor)로 작용하므로, fisetin에 의한 종양유도 가능성을 생각해 볼 수 있지만 본 연구의 Figure 1B에서 수행된 결과에 따르면 세포의 성장에서 특이점을 발견할 수는 없었다. 또한 fisetin은 폐암, 대장암, 전립선암, 이자암, 흑색종 등을 억제함이 잘 알려져 있기 때문에 해당 소재가 각질세포의 종양화를 유도할 가능성은 낮은 편이다[25-30].

Figure 2A의 결과는 말단소립 역전사효소를 구성하는 핵심 효소인 *TERT* 유전자의 전사 활성 증가 혹은 생성된 말단소립 역전사효소 활성의 증가로 해석할 수 있다. 이를 확인하기 위해 *TERT*의 다양한 전사변이체(splice variants)의 양적 변화를 분석하였다(Figure 2C). 분석대상은 엑손 2/3의 결합 부위(junction between exon 2 and 3), 7/8의 결합, 6/9의 결합, 15/16의 결합 등이다 이를 기존에 보고된 *TERT* 선택적 RNA 이어맞추기(alternative RNA splicing)와 대조하면 I2 minus β 형의 발현이 증가한 것을 알 수 있다[31]. 엑손 7과 8은 말단소립 역전사효소의 기능에 반드시 필요한 활성(reverse transcriptase)을 가지는 부위이며, 엑손 15와 16은 모든 *TERT* 유전자 전사변이체에 포함되는 부위이다. 엑손 6과 9의 접합부위는 말단소립 역전사효소의 대표적인 우성음성체(dominant negative form)인 minus β 형에 존재한다. 해당 결과를 종합하면 fisetin의 처리는 *TERT*의 전사를 8배 가까이 증가시키지만, 효소활성을 가지는 mRNA를 유의미하게 생산하지는 않는다. 따라서 fisetin은 전사단계에서의 조절이 아닌 이미 생성된 말단소립 역전사효소의 활성을 증가시키며, 주요 노화조절 인자인 *CDKN1B*의 발현을 저해하므로 항노화물질로 사용될 가능성이 있다.

상기 결과 Figure 2A에서 말단소립 역전사효소의 활성 증가로 인한 각질세포의 종양화를 고려할 수 있는데, 이는

*TERT*의 재발현이 세포의 복제노화(replicative senescence or M1 senescence) 극복에 필수적인 요인이기 때문이다[32]. 하지만 말단소립 역전사효소는 종양유도인자(oncogene)로 작용하지 않으며[33], 세포의 종양화에는 추가적인 단계가 더 필요하므로 fisetin의 처리로 인한 각질세포의 종양화는 가능성이 낮을 것으로 생각된다[34].

3.3. Fisetin의 피부장벽기능 조절 활성 분석

피부의 장벽기능은 분화된 각질세포를 구성하는 다양한 단백질과 세포 간의 연결 및 세포간지질 등으로 구성된다[35]. 이중 *FLG* 유전자가 암호화하고 있는 filaggrin 단백질은 각화과정(cornification) 중에 케라틴 섬유의 형성을 돕고, PCA (pyrro-lidine carboxylic acid)나 UCA (trans-urocanic acid)로 분해되어 천연보습인자로 작용한다[36]. 특히 유럽에서 발생하는 아토피(atopic dermatitis) 환자의 50%가 *FLG* 유전자에 돌연변이를 가지고 있을 정도로 중요한 유전자이며, 각화세포(corneocyte)의 모양 및 세포간지질(lamellar bilayer)의 정렬 등에 영향을 주는 것으로 알려져있다[37]. Fisetin의 처리는 *FLG* 유전자의 발현을 10 배 이상 증가시켰으며, 각화세포의 주요 구성요소인 케라틴 단백질의 주요 유전자 *KRT1*의 발현 또한 증가시켰다(Figure 3). *IVL*은 각질의 최종분화를 조절하고, 피부장벽의 구조적 토대로 작용하는 중요한 구조 단백질인 involucrin을 암호화하며, 아토피 발생과 유의미한 상관관계를 가진다[38]. Involucrin은 *TGMI* 유전자가 암호화하는 transglutaminase 1 단백질의 작용으로 피부장벽을 구성하게 되는데[39], fisetin의 처리는 *IVL*과 *TGMI* 유전자의 발현을 각기 3 배와 8 배 이상 증가시켰다. *DSP* 유전자는 desmoplakin 단백질을 암호화하는데, 이는 세포 간의 결합에 관여하는 접착반(desmosome)의 주요 구성요소이며 표피세포의 장벽을 유지하는 데에 핵심적이다[40]. Fisetin의 처리는 *DSP* 유전자의 발현을 10 배 이상 증가시켰으므로 피부장벽기능에 도움을 줄 것으로 예상할 수 있다. 한편 periplakin과 함께 세포간결합 및 각화세포 구성에 결정적인 역할을 하는 envoplakin을 암호화하는 *EVPL* 유전자의 발현에는 차이가 없었다. 이상의 결과는 fisetin의 처리가 피부장벽을 구성하는 다양한 유전자의 발현에 영향을 미쳐서 피부에 긍정적인 영향을 줄 가능성을 시사한다. 본 연구에서 분석한 *FLG*, *KRT*, *IVL* 등의 유전자는 각질의 구조적 역할을 하는 단백질과 세포와 세포 간의 결합에 관여하는 *DSP* 및 각질층 형성에 필요한 효소인 *TGMI* 등을 암호화하고 있다[41-44]. 상기 유전자는

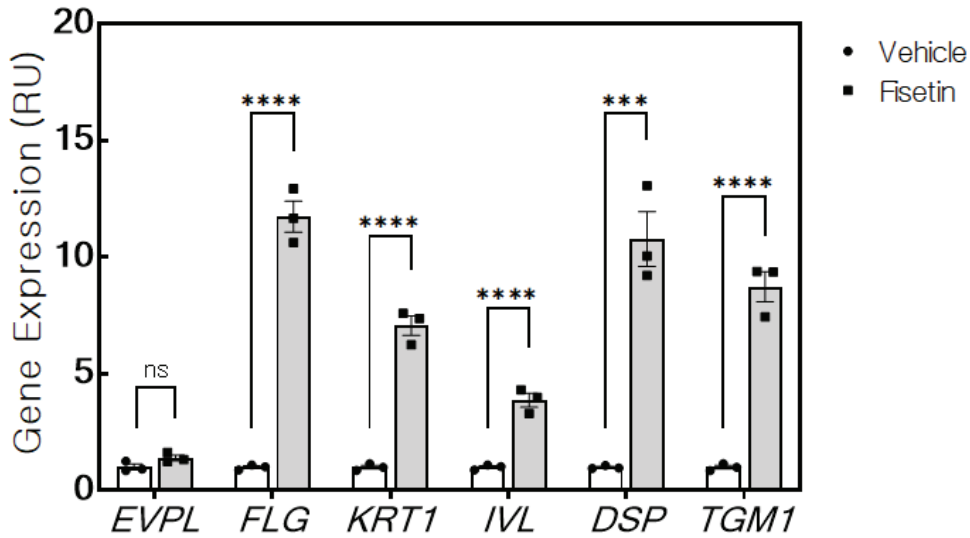


Figure 3. Fisetin upregulates mRNA expression of genes in the skin barrier function. HaCaT cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fisetin for 48 h. Genes associated with skin barrier function were analyzed. *EVPL*; envoplakin, *FLG*; filaggrin, *KRT1*; keratin 1, *IVL*; involucrin, *DSP*; desmoplakin, *TGM1*; transglutaminase 1. *G6PD* was used as a loading control. Student's *t*-test revealed statistical significance. *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$, ns: non-significant .

각질층의 연결 및 세포 간의 연결 등에 관여하므로 fisetin은 경피수분손실의 방지 및 외부 유해인자 유입 차단 등에 관여할 수 있다.

3.4. Fisetin의 세라마이드 합성 조절 활성 분석

세라마이드(ceramide)는 sphingosine과 지방산(fatty acid)으로 이루어진 왁스 상의 지질분자로 진핵세포 세포막의 주요 구성분 중의 하나이다[45]. 세라마이드는 특히 표피의 각질층(stratum corneum)에 다량 존재하며, 피부장벽을 구성하는 주요 구성요소 중의 하나로 콜레스테롤(cholesterol)과 자유 지방산(free fatty acids)과 함께 역할을 한다[46]. 피부장벽을 구성하는 세라마이드는 15 종 혹은 그 이상의 다양성을 가지며 이를 합성하는 다양한 효소반응의 대부분은 각질세포(epidermal keratinocyte) 내부에서 일어난다[47]. 이 과정에서 세라마이드 합성효소(ceramide synthase, CerS)가 중요한 역할을 담당하는데, 포유류에서는 6 개의 CerS 유전자가 존재해서 다양한 길이의 지방산과 sphinganine의 결합을 연결한다[48]. 이 중 피부에서의 발현이 가장 두드러지는 유전자는 *Cers3*와 *Cers4*로서, 18 ~ 26 개의 탄소를 가지는 아실기(acyl)를 연결하는 활성을 가지게 된다. 특히 *Cers3*의 결합은 선천성 어혈증(autosomal recessive congenital ichthyosis)을 유발하는 인자 중의 하나

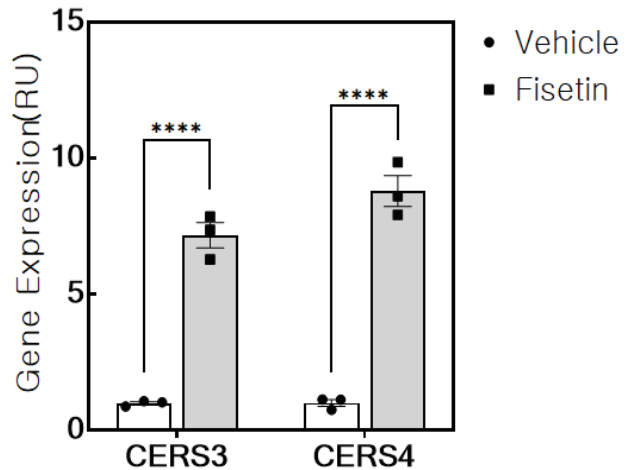


Figure 4. Fisetin upregulates mRNA expression of ceramide synthases. HaCaT cells were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fisetin for 48 h. *CERS3*; ceramide synthase 3, *CERS4*; ceramide synthase 4. *G6PD* was used as a loading control. Student's *t*-test revealed statistical significance. **** $p < 0.0001$.

인데[47], 이를 통해 각질세포에 의한 세라마이드 합성이 피부장벽 기능에 핵심적인 요소임을 알 수 있다. Fisetin의 처리는 *Cers3*와 *Cers4* 유전자의 발현을 7 배 이상 증가시켰으며, 이는 해당 화합물의 처리가 피부장벽기능을 회복

하는 효능을 가질 수 있음을 의미한다(Figure 4). *CERS3*와 *CERS4* 유전자는 각질세포가 분비하는 세라마이드의 합성에 관여하는 핵심 효소로서 세포간지질(intercellular lipid) 및 각질층의 지질 판상구조(lamella granule)를 형성하는 데에 중요한 역할을 수행한다[48,49]. 따라서 fisetin은 경피수분손실의 방지 및 외부 유해인자 유입 차단 등에 관여할 수 있다.

4. 고 찰

높은 생리활성을 보이는 플라보노이드의 일종인 fisetin은 노쇠용해물질로도 널리 알려져 있다. 노쇠용해물질이란 조직 내의 노화세포를 선별적으로 표적화하는 물질로서 노화세포로 인한 조직의 손상을 방지할 수 있다고 알려져 최근에 많은 주목을 받고 있다. 하지만 fisetin의 효능은 노쇠용해에 있을 뿐만 아니라 다양한 종류의 세포에 특이적으로 작용할 수 있음이 밝혀졌고, 2016년에는 진피섬유아 세포에 작용하여 피부건강에 도움을 줄 수 있음이 제시되었다[15]. 본 연구의 목표는 인간 표피 각질세포 모델을 대상으로 하여 fisetin의 효능을 분석하는 것으로, 특히 항노화 및 피부장벽기능에 집중하여 fisetin의 효능범위를 확장하였다. 본 연구는 세포모델에 대한 접근성을 이유로 HaCaT 세포를 사용하였으나, 이는 정상적인 표피 각질세포(normal human epidermal keratinocyte)와 동일한 생리학적 반응을 보이지 않을 가능성이 높다. 따라서 이점이 본 연구의 중대한 한계점이며 후속연구를 통해 실제 인체에서 유래한 정상세포(normal diploid keratinocyte)의 반응을 분석하여야 한다. Fisetin은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 의 농도에서 HaCaT세포의 생존에 거의 영향을 주지 않았으나 세포 내에 많은 변화를 유발하였다. 우선 표피줄기세포 및 각질세포 등의 복제노화를 조절하는 말단소립 역전사효소의 활성을 증가시켰으며, 이는 *TERT* 유전자의 전사활성증가로 인한 것이 아니라 이미 생성된 효소의 활성이 증가한 것으로 예상된다. 또한, 세포의 노화를 유도하는 *CDKN1B* 유전자의 발현 감소를 확인하였는데 이를 통해 fisetin이 각질세포에서 항노화 효능을 가질 것으로 예상된다. Fisetin의 처리는 피부장벽기능에 관여하는 주요 구조적 단백질 및 효소인 *FLG*, *KRT1*, *IVL*, *DSP*, *TGMI*의 유전자발현 증가에도 관여하였다. 또한, fisetin의 처리는 표피의 세라마이드 합성에 관여하는 주요 유전자인 *CerS3* 및 *CerS4*의 발현 증가에도 관여하였다. 이상의 결과는 천연물에서 유래한 생리활성물질인 fisetin이 인간 표피 각질세포에 작용하여 항노화 및 피부

장벽 기능에 관여하는 다양한 유전자의 활성을 조절할 수 있으며, 따라서 화장품과 의약품 등에 활용될 수 있음을 시사한다.

Acknowledgement

본 연구는 2020년 (재)동일문화장학재단 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

References

1. A. Martins, H. Vieira, H. Gaspar, and S. Santos, Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success, *Mar Drugs*, **12**(2), 1066 (2014).
2. P. L. Gupta, M. Rajput, T. Oza, U. Trivedi, and G. Sanghvi, Eminence of microbial products in cosmetic industry, *Nat Prod Bioprospect*, **9**(4), 267 (2019).
3. N. Khan, D. N. Syed, N. Ahmad, and H. Mukhtar, Fisetin: a dietary antioxidant for health promotion, *Antioxid Redox Signal*, **19**(2), 151 (2013).
4. W. Li, L. Qin, R. Feng, G. Hu, H. Sun, Y. He, and R. Zhang, Emerging senolytic agents derived from natural products, *Mech Ageing Dev*, **181**, 1 (2019).
5. Y. Arai, S. Watanabe, M. Kimira, K. Shimoi, R. Mochizuki, and N. Kinae, Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration, *J Nutr*, **130**(9), 2243 (2000).
6. K. Sundarraj, A. Raghunath, and E. Perumal, A review on the chemotherapeutic potential of fisetin: *In vitro* evidences, *Biomed Pharmacother*, **97**, 928 (2018).
7. Y. Zhu, E. J. Doornebal, T. Pirtskhalava, N. Giorgadze, M. Wentworth, H. Fuhrmann-Stroissnigg, L. J. Niedernhofer, P. D. Robbins, T. Tchkonja, and J. L. Kirkland, New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463, *Aging (Albany NY)*, **9**(3), 955 (2017).
8. K. Ishige, D. Schubert, and Y. Sagara, Flavonoids

- protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms, *Free Radic Biol Med*, **30**(4), 433 (2001).
9. Z. S. Markovic, S. V. Mentus, and J. M. Dimitric Markovic, Electrochemical and density functional theory study on the reactivity of fisetin and its radicals: implications on *in vitro* antioxidant activity, *J Phys Chem A*, **113**(51), 14170 (2009).
 10. Y. S. Touil, J. Seguin, D. Scherman, and G. G. Chabot, Improved antiangiogenic and antitumour activity of the combination of the natural flavonoid fisetin and cyclophosphamide in Lewis lung carcinoma-bearing mice, *Cancer Chemother Pharmacol*, **68**(2), 445 (2011).
 11. N. Ravichandran, G. Suresh, B. Ramesh, and G. V. Siva, Fisetin, a novel flavonol attenuates benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice, *Food Chem Toxicol*, **49**(5), 1141 (2011).
 12. N. Khan, M. Asim, F. Afaq, M. Abu Zaid, and H. Mukhtar, A novel dietary flavonoid fisetin inhibits androgen receptor signaling and tumor growth in athymic nude mice, *Cancer Res*, **68**(20), 8555 (2008).
 13. P. Maher, T. Akaishi, and K. Abe, Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(44), 16568 (2006).
 14. Y. Sagara, J. Vanhnasy, and P. Maher, Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation, *J Neurochem*, **90**(5), 1144 (2004).
 15. M. S. Shon, R. H. Kim, O. J. Kwon, S. S. Roh, and G. N. Kim, Beneficial role and function of fisetin in skin health via regulation of the CCN2/TGF-beta signaling pathway, *Food Sci Biotechnol*, **25**(Suppl 1), 133 (2016).
 16. M. Kimira, Y. Arai, K. Shimoi, and S. Watanabe, Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods, *J Epidemiol*, **8**(3), 168 (1998).
 17. H. C. Pal, R. D. Baxter, K. M. Hunt, J. Agarwal, C. A. Elmets, M. Athar, and F. Afaq, Fisetin, a phytochemical, potentiates sorafenib-induced apoptosis and abrogates tumor growth in athymic nude mice implanted with BRAF-mutated melanoma cells, *Oncotarget*, **6**(29), 28296 (2015).
 18. A. Sabarwal, R. Agarwal, and R. P. Singh, Fisetin inhibits cellular proliferation and induces mitochondria-dependent apoptosis in human gastric cancer cells, *Mol Carcinog*, **56**(2), 499 (2017).
 19. W. Kim and J. W. Shay, Long-range telomere regulation of gene expression: Telomere looping and telomere position effect over long distances (TPE-OLD), *Differentiation*, **99**, 1 (2018).
 20. I. Flores, M. L. Cayuela, and M. A. Blasco, Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior, *Science*, **309**(5738), 1253 (2005).
 21. N. Liu, Y. Yin, H. Wang, Z. Zhou, X. Sheng, H. Fu, R. Guo, H. Wang, J. Yang, P. Gong, W. Ning, Z. Ju, Y. Liu, and L. Liu, Telomere dysfunction impairs epidermal stem cell specification and differentiation by disrupting BMP/pSmad/P63 signaling, *PLoS Genet*, **15**(9), e1008368 (2019).
 22. A. L. Gartel and S. K. Radhakrishnan, Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences, *Cancer Res*, **65**(10), 3980 (2005).
 23. I. M. Chu, L. Hengst, and J. M. Slingerland, The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy, *Nat Rev Cancer*, **8**(4), 253 (2008).
 24. T. Tsutsui, B. Hesabi, D. S. Moons, P. P. Pandolfi, K. S. Hansel, A. Koff, and H. Kiyokawa, Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity, *Mol Cell Biol*, **19**(10), 7011 (1999).
 25. N. Khan, F. Afaq, F. H. Khusro, V. Mustafa Adhami, Y. Suh, and H. Mukhtar, Dual inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mammalian target of rapamycin signaling in human nonsmall cell lung cancer cells by a dietary flavonoid fisetin, *Int J Cancer*, **130**(7), 1695 (2012).
 26. X. Lu, J. Jung, H. J. Cho, D. Y. Lim, H. S. Lee, H. S. Chun, D. Y. Kwon, and J. H. Park, Fisetin inhibits the activities of cyclin-dependent kinases leading to

- cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells, *J Nutr*, **135**(12), 2884 (2005).
27. R. A. Hiipakka, H. Z. Zhang, W. Dai, Q. Dai, and S. Liao, Structure-activity relationships for inhibition of human 5 α -reductases by polyphenols, *Biochem Pharmacol*, **63**(6), 1165 (2002).
 28. A. Q. Haddad, V. Venkateswaran, L. Viswanathan, S. J. Teahan, N. E. Fleshner and L. H. Klotz, Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines, *Prostate Cancer Prostatic Dis*, **9**(1), 68 (2006).
 29. I. Murtaza, V. M. Adhami, B. B. Hafeez, M. Saleem, and H. Mukhtar, Fisetin, a natural flavonoid, targets chemoresistant human pancreatic cancer AsPC-1 cells through DR3-mediated inhibition of NF-kappaB, *Int J Cancer*, **125**(10), 2465 (2009).
 30. D. N. Syed, F. Afaq, N. Maddodi, J. J. Johnson, S. Sarfaraz, A. Ahmad, V. Setaluri, and H. Mukhtar, Inhibition of human melanoma cell growth by the dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of Wnt/beta-catenin signaling and decreased Mitf levels, *J Invest Dermatol*, **131**(6), 1291 (2011).
 31. A. L. Slusher, J. J. Kim, and A. T. Ludlow, The Role of Alternative RNA Splicing in the Regulation of hTERT, Telomerase, and Telomeres: Implications for Cancer Therapeutics, *Cancers (Basel)*, **12**(6), (2020).
 32. J. W. Shay and W. E. Wright, Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells, *FEBS Lett*, **584**(17), 3819 (2010).
 33. C. B. Harley, Telomerase is not an oncogene, *Oncogene*, **21**(4), 494 (2002).
 34. J. W. Shay and W. E. Wright, Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase, *Carcinogenesis*, **26**(5), 867 (2005).
 35. P. M. Elias, Skin barrier function, *Curr Allergy Asthma Rep*, **8**(4), 299 (2008).
 36. I. R. Scott and C. R. Harding, Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment, *Dev Biol*, **115**(1), 84 (1986).
 37. C. N. Palmer, A. D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S. P. Lee, D. R. Goudie, A. Sandilands, L. E. Campbell, F. J. Smith, G. M. O'Regan, R. M. Watson, J. E. Cecil, S. J. Bale, J. G. Compton, J. J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C. S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L. B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay, and W. H. McLean, Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, *Nat Genet*, **38**(4), 441 (2006).
 38. B. E. Kim, D. Y. Leung, M. Boguniewicz, and M. D. Howell, Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6, *Clin Immunol*, **126**(3), 332 (2008).
 39. Z. Nemes, L. N. Marekov, L. Fesus, and P. M. Steinert, A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(15), 8402 (1999).
 40. L. Polivka, S. Hadj-Rabia, E. Bal, S. Leclerc-Mercier, M. Madrangé, Y. Hamel, D. Bonnet, S. Mallet, H. Lepidi, C. Ovaert, P. Barbet, C. Dupont, B. Neven, A. Munnich, L. M. Godsel, F. Campeotto, R. Weil, E. Laplantine, S. Marchetto, J. P. Borg, W. I. Weis, J. L. Casanova, A. Puel, K. J. Green, C. Bodemer, and A. Smahi, Epithelial barrier dysfunction in desmoglein-1 deficiency, *J Allergy Clin Immunol*, **142**(2), 702 (2018).
 41. G. Mocsai, K. Gaspar, G. Nagy, B. Irinyi, A. Kapitany, T. Biro, E. Gyimesi, B. Toth, L. Marodi, and A. Szegedi, Severe skin inflammation and filaggrin mutation similarly alter the skin barrier in patients with atopic dermatitis, *Br J Dermatol*, **170**(3), 617 (2014).
 42. H. Green and P. Djian, Consecutive actions of different gene-altering mechanisms in the evolution of involucrin, *Mol Biol Evol*, **9**(6), 977 (1992).
 43. D. Garrod and M. Chidgey, Desmosome structure, composition and function, *Biochim Biophys Acta*, **1778**(3), 572 (2008).

44. R. L. Eckert, M. T. Sturniolo, A. M. Broome, M. Ruse and E. A. Rorke, Transglutaminase function in epidermis, *J Invest Dermatol*, **124**(3), 481 (2005).
45. D. Davis, M. Kannan and B. Wattenberg, Orm/ORMDL proteins: Gate guardians and master regulators, *Adv Biol Regul*, **70**, 3 (2018).
46. L. Coderch, O. Lopez, A. de la Maza and J. L. Parra, Ceramides and skin function, *Am J Clin Dermatol*, **4**(2), 107 (2003).
47. M. Rabionet, K. Gorgas and R. Sandhoff, Ceramide synthesis in the epidermis, *Biochim Biophys Acta*, **1841**(3), 422 (2014).
48. M. Levy and A. H. Futerman, Mammalian ceramide synthases, *IUBMB Life*, **62**(5), 347 (2010).
49. H. J. Cha, C. He, H. Zhao, Y. Dong, I. S. An and S. An, Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review), *Int J Mol Med*, **38**(1), 16 (2016).