



Improving effect of psoriasis dermatitis by yakuchinone A in the TNF- α stimulated HaCaT cells

Min Young Kim¹ · Hyung Seo Hwang¹

TNF- α 자극에 활성화된 HaCaT 세포주에서 Yakuchinone-A에 의한 건선 피부염 개선 효과

김민영¹ · 황형서¹

Received: 6 February 2020 / Accepted: 11 March 2020 / Published Online: 31 March 2020
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2020

Abstract Psoriasis is an autoimmune skin disease that is accompanied by hyper proliferation of the epidermis, erythema of various sizes, and ulceration. However, the mechanism of the development of psoriasis dermatitis is unclear. Recently, it is known that the inflammatory cytokines and Th17 cells as well as chemokine (CC motif) ligand 20 (CCL20) are involved in the process of keratinocytes hyper-differentiation, which is common in psoriasis dermatitis. Therefore, we studied the effects of yakuchinone-A, an active ingredient of *Alpinia oxyphylla Miquel* known for its anti-inflammatory activity, to improve psoriasis dermatitis. First, cytotoxicity of yakuchinone-A was observed in cell counting kit-8 assay and not observed in 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration on the human keratinocyte HaCaT cells. Yakuchinone-A in the presence of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) on HaCaT cells inhibited mRNA expression of IL-6, IL-8, and TNF- α by up to 61.4 \pm 7.5, 23.6 \pm 1.5, 46.0 \pm 4.8%. CCL20, a chemokine that attracts immune cells such Th17 cells to the inflammation location, was also significantly suppressed by yakuchinone-A. In addition, I κ B and STAT3 phosphorylation involved in the CCL20 expression was inhibited by yakuchinone-A in a concentration-dependent

manner up to the level of 79.1 \pm 5.0, 80.8 \pm 2.3%. Furthermore, yakuchinone-A downregulated CCL20 mRNA expression level on IL-17A-activated HaCaT cells as a concentration-dependent manner. Based on these results, yakuchinone-A is expected to be developed as a new material for improving psoriasis dermatitis in the future.

Keywords *Alpiniaoxy phylla Miquel* · Anti-inflammation · Chemokine (C-C motif) ligand 20 · Keratinocyte · Psoriasis · Yakuchinone-A

서론

건선은 만성 염증성 피부질환으로, 발병을 또한 지속적으로 증가하고 있는 추세이다[1,2]. 최근 연구에서 건선은 T 세포의 분화 및 이들이 생산하는 염증성 cytokine과 밀접한 연관이 있으며, 특히 Th17 세포의 분화와 IL-17 및 chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)이 중요한 역할을 한다고 보고된다. 혈액 속에 분포하고 있는 면역세포 중 랑게르한스 세포나, 수지상 세포와 같은 antigen-presenting cell (APCs)은 미성숙한 CD4⁺ T 세포에 항원(antigen)을 전달하여 성숙한 T 세포(Th1, Th2, Th17)로 분화시킨다[3-5]. Th1 세포는 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)를 생산하며, TNF- α 는 IL-1 α/β , IL-6, IL-23 등의 cytokine을 분비하여 피부 keratinocyte의 분화 촉진 및 과각화를 유발할 뿐 아니라 NF- κ B 및 STAT3 pathway에 의존적으로 Th17 세포 분화를 유도한다[6]. TNF- α 는 keratinocyte에서 NF- κ B pathway를 통해 CCL20을 분비한다[7]. 피부의 keratinocyte

HyungSeo Hwang (✉)
E-mail: hshwang@semyung.ac.kr

¹School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University, 65, Semyungro, Jechon, Chungbuk 27136, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

나 fibroblast, 점막 등에서 주로 발현되는 CCL20은 liver and activation-regulated chemokine, macrophage inflammatory protein-3 α), Exodus-1으로 불리는 chemokine으로, C-C chemokine receptor type 6와 특이적으로 결합하여 미성숙한 수지상세포, T세포, B 세포 등의 면역세포를 염증부위로 유인하는 역할을 한다[8,9]. Th17 세포는 CCL20을 따라 염증부위로 이동하여 Th17 세포의 특이적 cytokine인 IL-17을 분비하고, IL-17은 다시 CCL20의 분비를 증폭시켜 궁극적으로 CCL20에 의한 면역세포 유도 및 염증반응을 지속시킨다[10]. 따라서 CCL20은 크론병과 궤양성 대장암, 만성 폐쇄성 폐질환 등 다양한 질병에서 과다 발현되는 것으로 보고되며, 특히 만성 염증성 피부질환 중 건선 피부의 환자에게서 동일하게 보고된다[11,12]. 그러나 최근까지 건선 치료제로 흔히 사용되고 있는 국소 비타민 A 혹은 D 유사체, 국소 스테로이드제, UVB 광선 치료법은 장기간 이용 시 면역 억제제의 부작용이 나타나 천연 소재 기반의 새로운 건선 치료 소재 발굴이 중요하다[13].

Zingiberaceae에 속하는 익지인(*Alpinia oxyphylla Miquel*)은 익지의 열매로, 설사, 치매, 항종양, 위염, 고혈압 환자의 치료제로 사용되고 있는 전통 의약품 원료 식물이다[14]. 익지인은 현재까지 항산화 효능과 마우스 피부에서 종양 활성 억제, 쥐의 대뇌 신경세포의 보호 및 IGF1R-PI3K/Akt 신호전달을 통한 세포 증식 효과가 보고되었다[15-19]. 또한 선행 연구를 통해 RAW264.7 대식세포에서 익지인의 항염증 효능을 보고한 바 있다[20]. 익지인의 주성분은 Sesquiterpenes, diarylheptanoids 및 volatile oils, flavonoids 계열의 성분들로 보고되며, 이 중 Diarylheptanoid 계열의 yakuchinone-A는 울금의 curcumin과 매우 유사한 구조를 가진다[21]. Yakuchinone-A는 prostaglandin 합성의 강력한 억제제로 알려져 있으며, 이 외의 항염, 항종양, 항바이러스 등 다양한 생물학적 활성이 보고되었다[22-24]. 또한 최근에 yakuchinone-A는 마우스 비장세포에서 Th1과 Th17 세포가 분비하는 cytokine을 조절하여 자가면역 질환인 뇌 척수염을 개선한다고 보고되었다[25]. 따라서 Choi 등의 방법[26]에 따라 건선 *in vitro* 모델인 TNF- α 및 IL-17 유도 HaCaT 세포 주 시험 방법을 활용하여 yakuchinone-A에 의한 건선 관련 염증성 cytokine 발현 조절 기작에 대해 규명하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 사용한 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-phenylheptan-3-one (Yakuchinone-A, CAS Number 78954-23-1)는 Ensol Bioscience (Daejeon, Korea)에서 구매하여 사용하였다. TNF- α 는 Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, MO, USA)에서 구매하였으며, IL-17A (recombinant human IL-17A (human cell-expressed) protein, CF summary)는 R&D system(Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였다.

세포 배양

본 연구에서 항염증 효능을 평가하기 위해 사용된 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포주는 고려대학교 생명공학원에서 분양 받아 사용하였다. HaCaT 세포는 10% fetal bovine serum (Welgene,

Gyeongsan-si, Korea)과 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Gibco, Waltham, MA, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene)에서 배양하였다. 배양은 37°C, CO₂ 5% 유지 조건의 동물세포 배양기(Panasonic, Kadoma, Osaka, Japan)에서 이루어졌다.

세포독성 실험

Yakuchinone-A의 독성이 없는 세포 처리 농도를 설정하기 위해 cell counting kit-8 assay (CCK-8 assay, DoGen bio, Seoul, Korea)를 시행하였다. 세포독성 평가는 Choi 등의 방법[26]에 따라 측정하였다. HaCaT 세포주를 24 well-plate에서 약 5.0×10^4 cell/well이 되도록 500 μ L씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 이후 기존의 배양액을 제거하고, Serum Free-DMEM에 TNF- α 20 ng/mL와 yakuchinone-A를 공동 처리한 배양액으로 교체 후 24시간 동안 반응시켰다. 배양액은 제거하고 phenol red free-DMEM과 CCK-8reagent (DoGen bio, Seoul, Korea)를 10:1 비율로 희석한 후, 각 well 당 500 μ L씩 분주하여 30 분간 반응시켰다. 이후 상등액을 96 well-plate에 100 μ L씩 3번 분주하여 450 nm 파장에서 흡광도를 관찰하였다. 세포 생존율은 아래 수식에 따라 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}}^{\text{a}} - \text{OD}_{\text{blank}}^{\text{b}}}{\text{OD}_{\text{control}}^{\text{c}} - \text{OD}_{\text{blank}}^{\text{b}}} \times 100$$

a: Absorbance of the group treated with yakuchinone-A

b: Absorbance of CCK-8 solution

c: Absorbance of the control group

RNA extraction and real time RT-PCR

In-vitro 건선 피부염 시험모델은 Choi 등의 방법[26]에 따라 수행하였다. HaCaT 세포를 6 well-plate에 각 well 당 4×10^5 cell/well이 되도록 2 mL씩 분주하여 37°C, CO₂ 5% 조건에서 24시간 동안 배양하였다. HaCaT 세포에 염증을 유도하기 위해 TNF- α 20 ng/mL을 처리하고 yakuchinone-A를 최대 10 μ g/mL 농도까지 함께 반응시켰다. 2시간 후 배양액을 제거하고 TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 분주하여 세포를 용해시킨 뒤 200 μ L의 chloroform을 첨가하여 혼합한 뒤, 14000 rpm으로 원심 분리하여 total RNA를 추출하였다. RNA는 총 1.5 μ g을 되도록 정량 한 후 Revertra ACE kit (Toyobo, OSAKA, Japan)를 활용해 cDNA를 합성하였다. PCR은 real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 실험 기법을 사용하였으며 각각의 특이 primer를 사용하여 실시간으로 특정 유전자의 mRNA 발현량을 확인하였다. 사용된 Taqman probe는 Table 1에 표기하였다.

Table 1 Gene name and assay ID number in real-time PCR analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1
IL-6	Interleukin 6	Hs00174131_m1
IL-8	Interleukin 8	Hs00174103_m1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	Hs00174128_m1
CCL20	CCL20	Hs01011368_m1

Table 2 Protein and antibody used in western blot analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	MA5-15738 ^a
IκBα	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	39-7700 ^a
p-IκBα	Phospho-nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	MA5-15087 ^a
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	4904 ^b
p-STAT3	Phospho-Signal transducer and activator of transcription 3	9145 ^b
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP		31460 ^a
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP		31430 ^a

^aInvitrogen™

^bCell signaling™

Western blotting

HaCaT 세포를 6 well-plate 각 well 당 8×10^5 cell/well로 seeding한 후, 37 °C, CO₂ 5% 조건에서 24시간 배양하였다. 이후 염증을 유도하기 위해 TNF-α 20 ng/mL를 처리하였고, 이와 동시에 yakuchinone-A를 2.5, 5, 10 μg/mL 농도조건으로 각각 2 mL씩 분주한 뒤 2시간 동안 반응시켰다. 그 다음 차가운 phosphate buffered saline로 3회 세척한 후, RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, phosphatase inhibitor cocktail, 50 mM EDTA)를 100 μL씩 분주하여 30 rpm에서 5분 동안 교반하였다. 4 °C, 12000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 단백질을 추출한 뒤, Bradford (Bio-rad, Hercules, CA, USA) assay로 정량을 진행하였다. laemmli sample buffer (31.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, 0.005% Bromophenol Blue), β-mercaptoethanol과 단백질 혼합액을 95 °C 조건에서 5분간 열 충격을 주었다. 이후 10% SDS-PAGE gel에 각 sample과 buffer를 lane에 넣고 Tris/Glycine/SDS running buffer를 사용하여 전기 영동을 하였다. Filter paper에 gel을 부착하여 iBlot dry blotting system (Invitrogen, Calsbad, CA, USA)을 사용하여 PVDF membrane에 transfer 하였다. 10% skin milk를 제조하여 1시간 동안 blocking 후, primary antibody를 분주하여 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1X TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) buffer를 제조하여 5분씩 6번, 총 30분 동안 washing하였다. Secondary antibody를 1시간 뒤 5분씩 6번, 총 30분 동안 washing하였다. 이후 암실에서 PVDF membrane에 Western ECL substrates (Bio-rad)을 처리한 후, 30분 동안 반응시킨 뒤 이미지 처리장치 (Microchemi-DNR, NeveYamin, Israel)로 단백질 발현량을 측정하였다. 단백질 정량 분석은 Image J program (N.I.H, Bethesda, MD, USA)을 통해 분석하였고, 사용된 Antibody는 Table 2에 표기하였다.

통계처리

본 연구의 모든 실험은 3회 이상 반복 실험을 수행하였고, 얻어진 실험값에 대한 모든 통계처리는 Student's t-test를 통해 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

TNF-α 유도된 HaCaT 세포에서 yakuchinone-A의 세포독성

익지인의 유효성분 중 하나인 yakuchinone-A은 울금(*Curcuma longa*)의 curcumin과 매우 유사한 구조적 특징을 가진다(Fig. 1A). 따라서 yakuchinone-A의 피부염증 개선 효능을 확인하기 위해 HaCaT 세포에 미치는 세포독성을 CCK-8 assay를 통해 확인하였다(Fig. 1B). 먼저 HaCaT 세포에 미치는 TNF-α의 세포독성은 최대 50 ng/mL 농도까지 세포독성이 전혀 나타나지 않았으나, 선행 연구결과들을 고려하여 TNF-α는 20 ng/mL로 설정하였다. 이후 HaCaT 세포에 TNF-α 및 yakuchinone-A을 동시에 처리한 후 세포독성을 관찰한 결과, yakuchinone-A 10 μg/mL 농도 조건까지는 세포독성이 관찰되지 않았으나, 20 μg/mL 농도부터 세포독성이 관찰되어 yakuchinone-A의 최대 농도값을 10 μg/mL로 설정하여 이후 모든 실험에 적용하였다(Fig. 1C).

Yakuchinone-A에 의한 염증성 cytokine 및 CCL20 발현 억제

피부 염증반응에서 yakuchinone-A의 항염증 효능을 확인하기 위해 제일 먼저 TNF-α에 의해 활성화된 HaCaT 세포주에 yakuchinone-A를 농도별로 처리하여 Th17 세포의 활성 촉진에 중요한 IL-6/8, TNF-α cytokine 및 건선 유발 chemokine 중 하나인 CCL20의 mRNA 발현 변화를 관찰하였다. 먼저 HaCaT 세포에 TNF-α를 처리한 결과, IL-6의 mRNA 발현은 무처리군 대비 약 3.4±0.3배까지 증가하였고, yakuchinone-A를 각각 2.5, 5, 10 μg/mL 농도로 처리한 시험군에서 TNF-α 처리군 대비 각 13.4±8.3, 56.9±6.5, 61.4±7.5% 수준으로 유의성 있게 감소하여 yakuchinone-A가 농도의존적으로 IL-6의 mRNA 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2A). 그러나 yakuchinone-A에 의한 IL-8 발현량 변화는 TNF-α 처리군에서 약 7.2±0.7배로 정상적으로 증가됨이 관찰되었으나, yakuchinone-A를 농도별로 처리했을 때 저농도에서는 변화가 없었고, 10 μg/mL 농도조건에서만 TNF-α 처리군 대비 약 23.6±1.5%로 억제되었다(Fig. 2B). 또한 HaCaT 세포에서 TNF-α에 의해 활성화된 후 yakuchinone-A에 의한 TNF-α의 mRNA 발현량을 관찰한 결과, TNF-α 처리군 대비 약 26.6±9.2, 39.1±3.1, 46.0±4.8% 수준만큼 감소되었다(Fig. 2C). 마지막으로 건선 피부염 발병에 밀접한 관련이

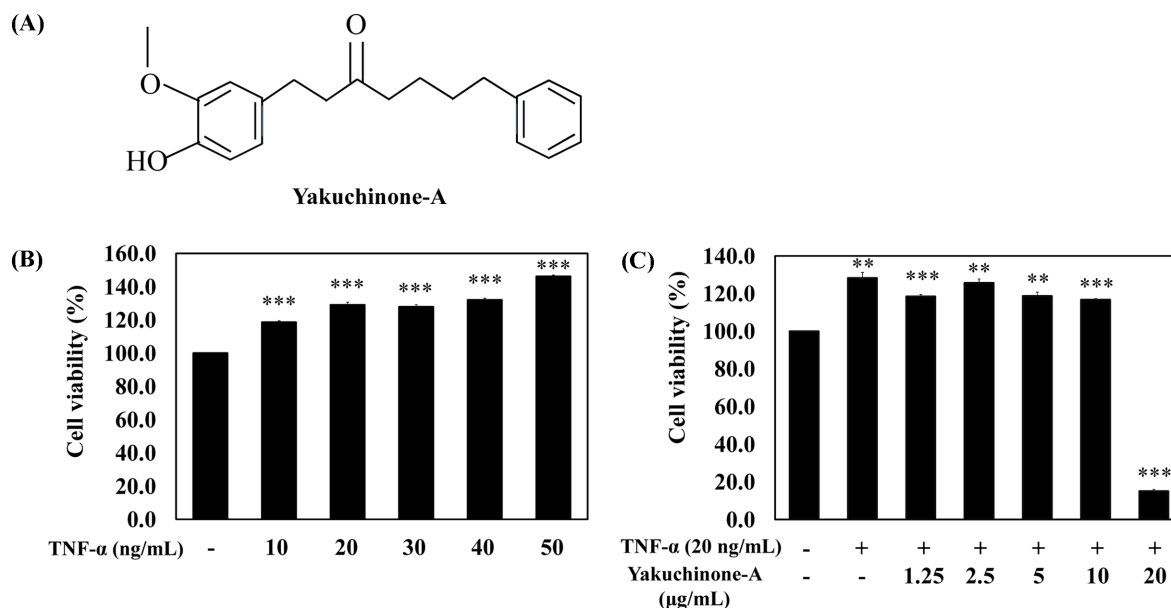


Fig. 1 CCK-8 analysis was performed by treating the cells with TNF- α and yakuchinone-A for 24 h. (A) Chemical structure of yakuchinone A. M.W.=312. (B) Cytotoxicity of TNF- α in HaCaT cells. (C) Cell viability by yakuchinone A in the presence of TNF- α (20 ng/mL). ** p <0.01, *** p <0.001 compared to control

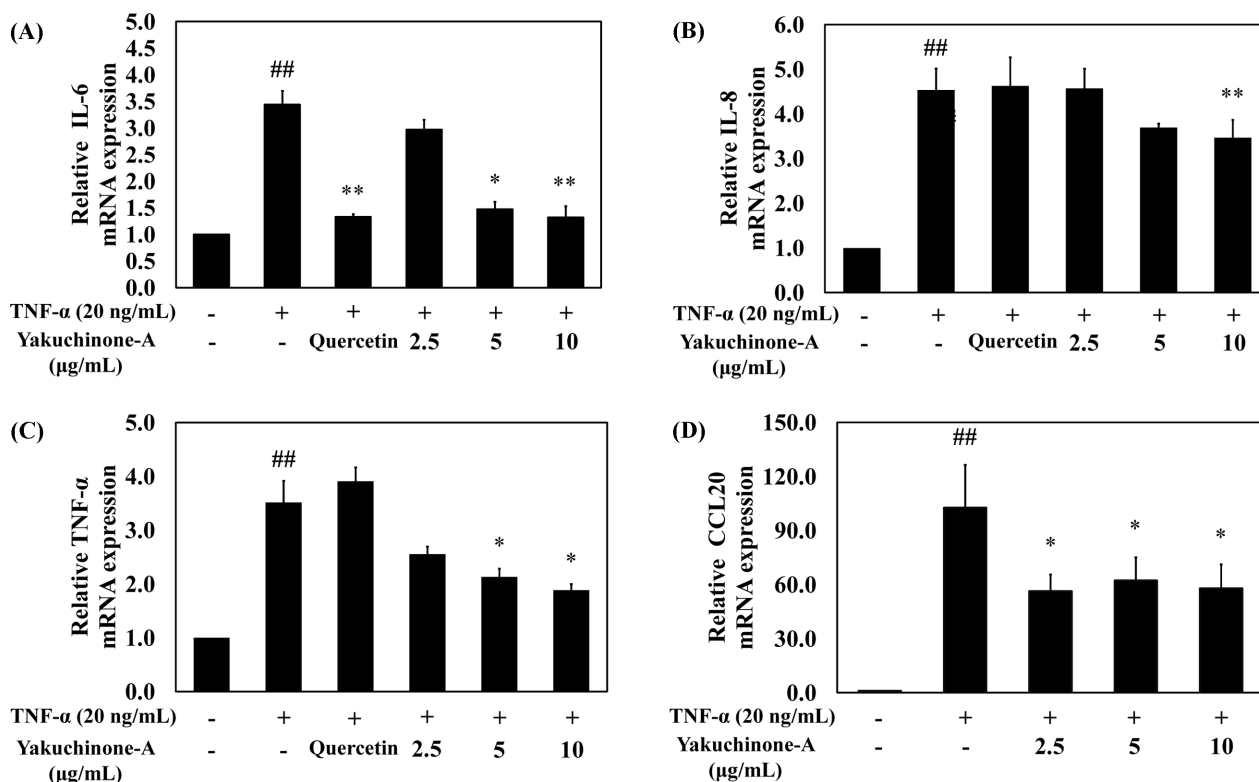


Fig. 2 Yakuchinone-A decreased the mRNA expression level of IL-6, IL-8, TNF- α and CCL20 in HaCaT cells. After stimulating HaCaT with TNF- α , yakuchinone-A was treated for 2 h to confirm mRNA expression of inflammatory cytokines and chemokine. Yakuchinone-A suppressed mRNA expression of IL-6 (A), IL-8 (B) and TNF- α (C) in a concentration-dependent manner, and significantly inhibited the expression of CCL20 (D). ## p <0.01, compared to control, * p <0.05, ** p <0.01 compared to TNF- α group

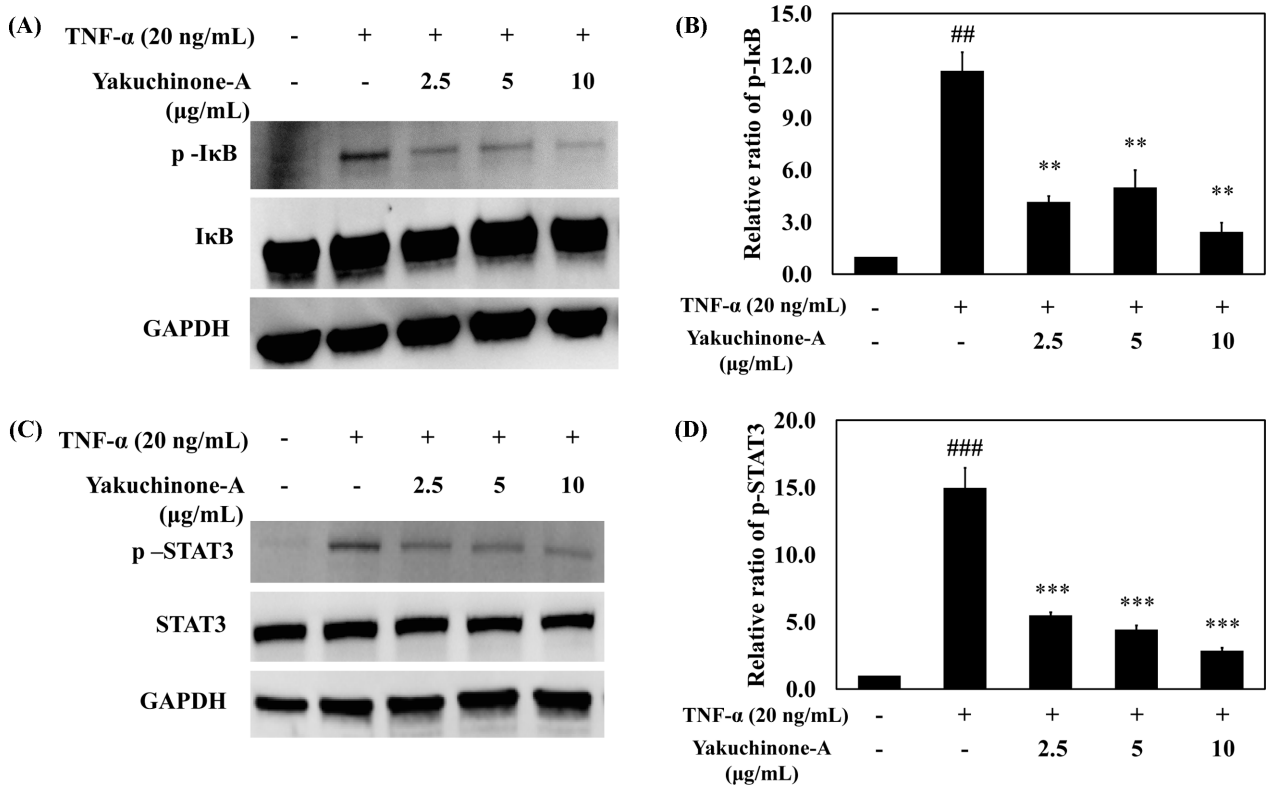


Fig. 3 Phosphorylation of I κ B and STAT3 protein was decreased by yakuchinone-A. Yakuchinone-A was treated with 2, 2.5 and 10 μ g/mL for 2 h. Yakuchinone-A specifically inhibited phosphorylation of I κ B (A, B) and STAT3 (C, D). p-I κ B (B), p-STAT3 (D) were analyzed via image J. ^{##} $p < 0.01$, ^{###} $p < 0.001$ compared to control, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ compared to TNF- α group

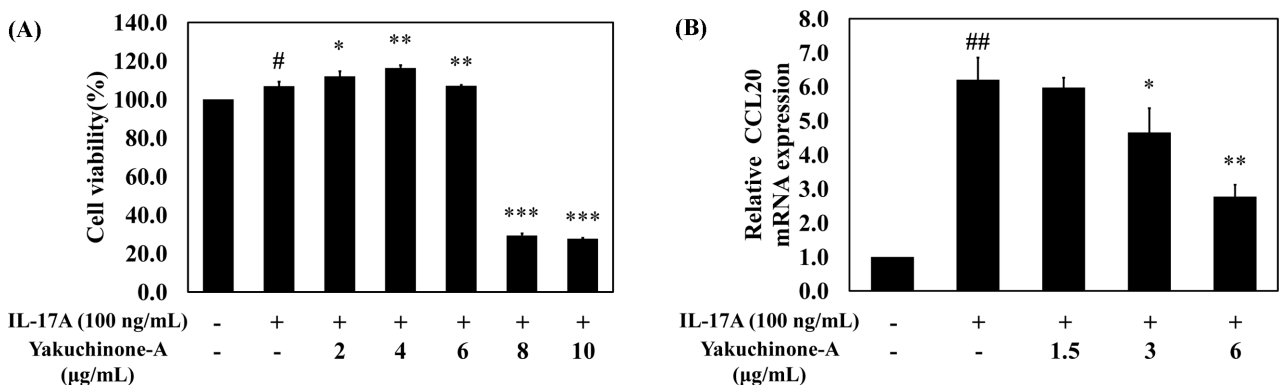


Fig. 4 Yakuchinone-A inhibited CCL20 mRNA expression in the presence of IL-17A (100 ng/mL). Cytotoxicity was confirmed by IL-17 and yakuchinone-A in HaCaT cells for up to 48 h using CCK-8 assay. (A) Cytotoxicity of yakuchinone-A was not detected up to 6 μ g/mL when co-treated with IL-17A (100 ng/mL) in HaCaT cells. (B) Yakuchinone-A inhibited CCL20 mRNA expression in the presence of IL-17A as a concentration-dependent manner. [#] $p < 0.5$, ^{##} $p < 0.01$ compared to control, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ compared to IL-17A group

있는 CCL20 chemokine의 mRNA 발현을 확인하였다. TNF- α 처리군에서 CCL20의 mRNA 발현은 102.7 ± 23.7 배 증가하였고, 이때 yakuchinone-A를 처리한 결과 TNF- α 처리군 대비 2.5 μ g/mL의 저농도 조건에서 약 $46.6 \pm 12.3\%$ 수준으로 유의성 있게 감소되었다(Fig. 2D). 따라서 위 결과로부터 우리는 yakuchinone-A가 건선 유발 cytokine인 IL-6/8, TNF- α 뿐 아니라 CCL20 chemokine의 mRNA 발현을 억제함을 알 수 있었다.

Yakuchinone-A에 의한 NF- κ B 및 STAT3 pathway의 조절
 Yakuchinone-A에 의해 염증성 cytokine 및 chemokine의 발현 억제 메커니즘 규명을 위해 western blot을 통해 NF- κ B 및 STAT3 신호전달 기작을 관찰하였다. 먼저, I κ B는 NF- κ B와 복합체를 이루어 전사조절 인자인 NF- κ B 기능을 저해하지만, 신호전달에 의해 인산화 되면 NF- κ B와 분리되어 NF- κ B가 핵 안으로 이동하게 되며, 여러 cytokine 및 chemokine 단백질 발현

이 촉진된다[27]. TNF- α 에 의해 활성화된 HaCaT 세포에서 yakuchinone-A에 의한 I κ B 단백질의 인산화를 관찰한 결과, TNF- α 처리군에서는 무처리군 대비 인산화 된 I κ B의 발현이 11.7 \pm 1.1배 증가하였고, 이때 yakuchinone-A를 2.5, 5, 10 μ g/mL 농도로 동시 처리 시 TNF- α 처리군 대비 각각 64.4 \pm 1.2, 57.6 \pm 5.1, 79.1 \pm 5.0%로 단백질 발현이 억제되었다(Figs. 3A, B). 또한 IL-6, IL-8, CCL20 발현뿐 아니라 염증반응 촉진과 Th17 분화 등에 밀접하게 연관된 STAT3 단백질의 인산화 조절 변화를 관찰한 결과, TNF- α 처리군에서는 무처리군 대비 인산화된 STAT3의 발현이 약 15.0 \pm 1.5배 증가된 반면, TNF- α 와 yakuchinone-A를 2.5, 5, 10 μ g/mL 농도조건으로 동시 처리한 결과 TNF- α 처리군 대비 63.3 \pm 2.1, 70.2 \pm 2.8, 80.8 \pm 2.3% 수준만큼 감소하였다(Figs. 3C, D). 따라서 우리는 본 연구를 통해 yakuchinone-A는 TNF- α 에 의해 활성화된 keratinocyte에서 I κ B뿐만 아니라 STAT3 단백질의 인산화를 유의적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

IL-17A 유도된 HaCaT 세포에서 yakuchinone-A에 의한 CCL20 mRNA 발현 조절

건선 피부염 발병과 밀접한 관련이 있는 Th17 세포에서 분비되는 IL-17A는 각질형성세포를 자극하여 CCL20을 분비하는데, 이는 건선 피부염 발병 기작과 연계되어 있다고 알려진다. 따라서 우리는 HaCaT 세포에 IL-17A를 48시간 처리한 후 yakuchinone-A에 의한 CCL20 mRNA 발현을 관찰하였다. 먼저 IL-17A, yakuchinone-A의 세포독성을 확인하기 위해 CCK-8 assay를 수행하였다. HaCaT 세포에 IL-17A (100 ng/mL)과 yakuchinone-A를 농도별로 48시간 동시 처리한 결과, 최대 6 μ g/mL 농도까지 세포독성이 나타나지 않아 이후 실험에 yakuchinone-A의 최대 농도를 6 μ g/mL로 설정하여 진행하였다 (Fig 4A). 인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 IL-17A(100 ng/mL)을 처리한 후 yakuchinone-A를 1.5, 3, 6 μ g/mL 농도로 동시 처리한 결과, IL-17A 처리군에서 CCL20의 발현이 무처리군 대비 약 6.2 \pm 0.7배 증가하였으나, yakuchinone-A를 3, 6 μ g/mL 농도로 동시 처리한 결과 25.0 \pm 7.4, 55.5 \pm 1.1% 수준만큼 CCL20 mRNA 발현이 감소되었다(Fig 4B). 따라서 위 결과들을 통해 IL-17A에 의해 활성화된 각질형성세포에서 CCL20의 발현 또한 yakuchinone-A에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

고찰

건선은 전 세계의 1~2%의 사람들에게서 나타나는 만성 염증성 피부질환으로, 건선에 대한 병인은 정확히 알려지지 않았지만, 최근 T 세포의 복잡한 상호작용으로 인한 질병임이 밝혀졌다 [28]. 이전까지 건선은 TNF- α 를 생산하는 Th1 세포에 의한 자가 면역질환으로 여겨져 TNF- α 를 타겟으로 하는 의약품이 널리 사용되었다[29]. 하지만 최근 Th17 세포의 발견을 통해 건선이 Th17 세포에 기인한다는 것이 보고되어 후속 연구들이 진행되고 있다. Th17 세포는 CD4⁺ T세포에서 APCs의 일종인 랑게르한스 세포를 통해 분화되며, keratinocyte에서 생산된 IL-1 β , IL-6, IL-23R 등에 의해 분화가 더욱 촉진되는 것으로 알려진다. Th17 세포는 keratinocyte에서 분비되는 chemokine CCL20

을 따라 염증 부위로 이동하여 IL-17을 분비하고, 이는 keratinocyte에서 CCL20 생산을 더욱 증폭시켜 염증반응을 촉발할 뿐 아니라 자가 면역질환과도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진다. 그러나 건선 피부염은 대표적인 난치성 피부질환으로 기존의 TNF- α 저해제 등의 치료법의 한계와 부작용이 보고되고 있어 새로운 천연 소재 기반의 후보물질을 규명하고자 하였다. 이에 우리는 yakuchinone-A의 건선 피부염증 조절 기능 및 향후 소재 개발 가능성을 규명하고자 하였다. 건선 피부염 시험 모델인 TNF- α 로 활성화된 HaCaT 세포에 yakuchinone-A를 처리한 결과에서 건선 피부염 지표인 IL-6, IL-8, TNF- α , CCL20의 mRNA 발현이 유의성 있게 감소하였다. 또한 IL-6, IL-8, TNF- α , CCL20의 mRNA 발현 조절은 NF- κ B/I κ B pathway 조절 및 STAT3의 단백질 인산화 억제를 통한 단백질 신호조절에 기인함을 확인하였다. 또 다른 *in-vitro* 건선 피부염 시험 모델인 IL-17A에 의해 활성화된 HaCaT 모델에서도 yakuchinone-A는 CCL20 발현을 유의적으로 감소시켰다. 한편 최근 컴퓨터 시뮬레이션 예측 연구에서는 curcumin과 구조적으로 유사한 yakuchinone-A가 COX2, IKK, TBK-1 등과 직접 결합하여 inhibitor로 작용할 가능성을 제시하였다[30]. 그러나 yakuchinone-A는 TNF- α 수용체 신호조절 내 ERK 등 MAPK pathway 인산화 조절에는 직접적으로 관여하지 않았다(data not shown). 따라서 추후 후속 연구를 통해 yakuchinone-A가 IKK의 직접적인 inhibitor로 작용하는지 규명할 필요가 있으며 항염증 신호전달에 대한 정확한 메커니즘 규명과 건선 피부염 마우스 모델에서의 유효성 검증이 필요하다. 위 연구 결과들을 통해 우리는 yakuchinone-A가 인간 피부 모델에서 NF- κ B/I κ B와 STAT3 pathway를 통해 염증성 cytokine 및 chemokine CCL20 발현을 억제하여 향후 건선 피부염 개선 소재 가능성을 확인하였다.

감사의 글 이 논문은 2019학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구입니다.

초록

건선(psoriasis)은 인체 피부조직 중 표피의 과증식 및 다양한 크기의 흉만, 인설 등이 동반되는 난치성 자가면역 피부질환이다. 건선 피부염 발병 기작은 명확히 규명되지 않았으나 각질형성세포의 과분화 과정에 관여하는 염증성 cytokine과 Th17 세포를 포함한 면역세포를 염증부위로 유인하는 chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)이 발병과정에 관여하는 것으로 알려진다. 따라서 건선치료에 효과적인 천연 소재를 발굴하기 위해 예로부터 항염증 활성이 알려진 익지인(*Alpiniaoxyphylla Miquel*)의 유효성분인 yakuchinone-A의 건선 피부염 개선효과를 연구하였다. 먼저 CCK-8 assay 통해 human keratinocyte (HaCaT) 세포에 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)와 yakuchinone-A를 동시 처리하여 세포독성을 관찰한 결과, yakuchinone-A는 10 μ g/mL까지 세포독성이 관찰되지 않았다. TNF- α 를 HaCaT 세포에 처리하여 염증을 유발한 후 yakuchinone-A를 농도별로 처리한 결과 IL-6, IL-8, TNF- α 등 건선 피부염 유발 cytokine의 mRNA 발현이 각각 61.4 \pm 7.5, 23.6 \pm 1.5, 46.0 \pm 4.8% 수준으로 감소하였고, Th17 세포를 유인하는 chemokine인 CCL20 또

한 yakuchinone-A에 의해 유의적으로 억제되었다. 또한 CCL20 발현에 관여하는 NF- κ B/I κ B pathway에서 I κ B 인산화 및 STAT3 인산화가 yakuchinone-A에 의해 79.1 \pm 5.0, 80.8 \pm 2.3% 수준만큼 농도 의존적으로 억제되었다. 마지막으로 Th17 세포에 의해 분비되는 IL-17A에 의해 활성화된 HaCaT 세포에 yakuchinone-A를 처리한 결과, CCL20 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 이러한 결과들을 토대로 yakuchinone-A는 건선 피부염 개선 활성을 가지며, 향후 새로운 건선 피부염 개선 소재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

Keywords 각질형성세포 · 건선 · 억제인 · 항염증 · Chemokine (C-C motif) ligand 20 · Yakuchinone-A

References

- Choi YM, Wu JJ (2015) Trends in the Frequency of Original Research in Acne Vulgaris, Rosacea, Dermatitis, Psoriasis, Skin Cancer, and Skin Infections, 1970–2010. *Perm J* 19: 44–47
- Michalek IM, Loring B, John SM (2017) A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol* 31: 205–212
- Liu Y, Lagowski JP, Gao S, Raymond JH, White CR, Kulesz-Martin MK (2010) Regulation of the psoriatic chemokine CCL20 by E3 ligases Trim32 and Piasy in keratinocytes. *J Eur Acad Dermatol* 130: 1384–1390
- Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A (2007) Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 9: 461–467
- Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu BM, Tato C, Akhico Y, Hennighausen L, O'Shea JJ (2006) Selective regulatory function of Socs 3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *P Natl Acad Sci USA* 103: 8137–8142
- Stockinger B, Veldhoen M (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19: 281–286
- Harper EG, Guo C, Rizzo H, Lillis JV, Kurtz SE, Skorcheva I, Purdy D, Fitch E, Lordanov M, Blauvelt A (2009) Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* 129: 2175–2183
- Kao CY, Huang F, Chen Y, Thai P, Wachi S, Kim C, Tam L, Wu R (2005) Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF- κ B-dependent signaling pathway. *J Immunol* 175: 6676–6685
- Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Muller A, Malefyt RD, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A, Deng G (2000) Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 164: 6621–6632
- Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Kodama A, Hirota Y, Koga K, Yoshino O, Harada M, Yano T, Taketani Y (2010) Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 β -, TNF- α -, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells. *Endocrinology* 151: 5468–5476
- Kaser A, Ludwiczek O, Holzmann S, Moschen AR, Weiss G, Enrich B, Graziadei I, Dunschdorfer S, Wiedermann CJ, Mürzl E, Jasarevic Z, Romani N, Offner FA, Tilg H, Grasl E (2004) Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 24: 74–85
- Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG (2007) Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care* 175: 998–1005
- Tzu J, Kerdel F (2008) From conventional to cutting edge: the new era of biologics in treatment of psoriasis. *Dermatol Ther* 21: 131–141
- Chang YM, Tsai CT, Wang CCR, Chen YS, Lin YM, Kuo CH, Tzang BS, Chen RJ, Tsai FT, Huang CY (2013) Alpinatoxyphyllaefructus (*AlpiniaOxyphyllaMiq*) extracts inhibit angiotensin-II induced cardiac apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells. *Biosci Biotech Bioch* 77: 229–234
- Liu A, Zhao X, Li H, Liu Z, Liu B, Mao X, Guo L, Bi K, Jia Y (2014) 5-Hydroxymethylfurfural, an antioxidant agent from *AlpiniaoxyphyllaMiq*. improves cognitive impairment in A β 1–42 mouse model of Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol* 23: 719–725
- Lin RJ, Yen CM, Chou TH, Chiang FY, Wang GH, Tseng YP, Wang L, Huang TW, Wang HC, Chan LP, Liang CH, Ding HY (2013) Antioxidant, anti-adipocyte differentiation, antitumor activity and anthelminticactivities against *Anisakis simplex* and *Hymenolepis nana* of yakuchinone A from *Alpiniaoxyphylla*. *BMC Complem Altern M. dio*: 10.1186/1472688213237
- Lee E, Park KK, Lee JM, Chun KS, Kang JY, Lee SS, Suerh YJ (1998) Suppression of mouse skin tumor promotion and induction of apoptosis in HL-60 cells by *AlpiniaoxyphyllaMiquel* (Zingiberaceae). *Carcinogenesis* 19: 1377–1381
- Yu X, An L, Wang Y, Zhao H, Gao C (2003) Neuroprotective effect of *AlpiniaoxyphyllaMiq*.fruits against glutamate-induced apoptosis in cortical neurons. *Toxicol Lett* 144: 205–212
- Chang YM, Chang HH, Tsai CC, Lin HJ, Ho TJ, Ye CX, Chiu LP, Chen YS, Chen RJ, Huang CY, Lin CC (2017) *AlpiniaoxyphyllaMiq*.fruit extract activates IGFR-PI3K/Akt signaling to induce Schwann cell proliferation and sciatic nerve regeneration. *BMC Complem Altern M. doi*: 10.1186/s1290601716952
- Choi DH, Kim MR, Kim MY, Kim HH, Park SY, Hwang HS (2019) Studies on Antioxidant, Anti-inflammatory and Whitening Effects of Oriental Herbal Extracts (Mix) including *Eucommiae cortex*. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 45: 37–47
- Qing ZJ, Yong W, Hui LY, Yong LW, Long LH, Ao DJ, Xia PL (2012) Two new natural products from the fruits of *Alpiniaoxyphylla* with inhibitory effects on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophage cells. *Arch Pharm Res* 35: 2143–2146
- Flynn DL, Rafferty MF, Boctor AM (1986) Inhibition of 5-hydroxy-eicosatetraenoic acid (5-HETE) formation in intact human neutrophils by naturally-occurring diarylheptanoids: inhibitory activities of curcuminoids and yakuchinones. *Prosta Leukotr Med* 22: 357–360
- Chun KS, Kang JY, Kim OH, Kang H, Surh YJ (2002) Effects of yakuchinone A and yakuchinone B on the Phorbol ester-induced expression of COX-2 and iNOS and activation of NF- κ B in mouse skin. *J Environ Pathol Tox.* doi: 10.1615/JenvironPatholToxicolOncol.v21.i2.60
- Jang S, Jung JC, Oh S (2007) Synthesis of 1, 3-diphenyl-2-propen-1-one derivatives and evaluation of their biological activities. *Bioorgan Med Chem* 15: 4098–4105
- Huang KK, Lin MN, Hsu YL, Lu I, Pan I, Yang JL (2019) *Alpiniaoxyphylla* Fruit Extract Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through the Regulation of Th1/Th17 Cells. *Evid Based Compl Alt.* doi: 10.1155/2019/6797030
- Choi DH, Hwang HS (2019) Anti-inflammation activity of brazilin in TNF- α induced human psoriasis dermatitis skin model. *Appl Biol Chem.* Doi: 10.1186/s137650190455z
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M (1997) The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 91: 243–252
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE (2007) IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821–852
- Mease PJ (2002) Tumour necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: pathophysiology and treatment with TNF inhibitors. *Ann Rheum Dis* 61: 298–304
- Ullah A, Johora FT, Sarkar B, Araf Y, Rahman H (2020) Curcumin analogues as the inhibitors of TLR4 pathway in inflammation and their drug like potentialities: A computer-based study. *bioRxiv.* doi: 10.1101/2020.01.27.921528