



Quercetin suppress CCL20 by reducing I κ B α /STAT3 phosphorylation in TNF- α /IL-17A induced HaCaT cells

Mi Ran Kim¹ · Min Young Kim¹ · Hyung Seo Hwang¹

TNF- α /IL-17A 유도된 HaCaT 세포주에서 Quercetin의 I κ B α /STAT3 인산화 조절에 의한 CCL20 발현 억제

김미란¹ · 김민영¹ · 황형서¹

Received: 2 July 2020 / Accepted: 19 August 2020 / Published Online: 30 September 2020
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2020

Abstract Quercetin is a polyphenol compound with excellent antioxidant and anti-inflammatory activity. However, little has been reported about the efficacy of quercetin to control psoriasis. Thus, we aimed to investigate the effect of quercetin to regulate psoriatic dermatitis with HaCaT cell lines activated by TNF- α and IL-17A, which are *in vitro* psoriasis skin models. When quercetin was treated with TNF- α -activated HaCaT cell line, inflammatory cytokine expressions such as IL-1 α , IL-1 β and IL-6 were reduced by 49.1 \pm 7.14, 42.8 \pm 8.16, and 34.5 \pm 2.52%, respectively. In addition, mRNA expression levels of IL-8 and CCL20 the chemokines that attract immune cells such as Th17 cells and dendritic cells to the inflammatory reaction site, were also reduced by 38.4 \pm 5.83 and 52.9 \pm 4.59% compared to the TNF- α treatment group. The expression of proteins KRT6A and KRT16, which was nonspecifically increased in psoriatic skin was also significantly suppressed. Moreover, phosphorylation of I κ B α and STAT3 proteins activated by TNF- α was also significantly inhibited. After stimulating the HaCaT with IL-17A, known as another psoriasis-inducing cytokine, it was observed that I κ B α mRNA expression decreased by 55.8 \pm

5.28%, and STAT3 phosphorylation was downregulated by 36.3 \pm 6.81%. Finally, after co-activation by TNF- α /IL-17A, quercetin inhibited all of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α and CCL20 gene expression. The above results strongly suggest that quercetin is a material that has not only anti-oxidant and anti-inflammatory activities, but also has an activity in improving psoriasis.

Keywords C-C motif chemokine ligand 20 · Keratinocyte · Psoriasis · Quercetin · Signal transducer and activator of transcription 3

서론

인체 내 피부조직은 외부 충격이나 병원성 미생물 감염 등에 의해 피부 손상이 발생하면 염증성 면역 반응과 피부 재생 기작이 조화롭게 이어져 항상성을 유지한다. 따라서 피부 내 염증 조절의 실패는 오히려 피부조직 손상을 유발하고, 급성 또는 만성 염증질환의 발병 원인이 된다[1,2]. 대표적인 자가면역 피부질환으로 알려진 건선(psoriasis) 피부염 발생 주변에는 C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20), IL-1, IL-6, IL-8, IL-17 등의 사이토카인 및 케모카인 분비에 의한 광범위한 염증 반응과 각질형성세포의 비정상적인 분화로 인한 두꺼워진 각질층이 나타난다[3-6]. LARC (Liver and activation-regulated chemokine), Macrophage inflammatory protein-3 α 로도 알려지는 CCL20 은 피부 각질형성세포, 기관지 상피 및 내장 상피세포와 같은 표면 상피세포에서 주로 발현되며, 특정 수용체인 C-C motif chemokine receptor 6과 결합하여 병원성 미생물의 항원을 표면에 표지하는 수지상세포(Dendritic cell) 및 T helper (Th)17 세

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

¹School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 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.

포를 염증 부위로 유인하여 염증반응을 더욱 촉진시킨다[7-9]. 따라서 건선 피부염 발생과 CCL20에 의한 Th 세포의 유인 및 활성화가 매우 밀접하게 연관되어 있어 건선 치료 관점에서 CCL20 조절 기능은 매우 중요하다[10,11]. 또한 건선 피부는 NF- κ B STAT3 전사인자의 발현 및 염증성 사이토카인 분비로 인해 과도한 염증 반응이 촉진되는 경향을 보인다[12-15].

건선피부염에서는 많은 종류의 사이토카인, 케모카인 및 염증성 분자의 생성과 함께 각질 세포의 비정상적인 케라틴 단백질 발현 패턴이 발견된다[16]. 상피 세포 골격의 주요 성분인 케라틴 단백질은 각질형성세포 내 단백질 중 약 30-80%를 차지하며, I형과 II형 타입의 케라틴이 쌍을 이루어 피부 표피의 구조적 안정성 및 분화 과정에서 중요한 역할을 담당한다. 정상 피부조직에서 표피층은 가장 바깥 부분에 위치하며, 기저층에서 각질층까지 각질형성세포의 분화가 일어난다. 분화 과정 중 기저층에서는 주로 KRT5-KRT14 단백질이 발현되지만, 분화가 시작되면서 KRT5-KRT14 단백질은 감소하고, 대신 KRT1-KRT10 단백질 발현이 관찰된다[17]. 반면, 건선처럼 염증반응이 활성화된 각질세포에서는 KRT1-KRT10 단백질들은 하향 조절되고, KRT6/16/17 단백질 발현이 현저하게 증가된다. 피부조직에서 손상된 각질 세포는 핵산 및 단백질과 같은 다양한 손상 관련 분자 패턴(DAMP)을 방출하고, 이들은 MAPK 및 전사 인자를 포함한 신호 전달 분자를 활성화시킨다. 이때 NF- κ B, CEBP β 및 AP1은 핵으로 이동하여 KRT6, KRT16 및 KRT17의 전사를 더욱 촉진한다. Th17 세포 유래 IL-17, IL-22는 ERK1/2 및 STAT1/3의 활성화를 초래하여 KRT17 발현을 유도한다[18-20].

일반적으로 폴리페놀 화합물은 면역세포의 사이토카인 생성 및 분비 조절에 다양한 기능을 가지는데, 이 중 대표적 플라보노이드 계열 화합물인 quercetin은 양파 껍질, 케일 등 자연 내 많은 식물 속에 함유되어 있으며, 현재까지 항산화, 항염증 활성 등 다양한 생물학적 효능이 보고 되었다[21-24]. Quercetin은 LPS로 유도된 대식세포 RAW264.7에서 NO, iNOS, COX-2 발현을 억제하였고, p38, JNK1/2, ERK1/2, I κ B, IRAK1, TRAF6, TAK1의 활성화를 저해하였다[25,26]. 또한 인간 체대 정맥 내피 세포(HUVEC)에서 H₂O₂로 유도된 산화적 손상 및 염증에 대해서도 혈관 세포 부착 분자1 (VCAM-1) 및 CD80 발현을 감소시켰다[27]. 최근에는 IMQ-유도 건선 마우스 동물 모델에서 NF- κ B 신호 활성화 억제하여 TNF- α 뿐 아니라 IL-6, IL-17 등 염증성 사이토카인 발현을 저해시키는 것이 보고되었다[28]. 그러나, 건선 피부염 발병과 밀접한 CCL20 발현 조절에 대한 결과는 거의 알려지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro* 건선 모델인 TNF- α /IL-17A 유도 HaCaT 세포주 모델에서 quercetin에 의한 CCL20 및 케라틴 단백질 조절 기능을 규명하고 건선 억제 효능을 규명하였다.

재료 및 방법

시약

본 연구에서 사용된 quercetin hydrate는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, dimethyl sulfoxide에 10 mg/mL 농도로 용해한 뒤 -20 °C에 보관하였다. TNF- α 는

Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, IL-17A는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였으며, 모두 PBS (Welgene, Gyeongbuk, Korea) buffer에 녹여 사용하였다.

세포배양

HaCaT 세포주(Human keratinocyte cell lines)는 고려대학교 (Seoul, Republic of Korea)에서 분양 받았으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (Welgene, Gyeongbuk, Korea)에 10% Fetal bovine serum (Welgene)과 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 혼합한 배지를 이용해 37 °C, CO₂ 5% 조건에서 배양하였다. 배양 접시에 세포가 70-80%로 증식하면 Trypsin-EDTA Solution, 1X (Welgene)을 이용하여 배양 접시에 부착된 세포를 분리시켜 계대 배양 하였다.

세포독성 실험

Cell counting kit-8 (CCK-8 assay, DogenBio, Seoul, Korea) 방법으로 세포독성을 평가하였다. HaCaT 세포를 24-well plate에 5.0×10⁴ cells/well로 분주하여 37 °C, CO₂ 5% 배양기에서 24시간 동안 안정화시켰다. 이때 serum-free 배지를 이용하여 quercetin을 농도별로 희석하여 분주한 뒤 최대 72시간 동안 배양하였다. 기존 배지를 제거한 후 phenol red-free 배지와 CCK-8 용액을 각각 10:1로 희석하여 well에 500 μ L씩 분주하였고 30분간 반응시킨 후 상등액만 별도로 채취하여 450 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아래 수식에 따라 측정되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \left(\frac{OD_{\text{sample}^a} - OD_{\text{blank}^b}}{OD_{\text{sample}^c} - OD_{\text{blank}^b}} \right) \times 100$$

a: Quercetin 처리군의 흡광도

b: CCK-8 solution의 흡광도

c: 대조군의 흡광도

RNA 추출 분리 및 real time RT-PCR

HaCaT 세포주를 6-well plate에 4.0×10⁵ cells/well로 분주하여 37 °C, CO₂ 5% 배양기에서 24시간 동안 안정화시켰다. 이때 건선 유발을 위해 TNF- α (Sigma aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 IL-17A (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 각각의 농도 조건에서 처리한 후 serum-free 배지 조건에서 quercetin을 각 농도별로 동시 처리하였다. TRIzol reagent (Ambion, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하고, Revertra ACE kit (Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA로 역전사하였다. PCR 반응은 StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 장비를 이용하여 50 °C 2분, 95 °C 10분 holding stage, 95 °C 15초, 60 °C 1분 cycling stage로 총 45회 실시하였다. 위 실험에서 사용한 probe들은 Table 1에 별도로 표기하였다.

Western blot을 활용한 단백질 발현의 분석

HaCaT 세포주를 6-well plate에 8.0×10⁵ cells/well로 분주하여 37 °C, CO₂ 5% 배양기에서 24시간 동안 안정화하고, serum-free 배지 조건에서 TNF- α (20 ng/mL)와 quercetin을 농도별로 처리

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-1 α	Interleukin 1 alpha	Hs00174092_m1
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Hs01555410_m1
IL-6	Interleukin 6	Hs00174131_m1
IL-8 (CXCL8)	C-X-C motif chemokine ligand 8	Hs00174103_m1
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	Hs01011368_m1
KRT6A	Keratin 6A	Hs01699178_g1
KRT16	Keratin 16	Hs00373910_g1
I κ B α (NFKBIA)	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Hs00355671_g1

Table 2 Protein and antibody catalog number in western blot analysis

Symbol	Protein name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	MA5-15738 ^b
I κ B α	Nuclear factor of kappa lighth polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	39-7700 ^b
p-I κ B α	Phospho-nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	9246 ^a
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	4904 ^a
p-STAT3	Phospho-signal transducer and activator of transcription 3	9145 ^a
Goat anti-Rabbit IgG(H+L) Secondary Antibody, HRP		31460 ^b
Goat anti-Mouse IgG(H+L) Secondary Antibody, HRP		31430 ^b

^a Cell Signaling Technology

^b Invitrogen

하였다. 기존 배지를 제거한 뒤 차가운 DPBS (Welgene)로 3회 washing 하였다. RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Protease and Phosphatase Inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) 혼합액을 100 μ L를 분주한 뒤 단백질을 추출하고 전기영동을 실시하였다. PVDF membrane에 transfer시킨 뒤 4°C에서 primary antibody (1:1000)를 처리하였다. 그 후 secondary antibody (1:10000)를 1시간 동안 처리한 뒤 ECL 용액(Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 PVDF membrane 위에 분주하고, 이미지 처리 장치(MicroChem 4.2, DNR, Neve Wamin, Israel)를 이용하여 단백질 발현을 관찰하였다. 이후 Image J 프로그램(N.I.H, Bethesda, MD, USA)을 통해 단백질의 발현량을 정량화 하였다. 실험에서 사용된 모든 항체는 Table 2에 별도로 표기하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 측정을 실시하여 각 군별로 평균과 표준 편차를 사용해 표기 하였으며, Student’s t-test를 활용하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

TNF- α 유도 HaCaT 세포주에서 quercetin에 의한 CCL20 발현 억제

TNF- α 및 quercetin이 HaCaT 세포주에 미치는 독성을 평가하기 위해 CCK-8 assay를 수행하였다. Serum-free 조건에서 TNF- α (20 ng/mL)와 quercetin을 동시 처리한 결과, quercetin

10 μ g/mL 농도 조건에서 세포 생존율이 131.5 \pm 7.13%로 세포 독성이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 따라서 이후 실험에서는 TNF- α 를 20 ng/mL, quercetin의 최대 농도는 10 μ g/mL로 설정하였다. 건선 피부염 시험 모델인 TNF- α 유도 HaCaT 세포주에 quercetin을 최대 10 μ g/mL 농도 조건으로 처리한 후 염증성 사이토카인 IL-1 α , IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현을 확인한 결과, TNF- α 단독 처리군에서 IL-1 α mRNA 발현량은 무처리군 대비 2.5 \pm 0.40배 증가하였고, 양성대조군으로 사용된 brazilin은 TNF- α 처리군 대비 64.3 \pm 4.56% 감소하였으며, quercetin 2.5, 5, 10 μ g/mL 농도별로 처리한 결과 TNF- α 처리군 대비 각각 33.8 \pm 9.00, 37.8 \pm 9.98, 49.1 \pm 7.14% 감소하였다(Fig. 1B). 또 다른 염증성 사이토카인 IL-1 β 에서는 quercetin 10 μ g/mL 농도 처리군에서 TNF- α 처리군 대비 약 42.8 \pm 8.16% 감소 하였다(Fig. 1C). Quercetin에 의한 IL-6, IL-8 mRNA 발현양 또한 quercetin에 의해 유의성있게 감소하였다(Fig. 1D, 1E). 건선 피부염의 중요한 인자인 CCL20 케모카인의 mRNA 발현 변화를 관찰한 결과, TNF- α 에 의해 활성화된 HaCaT 세포주에서 CCL20 mRNA 발현량이 무처리군 대비 5.6 \pm 0.55배 증가되어 TNF- α 유도 HaCaT 세포주에서 CCL20 mRNA 발현이 정상적으로 작동하였음을 확인하였다. 양성 대조군인 brazilin을 7 μ g/mL 농도 조건으로 처리하였을 때 TNF- α 단독 처리군 대비 약 79.0 \pm 2.23% 감소하였고, 동일한 조건에서 TNF- α 와 quercetin을 각 농도별로 동시 처리한 결과 TNF- α 단독 처리군 대비 각각 19.5 \pm 5.71, 32.5 \pm 4.64, 52.9 \pm 4.59% 감소하여 농도 의존적 방식으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 1F). 마지막으로 건선에서 비특이적으로 증가되는 KRT6A 및 KRT16의 발현 변화를 관찰한 결과, KRT6A 및 KRT16 유전자

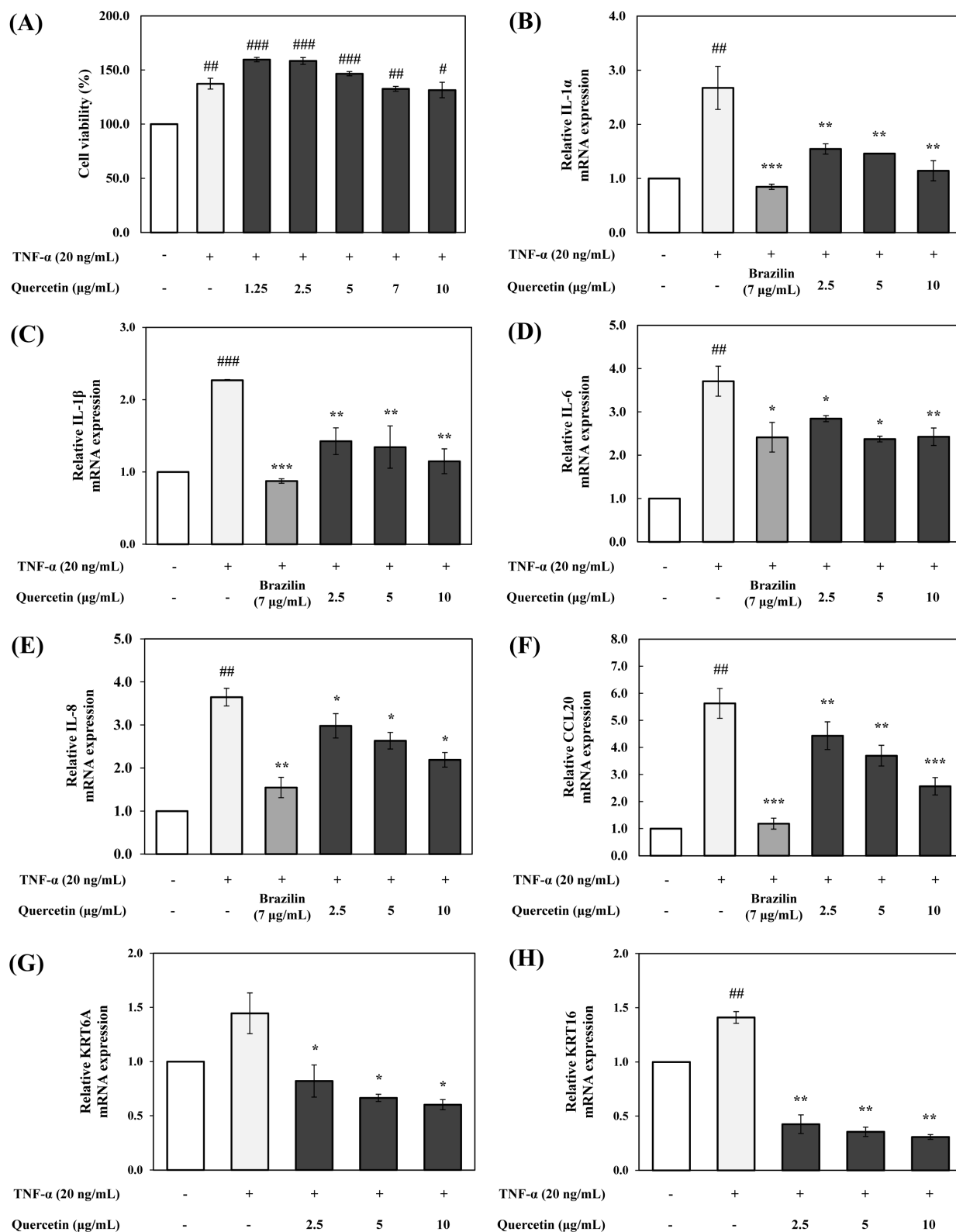


Fig. 1 Quercetin inhibited pro-inflammatory cytokine, chemokine and psoriasis related keratins. (A) The cytotoxicity was evaluated by the CCK-8 assay and the maximum concentration of quercetin was determined to be 10 μg/mL. Quercetin decreased mRNA expression of (B-D) pro-inflammatory cytokines, (E, F) chemokines and (G, H) psoriasis related keratin on TNF-α stimulated HaCaT cells. Gene expression levels were confirmed by real time RT-PCR analysis. All experimental results were expressed as the mean±standard deviation after repeating 3 experiments. #*p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001, compared to control, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, compared to TNF-α treated control

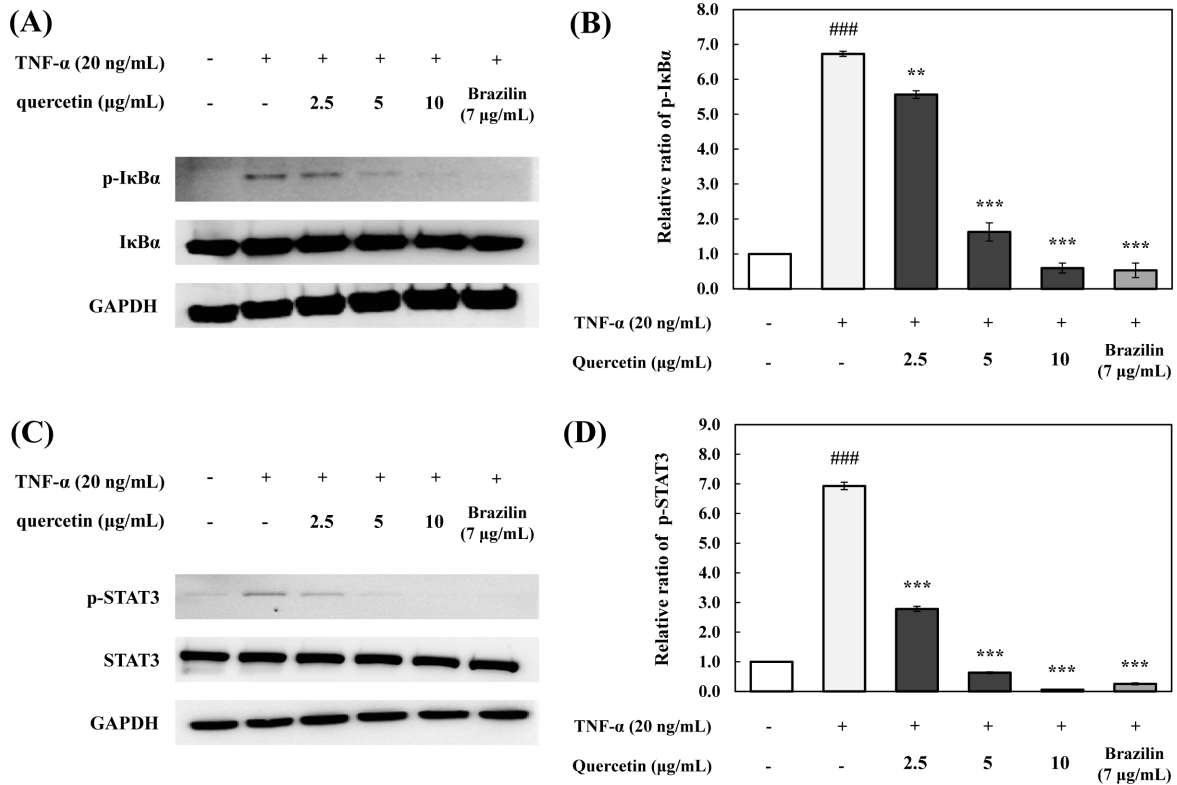


Fig. 2 Effect of quercetin on protein expression of p-IκBα and p-STAT3 in TNF-α induced HaCaT cells. (A) Quercetin suppressed phosphorylation of IκBα and STAT3 in TNF-α stimulated HaCaT cells in a concentration-dependent manner. (C) STAT3 phosphorylation was down regulated by quercetin as concentration dependent manner. (B, D) Quantification of p-IκBα and p-STAT3 protein expression level using Image J programs. All experimental results were expressed as the mean ± standard deviation after repeating 3 experiments. ###*p* < 0.001, compared to control, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, compared to TNF-α treated control

의 mRNA 발현량 또한 quercetin에 의해 농도 의존적 방식으로 감소하였다(Fig. 1H). 위 결과들을 통해 quercetin은 TNF-α로 유도된 HaCaT 세포주에서 염증성 사이토카인, 케모카인 분비를 억제할 뿐 아니라 건선 피부에서 비특이적으로 증가하는 KRT6A/16 발현 또한 유의적으로 억제함을 알 수 있었다.

Quercetin에 의한 IκBα 및 STAT3 단백질 인산화 조절

각질형성세포 내 CCL20 단백질 발현은 NF-κB 및 STAT3 신호전달 기작과 밀접하게 연결되어 있다[29]. 따라서 TNF-α에 의해 유도된 HaCaT 세포주에서 quercetin에 의한 CCL20 신호전달 조절 메커니즘을 규명하기 위해, western blot 기법을 활용하여 IκBα/NFκB complex 내 IκBα의 인산화 조절 여부를 확인하였다. TNF-α로 유도된 HaCaT 세포주에서 인산화된 IκBα 단백질은 약 6.7±0.07배 증가하였고, quercetin을 각각 농도별 2.5, 5, 10 μg/mL로 처리한 결과 IκBα 단백질의 인산화가 유의성 있게 억제되었다(Fig. 2A). 인산화된 IκBα 단백질은 양성 대조군으로 사용한 brazilin 처리군에서 약 92.2±3.05% 감소하였고, quercetin 2.5, 5, 10 μg/mL 처리군에서는 TNF-α 단독 처리군 대비 17.3±2.41, 75.8±3.57, 91.1±2.10% 감소하였다(Fig. 2B). 이는 quercetin이 IκBα 단백질 인산화 억제를 통해 CCL20 유전자 발현을 유의성 있게 억제함을 보여준다. 또한 TNF-α에 의한 CCL20 발현 조절 기작은 STAT3 단백질 활성화

와도 밀접하게 연관되어 있다. 따라서 TNF-α에 의해 유도된 HaCaT 세포주에서 quercetin에 의한 STAT3 단백질의 인산화를 관찰하였다. TNF-α로 유도된 HaCaT 세포주에서 인산화된 STAT3 단백질은 6.9±0.12배 증가되었고, quercetin에 의해 STAT3 단백질 인산화가 유의성 있게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2C). 이를 정량 분석한 결과, 양성 대조군으로 사용한 brazilin은 약 96.3±0.40% 감소시켰고, quercetin 10 μg/mL 농도 조건에서 99.1±0.27% 감소시켰다(Fig. 2D). 위 결과를 토대로 TNF-α로 활성화된 HaCaT 세포주에서 quercetin에 의한 염증성 사이토카인 및 CCL20 케모카인의 발현 조절 기작은 IκBα 및 STAT3 인산화 신호조절과 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다.

IL-17A 신호 기작에서 quercetin에 의한 IκBα 및 STAT3 조절

TNF-α와 함께 건선 유발 사이토카인으로 알려진 IL-17A에 의한 신호조절에서 quercetin의 관여하는지 확인하고자 하였다. 먼저, CCK-8 assay를 통해 IL-17A 및 quercetin에 의한 세포 독성을 확인하였다. HaCaT 세포주에 IL-17A를 100 ng/mL 농도로 처리했을 때 무처리군 대비 112.4±2.07% 세포 생존율을 보였으며, IL-17A와 quercetin (10 μg/mL)을 동시 처리한 시험군에서는 무처리군 대비 119.4±0.57% 세포 생존율을 확인하여 추후 실험에 적용하였다. 건선 유발 사이토카인으로 알려진 IL-17

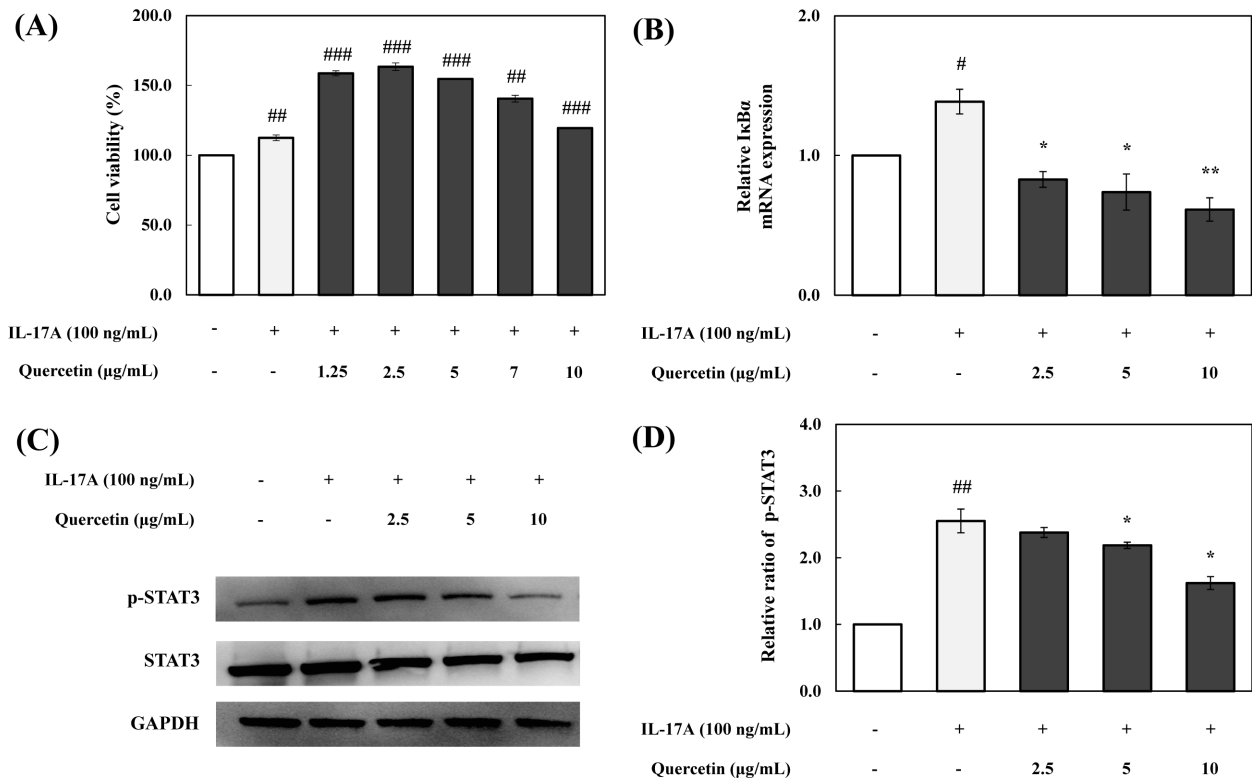


Fig. 3 Quercetin down regulates IκBα and STAT3 phosphorylation in the presence of IL-17A. Cell viability was analyzed by CCK-8 assay to understand the effect of IL-17A. (A) Concentration of 10 μg/mL was found to be the maximum concentration without inducing cytotoxicity. (B) Quercetin suppressed IκBα mRNA expression as concentration dependent manner in IL-17A induced HaCaT cells. (C) Protein expression of STAT3 was examined using western blot. (D) Quantification of p-STAT3 protein expression level using image J program. All experimental results were expressed as the mean ± standard deviation after repeating 3 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to IL-17A treated control

은 NF-κB 및 STAT3 기작을 포함하는 신호 전달을 통해 각질 형성세포가 다양한 케모카인, 사이토카인 및 다른 염증성 매개체를 생성하도록 자극한다[30,31]. 따라서 IL-17A 처리 조건에서 quercetin에 의한 IκBα mRNA 변화를 관찰하였다. IL-17A 처리군은 무처리군 대비 1.4±0.09배 증가하였고, IL-17A 및 quercetin 10 μg/mL 농도로 동시 처리한 결과 IL-17A 단독 처리군 대비 각각 55.8±5.28% mRNA 발현이 감소하였다(Fig. 3B). 또한 IL-17A로 유도된 HaCaT 세포주에서 quercetin에 의한 STAT3 인산화 조절 여부를 관찰한 결과, 무처리군 대비 IL-17A 처리군에서 STAT3 단백질 인산화가 유도된 것을 확인하였고, quercetin은 유의성 있게 STAT3 단백질의 인산화를 억제하였다 (Fig. 3C). 인산화된 STAT3 단백질 정량 분석 결과, quercetin 10 μg/mL 처리군에서 약 36.3±6.81% STAT3 단백질 인산화를 억제하였다(Fig. 3D). 따라서 quercetin은 IL-17A로 유도된 HaCaT 세포주에서 IκBα mRNA 발현 뿐 아니라 STAT3 단백질의 인산화를 유의성 있게 억제하는 것을 알 수 있다.

TNF-α/IL-17A로 동시 유도된 HaCaT 세포주에서 quercetin에 의한 염증성 사이토카인 억제

마지막으로 HaCaT 세포주에 TNF-α 및 IL-17A를 동시 처리하

여 활성을 유도한 후, quercetin의 사이토카인 발현 조절 기능을 관찰하였다. IL-1α mRNA 발현량을 확인한 결과, TNF-α/IL-17A 처리군은 무처리군 대비 2.5±0.07 배 증가하였으며 quercetin 2.5, 5, 10 μg/mL 처리군은 TNF-α/IL-17A 처리군 대비 각각 30.6±8.43, 30.6±5.87, 10.3±6.51% 감소하였다(Fig. 4A). IL-1β 유전자 발현은 TNF-α/IL-17A 처리군에서 무처리군 대비 2.0±0.21 배 증가하였고, quercetin을 농도별로 처리한 결과 TNF-α/IL-17A 처리군 대비 각각 35.7±5.67, 39.0±5.48, 39.2±2.44% 감소하였다(Fig. 4B). IL-6 mRNA 발현량은 quercetin 단독 처리군에서 무처리군 대비 13.5±0.68% 감소하였고, TNF-α/IL-17A 처리군은 무처리군 대비 3.8±0.44 배 증가하였다. 이때 quercetin 2.5, 5, 10 μg/mL 처리군은 각각 27.2±7.00, 13.3±4.16, 16.1±5.30% 감소하였다(Fig. 4C). TNF-α mRNA TNF-α/IL-17A 처리군에서 무처리군 대비 4.6±0.30 배 상향 조절되었다. 동시에 quercetin 10 μg/mL 농도 처리군에서는 TNF-α/IL-17A 처리군 대비 14.5±5.63% 감소하였지만 통계적 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 4D). 마지막으로 CCL20 mRNA 발현량을 확인하였을 때, TNF-α/IL-17A 처리군에서는 무처리군 대비 8.7±0.53배로 발현이 증가하였고, 이때 quercetin을 농도별로 처리한 결과 2.5 μg/mL 농도에서는 CCL20 mRNA 발현 감소가 나타나지 않았으나 5, 10 μg/mL 농도에서

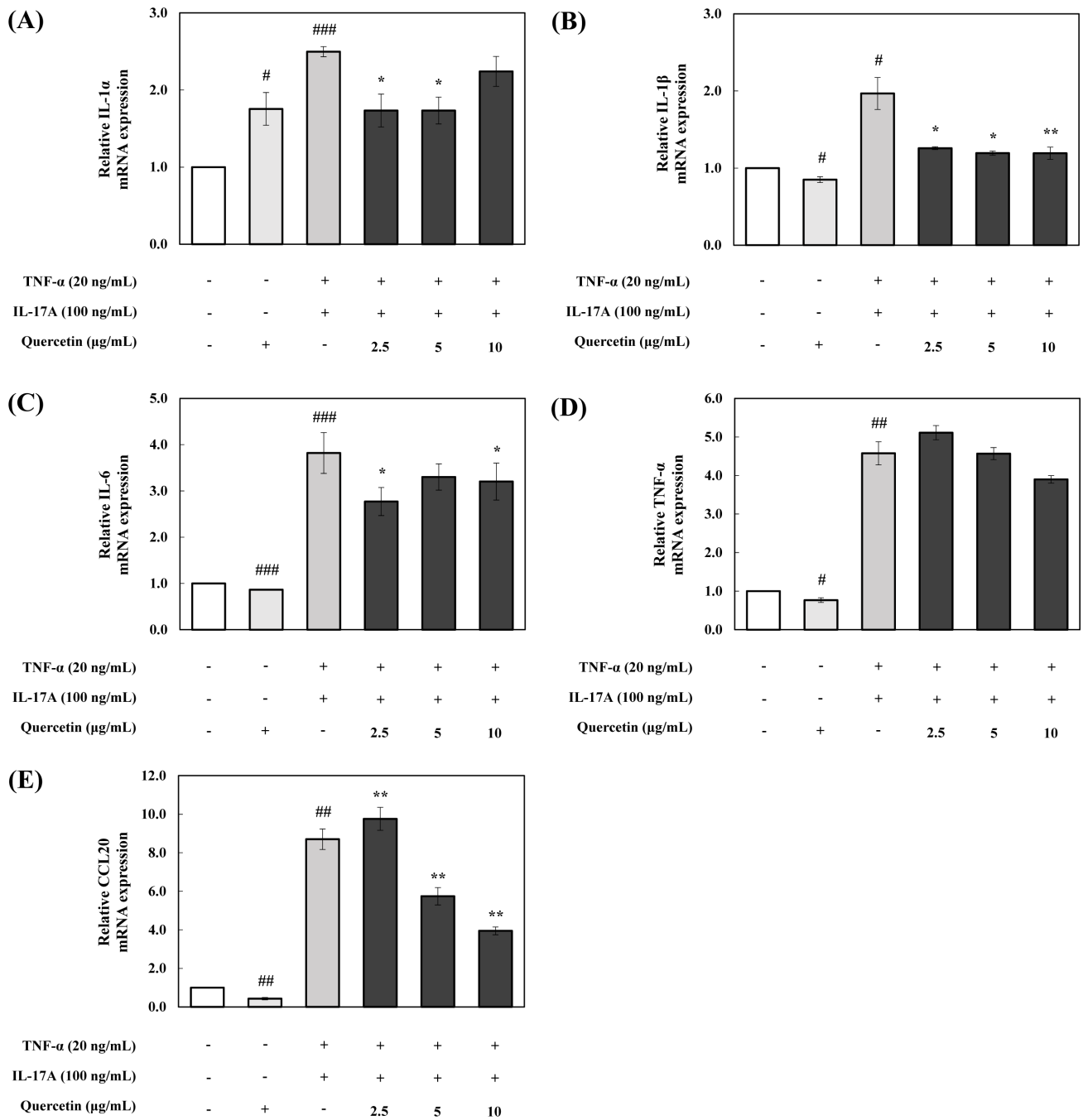


Fig. 4 Effect of quercetin on cytokine suppression in TNF- α /IL-17A induced HaCaT cells. After stimulation with TNF- α /IL-17A, mRNA expression level of pro-inflammatory cytokines were examined by real time RT-PCR. (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-6, (D) TNF- α , (E) CCL20. All experimental results were expressed as the mean \pm standard deviation after repeating 3 experiments. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, compared to control, * p < 0.05, ** p < 0.01, compared to TNF- α /IL-17A treated control

각각 34.0 ± 2.23 , $54.6 \pm 0.81\%$ 감소되었다(Fig. 4E). 이러한 결과들은 quercetin이 TNF- α 또는 IL-17A 단독 처리 조건에서 나타난 결과와 마찬가지로 TNF- α /IL-17A 유도 HaCaT 세포주에서 염증성 사이토카인 및 케모카인의 유전자 발현이 유의적으로 억제함을 보여준다.

고찰

Quercetin은 과일, 채소에서 널리 발견되는 플라보노이드 중 하나이며 항산화, 항염증, 항고혈압, 혈관 확장, 항비만 등 다양한 생물학적 및 약리학적 특성을 가진다[32,33]. 그러나, 건선과 같

은 자가면역성 만성 피부질환 등에 대한 quercetin의 효능과 활성 연구는 많이 보고되지 않았다. 따라서 본 연구는 표피층을 이루는 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포주를 활용해 quercetin이 피부 염증 개선에 미치는 효과와 작용 기전을 밝히고자 하였다. 건선은 대표적인 피부 자가면역 질환으로 각질형성세포에서 생성되는 케라틴 단백질의 과발현 및 과각화로 인한 두꺼운 각질층 형성, 그리고 면역 세포들로부터 과도한 사이토카인, 케모카인 분비로 인한 만성 피부 염증 유발이 가장 큰 특징이다 [34]. TNF- α 및 IL-23/IL-17은 건선 발병 인자로 알려지며, 특히 IL-17A는 각질형성세포에서 CXCL1, CXCL2, CXCL8 및 CCL20을 생산을 상향 조절하여 조직 병리학적 특징을 초래한다 [35]. CCL20은 건선에서 과다 발현되는 케모카인 중 하나로 면역세포를 피부 염증 부위로 유인하여 면역반응을 촉진시켜 과도한 염증 반응을 가져온다. 특히 피부각질형성세포에 TNF- α 가 TNF 수용체에 결합하면 TRADD, TRAF2, NIK1, IKK α / β 단백질 신호전달 기작을 통해 I κ B α 인산화가 이뤄지고 이는 전사조절 인자인 NF- κ B p65 단백질이 핵 내로 이동하여 궁극적으로 IL-1 β , IL-6, IL-8 및 CCL20 유전자의 mRNA가 합성된다 [36-39]. 이때 분비된 IL-6는 IL-6 수용체에 결합하여 STAT3 전사인자를 활성화시킴으로써 CCL20 발현을 더욱 촉진한다 [40,41].

케라틴은 상피의 유형, 세포 분화 단계 및 상황에 의존한다. 따라서 케라틴 유전자 및 단백질은 건강 및 질병에서 상피 세포의 상태를 추적하기 위해 분자 마커를 제공한다. 비정상적인 각질 발현 패턴은 건선 각질 세포에서 발견되며 질병의 특징으로 간주된다. 건선에서는 KRT6, KRT16 및 KRT17의 발현이 표피에서 과도하게 증가한다 [42].

본 연구에서는 시험관 내 건선 유사 모델인 TNF- α 또는 IL-17A 단독 처리 조건 및 TNF- α /IL-17A 동시 처리 조건에서 유도된 HaCaT 세포주를 사용하여 quercetin의 건선 피부염 개선 효능을 관찰하였다. 먼저 quercetin은 TNF- α 유도 HaCaT 세포주에서 quercetin은 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 및 CCL20 mRNA 발현을 유의적으로 감소시켰다. 또한 quercetin은 I κ B α 및 STAT3 단백질의 인산화를 억제하였다. 결론적으로, quercetin이 TNF- α 유도된 HaCaT 세포주에서 NF- κ B, STAT3 신호전달 활성화를 억제함으로써 염증성 사이토카인 및 CCL20 케모카인 발현을 효과적으로 저해한다는 것을 입증하였다. 이 뿐만 아니라 quercetin은 건선에서 발현되는 KRT6A, KRT16 유전자 mRNA 발현과 IL-17A 자극에 의한 I κ B α mRNA 수준 및 STAT3 인산화를 유의하게 억제하였다. 마지막으로 TNF- α /IL-17A 동시 처리하여 HaCaT 세포를 자극한 후 quercetin에 의해 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 CCL20 mRNA 발현이 억제되어 *in vitro* 세포 수준에서는 최대 10 μ g/mL 조건에서 유의미한 개선 효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 건선 피부염 유발 인자들의 quercetin에 의한 선택적 제어를 보여주며, 이는 건선 피부염 개선 소재로서의 개발 가능성을 보여준다. 따라서 향후 건선 피부염 세포 모델에서의 quercetin 효능 결과를 바탕으로 전 임상 동물실험 및 임상시험을 통해 건선 피부염 개선 후보 물질로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

초 록

Quercetin은 항산화 및 항염증 활성이 잘 알려져 있으나, 건선 피부염 조절에 대한 효능 연구는 거의 보고된 것이 없어, *in vitro* 건선 피부염 시험 모델인 TNF- α /IL-17A 유도 HaCaT 세포주를 이용해 quercetin에 의한 건선 피부염 개선 효과를 규명하였다. 먼저, TNF- α 에 의해 활성화된 HaCaT 세포주에 quercetin을 처리한 결과, IL-1 α , IL-1 β , IL-6 등 염증성 사이토카인 발현이 TNF- α 처리군 대비 각각 49.1 \pm 7.14, 42.8 \pm 8.16, 34.5 \pm 2.52% 억제되었다. Th17세포 및 수치상세포 등 면역세포를 염증 반응 부위로 유인하는 케모카인 IL-8 및 CCL20의 mRNA 발현량 또한 TNF- α 처리군 대비 38.4 \pm 5.83, 52.9 \pm 4.59% 감소하였다. TNF- α 자극에 의해 건선피부에서 비특이적으로 증가되는 케라틴 단백질 KRT6A 및 KRT16 발현뿐만 아니라, I κ B α 및 STAT3 단백질의 인산화 또한 quercetin에 의해 유의적으로 억제되었다. 또 다른 건선 유발 사이토카인으로 알려진 IL-17A로 HaCaT 세포주를 자극한 후 quercetin에 의한 영향을 관찰한 결과, I κ B α mRNA 발현은 55.8 \pm 5.28% 감소하였고, STAT3 인산화는 36.3 \pm 6.81% 하향 조절되었다. 마지막으로 TNF- α /IL-17A를 동시 자극한 HaCaT 세포주에 quercetin을 처리한 결과, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL20 유전자 발현이 모두 억제되는 것을 확인하였다. 이를 통해 quercetin은 기존 항산화, 항염증 활성뿐만 아니라 건선 피부염 개선에 활성을 갖는 소재임을 확인할 수 있었다.

Keywords C-C motif chemokine ligand 20 · Keratinocyte · Psoriasis · Quercetin · Signal transducer and activator of transcription 3

감사의 글 본 연구는 교육부 2020 대학혁신지원사업으로 지원되었습니다.

References

1. Lin TK, Zhong L, Santiago JL (2018) Anti-inflammatory and skin barrier repair effects of topical application of some plant oils. *Int J Mol Sci* 19: 70
2. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428–435
3. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Farinas M, Nogales KE, Tian S, Cardinale I, Chimentii S, Krueger JG (2011) Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol* 131: 677–687
4. Chiricozzi A, Romanelli P, Volpe E, Borsellino G, Romanelli M (2018) Scanning the immunopathogenesis of psoriasis. *Int J Mol Sci* 19: 179
5. Ippagunta SK, Gangwar R, Finkelstein D, Vogel P, Pelletier S, Gingras S, Redecke V, Häcker H (2016) Keratinocytes contribute intrinsically to psoriasis upon loss of Tnfr1 function. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E6162–E6171
6. Kennedy-Crispin M, Billick E, Mitsui H, Gulati N, Fujita H, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Johnson-Huang LM, Suárez-Farinas M, Krueger JG (2012) Human keratinocytes' response to injury upregulates CCL20 and other genes linking innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 132: 105–113

7. Schmuth M, Neyer S, Rainer C, Grassegger A, Fritsch P, Romani N, Heufler C (2002) Expression of the CC chemokine MIP3- α /CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol* 11: 135–142
8. Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF (2001) Regulated MIP-3 α /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G710–G719
9. Harper EG, Guo C, Rizzo H, Lillis JV, Kurtz SE, Skorcheva I, Purdy D, Fitch E, Iordanov 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
10. Mabuchi T, Chang TW, Quinter S, Hwang ST (2012) Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *Eur J Pharmacol* 65: 4–11
11. Kuang YH, Lu Y, Liu YK, Liao LQ, Zhou XC, Qin Q S, Jia XK, Wu LS, Zhu W, Chen X (2018) Topical sunitinib ointment alleviates psoriasis-like inflammation by inhibiting the proliferation and apoptosis of keratinocytes. *Eur J Pharmacol* 824: 57–63
12. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Müller A, de Waal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A (2000) Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 164: 6621–6632
13. Wang A, Wei J, Lu C, Chen H, Zhong X, Lu Y, Li L, Huang H, Dai Z, Han L (2019) Genistein suppresses psoriasis-related inflammation through a STAT3-NF- κ B-dependent mechanism in keratinocytes. *Int immunopharmacol* 69: 270–278
14. Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, Itami Satoshi, Nickoloff BJ, DiGiovanni J (2005) Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* 11: 43–49
15. Andrés RM, Montesinos MC, Navalón P, Payá M, Terencio MC (2013) NF- κ B and STAT3 inhibition as a therapeutic strategy in psoriasis: In vitro and in vivo effects of BTH. *J Invest Dermatol* 133: 2362–2371
16. Wang YN, Chang WC (2003) Induction of disease-associated keratin 16 gene expression by epidermal growth factor is regulated through cooperation of transcription factors Sp1 and c-Jun. *J Biol Chem* 278: 45848–45857
17. Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mittnacht S, Lane EB, Jorcano JL (1999) Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol* 19: 3086–3094
18. Zhang X, Yin M, Zhang LJ (2019) Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells* 8: 807
19. Zhang LJ (2018) Keratins in Skin Epidermal Development and Diseases. IntechOpen, London
20. Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M (2001) Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* 116: 633–640
21. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, Liu H, Yin Y (2016) Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* 8: 167
22. Dabeek WM, Marra MV (2019) Dietary Quercetin and Kaempferol: bioavailability and potential cardiovascular-related bioactivity in humans. *Nutrients* 11: 2288
23. Wang R, Zhang H, Wang Y, Song F, Yuan Y (2017) Inhibitory effects of quercetin on the progression of liver fibrosis through the regulation of NF- κ B/I κ B α , p38 MAPK, and Bcl-2/Bax signaling. *Int Immunopharmacol* 47: 126–133
24. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C (2018) The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* 10: 1618
25. Carrasco-Pozo C, Tan KN, Reyes-Farias M, De La Jara N, Ngo ST, Garcia-Diaz DF, Llanos P, Cires MJ, Borges K (2016) The deleterious effect of cholesterol and protection by quercetin on mitochondrial bioenergetics of pancreatic β -cells, glycemic control and inflammation: *In vitro* and *in vivo* studies. *Redox Biol* 9: 229–243
26. Endale M, Park SC, Kim S, Kim SH, Yang Y, Cho JY, Rhee MH (2013) Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology* 218: 1452–1467
27. Yang D, Liu X, Liu M, Chi H, Liu J, Han H (2015) Protective effects of quercetin and taraxasterol against H₂O₂-induced human umbilical vein endothelial cell injury in vitro. *Exp Ther Med* 10: 1253–1260
28. Chen H, Lu C, Liu H, Wang M, Zhao H, Yan Y, Han L (2017) Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF- κ B pathway. *Int Immunopharmacol* 48: 110–117
29. Zhao L, Xia J, Wang X, Xu F (2014) Transcriptional regulation of CCL20 expression. *Microbes Infect* 16: 864–870
30. Jin W, Dong C (2013) IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect* 2: 1–5
31. Yuan S, Zhang S, Zhuang Y, Zhang H, Bai J, Hou Q (2015) Interleukin-17 stimulates STAT3-mediated endothelial cell activation for neutrophil recruitment. *Cell Physiol Biochem* 36: 2340–2356
32. Udommethaporn S, Tencomnao T, McGowan EM, Boonyaratanakornkit V (2016) Assessment of anti-TNF- α activities in keratinocytes expressing inducible TNF- α : a novel tool for anti-TNF- α drug screening. *PLoS one* 11: e0159151
33. Anand David AV, Arulmoli R, Parasuraman S (2016) Overview of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn Rev* 10: 84
34. Xiong H, Xu Y, Tan G, Han Y, Tang Z, Xu W, Zeng F, Guo Q (2015) Glycyrrhizin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice and inhibits TNF- α -induced ICAM-1 expression via NF- κ B/MAPK in HaCaT cells. *Cell Physiol Biochem* 35: 1335–1346
35. Furue M, Furue K, Nakahara T (2020) Interleukin-17A and Keratinocytes in Psoriasis. *Int J Mol Sci* 21: 1275
36. Tak PP, Firestein GS (2001) NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7–11
37. Hayden MS, Ghosh S (2014) Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol* (Vol. 26, No. 3, pp. 253–266). Academic Press
38. Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C (2000) NF- κ B and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12: 52–58
39. Park K, Lee JH, Cho HC, Cho SY, Cho JW (2010) Down-regulation of IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1 β by glucosamine in HaCaT cells, but not in the presence of TNF- α . *Oncol Lett* 1: 289–292
40. McFarland BC, Hong SW, Rajbhandari R, Twitty GB Jr, Gray GK, Yu H, Benveniste EN, Nozell SE (2013) NF- κ B-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma. *PLoS One* 8: e78728
41. Meares GP, Ma X, Qin H, Benveniste EN (2012) Regulation of CCL20 expression in astrocytes by IL-6 and IL-17. *Glia* 60: 771–781
42. Jiang M, Li B, Zhang J, Hu L, Dang E, Wang G (2017) Vascular endothelial growth factor driving aberrant keratin expression pattern contributes to the pathogenesis of psoriasis. *Exp Cell Res* 360: 310–319