

# The Effect of Magnolol on UVB-induced Inflammation Damage Control via the Nrf2-SOCS3-Jak2-STAT3 Pathway in Human Dermal Fibroblasts

Young sun Nam<sup>1\*</sup> and Juree Ji<sup>2</sup>

<sup>1</sup>400-5 Namyangjungang-ro, Hwaseong Shingyeong University, Department of Beauty Design, Gyeonggi 18274, Korea

<sup>2</sup>CIVASAN, 3 Floor, Dosandaero 81gil 25, Gangnamgu, Seoul 01050, Korea

Received June 17, 2020 / Revised September 12, 2020 / Accepted September 24, 2020

This study investigated the repair of UVB-induced cell damage by magnolol. We performed a drug-repurposing screen, and, in the STAT3 reporter gene assay, magnolol was identified as a suppressor of STAT3 that improves the cell viability of HDF cells. HDF cells treated with IL-6, UVB, and IFN $\gamma$  showed the highest expression of Jak2 and phosphorylated STAT3 (p-STAT3), and magnolol was able to decrease the expression of Jak2 and p-STAT3 in UVB-induced cells. Moreover, UVB-damaged cell growth increased significantly in correlation with both reactivation and with magnolol in a dose-dependent manner. Compared with AG490 (a Jak2 inhibitor) treatment of UVB-treated HDF cells, cell proliferation increased significantly. We confirmed that AG490 and magnolol reduced TNF- $\alpha$  concentrations, and Western blotting (protein level) showed decreases in Jak2 and p-STAT3 expression in only the magnolol-treated cells. The expression of Jak2, p-STAT3, and SOCS3 also increased only after treatment with magnolol. Cells were treated with magnolol and ML385 (an NRF2 inhibitor), and these secondary metabolites reduced cell proliferation and NRF2 expression. The amount of MMP9 was also increased by cotreatment with magnolol and ML385. Collectively, these results demonstrate the potential of magnolol for repairing cells after UVB-induced damage by regulating the expression of NRF2, SOCS3, Jak2, and STAT3.

**Key words** : Jak2, magnolol, SOCS3, STAT3, UVB

## 서론

피부의 광노화는 ultraviolet absorption (UVA)와 ultraviolet narrow band (UVB)로 인해 발생하며, UVA와 UVB의 물리적 특성에 따라 피부의 표피층과 진피층 모두에서 생물학적 반응을 유도한다[21]. UV는 DNA의 디피리미딘 부위에서 이량체를 형성해 광병변을 발생시킨다. UV 중에서 UVB는 시토신(C) → 티민(T) 염기 치환 돌연변이를 유발시키는 DNA 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다[11]. 이처럼 인체 피부에 직접 노출된 UV는 피부질환을 야기시키는 중요한 위험요소 중 하나이며, UVB는 태양 방사선의 5%에 불과하지만 피부의 화상을 입힐 뿐 아니라 피부 발암을 유발할 수 있는 가장 위험한 요소이다[2].

인간피부섬유아세포(Human dermal fibroblast, HDF)는 UVB를 이용한 반복적인 처리시 피부 노화를 촉진시키고, 테미지를 조절하는 다양한 경로에 대한 연구가 보고되었다[4,

25], 또한, 인간 피부에서 UVB에 의해 형성되는 노화 마커인 senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) 및 p16<sup>INK4a</sup> 양성세포의 증가는 세포의 죽음에 이르게 하는 것으로 보고되었다[3]. 이러한 인간 피부에서 노화의 증가는 세포의 죽음에 이르게 하는 것으로 보고되었다[19].

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)는 항산화 스트레스 및 항염증 반응을 조절하는 중요한 역할을 하며, UV 조사의 pro-oxidant 효과로 인간 피부에는 방어 메커니즘이 발생된다[12, 21]. 그 중 전사 인자 Nrf의 패밀리 중 Nrf1~2은 염기성 루신저피 단백질로 광범위하게 발현되는 반면, Nrf3은 태반, B 세포 및 단핵구 계통과 같은 몇몇 조직에만 존재한다 [5, 6, 18]. 정상적인 조건 하에서, Nrf2는 Keap1 단백질에 결합되어 세포질에서 분해되지만, 산화 스트레스에 노출되면 Nrf2는 핵으로 전위되어 다른 전사 인자와 함께 표적 유전자를 활성화시킨다. Nrf2는 표적 유전자의 프로모터 영역에서 항산화 반응 요소를 인식하고 결합하며 heme oxygenase-1 (HO-1),  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS)와 같은 해독 효소를 유도시키거나 glutathione S-transferase Pi (GSTPi) 항산화 반응 요소를 활성화한다[14, 22]. 또한, Nrf2는 또한 Fas에 의해 유도된 apoptosis에 대해 보호 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[27].

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 계열 단백질은 인슐린 저항성에 관여하는 다양한 사이토카인에 의해 유도되는 단백질로 높은 glucose 함량을 갖는 다양한 세포에서 나타

### \*Corresponding author

Tel : +82-31-369-9112, Fax : +82-31-369-9116

E-mail : nys9980@gmail.com

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.

난다. 일부 연구에서는 SOCS3와 TNF- $\alpha$ 의 증가에서 유의성이 있음이 밝혀진 바 있고[11], 다양한 산화스트레스 질병 모델에서 지표로 이용된다. SOCS3는 Nrf2에 의해 유도되며 Jak2를 조절하는 것으로 알려져 있고, SOCS3 단백질이 다운 조절된 세포에서 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 발현수준이 감소된 보고가 있었다[9].

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)는 STAT3은 STAT 단백질 패밀리의 구성원으로 사이토카인 및 성장 인자에 반응하여, STAT3은 수용체 관련 키나제(JAK)에 의해 인산화되고, 동종 또는 이종이량체를 형성한다[17]. 형성된 이량체는 세포핵으로 전위되어 관련 유전자 발현을 매개한다. STAT3는 인터페론, 표피성장인자(EGF), 인터루킨(IL-5 및 IL-6)과 같은 리간드에 반응하여 티로신(705)의 인산화 후에 활성화된다. 또한, STAT3의 활성화는 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK)에 의한 세린727의 인산화 및 c-src 비수용체 티로신 키나제를 통해 일어날 수 있다[1]. STAT3는 세포 종류에 따라 세포성장 및 apoptosis와 같은 세포 과정에서 중요한 역할을 한다[28].

Magnolol은 목련, 후박 등의 천연물에 존재하는 천연 항산화 물질로[23], 소염, 혈소판 활동성 조절, iNOS 및 COX-2 발현 억제 및 LPS 유래 NF- $\kappa$ B 활성 조절 기능을 갖으며, 급성 폐손상 및 패혈증에 대한 보호효과를 갖는 것으로 보고되었다[20]. 그러나, magnolol의 항산화 기작 중 UVB 데미지 피부세포에 대한 매커니즘적 연구는 정확하게 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 magnolol의 처리가 피부세포에서 UVB에 저항하는 기작을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

선별된 후박의 성분으로 알려진 magnolol (분자량 266.33)을 Sigma-aldrich에서 HPLC 순도 95% 이상을 구매하여 실험에 이용하였다. Magnolol은 1 mg/ml의 농도로 에탄올에 녹인 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma - Aldrich Corporation, MO, USA)로 희석하여 실험에 이용하였다. Human dermal fibroblast (ATCC, Manassas, VA, SCRC-1042)에서 분양 받아 Passage number 15의 조건에서 세포주를 실험에 이용하였다.

후박의 추출은 915 g의 후박건조물을 3일간 80% 메탄올 추출한 뒤 감압농축 하였고, 건조 추출분말(155 g)을 3차 증류수에 섞어 *n*-hexane (14.4 g), ethyl acetate (32.1 g), *n*-butanol (45.3 g) 및 water (22.8 g)을 얻어 농축 및 동결건조 후 실험에 이용하였다. 농축과정에서 생성된 거품층은 실험 중간 제거하였다.

### IL6, IFN $\gamma$ 측정 및 UVB 처리

60 mm plate (SPL Life Sciences, Seoul, Korea)에  $5 \times 10^5$  세

포수로 12시간 배양한 IL6 및 IFN $\gamma$ 는 magnolol을 5, 10, 20  $\mu$ M로 처리 후 20 ng/ml처리 30분 뒤 세포를 수집하였고, UVB는 magnolol을 5, 10, 20  $\mu$ M로 처리 후 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, ThermoFisher Scientific, IL, USA)로 세척 후 serum 1% 첨가된 배지에서 UVB를 조사하였다. UVB 램프(Heber Scientific lamp, 254-312 nm, Herber Scientific Company Ltd., Chennai, India)로 312 nm 35 mJ/cm<sup>2</sup>에 시간 단위로 노출하였고, 대조군은 형광등이 내제된 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 조건하에 배양하였다.

### 세포배양 및 Cyto-X 분석

HDF세포주를 이용하여 세포의 독성테스트Cyto-X (LPS solution, Daejeon, Korea)시약을 이용하였다. 세포를 96 well plate (SPL Life Sciences, Seoul, Korea)에  $1 \times 10^4$  세포수로 12시간 배양한 뒤 80종의 천연물질을 이용하여 세포 독성 또는 세포 증식을 확인한다. 또한, 선별된 magnolol은 5, 10, 20  $\mu$ M로 처리하였다. 배양 24시간 후 각 well에 1/10 농도로 Cyto-X 시약을 첨가한 후 호일로 감싸 빛을 차단 후 4시간 배양기에 처리하였다. Wallac Victor2 plate reader (Perkin Elmer Corp., Nerwalk, CT)로 450 nm 흡광도에서 측정하여 수치화 하였다.

### NRF2와 STAT3 활성 분석법

항산화 작용을 확인하기 위해 NRF2 binding site가 포함된 antioxidant response element (ARE) binding 부위를 pGL3 vector (Promega, USA)에 포함되도록 제작하여 실험을 실시하였다. 또한, 염증 작용을 확인하기 위해 STAT3 promoter가 포함된 pGL3 vector (Promega, USA)를 제작하여 실험을 실시하였다. STAT3 promoter는 80종의 천연물질을 선별에 이용하였다. HDF 세포주를 4.5 g/l D-Glucose, L-Glutamine, 110 mg/l Sodium Pyruvate가 포함된 DMEM (well gene)과 10% FBS, 1% Penicillin streptomycin (GenDEPOT, Barker, TX, USA)에 배양하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 조건하에 배양하였다. 세포를 6-well plate (SPL Life Sciences, Seoul, Korea)에  $3 \times 10^5$  세포수로 overnight 배양한 뒤 target vector와 pRL-Renilla vector를 1  $\mu$ g 용량으로 Terbofect (Thermo Fisher Scientific, USA)시약으로 주입시켰다. 다시 하룻밤 배양한 뒤 UVB와 magnolol을 5, 10, 20  $\mu$ M로 처리하였다. 배양 24시간 후 각 well의 세포를 회수하여 Dual-luciferase® reporter assay kit (Promega, USA)을 이용하여 제공된 실험방법에 따라 측정하였다. pRL-Renilla vector는 transfection control을 측정하기 위해 사용하였다. Victor2 plate reader를 이용하여 luciferase 측정 후 수치화 하였다.

### TNF- $\alpha$ 와 MMP-9 ELISA 측정

세포 내 TNF- $\alpha$  (BioVision, Milpitas, CA, USA) 및 MMP-9 (Merck, Darmstadt, Germany) 함량은 enzyme linked im-

Table 1. Characteristic of single compound information

No.	Single compound name	Molecular weight
1	Jaceosidin	330
2	4'-O-Methylnyasol	266.33
3	Astrapterocarpan-3-O- $\beta$ -glucoside	462.45
4	Myristargenol A	344.16
5	p-Coumaroyl-D-alanine	235.24
6	peucedanocoumarin III	386.13
7	Pygenic acid A	472.71
8	Questin	284.26
9	Magnolol	266.34
10	Sasanquol	428.75
11	Sinomenine N-oxide	397.87
12	Suberosin	244.29
13	3,4,5-Trimethoxyphenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside	346.13
14	Neochlorogenic acid methyl ester	368.11
15	Bufogenin	384.51
16	Cinobufagin	442.55
17	Dehydrocostus lactone	230.3
18	Euscaphic acid	488.7
19	Torilolone	251.35
20	Vitexin	432.38
21	Manassantin B	716.81
22	Nuciferine	295.38
23	Oxypeucedanin	286
24	SaikosaponinD	780.98
25	Cantharidin	190.2
26	Dioscin	868
27	ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl acetate	360.49
28	(E)-5-Hydroxy-3-(2'-hydroxybenzylidene)-7-methoxy-4-chromanone	331
29	Cynaropicrin	346.38
30	6-(3,4-Dimethylcyclohexa-2,4-dien-1-yl)-2-methylhexane-2,3-diol	238
31	Otobaphenol	326.39
32	Sargachromanol I	428
33	wilfoside C1G	1228.6
34	Brazilane	270.28
35	Cyanoneside B	314.1
36	Panaxynol	244.37
37	p-Coumaroyl-D-alanine	235.24
38	p-Coumaroylglycine	221.21
39	Peucedanocoumarin III	386.13
40	Prunasin	295.01
41	Pygenic acid A	472.71
42	Tomentosin	248
43	Acetylshikonin	330.33
44	6,8-Diprenylgenistein	406.18
45	Reynosin	248.3
46	Ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol	398.66
47	Magnolol	266.34
48	Manassantin B	716.81
49	Nuciferine	295.38
50	Oxypeucedanin	286
51	SaikosaponinD	780.98
52	Cantharidin	190.2
53	Dioscin	868

Table 1. Continued

No.	Single compound name	Molecular weight
54	ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl acetate	360.49
55	(E)-5-Hydroxy-3-(2'-hydroxybenzylidene)-7-methoxy-4-chromanone	331
56	Cynaropicrin	346.38
57	6-(3,4-Dimethylcyclohexa-2,4-dien-1-yl)-2-methylhexane-2,3-diol	238
58	Otobaphenol	326.39
59	Sargachromanol I	428
60	wilfoside C1G	1228.6
61	SaikosaponinD	780.98
62	Cantharidin	190.2
63	Dioscin	868
64	ent-7 $\beta$ -hydroxy-15-oxokaur-16-en-18-yl acetate	360.49
65	(E)-5-Hydroxy-3-(2'-hydroxybenzylidene)-7-methoxy-4-chromanone	331
66	Broussonin A	258.31
67	Alisol B 23-acetate	514.74
68	Brazilane	270.28
69	Ursolic acid	456.7
70	Apigenin	270.23
71	Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide	446.36
72	Aristolactam	293.27
73	Anthriscinol	208.21
74	(2S)-4',6-Dihydroxy-7-methoxyflavanone	286.27
75	(E)-methyl-cinnamate	162
76	6-(3,4-Dimethylcyclohexa-2,4-dien-1-yl)-2-methylhexane-2,3-diol	238
77	9-Hydroxy-6,7-dimethoxydalbergiquinol	270.31
78	Deoxyvasicinone	186
79	Dieckol	426
80	Digitolutein	268.26

munosorbent assay (ELISA) Kit을 이용하여 측정하였다. HDF 세포주를 35 mm 세포배양 접시에  $8 \times 10^4$  세포수로 12시간 배양한 뒤 세포를 DMSO, 10 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, MO, USA) 또는 병풀 추출물(20  $\mu$ g/ml), 분획물(13  $\mu$ g/ml) 및 asiaticoside (100  $\mu$ M, Sigma-Aldrich, MO, USA)을 동시 처리 후 24시간 뒤 세포를 수집하였다. NP-40 (Bio-rad, CA, USA)으로 균질화시켜 2분간 원심 분리하여 얻어진 상층액 및 Kit에 포함된 방법으로 각 well에 상층액을 20  $\mu$ l씩 분주하여 섞은 후 30분간 실온에 방치하였다. ELISA 측정은 Wallac Victor2 plate reader를 이용하여 optical density를 측정하였다.

#### Real-time PCR을 이용한 유전자 발현 측정

HDF 세포주를 60 mm 세포배양 접시에  $5 \times 10^5$  세포수로 12시간 배양한 뒤 magnolol을 5, 10, 20  $\mu$ M로 처리하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포에 TRI reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 이용하여 total RNA를 분리한다. 추출된 RNA는 Power cDNA synthesis kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)을 이용하여 cDNA를 합성한 후 SYBR green과 각 primer를 이용하여 Corbett 6000 Rotor-Gene thermocycler (Corbett Life Science, Mortlake, Australia)을 이용하여 re-

al-time PCR을 수행하고, 대조군 유전자로는 GAPDH를 사용하였다. GAPDH 발현 대비 target 유전자의 발현을 상대적으로 정량·분석하였다. Real-time PCR에 사용한 primer sequence는 GAPDH (Forward AATGGACAACCTGGTCGTGGAC, Reverse CCTCCAGGGGATCTGTTTG), Jak2 (Forward ATCCACCCAACCATGTCTTCC, Reverse ATTCCATGCCGATAGGCTCTG), STAT3 (Forward ACCAGCAGTATAGCCGCTTC, Reverse GCCACAATCCGGGCAATCT)을 이용하였다.

#### 총단백질 발현분석

HDF세포주를 60 mm 세포배양 접시에  $5 \times 10^5$  세포수로 12시간 배양한 뒤 magnolol을 5, 10, 20  $\mu$ M로 처리하여 세포를 수집하였다. RIPA lysis buffer (GenDEPOT, TX, USA)에 phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Life Sciences, MA, USA)과 protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Life Sciences, MA, USA)을 1x로 섞어 얼음에 1시간 동안 lysis 후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 회수하여 Bio-Rad protein assay (Bio-rad, CA, USA)를 이용하여 정량 후 10~25  $\mu$ g의 단백질을 SDS-PAGE

gel method를 이용하여 전기영동 하였다. Gel transfer된 단백질을 PBS-T에 희석한 5% skim milk (LPS solution, Daejeon, Korea)에 1시간 동안 blocking한 뒤 1차 항체를 각각 1:1,000의 농도로 12시간 냉장실에 처리하였다. 3회 PBS-T로 세척한 뒤 2차 항체를 각각 1:5,000의 농도로 실온에서 처리 후 다시 3회 PBS-T로 세척하였다. Amersham ECL Western blotting detection reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 X-ray film (BioMax MR film, Kodak, USA) 발색으로 측정하였다. 항체는 anti-Jak2, anti-p-STAT3, anti-STAT3, anti-β-actin (Santa Cruze, Dallas, TX, USA), anti-SOCS3 (Thermo Fisher Scientific Life Sciences, MA, USA)을 이용하였다.

**세포질 및 핵 분리**

HDF세포에서 핵 내에 있는 STAT3의 양을 측정하기 위해 세포질 및 핵을 분리하는 실험을 실시하였다. HDF세포주를 60 mm 세포배양 접시에 5×10<sup>5</sup> 세포수로 12시간 배양한 뒤 magnolol을 5, 10, 20 μM를 처리한 후 세포를 수집하였다. NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE, Rockford, USA)를 사용하여 분리한 뒤 핵단백질을 분리하고 kit에 포함된 시약 cytosolic extraction reagent I

(CER I) 500 μl를 넣은 뒤 약 15초간 vortex후 10분간 얼음에 보관했다. 다시 27.5 μl의 CER II를 넣은 뒤 5초간 vortex후 1분간 얼음에 보관했다. 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 세포질인 부유층을 걸어냈다. 남아있는 핵은 다시 250 μl의 nuclear extraction reagent (NER)을 넣고 15초간 vortex후 10분간 얼음에 보관하는 과정을 총 3회 반복했다. 최종적으로 13,000 rpm에서 5분간 원심분리를 시행하여 핵의 단백질로 이루어진 상층액을 얻었다. 분리된 상층액은 Bio-Rad protein assay 로 정량 후 Western blot을 실시하였다.

**통계분석**

모든 생리활성 실험은 3반복 실험을 통해 수치화 하였으며, 통계분석은 one-way ANOVA로 신뢰구간 p<0.05으로 검정을 실시하였다. 통계프로그램은 Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하였다.

**결 과**

**UVB 처리된 HDF 세포에서 80개의 천연물유래 단일물질 중 STAT3를 억제 및 세포 증식확인 및 타겟물질 선별**

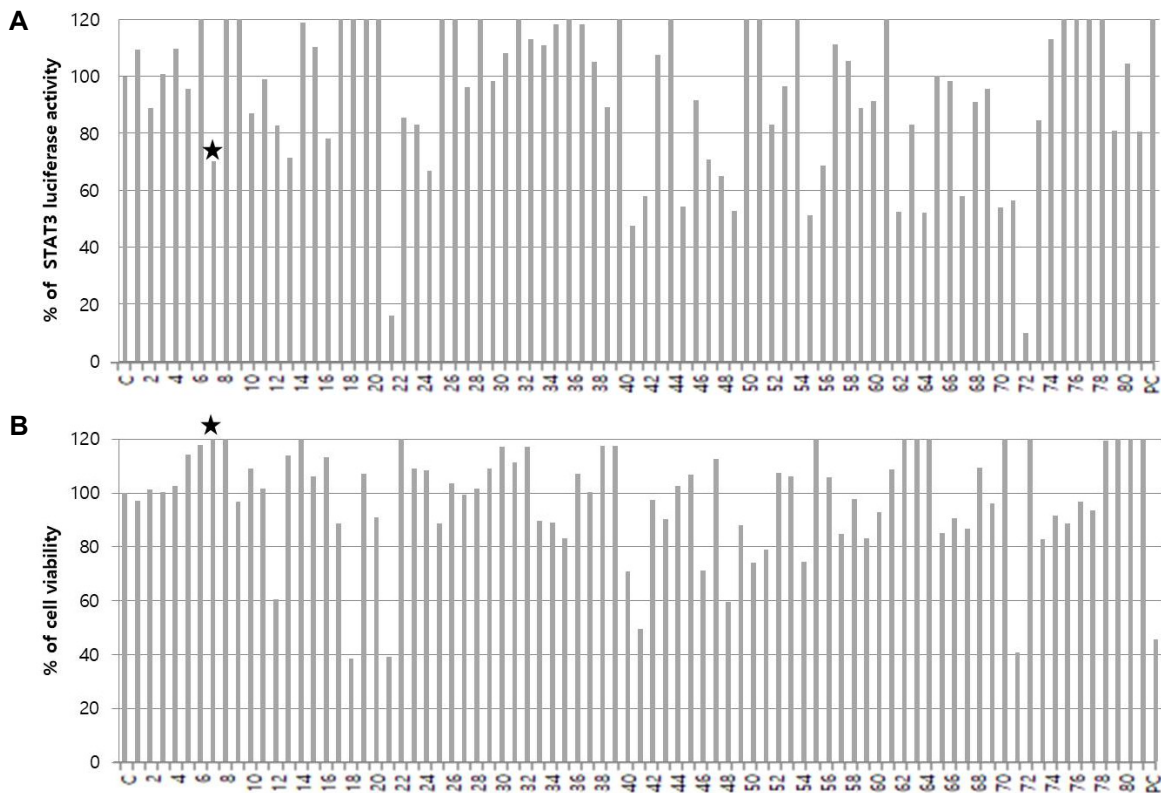


Fig. 1. Select of magnolol from STAT3 promoter inhibition and cell proliferation experiments of 80 natural-derived single substances in UVB-induced oxidation stress. UVB-induced oxidation stressed HDF cells were treated with different single compounds for 24 hr, and the relative Stat3 promoter inhibition (A) and high cell proliferation (B) was determined. The stat (★) was hit compound (mognolol). Data were expressed as mean (n=3).

본 연구에서는 80개의 천연물유래 단일물질을 이용하여 HDF세포주에서 STAT3 promoter 실험과 세포 증식 실험을 확인하였다. 단일물질의 선별 기준은 120% 이상의 세포증식이 되면서, 80% 미만의 STAT3 promoter를 조절하는 기준점을 두었고, ★표시된 7번 물질인 magnolol이 선별되었다(Fig. 1A, Fig. 1B).

**UVB 처리가 HDF 세포 magnolol에 의해 Jak2-STAT3 조절**

IL-6, UVB 및 IFN $\gamma$ 를 처리하여 HDF세포에서 Jak2-STAT3의 조절을 확인해 본 결과 모두 활성화되는 것을 확인하였다(Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 2C). 하지만, magnolol 처리 시 Jak2를 통한 STAT3의 조절은 UVB가 제일 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 2D). 또한, UVB에 의해 조절되는 mRNA 발현양을 통해 UVB에 의해 증가되는 Jak2 및 STAT의 증가되는 양을 magnolol이 억제 조절하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2E). UVB에 의해 유도된 세포독성이 세포의 성장을 억제하지만 magnolol의 처리가 세포의 성장을 유도하는 세포를 재생시키는 것을 확인하였다(Fig. 2F). 이 같은 결과는 염증성 사이토카인과 면역인터페론의 기전과 UVB의 염증 기전이 다른 것으로

보인다.

**Jak2 억제제와 유사한 magnolol의 세포영향**

세포독성 및 세포사멸에서 magnolol의 영향임을 다시 확인하기 위해 농도를 다르게 설정하여 UVB처리시 세포 데미지를 억제하였고(Fig. 3A), Jak2 억제제인 AG490의 처리가 UVB에 의해 유도된 세포의 데미지를 회복하는 양( $p < 0.01$ ) 보다 magnolol의 처리가 더 많은 회복을 하는 것을 확인하였다( $p < 0.001$ ).

**Nrf2 억제제와 동시 처리가 magnolol의 세포영향을 억제**

UVB에 의해 발생하는 산화스트레스는 피부세포의 노화 및 콜라겐 분해 등과 같은 악영향을 미친다. 이에 magnolol 처리가 UVB의 산화 스트레스에 영향을 주는 지 확인하기 위해 Nrf2의 작용에 의해 발현되는 SOCS3를 확인하였고, magnolol 처리시 증가되는 것을 확인하였다. 또한, magnolol과 ML385 (Nrf2 억제제)를 같이 처리하였을 때 SOCS3가 억제되는 것을 확인하였다. 이 같은 결과는 magnolol이 NRF를 조절하여 SOCS3의 발현하는 것을 알 수 있었으며, 발현된 SOCS3는 Jak2-STAT3를 조절하는 것으로 보인다(Fig. 4A). 세포증식

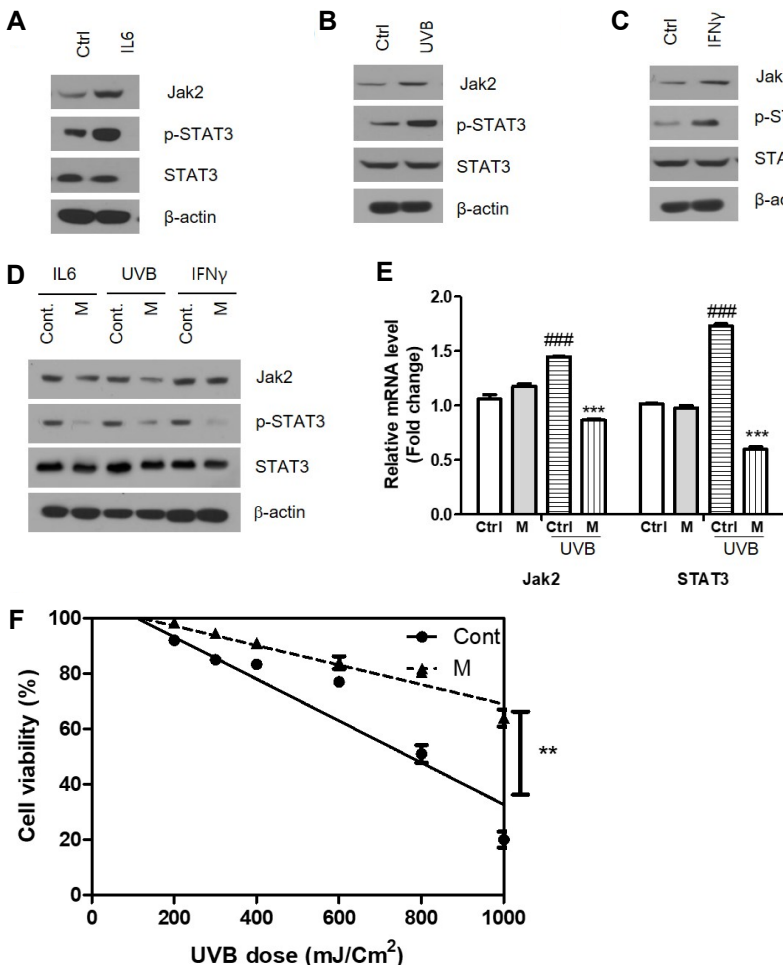


Fig. 2. Effect of magnolol on IL6, UV and IFN $\gamma$ -induced inflammation stress control leads to cell viability in HDF cells. IL6 (A) 20 ng/ml, UVB (B) 600 mJ/Cm<sup>2</sup> and IFN $\gamma$  (C) 20 ng/mL treated cell expression of Jak2-Stat3 protein. Cells were incubated with the magnolol for 24 hr, the Jak2-STAT3 expression (D), the cell viability (F) were compared to UVB 600 mJ/Cm<sup>2</sup> vs. 600 mJ/Cm<sup>2</sup> with magnolol. UVB-induced Jak2 and STAT3 mRNA expression level were change by magnolol (E), M, magnolol, \*\* $p < 0.01$  compared to control group.

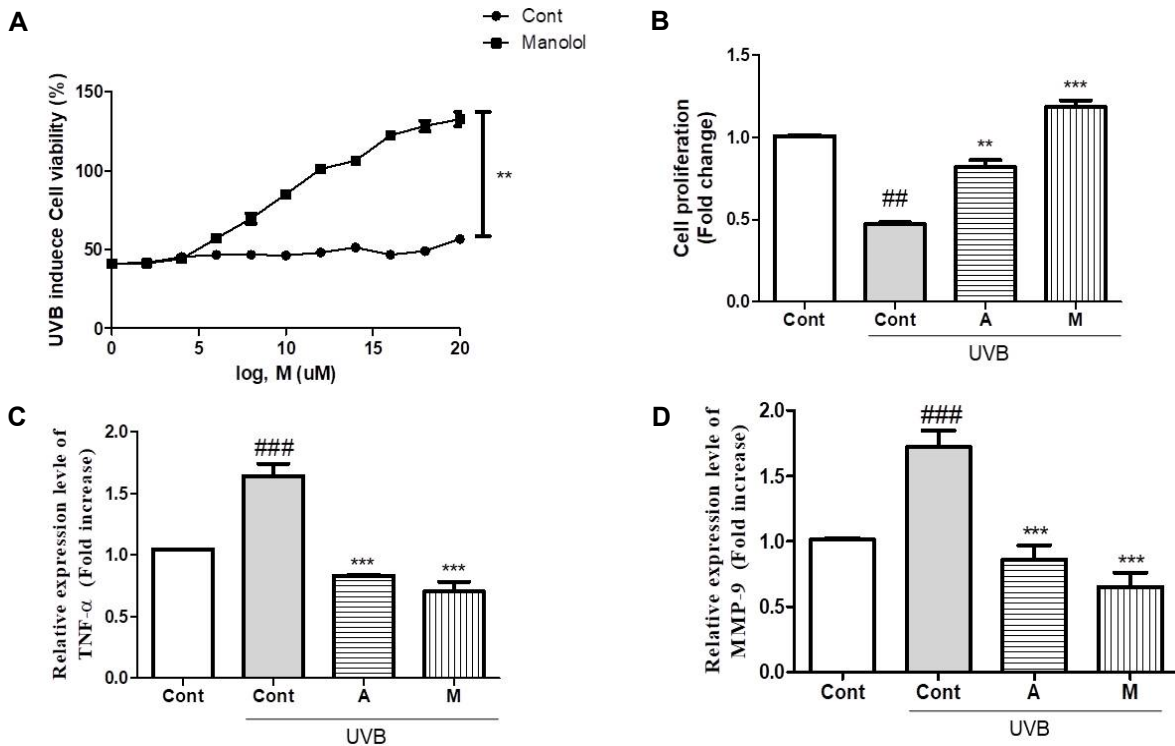


Fig. 3. Effect of magnolol on UVB-induced cell death pathway to overcome by TNF $\alpha$  and MMP9. UVB-induced cell viability and magnolol effect on HDF cells (A), AG490 (Jak2 inhibitor) 40  $\mu$ M (B) 600 mJ/Cm $^2$  and IFN $\gamma$  (C) 20 ng/ml treated cell expression of Jak2-Stat3 protein. Cells were incubated with the magnolol for 24 hr, the Jak2-STAT3 expression (D), the cell viability were compared to UVB 600 mJ/Cm $^2$  vs. 600 mJ/Cm $^2$  with magnolol. ## $p$ <0.01, ### $p$ <0.001 compared to control group. \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 compared to control (+UVB) group.

에서도 magnolol과 ML385를 같이 처리하였을 때 세포의 성장이 억제되는 것을 알 수 있었고(Fig. 4B,  $p$ <0.001), Nrf2 luciferase 활성도 magnolol과 ML385를 동시 처리시 떨어지는 것을 확인하였다(Fig. 4C,  $p$ <0.001). MMP-9 역시 magnolol과 ML385를 동시 처리시 억제 감소되었지만 magnolol 단독 처리보다 MMP-9의 양이 증가된 것을 확인하였다(Fig. 4D,  $p$ <0.001).

피부섬유아세포에서 매트릭스 메탈로 프로테아제(MMP)는 콜라겐 타입 IV를 포함하는 세포 외 매트릭스의 젤라틴, 라미닌, 엘라스틴 및 피브로넥틴을 분해한다. 97kDa의 단백질 proMMP-9은 피부섬유아세포에서 자이모겐으로 분비되어 진피세포의 매트릭스를 조절하며, 활성화된 MMP-9의 작용을 통해 분해를 한다. AG490는 proMMP-9을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 MMP-9을 확인한 결과 AG490 처리 모두 MMP-9을 억제하는 것을 확인하였다( $p$ <0.001). 또한 magnolol 처리시 AG490과 유사하게 MMP-9을 억제하는 것을 확인하였다( $p$ <0.001). 하지만, MMP-2와 MMP-9은 IL6 처리에 의해 p-STAT3와 함께 활성화될 수 있고, Fig. 2D에서 IL6 처리에서는 Jak2의 감소보다 p-STAT3의 감소가 큰 영향을 받았기 때문에 이는 MMP-9의 작용이 크게 영향을 미친 것으로 판단된다. 하지만, UVB 처리시 IL6 또는 IFN $\gamma$ 처리보다

magnolol의 영향이 크게 작용된 것은 다른 매커니즘이 존재할 것으로 보인다.

### 고 찰

초기 발달 단계에서 STAT3 활성화는 배아줄기세포의 자가 재생을 위해 요구되지만, 피부세포에서의 STAT3는 다른 수단을 통해 비활성화된다. STAT3와 NRF2는 모두 항염증 및 세포자연사(apoptosis)를 억제하는 작용기능을 갖는 것으로 보고되었고, 염증발생 시STAT3는 도메인 모티프 상호 작용에 기초하여 NRF2와 상호 작용하는 것으로 보고되었다[5, 6]. 항산화 작용을 통해 STAT3의 조절이 이루어지는 것으로 판단된다. STAT3-NRF2 상호 작용은 비만세포에서도 확인된 바 있으며[24], IL-10-STAT3-NRF2의 신호체계에서도 염증성 사이토카인 조절기전이 확인된다. 천연물 기원 알카로이드는 다양한 세포에서 STAT3 기전을 억제하며, 세포주기 정체를 억제시킨다[30]. IL-6는 STAT3 신호 전달 경로를 활성화시킴으로써 전염증 효과를 발휘한다[1, 9]. 이때 천연물 알카로이드의 처리는 Jak2-STAT3를 억제하여 염증성 사이토카인의 생성을 차단하고, NF- $\kappa$ B 신호 통로에 억제가 보고된 바 있다[28].

Magnolol의 Jak/STAT pathway의 하향조절은 이미 다수

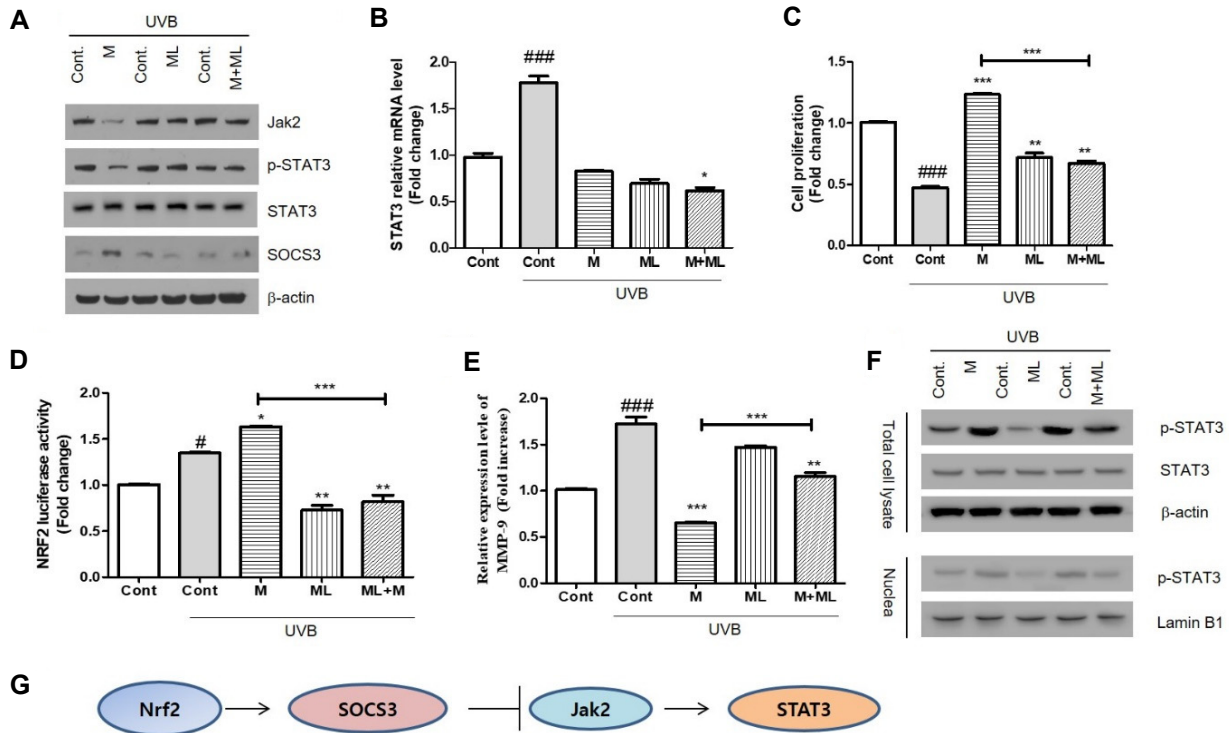


Fig. 4. Role of NRF2-SOCS3-JAK2-STAT3 control on UVB-induced HDF cells by magnolol. UVB (600 mJ/Cm<sup>2</sup>)-induced cell signaling of Jak2, STAT3 and SOCS3 in HDF cells (A), ML385 (NRF2 inhibitor) 3.5  $\mu$ M treated cells. STAT3 mRNA expression level (B), Cell proliferation (C), Nrf2 luciferase activity (D) and MMP-9 expression level (E) is incubated with the magnolol or ML385 or magnolol with ML385 for 24 hr. Western blots of total cell lysates and nuclear extracts (F) and mechanism of Action/Pathway Profiles (G). # $p$ <0.05, ### $p$ <0.001 compared to control group. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 compared to control (+UVB) group.

의 논문에서 확인되었고[7, 10], 본 연구에서도 유의하게 감소되는 것을 알 수 있었다. 우리는 이러한 현상의 작용 매커니즘을 확인하고자 하였고, 사천고추(*Zanthoxylum bungeanum*) 유래 sanshool을 이용하여 UVB 조사된 HDF에서 MMP-1 및 MMP-3 발현 수준을 감소하고, JAK2 / STAT3 경로 억제하여 UVB 데미지를 억제하고, 세포보호 효과를 보고한 바 있었다 [8]. 이러한 실험에 착안하여 magnolol을 이용한 UVB 데미지를 확인했을 때 Jak/STAT pathway 이외 MMP family 중 MMP-1 및 MMP-3는 어렵게 조절하지 못했다(data not shown). 하지만, magnolol은 MMP-9을 조절하였고, 주로 피부 결합 조직의 세포 외 매트릭스에서 주요 구조 성분인 콜라겐의 분해와 관련이 있기 때문에 HDF세포의 UVB의 데미지 발생된 콜라겐을 분해하는 인자로 작용했을 것으로 판단된다. 또한, AG490은 미세아교세포에서 TNF- $\alpha$ 의 억제를 유도한 바 있기에[29], 본 연구에서도 UVB 처리시 유도된 대식세포에 의해 분비되는 염증성 사이토카인류인 TNF- $\alpha$ 의 증가를 확인하였고( $p$ <0.001), magnolol 및 AG490 처리 모두 TNF- $\alpha$ 를 억제하는 것을 확인하였다( $p$ <0.001).

SOCS3의 Jak2 조절의 매커니즘에서 ML385의 Jak2 억제와 magnolol의 SOCS3-Jak2억제와 비슷한 역할을 하는 것으로 판

단되며[15, 26], MMP-9의 억제 작용은 SOCS3의 역할과 매우 관련성이 높은 것을 확인하였다. SOCS3와 관련된 보고에서 IL-6에 의해 SOCS3의 발현이 조절되는 것으로 알려져 있는데 [9, 13], 본 연구에서는 UVB 유도 및 magnolol의 처리에서 SOCS3의 발현이 조절되는 것은 처음으로 확인하였다. HDF 세포에서 magnolol의 UVB 데미지 억제효과는 Nrf2-SOCS3의 활성화를 통한 Jak2-STAT3 억제를 보이며, SOCS3를 중심으로 세포, 생화학적, 분자 및 병리 생리학적 수준에서 향후 SOCS3의 구체적 기전연구를 위한 기초자료로 활용할 수 있을 것이다.

Magnolol은 다수의 연구에서 항산화 기전을 갖는 것을 알 수 있다. 특히 UVB의 작용 중 산화스트레스를 유도하고 세포를 노화기전으로 변화시키는 작용이 있기에 magnolol의 항산화 효과가 Jak2에 영향을 준 것이 아닐까 생각되었다. 분자 수준에서, 전사 인자 인 Nrf2는 ARE (antioxidant response element)를 포함한 몇몇 유전자를 조절하고 각각의 번역을 가져와 반응성 라디칼을 상쇄시키고 항상성을 유지한다[12, 16]. 세포계는 항산화 신호 전달을 전사적으로 제어하는 NF $\kappa$ B, AP1, HIF1 $\alpha$ , P53, 및 Nrf2와 같은 몇몇 신호 전달 단백질 및 전사 인자의 활성화를 통해 산화를 억제한다[16]. 그러나, 세포



에 따라 산화적 스트레스를 조절하는 여러 다른 조절 인자에 따라 크게 달라질 수 있기 때문에 UVB 데미지가 발생한 HDF 세포에서 항산화 기전인 Nrf2의 기능을 확인했다.

UVB 데미지는 생명을 위협할 주요질환은 아니다. 하지만, 피부의 자극 및 노화를 촉진하거나, 일부 염증을 유발시켜 심하게는 피부암을 유발하는 염증성 반응을 동반할 수 있다. 앞서 기술한 magnolol의 항산화, 항염증 및 피부세포의 재생을 조절하는 기전을 통해 새로운 연구의 기초를 제시하고자 한다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Agrawal, S., Gollapudi, S., Su, H. and Gupta, S. 2011. Leptin activates human B cells to secrete TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway. *J. Clin. Immunol.* **31**, 472-478.
- Besaratinia, A., Kim, S. I. and Pfeifer, G. P. 2008. Rapid repair of UVA-induced oxidized purines and persistence of UVB-induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells. *FASEB J.* **22**, 2379-2392.
- Cavinato, M., Koziel, R., Romani, N., Weinmüller, R., Jenewein, B., Hermann, M., Dubrac, S., Ratzinger, G., Grillari, J. and Schmuth, M. 2017. UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. *J. Gerontol.* **72**, 632-639.
- Chen, W., Kang, J., Xia, J., Yang, B., Chen, B., Sun, W., Song, X., Xiang, W., Wang, X. and Wang, F. 2008. p53-related apoptosis resistance and tumor suppression activity in UVB-induced premature senescent human skin fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* **21**, 645-653.
- Chenais, B., Derjuga, A., Massrieh, W., Red-Horse, K., Bellingard, V., Fisher, S. J. and Blank, V. 2005. Functional and placental expression analysis of the human NRF3 transcription factor. *Mol. Endocrinol.* **19**, 125-137.
- Chevillard, G., Paquet, M. and Blank, V. 2011. Nfe2l3 (Nrf3) deficiency predisposes mice to T-cell lymphoblastic lymphoma. *Blood* **117**, 2005-2008.
- Han, X., Wang, Y., Chen, H., Zhang, J., Xu, C., Li, J. and Li, M. 2016. Enhancement of ICAM-1 via the JAK2/STAT3 signaling pathway in a rat model of severe acute pancreatitis-associated lung injury. *Exp. Ther. Med.* **11**, 788-796.
- Hao, D., Wen, X., Liu, L., Wang, L., Zhou, X., Li, Y., Zeng, X., He, G. and Jiang, X. 2019. Sanshool improves UVB-induced skin photodamage by targeting JAK2/STAT3-dependent autophagy. *Cell Death Dis.* **10**, 19.
- Huang, L., Hu, B., Ni, J., Wu, J., Jiang, W., Chen, C., Yang, L., Zeng, Y., Wan, R. and Hu, G. 2016. Transcriptional repression of SOCS3 mediated by IL-6/STAT3 signaling via DNMT1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 27.
- Huang, Q., Han, L., Lv, R. and Ling, L. 2019. Magnolol exerts anti-asthmatic effects by regulating Janus kinase-signal transduction and activation of transcription and Notch signaling pathways and modulating Th1/Th2/Th17 cytokines in ovalbumin-sensitized asthmatic mice. *Kor. J. Physiol. Pharmacol.* **23**, 251-261.
- Ikehata, H., Mori, T., Douki, T., Cadet, J. and Yamamoto, M. 2018. Quantitative analysis of UV photolesions suggests that cyclobutane pyrimidine dimers produced in mouse skin by UVB are more mutagenic than those produced by UVC. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 404-413.
- Kawachi, Y., Xu, X., Taguchi, S., Sakurai, H., Nakamura, Y., Ishii, Y., Fujisawa, Y., Furuta, J., Takahashi, T. and Itoh, K. 2008. Attenuation of UVB-induced sunburn reaction and oxidative DNA damage with no alterations in UVB-induced skin carcinogenesis in Nrf2 gene-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1773-1779.
- Kim, J. H., Kim, J. E., Liu, H. Y., Cao, W. and Chen, J. 2008. Regulation of interleukin-6-induced hepatic insulin resistance by mammalian target of rapamycin through the STAT3-SOCS3 pathway. *J. Biol. Chem.* **283**, 708-715.
- Lu, S. H., Hsu, W. L., Chen, T. H. and Chou, T. C. 2015. Activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway involves the anti-inflammatory activity of magnolol in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated mouse RAW 264.7 macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **29**, 770-778.
- Lu, Y., Fukuyama, S., Yoshida, R., Kobayashi, T., Saeki, K., Shiraiishi, H., Yoshimura, A. and Takaesu, G. 2006. Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J. Biol. Chem.* **281**, 36683-36690.
- Narasimhan, M. and Rajasekaran, N. S. 2016. Exercise, Nrf2 and antioxidant signaling in cardiac aging. *Front. Physiol.* **7**, 241.
- Nefedova, Y., Cheng, P., Gilkes, D., Blaskovich, M., Beg, A. A., Sefti, S. M. and Gabrilovich, D. I. 2005. Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling. *J. Immunol.* **175**, 4338-4346.
- Nouhi, Z., Chevillard, G., Derjuga, A. and Blank, V. 2007. Endoplasmic reticulum association and N-linked glycosylation of the human Nrf3 transcription factor. *FEBS Lett.* **581**, 5401-5406.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharfetter-Kochanek, K., Jansen-Dürr, P. and Wlaschek, M. 2006. p16INK4A is a robust *in vivo* biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* **5**, 379-389.
- Sakaue, Y., Domon, H., Oda, M., Takenaka, S., Kubo, M., Fukuyama, Y., Okiji, T. and Terao, Y. 2016. Anti-biofilm and bactericidal effects of magnolia bark-derived magnolol and honokiol on *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Immunol.* **60**, 10-16.
- Saw, C. L., Huang, M. T., Liu, Y., Khor, T. O., Conney, A. H. and Kong, A. N. 2011. Impact of Nrf2 on UVB-induced skin inflammation/photoprotection and photoprotective effect of sulforaphane. *Mol. Carcinog.* **50**, 479-486.
- Shanuja, S., Iswarya, S., Rajasekaran, S., Dinesh, M. and

- Gnanamani, A. 2018. Pre-treatment of extracellular water soluble pigmented secondary metabolites of marine imperfect fungus protects HDF cells from UVB induced oxidative stress. *Photochem. Photobiol. Sci.* **17**, 1229-1238.
23. Sun, L., Liao, K. and Wang, D. 2015. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PLoS One* **10**, e0117695.
24. Wang, Y., Li, H., Huang, H., Liu, S., Mao, X., Wang, S., Wong, S. S.-C., Xia, Z. and Irwin, M. G. 2016. Cardioprotection from emulsified isoflurane postconditioning is lost in rats with streptozotocin-induced diabetes due to the impairment of Brg1/Nrf2/STAT3 signalling. *Clin. Sci.* **130**, 801-812.
25. Wang, Y. N., Wu, W., Chen, H. C. and Fang, H. 2010. Genistein protects against UVB-induced senescence-like characteristics in human dermal fibroblast by p66Shc down-regulation. *J. Dermatol. Sci.* **58**, 19-27.
26. Wunderlich, C. M., Hövelmeyer, N. and Wunderlich, F. T. 2013. Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT* **2**, e23878.
27. Yan, D., Dong, J., Sulik, K. K. and Chen, S. 2010. Induction of the Nrf2-driven antioxidant response by tert-butylhydroquinone prevents ethanol-induced apoptosis in cranial neural crest cells. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 144-149.
28. Yang, X., Gao, X., Cao, Y., Guo, Q., Li, S., Zhu, Z., Zhao, Y., Tu, P. and Chai, X. 2018. Anti-inflammatory effects of boldine and reticuline isolated from *Litsea cubeba* through JAK2/STAT3 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Planta Med.* **84**, 20-25.
29. Yin, L., Dai, Q., Jiang, P., Zhu, L., Dai, H., Yao, Z., Liu, H., Ma, X., Qu, L. and Jiang, J. 2018. Manganese exposure facilitates microglial JAK2-STAT3 signaling and consequent secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  to promote neuronal death. *Neurotoxicology* **64**, 195-203.
30. Zhao, J., Lin, W., Cao, Z., Liu, L., Zhuang, Q., Zhong, X., Hong, Z. and Peng, J. 2013. Total alkaloids of *Rubus aleaefolius* Poir. inhibit the STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and cell cycle arrest in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* **30**, 1309-1314.

## 초록 : 마그놀롤의 HDF세포에서 Nrf2-SOCS3-Jak2-STAT3에 의한 UVB 유래 염증데미지 조절

남영선<sup>1\*</sup> · 지주리<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>신경대학교 뷰티디자인학과, <sup>2</sup>동남보건대학교 뷰티케어과)

본 연구는 magnolol에 의한 UVB 유도 세포 손상의 복구를 조사하였다. 우리는 약물재배치를 위해 STAT3 기작을 분석하였고, magnolol HDF 세포에서 세포 생존력을 향상시키며, STAT3의 억제제인 것을 확인하였다. IL-6, UVB 및 IFN $\gamma$ 로 처리된 HDF 세포는 Jak2 및 인산화된 STAT3 (p-STAT3)의 높은 발현을 나타냈다. Magnolol의 처리는 UVB 유도 세포에서 Jak2 및 p-STAT3의 발현을 감소시킬 수 있었다. 또한, UVB- 손상된 세포 성장은 용량 의존적 방식으로 재 활성화 및 magnolol 과의 상관 관계가 상당히 증가되었다. UVB 처리된 HDF 세포에 대한 AG490 (Jak2 억제제) 처리와 비교하여, 세포 증식이 유의하게 증가 하였다. 우리는 AG490 및 magnolol 이 TNF- $\alpha$  농도를 감소시키는 것을 확인했다. Western blot (단백질 수준)은 오직 magnolol 처리된 세포에서만 Jak2 및 p-STAT3 발현의 감소를 나타냈고, Jak2, p-STAT3 및 SOCS3의 발현은 또한 magnolol 처리한 세포에서만 증가 하였다. 세포를 magnolol 및 ML385 (NRF2 억제제)로 동시 처리시 세포 증식 및 NRF2 발현을 감소시켰다. MMP9의 양은 magnolol 및 ML385 로의 처리에 의해 증가되었다. 종합적으로, 이들 결과는 NRF2, SOCS3, Jak2 및 STAT3의 발현을 조절함으로써 UVB 손상 후 세포를 회복시키는데 있어 magnolol의 가능성을 입증한다.