



Brazilin downregulates CCL20 expression via regulation of STAT3 phosphorylation in TNF- α /IL-17A/IFN- γ -induced HaCaT cells

Mi Ran Kim¹ · Hyung Seo Hwang¹

TNF- α /IL-17A/IFN- γ 유도된 HaCaT 세포에서 브라질린의 STAT3 인산화 억제를 통한 CCL20 저해 효과

김미란¹ · 황형서¹

Received: 13 May 2021 / Accepted: 10 June 2021 / Published Online: 30 June 2021
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

Abstract Psoriasis is a chronic intractable skin disease caused by various inflammatory cytokines such as IL-6, CXCL8, TNF- α , and IFN- γ , as well as IL-17A secreted from Th17 cells and is characterized by hyperkeratosis and chronic inflammation of the epidermis. Brazilin, an active ingredient of *Caesalpinia sappan* L., is known to exert antioxidant and anti-inflammatory activity, and function in skin barrier improvement. In particular, it was shown as a potential material for treating psoriasis in a tumor necrosis factor (TNF)- α -stimulated HaCaT keratinocyte model. However, the direct regulation of the C-C motif chemokine ligand (CCL) 20, a psoriasis-inducing factor, by brazilin has not been reported. Therefore, in this study, we investigated the suppression of CCL20 and the regulatory mechanism by brazilin using a psoriasis-like model. First, brazilin downregulated CCL20 and CXCL8 in IL-17A-stimulated HaCaT cells in a concentration-dependent manner by inhibiting signal transducer and transcription (STAT)3 phosphorylation. In addition, brazilin significantly inhibited the expression of psoriasis-related genes CXCL8,

CCL20, IL-1, IL-6, and TNF- α in TNF- α /IL-17A/IFN- γ -stimulated HaCaT cells. Moreover, brazilin also had a positive effect on improving the skin barrier in TNF- α /IL-17A/IFN- γ -stimulated HaCaT cells. The above results indicated that brazilin ultimately downregulated CCL20 expression by inhibiting STAT3 phosphorylation, and also suppressed the expression of psoriasis-induced cytokines. If the efficacy of brazilin in improving psoriasis is verified through animal models and clinical trials in the future, it may represent a potentially therapeutic substance for psoriasis patients.

Keywords Brazilin · C-C motif chemokine ligand 20 · HaCaT cells · Interleukin 17A · Psoriasis · Signal transducer and transcription3

서 론

건선(Psoriasis)은 표피 각질형성세포의 비정상적인 분화, 진피 면역 세포 침윤으로 인한 염증 반응을 특징으로 하는 만성 피부질환이다[1]. 건선의 표피는 정상 피부보다 훨씬 빠르게 증식하여 두꺼워지고, 감염과 탈수로 인해 피부 장벽의 결함이 초래된다[2]. 임상학적으로는 피부의 각질화, 상처, 가려움, 발진, 피부 통증 및 출혈 등의 증상이 나타난다[3]. 이외에도 건선성 관절염을 포함하여 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환 및 염증성 장 질환과 같은 다양한 합병증을 유발할 수 있다[4-6]. 현재까지 전 세계적으로 약 2%의 유병률을 가지는 것으로 추정되며, 질환을

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

¹Department of Cosmetic Science, 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.

겪고 있는 건선 환자의 삶의 질에도 중대한 영향을 미치고 있다[7,8]. 건선의 병리기전은 완전히 이해되지 않았으나 보통 수지상 세포, B 세포, T 세포, 대식세포, 호중구 등 선천성 또는 적응성 면역 세포들이 관여되는 것으로 알려져 있다[9]. 특히, 수지상 세포에서 분비되는 사이토카인 IL-23은 Th17 세포의 분화를 유도하여 IL-17 분비를 촉진한다[10-12]. 최근 Th17 세포가 Th1 및 Th2 세포와는 다른 새로운 유형으로 제안되며, 건선의 유발과 직접적 연관이 있는 것으로 보고된다. Th17 세포가 생산하는 IL-17은 6개의 구성원(IL-17A~IL-17F)을 포함하며 이들은 염증성, 자가 면역 질환에서 면역 반응에 중요한 역할을 한다. 이들 IL-17 구성원 중 IL-17A가 인간의 건강과 질병과 가장 밀접하게 관련되어 있는 것으로 보고되었다[13-15]. IL-17A의 수용체는 IL-17RA 및 IL-17RC 이종이량체로 구성되며 IL-17A에 대한 수용체 결합 시 연결기(adaptor) 단백질 ACT1을 동원하고, TNF receptor-associated factor 6와 함께 NF- κ B, ERK1/2, GSK-3 β 경로를 활성화시킨다[16,17]. 또한, IL-17A에 의한 signal transducer and transcription (STAT) 3 단백질 활성화 및 신호전달은 과도한 세포 증식을 유발할 뿐만 아니라 CXCL8 및 C-C motif chemokine 20 (CCL20)과 같은 케모카인 생산을 상향 조절한다[18-20]. CCL20은 면역 세포를 염증 부위로 동원하기 위한 화학 유인 물질로서 C-C motif chemokine receptor 6 (CCR6)을 발현하는 Th17 세포, 호중구 및 수지상 세포를 포함하는 면역세포 모집에 기여한다[21-23]. 현재까지 건선 치료제는 비타민 D 유도제, 국소 코르티코스테로이드와 같은 국소 치료제와 IL-17, IL-23 및 TNF- α 를 억제하는 생물학적 제제가 이용되고 있다[24,25]. 그러나 기존 약물에서 일부 부작용이 보고되었고, 효능 또한 제한적이기 때문에 천연물 기반의 신규 소재 개발이 필요하다. 소목(*Caesalpinia sappan* L.)의 심재인 Sappan Lignum은 항염증제, 항산화 활성 등의 의학적 특성을 가지고 있다[26]. Sappan Lignum의 주요 성분인 브라질린(brazilin)은 폴리페놀 계열 성분으로 천연염색을 위한 염료로도 잘 알려져 있다. 브라질린은 항산화, 항박테리아, 항염증, 항여드름, 저혈당 활성, 혈관 이완 등 다양한 생물학적 활성을 나타낸다[27]. 특히, TNF- α 유도 HaCaT 세포 모델을 이용한 선행연구에서 브라질린에 의한 I κ B, Akt, MAPK 및 STAT3 단백질 활성 저해, 염증성 사이토카인 발현 억제 및 피부 장벽 강화를 통해 건선 치료제로서 가능성을 보고하였다[28]. 그러나 브라질린에 의한 건선의 CCL20 조절 및 표피 피부장벽 개선에 관한 분자 메커니즘은 거의 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 *in-vitro* 건선 유사 모델에서 브라질린에 의한 CCL20 발현 조절 여부와 표피 밀착연접에서 역할을 조사하여 브라질린의 새로운 건선 완화 기능 및 메커니즘을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

브라질린은 Chem Faces (Wuhan, Hubei, China)에서 구매하였으며, TNF- α 는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 재료를 구매하여 사용하였다. IL-17A 및 IFN- γ 는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였다.

세포배양

본 실험에서 사용된 HaCaT 인간 각질형성세포주는 CLS (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Baden-Wurttemberg, Germany)에서 구입하였다. 세포주는 5% CO₂, 37 °C 배양조건에서 10% Fetal bovine serum (Welgene, Gyeongbuk, Korea), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Gyeongbuk, Korea)으로 배양하였다. 주 2-3회 1× Trysin-EDTA solution (Welgene, Gyeongbuk, Korea)을 이용하여 100 mm 세포 배양 접시에서 3.0×10⁵ cells로 분주하여 계대배양을 실시하였다.

RNA 추출 및 Real time RT-PCR

HaCaT 세포를 35 mm cell culture plate (+)FBS DMEM 배지 조건에서 24시간 배양한 후 (-)FBS DMEM 배지로 옮겨 2 시간 또는 48시간 동안 세포를 배양하였다. Trizol (Ambion, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 세포를 충분히 용해시킨 뒤 1.5 mL EP 튜브로 옮긴 후 200 μ L chloroform을 추가 분주하고 12,000 rpm, 4 °C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 획득하였다. 상층액에 400 μ L 2-propanol을 넣고 상온에서 10분간 반응시킨 뒤 4 °C, 12,000 rpm에서 원심분리하여 total RNA를 추출하였다. RNA를 1.5 μ g로 정량한 뒤 Revertra ace - α kit (Toyobo, Osaka, Japan)를 이용하여 42 °C에서 20분, 99 °C에서 5분, 4 °C에서 5분 조건에서 cDNA로 역전사 시켰다. 합성된 cDNA는 1× Tris/EDTA buffer (sigma aldrich, St. Louis, MO, USA)로 희석하여 사용하였다. Real time RT-PCR은 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) 장비를 사용하였고, 각각의 유전자별 Taqman probe (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 다음 조건에서 PCR 반응을 수행하였다. PCR 조건은 50 °C 2분, 95 °C 10분, 95 °C 15초, 60 °C 1분으로 총 45회 실시하여 실시간으로 유전자의 발현 변화를 관찰하였다. 위 실험에 사용된 probe들은 Table 1에 별도로 표기하였다.

Western blot을 이용한 단백질 발현 분석

RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 Protease and Phosphatase Inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) 혼합액을 100 μ L 분주하여 세포를 용해시킨 후 14,000 rpm, 4 °C 조건에서 15분간 원심분리를 통해 단백질을 추출하였다. 10% polyacrylamide gel에서 135 V에서 50 분간 전기영동을 수행한 뒤 Polyvinylidene fluoride (Invitrogen, Waltham, MA, USA) 막으로 transfer하고 실온에서 1시간 동안 10% (w/v) skim milk로 blocking하였다. 1× TBS-T로 1분간 3회 세척 후 1차 항체(1:1000)를 처리하여 4 °C에서 반응시켰다. 1× TBS-T로 10분간 5회 세척한 뒤 2차 항체(1:10000)를 처리하여 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 1× TBS-T로 10분간 5회 washing 단계를 수행하고 ECL solution (Bio-rad, Hercules, CA, USA)과 반응시켰다. 이후 이미지 처리 장치 (Microchemi-DNR, Neve Wamin, Israel)를 이용하여 단백질 발현을 시각화 하였고, 단백질 정량분석을 위해 Image J (N.I.H, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 사용하였다. 실험에서 사용한 항체들의 정보는 Table 2에 별도로 설명하였다.

Table 1 Gene symbol, name, and assay ID of Taqman probe used for real time RT-PCR

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	Hs00174103_m1
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	Hs01011368_m1
IL-1 α	Interleukin 1 alpha	Hs00174092_m1
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Hs01555410_m1
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	Hs00174128_m1
IL-6	Interleukin 6	Hs00174131_m1

Table 2 Antibody catalog number used in western blot analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	MA5-15738 ^a
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	4904 ^b
p-STAT3	Phosphosignal 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

^a Invitrogen

^b Cell signaling Technology

Transepithelial Electrical Resistance (TEER) 측정

Transwell plate (Corning, Lowell, MA, US)에 HaCaT 세포를 5.0×10^4 cells/well 밀도로 분주한 후 (-)FBS 배양 조건에서 24 시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 안정화 시켰다. 브라질린과 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 를 세포에 처리하고 Epithelial Voltohmmete (EVOM2, WPI, Sarasota, FL, USA) 장비를 사용하여 시간대별로 TEER 값을 측정하였다. TEER 측정 전극은 사용하기 전 배양 배지에 0이 되도록 맞추고 STX2 전극의 끝이 긴 쪽을 plate well에 넣어 배지에 잠기게 하였다. 전극의 끝이 짧은 쪽은 transwell insert의 배지에 닿을 정도로만 넣어 세포가 손상되지 않도록 하며 TEER 값을 측정하였다.

통계 처리

모든 실험은 3회 측정을 통해 얻은 평균값과 편차로 나타내었으며, Student's t-test를 통해 $p < 0.05$ 일 경우 실험값에 대한 통계적 유의성 있는 결과로 판단하였다.

결 과

IL-17A 자극 HaCaT 세포에서 브라질린에 의한 케모카인 발현 조절

건선 유발에 밀접한 연관이 있는 IL-17A에 의한 브라질린의 억제 효능을 관찰하기 위해, IL-17A 처리 조건에서 브라질린에 의한 케모카인 CXCL8, CCL20의 발현 변화를 확인하였다. Real time RT-PCR을 통해 CXCL8, CCL20 mRNA 발현을 확인한 결과, IL-17A를 세포에 처리하였을 때 무처리군 대비 CXCL8, CCL20 mRNA 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 반면, 브라질린을 농도별로 처리한 결과 IL-17A 단독 처리군 대비 CXCL8 mRNA 발현량은 5.7 ± 14.7 , $25.8 \pm 3.6\%$ 만큼 억제되었고, CCL20 발현량 또한 각각 34.9 ± 1.7 , $68.1 \pm 1.0\%$ 만큼

억제되었다(Fig. 1A, B). 이를 통해 IL-17A 자극에 따른 CXCL8, CCL20의 발현이 브라질린에 의해 농도의존적 방식으로 저해됨을 확인하였다. 또한, IL-17A는 각질형성세포에서 전사인자인 STAT3 단백질의 인산화를 촉진하고 CCL20 발현을 상향 조절한다. 따라서, 케모카인 발현 저해에 대한 작용 기전을 규명하고자 브라질린에 의한 STAT3 인산화 조절 여부를 조사하였다. IL-17A로 HaCaT 세포를 자극하였을 때, 무처리군 대비 STAT3 단백질 인산화는 2.3 ± 0.2 배로 증가였으며, IL-17A와 브라질린 동시 처리 시 인산화된 STAT3 단백질 수준은 3 $\mu\text{g/mL}$ 농도 조건에서 $17.0 \pm 9.1\%$ 만큼 하향 조절되었다(Fig. 1C, D). 이는 브라질린이 STAT3 인산화 및 CXCL8, CCL20 mRNA 발현을 유의적으로 억제함을 보여준다.

TNF- α /IL-17A/IFN- γ 자극 조건에서 브라질린의 케모카인 발현 조절

IL-17A 이외의 Th 세포에서 분비되는 IFN- γ , TNF- α 염증성 사이토카인 또한 건선 환자의 혈청에서 높은 수준으로 발현된다 [29]. 건선 유사 환경을 위해 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 등 3종의 사이토카인으로 자극한 HaCaT 세포를 *in-vitro* 시험 모델로 사용하였다. 위와 같은 염증 환경에서 브라질린의 항염증 효과를 조사하고자 real time RT-PCR 분석을 수행하여 염증성 사이토카인 발현 수준을 측정하였다. 먼저, TNF- α /IL-17A/IFN- γ 자극은 HaCaT 세포에서 IL-1 α/β , TNF- α 그리고 IL-6의 발현을 각각 1.9 ± 0.0 , 1.7 ± 0.2 , 2.9 ± 0.1 , 2.6 ± 0.2 배 증가시켰다. 대조적으로, 브라질린은 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 유도된 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인 mRNA 발현 수준을 감소시켰다. 특히, 3 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리된 브라질린은 IL-1 α/β , TNF- α 및 IL-6의 발현 수준을 각각 72.7 ± 1.6 , 69.0 ± 2.9 , 39.1 ± 12.9 , $66.6 \pm 8.0\%$ 감소시켰다(Fig. 2A-D). 이러한 결과는 브라질린이 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 복합적 염증 환경에서도 IL-1 α/β , IL-6 및 TNF- α mRNA 발현을 유의적으로 억제함을 보여준다. 또한, TNF- α /IL-17A/IFN- γ

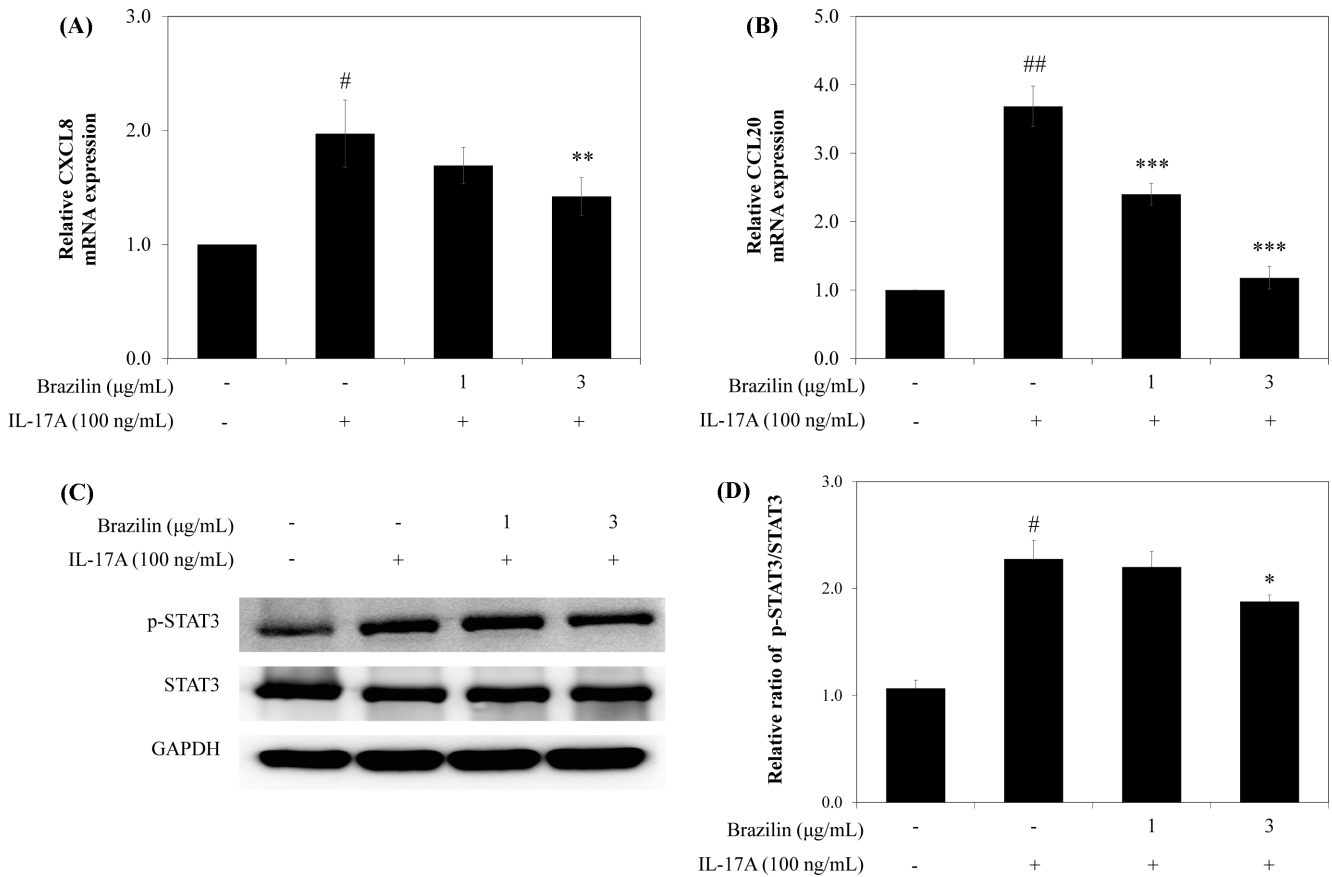


Fig. 1 Effect of brazilin on chemokine production and STAT3 phosphorylation in HaCaT cells treated with IL-17A. HaCaT cells were stimulated with IL-17A (100 ng/mL) and brazilin (1, 3 μg/mL) for 48 h. Then, mRNA expression was measured by real-time RT-PCR. (A) CXCL8 and (B) CCL20. (C) The level of phosphorylated STAT3 protein was measured by Western blot analysis. (D) Protein density was quantified as the relative ratio of p-STAT3/STAT3 using ImageJ software. The data are expressed as the mean ± SD. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, compared to the untreated group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to the IL-17A-treated group

자극에 의해 활성화된 각질형성세포에서 브라질린에 의한 CXCL8, CCL20 케모카인 발현 조절 효과를 확인하고자 하였다. TNF- α /IL-17A/IFN- γ 자극은 HaCaT 세포에서 CXCL8, CCL20의 발현 수준을 각각 5.9 ± 0.6 , 4.7 ± 0.6 배 증가시켰다. 브라질린을 1, 3 μg/mL 농도로 처리하였을 때, 상향 조절된 CXCL8 mRNA 발현은 34.8 ± 8.0 , $80.3 \pm 1.9\%$ 감소되었다(Fig. 2E). CCL20 mRNA 발현에서는 브라질린 1 μg/mL 농도에서 유의미한 감소가 보이지 않았으나, 3 μg/mL 농도에서 $61.9 \pm 11.4\%$ 의 저해 효과가 관찰되었다(Fig. 2F). 또한 western blot을 통해 CCL20 전사 인자인 STAT3 인산화 조절을 관찰하였다. TNF- α /IL-17A/IFN- γ 자극에 의해 STAT3 활성화가 유도되었고, STAT3의 인산화는 브라질린에 의해 유의적으로 억제되었다(Fig. 2G). 이를 정량 분석하였을 때, TNF- α /IL-17A/IFN- γ 처리한 세포에서 무처리군 대비 STAT3의 인산화가 3.8 ± 1.6 배 상향 조절되었다. 대조적으로, 브라질린을 1, 3 μg/mL으로 각각 처리하였을 때, 인산화된 STAT3 단백질 발현 수준은 각각 14.4 ± 3.4 , $15.6 \pm 2.8\%$ 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2H). 위 결과들은 각질형성세포에서 브라질린이 건선 유발과 관련된 염증성 사이토카인 및 케모카인들의 발현을 유의적으로 조절하고, STAT3 인

산화를 억제 할 수 있음을 보여준다.

TNF- α /IL-17A/IFN- γ 자극 조건에서 브라질린에 의한 피부장벽 개선 효과

피부장벽은 외부로부터 유해균의 침입을 방어하는 장벽 기능 외에 피부보습 유지에도 중요하다. 이전 연구에 따르면 건선의 피부 장벽 이상이 입증되었고, 표피 장벽의 결함이 염증, 면역반응에 관여한다는 사실이 보고되었다[30]. 브라질린이 건선 유사 환경에서 손상된 피부 장벽을 회복할 수 있는지 확인하고자 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 자극 HaCaT 세포에서 TEER 측정을 수행하였다. TEER ($\text{ohm} \cdot \text{cm}^2$) 수치의 감소는 세포 간극의 투과성이 증가되었음을 의미하며, TEER 전기 저항의 수치가 높은 수준으로 측정되면 세포 간 투과성 개선 효과가 있음을 의미한다. TNF- α /IL-17A/IFN- γ 처리 후 6시간에서는 큰 차이를 보이지 않았으나 12시간부터 무처리군 대비 TEER 수치가 점차 감소하였다. 동일 시간에서 브라질린은 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 처리 대비 TEER 수치가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 48시간에서는 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 처리에 의해 세포 간 저항값 수치가 152.3 ± 1.9 로 측정된 데 반해 브라질린 1, 3 μg/mL 농도로 처리

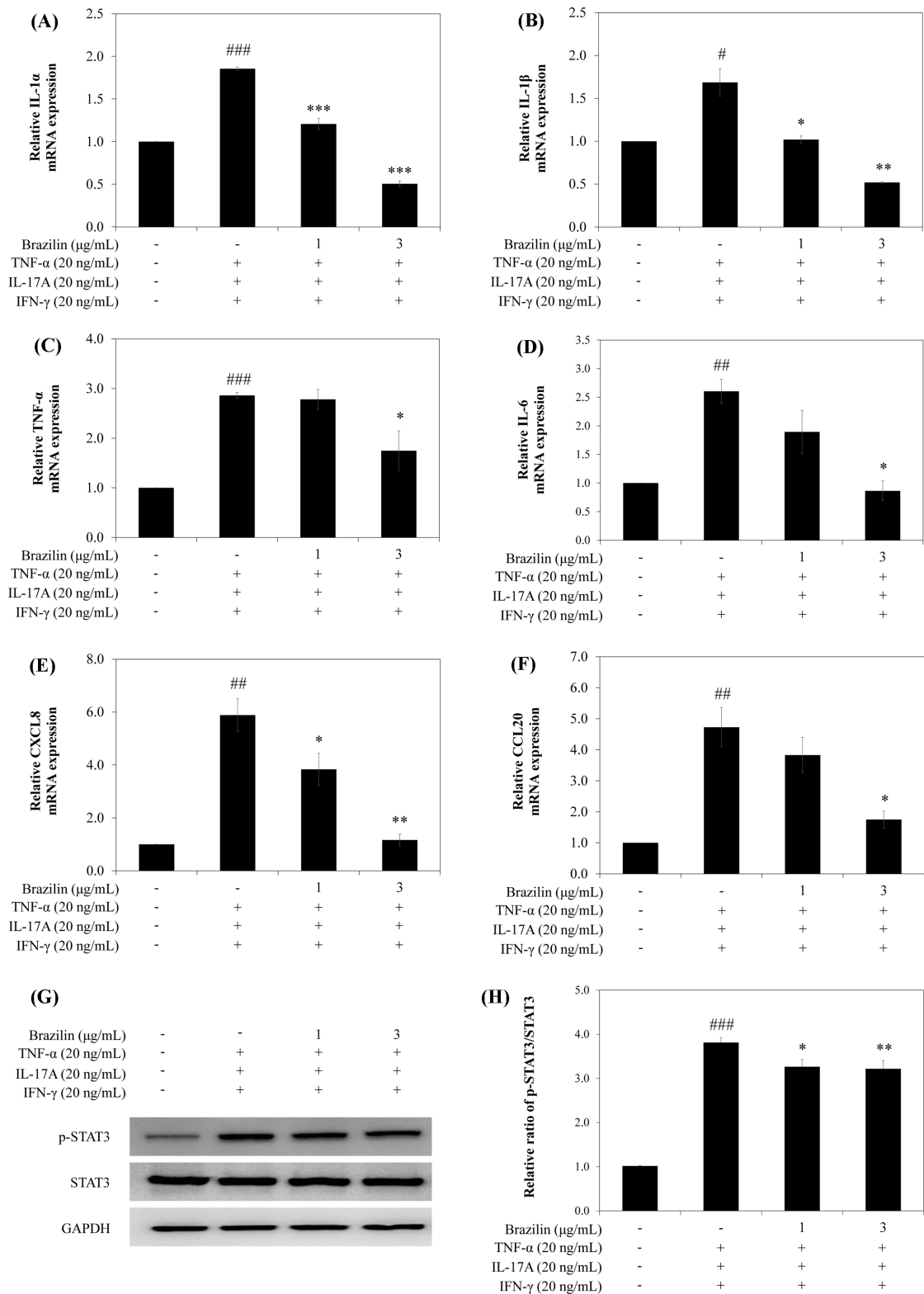


Fig. 2 Brazilin downregulated the mRNA expression of inflammatory cytokines and chemokines in TNF- α /IL-17A/IFN- γ induced HaCaT cells. The cells were treated with brazilin (1, 3 μ g/mL) in the presence of TNF- α /IL-17A/IFN- γ (20 ng/mL) for 2 h and mRNA expression levels were confirmed by real-time RT-PCR. (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) TNF- α , (D) IL-6, (E) CXCL8, and (F) CCL20. (G) Phosphorylation of STAT3 protein was suppressed by brazilin in TNF- α /IL-17A/IFN- γ induced HaCaT cells. (H) Protein density quantification of p-STAT3/STAT3 protein levels. The data are expressed as the mean \pm SD. # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, compared to the untreated group. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared to the TNF- α /IL-17A/IFN- γ -treated group

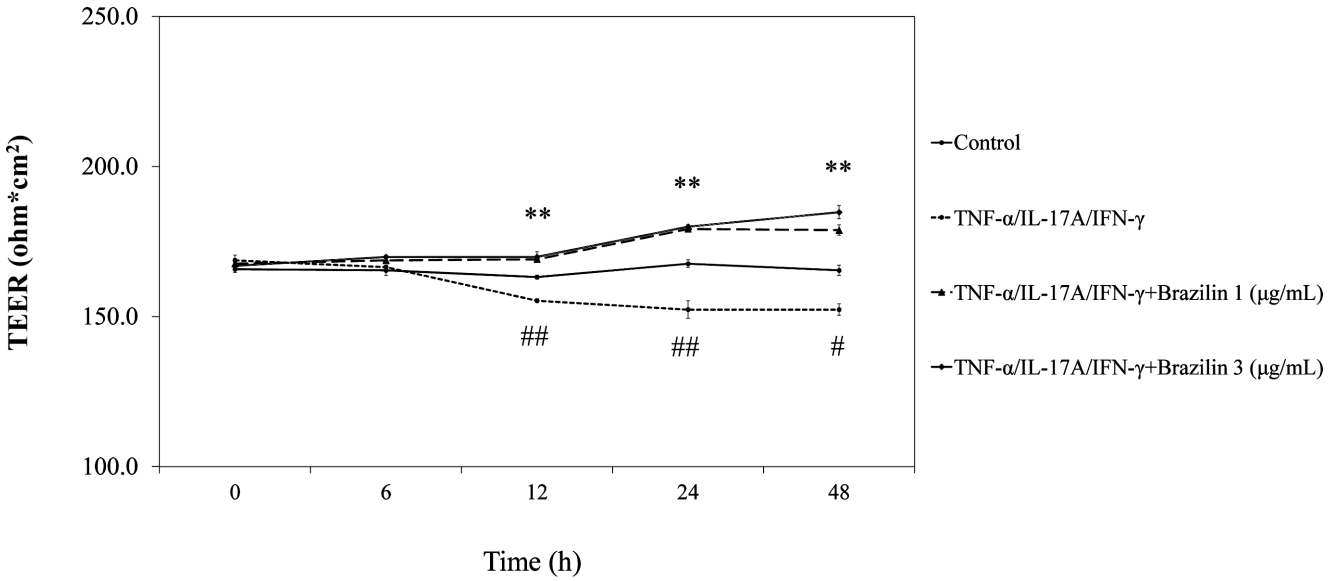


Fig. 3 Brazilin increases epithelial electrical resistance (TEER) values in TNF-α/IL-17A/IFN-γ induced HaCaT cells. Inflammation by TNF-α/IL-17A/IFN-γ decreased TEER values in a time-dependent manner, whereas brazilin increased TEER in a concentration-dependent manner, which was effective in strengthening the skin barrier. The data are expressed as the mean ± SD. #*p* <0.05, ##*p* <0.01, ###*p* <0.001, compared to the untreated group. ***p* <0.01, compared to the TNF-α / IL-17A / IFN-γ-treated group

한 세포에서는 각각 178.8±1.7, 184.8±2.2로 무처리군보다 높은 수치로 측정되었다(Fig. 3). 위 결과를 통해 *in-vitro* 건선 유사 환경에서 브라질린은 염증성 사이토카인 및 케모카인 발현 억제 뿐만 아니라 피부 장벽 기능을 개선하였다.

고찰

건선은 면역 세포와 피부 세포 사이의 상호 작용으로 피부 염증, 증식 및 분화의 악순환이 반복되는 질환이다[31]. 건선 발병 원인에 대해 명확한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만 발병 기전에서의 T 세포 매개 면역 반응은 매우 중요한 것으로 이해된다. 특히 최근 들어 Th17 세포 분화로 인해 분비되는 IL-17이 건선 유발 과정에서 직접적인 원인으로 이해되면서 건선 치료에 중요한 인자로 인식된다. IL-17A는 피부와 관련하여 각질형성세포의 과증식과 비정상적인 분화를 증가시키고, 관련 분자의 발현을 하향 조절함으로써 피부 장벽 훼손을 유발한다. 또한 IL-17A에 의한 단백질 활성화 및 신호전달을 통해 CXCL8, CCL20과 같은 케모카인의 발현을 유도하여 호중구, Th17 세포를 염증 부위로 모집하고 이는 건선 병인에 직접적으로 기여한다[32,33].

현재 건선 치료법으로 국소 치료, 전신 치료, 생물학적 제제가 사용되고 있으나, 사용 후 고혈압, 간 독성, 혈관 확장 및 고지혈증과 같은 부작용이 발생할 수 있다. 특히, 건선 치료제로 사용되는 국소 코르티코스테로이드와 같은 합성 의약품의 부작용 문제점이 강조되면서 천연물 기반 소재 개발이 중요하다. 천연물 소재는 항염 및 면역 조절 활성을 가질뿐만 아니라 합성 의약품 대비 낮은 부작용을 가진다. 또한, 신약 개발에 소요되는 시간과 비용이 적어 고효율성 측면에서도 건선 치료에 매

우 효과적일 것으로 기대된다[34,35]. 본 연구에서는 천연물 기반의 유효성분인 브라질린을 건선 치료의 후보 물질로 제시하였다. 브라질린은 천연 염료로 알려진 소목의 심재 부위에 고농도로 존재하며 RAW 264.7 마우스 대식세포, HaCaT 인간 각질형성세포에서 뛰어난 항염증 활성을 나타냈다. 특히, 이전 연구는 TNF-α로 자극된 HaCaT 세포에서 염증성 분자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다[28,36]. 위 결과를 바탕으로 우리는 보다 건선 환경과 유사한 *in-vitro* 시험 모델을 구축하여 브라질린에 의한 건선 개선 효능 및 그에 대한 메커니즘을 관찰하고자 하였다. 따라서, 본 연구는 브라질린이 *in-vitro* 건선 유사 모델에서 면역 세포 유인에 기인하는 CCL20 발현과 피부 장벽 개선 여부를 조사하였고, 브라질린에 의한 CXCL8, CCL20 발현 억제가 유의성 있게 관찰되었다. 각질형성세포가 IL-17A에 의해 활성화되면 STAT3 신호 경로를 통해 염증성사이토카인, 케모카인 등 다양한 염증성 분자가 방출된다. 따라서 브라질린이 STAT3 신호 전달 경로에 미치는 영향을 관찰하기 위해 추가 실험을 진행하였고, 브라질린이 IL-17A 자극 HaCaT 세포에서 STAT3 단백질 인산화를 유의적으로 억제함을 규명하였다. 또한 브라질린은 TNF-α/IL-17A/IFN-γ 자극에서도 동일하게 염증성 사이토카인 IL-1α/β, TNF-α 및 IL-6의 유전자 발현을 농도 의존적 방식으로 감소시켰으며, CXCL8 및 CCL20과 같은 케모카인 발현 또한 강하게 억제하였다. 건선에서는 피부 장벽 기능이 손상되어 비정상적인 투과성을 보이며 수분 공급 능력이 저하된다. 따라서, 브라질린에 의한 피부 장벽 개선 효능을 확인하고자 하였다. 브라질린은 TNF-α/IL-17A/IFN-γ 자극으로 손상된 HaCaT 세포에서 세포 간 TEER 저항값을 증가시켰고, 이러한 연구 결과를 통해 브라질린이 항염증 활성뿐 아니라 피부 장벽 강화에도 유의한 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 결론적으로, 본 연구는 시험관 내 각질형성세포

에 대한 브라질린의 STAT3 인산화 억제 및 CCL20 발현 조절 기능과 건선 완화 효과 가능성을 제시한다. 따라서, 본 연구결과를 토대로 향후 건선 동물모델 및 인체 임상시험에서도 유의한 결과가 얻어진다면 새로운 건선 치료제로서의 유망한 후보 물질이 될 수 있을 것으로 기대된다.

초 록

건선(Psoriasis)은 IL-6, CXCL8, TNF- α 및 IFN- γ 뿐만 아니라 Th17 세포에서 분비되는 IL-17A 등 다양한 염증성 사이토카인에 의해 표피의 과증식(hyperkeratosis) 및 만성적 염증(inflammation)이 유발되는 난치성 피부 질환이다. 소목(*Caesalpinia sappan* L.)의 유효성분으로 알려진 브라질린(brazilin)은 항산화, 항염증 및 피부 장벽 개선 등의 효능이 알려졌다. 특히, tumor necrosis factor (TNF)- α 자극 HaCaT 각질형성세포 모델에서 브라질린의 건선 치료 소재 가능성을 보여주었다. 그러나, 직접적인 건선 유발 인자인 C-C motif chemokine ligand (CCL) 20의 조절은 전혀 보고되지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 건선 유사 모델을 활용해 CCL20 발현 조절 여부 및 그 기작에 대해 규명하고자 하였다. IL-17A로 자극된 HaCaT 세포에서 브라질린은 CCL20, CXCL8 발현 및 signal transducer and transcription (STAT)3 인산화를 유의하게 억제하였다. 또한, 브라질린은 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 3중 사이토카인으로 처리된 조건에서도 STAT3 인산화를 억제하며 염증성 분자(CXCL8, CCL20, IL-1, IL-6, 및 TNF- α)의 발현을 하향 조절하였다. 마지막으로 브라질린은 TNF- α /IL-17A/IFN- γ 로 자극된 건선 유사 환경에서 피부 장벽 개선에도 유의적인 영향을 미쳤다. 위 결과들을 통해 우리는 궁극적으로 브라질린이 STAT3 인산화 억제를 통해 CCL20 발현을 하향 조절하며, 건선 유발 사이토카인들의 발현 또한 억제함을 알 수 있었다. 향후, 건선 동물모델 및 임상시험을 통해 브라질린의 건선 개선에 대한 효능이 검증된다면, 건선 환자에게 잠재적인 치료 물질로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

Keywords 건선 · Brazilin · C-C motif chemokine ligand 20 · HaCaT cells · Interleukin 17A · Signal transducer and transcription3

References

- Sun S, Zhang X, Xu M, Zhang F, Tian, F, Cui, J, Xia Y, Liang C, Zhou Shujie, Wei H, Zhao Hui, Wu G, Xu Bohan, Liu X, Yang G, Wang Q, Zhang L, Gong Y, Shao C, Zou Y (2019) Berberine downregulates CDC6 and inhibits proliferation via targeting JAK-STAT3 signaling in keratinocytes. *Cell Death Dis* 10: 274
- Roberson EDO, Bowcock AM (2010) Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet* 26: 415–423. doi: 10.1016/j.tig.2010.06.006
- Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM (2005) Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 64: ii18–ii23. doi: 10.1136/ard.2004.033217
- Kimball AB, Gladman D, Gelfand JM, Gordon K, Horn EJ, Korman NJ, Korver G, Krueger GG, Strober BE, Lebwohl MG (2008) National Psoriasis Foundation clinical consensus on psoriasis comorbidities and recommendations for screening. *J Am Acad Dermatol* 58: 1031–1042. doi: 10.1016/j.jaad.2008.01.006

- Vlachos C, Gaitanis G, Katsanos KH, Christodoulou DK, Tsianos E, Bassukas ID (2016) Psoriasis and inflammatory bowel disease: links and risks. *Psoriasis (Auckl)* 6: 73–92. doi: 10.2147/PTT.S85194
- Oliveira MFSPD, Rocha BO, Duarte GV (2015) Psoriasis: classical and emerging comorbidities. *An Bras Dermatol* 90: 9–20. doi: 10.1590/abd1806–4841
- Rendon A, Schäkel K (2019) Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int J Mol Sci* 20: 1475. doi: 10.3390/ijms20061475
- Christophers E (2001) Psoriasis-epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 26: 314–320. doi: 10.1046/j.1365-2230.2001.00832.x
- Alzahrani KS, Nadeem A, Ahmad SF, Al-Harbi NO, Ibrahim KE, El-Sherbeeney AM, Alhoshani AR, Alshammari MA, Alotaibi MR, Al-Harbi MM (2019) Inhibition of spleen tyrosine kinase attenuates psoriasis-like inflammation in mice through blockade of dendritic cell-Th17 inflammation axis. *Biomed Pharmacother* 111: 347–358. doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.060
- Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG (2014) Immunology of psoriasis. *Ann Rev Immunol* 32: 227–255. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120225
- Pirowska M, Obtulowicz A, Lipko-Godlewska S, Goździalska A, Podolec K, Wojas-Pelc A (2018) The level of proinflammatory cytokines: interleukins 12, 23, 17 and tumor necrosis factor α in patients with metabolic syndrome accompanying severe psoriasis and psoriatic arthritis. *Postępy Dermatol Alergol* 35: 360–366. doi: 10.5114/ada.2018.77665
- Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L, Kragballe K (2009) Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 160: 319–324. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08902.x
- McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL (2019) The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity* 50: 892–906. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.021
- Brembilla NC, Senra L, Boehncke WH (2018) The IL-17 family of cytokines in psoriasis: IL-17A and beyond. *Front Immunol* 9: 1682. doi: 10.3389/fimmu.2018.01682
- Furie K, Ito T, Tsuji G, Nakahara T, Furue M (2020) The CCL20 and CCR6 axis in psoriasis. *Scand J Immunol* 91: e12846. doi: 10.1111/sji.12846
- Bartlett HS, Million RP (2014) Targeting the IL-17–T H 17 pathway. *Nat Rev Drug Discov* 14: 11–12
- Wu L, Chen X, Zhao J, Martin B, Zepp JA, Ko JS, Gu C, Cai G, Ouyang W, Sen G, Stark GR, Su B, Vines CM, Toumier C, Hamilton TA, Vidimos A, Gastman B, Liu C, Li X (2015) A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4-ERK5 axis. *J Exp Med* 212: 1571–1587. doi: 10.1084/jem.20150204
- Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Farinas M, Nograles KE, Tian S, Cardinale I, Chimenti 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. doi: 10.1038/jid.2010.340
- Blauvelt A, Chiricozzi A (2018) The immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis. *Clini Rev Allergy Immunol* 55: 379–390
- Calautti E, Avalle L, Poli V (2018) Psoriasis: a STAT3-centric view. *Int J Mol Sci* 19: 171. doi: 10.3390/ijms19010171
- Li Q, Laumonier Y, Syrovets T, Simmet T (2013) Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL20 secreted from plasmin-stimulated macrophages. *Acta Biochim Biophys Sin* 45: 593–600. doi: 10.1093/abbs/gmt049
- Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, Yamaguchi T, Nomura T, Ito H, Nakamura T, Sakaguchi N, Sakaguchi N (2007) Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* 204: 2803–2812. doi: 10.1084/jem.20071397

23. Liu Y, Lagowski JP, Gao S, Raymond JH, White CR, Kulesz-Martin MF (2010) Regulation of the psoriatic chemokine CCL20 by E3 ligases Trim32 and Piasy in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 130: 1384–1390. doi: 10.1038/jid.2009.416
24. Armstrong AW, Read C (2020) Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA* 23: 1945–1960. doi:10.1001/jama.2020.4006
25. Mare SD, Jong ED, Van de Kerkhof PCM (1990) DNA content and Ks8. 12 binding of the psoriatic lesion during treatment with the vitamin D3 analogue MC903 and betamethasone. *Br J Dermatol* 123: 291–295. doi: 10.1111/j.1365-2133.1990.tb06287.x
26. Ngamwonglumlert L, Devahastin S, Chiewchan N, Raghavan GV (2020) Color and molecular structure alterations of brazilein extracted from *Caesalpinia sappan* L. under different pH and heating conditions. *Sci Rep* 10: 1–10. doi: 10.1038/s41598-020-69189-3
27. Nirmal NP, Rajput MS, Prasad RG, Ahmad M (2015) Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and its pharmacological activities: A review. *Asian Pac J Trop Med* 8: 421–430. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.05.014
28. Choi DH, Hwang HS (2019) Anti-inflammation activity of brazilin in TNF- α induced human psoriasis dermatitis skin model. *Appl Biol Chem* 62: 46. doi: 10.1186/s13765-019-0455-z
29. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P (2005) Serum levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm* 2005: 273–279. doi: 10.1155/MI.2005.273
30. Sano S (2015) Psoriasis as a barrier disease. *Dermatologica Sinica* 33: 64–69. doi: 10.1016/j.dsi.2015.04.010
31. Roberson ED, Bowcock AM (2010) Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet* 26: 415–423. doi: 10.1016/j.tig.2010.06.006
32. Toussiot É (2012) The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic inflammatory diseases. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 11: 159–168. doi: 10.2174/187152812800392805
33. Hawkes JE, Yan BY, Chan TC, Krueger JG (2018) Discovery of the IL-23/IL-17 signaling pathway and the treatment of psoriasis. *J Immunol* 201: 1605–1613. doi: 10.4049/jimmunol.1800013
34. Xie J, Huang S, Huang H, Deng X, Yue P, Lin J, Yang M, Han L, Zhang DK (2021) Advances in the application of natural products and the novel drug delivery systems for psoriasis. *Front Pharmacol* 12: 644952. doi: 10.3389/fphar.2021.644952
35. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G (2016) The traditional medicine and modern medicine form natural products. *Molecules* 21: 559. doi: 10.3390/molecules21050559
36. Shim JH (2019) Anti-inflammatory effect of brazilin in RAW264. 7 cells. *Asian J Beauty Cosmetol* 17: 107–115. doi: 10.20402/ajbc.2019.0270