

TNF- α /IFN- γ 유도된 각질형성세포 염증에서 가자 추출물의 케모카인 저해 효과

조일주*

원광대학교 한의과대학 뇌졸중한의중점연구센터

Inhibitory activity of *Terminalia chebula* extract against TNF- α /IFN- γ -induced chemokine increase on human keratinocyte, HaCaT cells

Il-Joo Jo*

Central Stroke Center of Korean medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : *Terminalia chebula* (TC) has been used as a traditional remedy to treat gastrointestinal infectious and inflammatory diseases. However, its protective effects and mechanisms against skin inflammation have not been well-elucidated. Thus, the aim of this study is to evaluate the protective effects of the TC water extract and also to suggest a putative mechanism of TC against skin injury on human keratinocytes, HaCaT cells.

Methods : HaCaT cells were pre-treated with TC for 1 h and then stimulated with tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) (10 ng/mL each) to induce skin inflammation and injury. After 24 h, the cells were harvested to evaluate the expression of Th2 chemokines, such as C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5, also known as RANTES), C-C chemokine ligand 17 (CCL17, also known as TARC) and C-C chemokine ligand 22 (CCL22, also known as MDC). To investigate the regulatory mechanisms of TC, we also assessed the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) signaling pathways in HaCaT cells.

Results : Treatment of TC decreased the mRNA levels of RANTES, TARC and MDC with a concentration dependent manner against co-stimulation of TNF- α and IFN- γ . In addition, TC significantly reduced TNF- α and IFN- γ induced phosphorylation of STAT1.

Conclusions : In summary, we propose that TC may be a promising candidate for anti-inflammatory skin protector through the inhibition of chemokines via STAT1 deactivation.

Key words : *Terminalia chebula*, Skin inflammation, Keratinocyte, HaCaT cells, Chemokine

I. 서 론

피부는 외부환경으로부터 보호 장벽 역할을 수행하며 물리·화학적 자극으로부터 체내를 보호한다. 가장 바깥층인 표피는 외부환경에 직접 노출되어있으며, 특히 각질층은 표피세포의 형성과 분화 및 탈각 과정을 반복함으로써 항상성을 유지한다¹⁾.

표피를 구성하는 각질형성세포는 수많은 항원에 접촉하며, 스트레스 환경에 노출되면 다양한 사이토카인(cytokine)과 케모카인(chemokine) 등 염증 매개 인자를 생성하여 염증 및 면역 반응에 관여한다. 지속적인 피부 손상으로 사이토카인 및 케모카인이 만성적으로 생성되면 피부 염증과 건조를 유발시켜 피부염, 건선, 아토피 피부염 등의 만성 염증성 피부질환이 유도

*Corresponding and first author : Il-Joo Jo, Central Stroke Center of Korean medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksandaero 460, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6447

· E-mail : joiljoo@naver.com

· Received : 21 May 2022

· Revised : 23 May 2022

· Accepted : 25 May 2022

된다²⁾. 케모카인은 염증 또는 감염 부위로 면역 세포의 침투에 관여 한다^{3,4)}. 피부의 염증은 Th2 케모카인 생성과 밀접하게 관련되어 있다⁵⁾. 전염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interferon-gamma (IFN- γ)로 자극된 피부각질형성세포는 thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17)과 macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22), regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5) 및 interleukin-8 (IL-8)를 포함한 케모카인을 생성한다⁶⁻⁸⁾. 각질형성세포에서 생성된 이러한 케모카인은 C-C chemokine receptor type 4⁺ (CCR4⁺) Th2 세포에 결합 후 염증 조직으로 이동 및 침윤에 관여한다⁸⁾.

Signal transducer and activator of transcription (STAT)은 Janus kinase(JAK)에 의해 활성화되는 전사 인자 단백질이며 성장, 생존, 증식 및 분화를 비롯한 다양한 세포 과정에 관여한다. STAT 패밀리 단백질 중 STAT1은 1차 염증 반응의 조절에 중요한 역할을 한다^{9,10)}. 피부각질형성세포에서 STAT1은 TNF- α 및 IFN- γ 자극 면역 반응의 중추 조절자이며¹¹⁻¹⁴⁾, TARC, MDC 및 RANTES를 포함한 케모카인 생성을 자극한다^{15,16)}. 따라서 STAT1은 아토피 피부염을 비롯한 피부의 염증성 질환 연구에 중요한 분자로 간주된다.

가자(訶子, *Terminalia chebula* Retzins, TC)는 사군자과(Cambretaceae)에 속하는 성숙한 과실을 건조한 것을 사용한다. 가자는 新修本草에 처음 收載되었으며, 임상에서는 降火利咽, 斂肺, 澀腸의 효능이 있어 久瀉, 脫肛, 便血, 崩漏, 帶下, 遺精, 尿頻數, 久咳失音의 증상을 치료하는데 사용된다¹⁷⁾. 가자의 성분으로는 chebulic acid, chebulagic acid, gallic acid, tannin 등이 함유되어 있으며¹⁸⁾, 항균 효과¹⁹⁾, 항암 효과²⁰⁾, 항염 및 항산화 효과²¹⁾, 항당뇨 효과²²⁾가 보고되어 있으나, 피부 염증 보호효과에 대한 보고는 되어 있지 않다.

기존의 연구에서 가자의 항균¹⁹⁾, 항산화효과²¹⁾를 빗대어 보면 피부 염증 보호에도 가자는 우수한 효과가 있을 것으로 판단되어, 이에 본 연구에서는 피부각질형성세포인 HaCaT 세포에서 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 피부 손상 및 염증 환경에서 가자를 처리하였을 때 RANTES, TARC, MDC 등 케모카인의 활성 억제 효과 및 그 기전을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료 추출

본 연구에 사용한 가자 추출물은 광명당 제약(울산, 대한민국)에서 구입하여 정선 후 사용하였다. 가자 추출물은 가자 100 g에 증류수 1 L를 이용하여 100℃에서 150분 동안 열수 추출한 후 -80℃에서 하루동안 동결하였으며, 동결된 가자 추출물을 동결 건조기(IIShinBioBase, Dongducheon, Korea)를 이용하여 -50℃에서 4mTorr 압력으로 7일 동안 동결 건조하였다. 동결 건조된 가자 추출물 파우더는 3차 증류수에 녹이고, 0.22 μ m filter를 이용하여 여과하여 사용하였다. 동결 건조

후 수득한 분말은 18.69 g으로 수율은 18.69%였다.

2) 시약

본 연구에 사용된 RPMI 1640 medium, Fetal bovine serum (FBS), Penicillin Streptomycin, Tryple Express는 GibcoBRL (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO), Iso-propanol, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다. easy-BLUE 용액은 iNtRON Biotechnology (Daejeon, South Korea)에서 구입하였으며, ReverTra Ace qPCR RT Kit는 Toyobo (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Power SYBR Green Master Mix, MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate는 Applied Biosystems (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 20X PBS buffer, 1.5M Tris Buffer (pH 8.8), 0.5M Tris Buffer (pH 6.8), 10% SDS Solution, Tween 20, Xpert Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X), Protease Inhibitor Cocktail Solution (100X) 및 Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 용액은 GenDEPOT (TX, USA)에서 구입하여 사용하였다. Power Blotter 1-Step Transfer Buffer (5X)는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였으며, Western Blotting Filter Paper는 Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Amersham Hybond PVDF blotting membrane은 Amersham (Buckinghamshire, UK)에서 구입하였다. Human TNF- α (hTNF- α), hIFN- γ recombinant는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였으며, pSTAT1 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, STAT1, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)의 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 배양

인체 유래 피부각질형성세포인 HaCaT (Human Adult low Calcium High Temperature) 세포주를 RPMI 1640 medium에 10% FBS와 1% Penicillin 첨가 후 37℃, 5% CO₂의 조건에서 배양하였으며, 계대배양은 2~3일 간격으로 유지하였다.

2) 세포 독성 평가

HaCaT 세포에서 가자의 세포독성평가를 위하여 MTT 분석 방법을 이용하였다. HaCaT 세포를 24 well plate에 1×10⁵ cells/mL로 분주하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 안정화 하였으며, 그 후 각 well에 가자 추출물을 0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20 및 50 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 배양 후 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 가한 뒤 5% CO₂ 조건에서 37℃로 30분간 배양하였다. 그 후, 상등액을 제거하였으며, DMSO 200 μ L를 넣어 formazan 결정체를 용해시켜 96 well plate에 90 μ L/well씩 분주하여 Spectrometer (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) Total RNA 추출 및 mRNA 발현 측정

HaCaT 세포를 6 well plate에 5×10^5 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 안정화 하였다. 그 후, 가자 추출물을 1, 2 및 5 mg/mL 농도로 1시간 동안 전 처리 하였다. 그 후, TNF- α (10 ng/mL) 및 IFN- γ (10 ng/mL)를 처리하여 세포를 24시간 동안 자극하였다. Cold PBS로 2회 세척하여 세포만 남긴 후, 각 well당 1 mL의 Easy-BLUE 용액을 넣어 세포막을 용해시킨 후 Total RNA를 추출하였다.

1 μ g의 RNA를 Rever Tra Ace qPCR RT Kit를 사용하여 cDNA를 합성하였으며, SYBR Green Master Mix와 StepOne™ RealTime PCR system (Applied Biosystem)을 사용하여 Realtime reverse transcription-polymerase chain reaction (realtime RT-PCR)을 수행하였고, Housekeeping 유전자(GAPDH)를 이용하여 RNA 양을 보정 하였다. 표적 유전자는 특이적인 Primer를 주문제작하여 사용 하였다 (Table 1.)

Table 1. Sequences of realtime RT-PCR primers.

Genes	Direction	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
RANTES/CCL5	Forward	GAG TAT TTC TAC ACC AGT GGC AAG	63°C
	Reverse	TCC CGA ACC CAT TTC TTC TCT	
GAPDH	Forward	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G	63°C
	Reverse	TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT	
TARC/CCL17	Forward	ACT GCA CTC CTG GTT GTC CT	60°C
	Reverse	AAG GTT AGC AAC ACC ACG CC	
MDC/CCL22	Forward	CAG CAC GAG GGA CCA ATG TG	60°C
	Reverse	CTT GGG GTC CGA ACA GAT GG	
18S	Forward	AAC CCG TTG AAC CCC ATT	60°C
	Reverse	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG	

4) Protein 추출 및 Western blot 분석

HaCaT 세포를 6 cm dish에 25×10^5 cells/mL로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3시간 동안 안정화 하였다. 그 후, 가자 추출물을 1, 2 및 5 mg/mL 농도로 1시간 전처리하고 TNF- α (10 ng/mL) 및 IFN- γ (10 ng/mL)로 세포를 15분 동안 자극하였다. 그리고, Cold PBS로 2회 세척하여 세포만 남긴 후, RIPA lysis buffe (1X RIPA buffer + Protease inhibitor, Phosphatase inhibitor)를 넣은 뒤 세포를 harvest 하였다. 세포 단백질을 추출을 위하여 4°C에서 2시간 동안 Lysis 후, 원심분리하여 상층액을 이용하여 Bradford법으로 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질에 Sample buffer를 넣은 뒤 98°C Heating block에서 5분간 끓인 다음 샘플을 보관하였다. 단백질을 8% SDS PAGE에 전기 영동한 후 Membrane으로 옮겨 5% Skim milk가 함유된 PBST (PBS-Tween 20) 용액으로 상온에서 2시간 동안 Blocking 하였다. phospho-STAT1 및 STAT1 분석을 위하여 1, 2차 항체를 반응시켰다. 그리고 ECL detection 용액의 반응을 이용하여 Chemidoc (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 기기로 단백질 발현 정도를 확인하였다.

5) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 실시하였으며, SPSS 22.0 프로그램을 사용하여 평균값과 표준편차 (Mean \pm Standard deviation (S.D.))를 계산하였고, one-way ANOVA 분석을 실시하여 $p < 0.05$ 에서 유의성이 있는 것으로 검증하였다.

III. 결 과

1. 가자의 HaCaT 세포에 대한 세포독성

HaCaT 세포에서 가자의 세포독성 평가를 위하여 MTT 분석법을 수행한 결과는 다음과 같다. 가자 추출물을 0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20 및 50 mg/mL의 농도로 처리하여 24 시간 동안 배양 후, 세포 생존율을 관찰하였다. 가자 추출물의 세포독성 평가 결과 10, 20, 50 mg/mL에서 유의성 있는 세포 독성이 관찰되었으며($p < 0.05$), 0.05, 0.1, 1, 2 및 5 mg/mL 농도에서는 유의성 있는 세포 독성이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 따라서 이후 실험은 독성이 없는 상기 농도 범위에서 수행하였다.

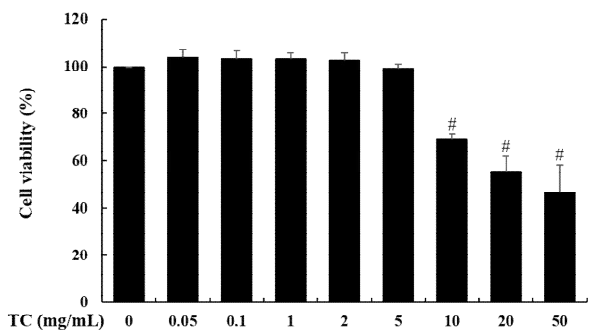


Fig. 1. Cytotoxic effects of *Terminalia chebula* (TC) in HaCaT cells. The cell viability was measured by MTT assay. HaCaT cells were incubated with or without TC as indicated doses (0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20 or 50 mg/mL) for 24 h. # $p < 0.05$ versus normal. The values are means \pm S.D. of three independent experiments.

2. 가자의 RANTES 생성에 미치는 영향

HaCaT 세포의 mRNA 수준에서 RANTES 생성에 대한 분석 결과는 다음과 같다. 정상군과 비교하여 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 대조군에서 유의성 있는 RANTES 생성이 증가하였다 ($p < 0.05$). 반면에 대조군과 비교하여 가자 추출물 1, 2 및 5 mg/mL 처리 시 가자 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2).

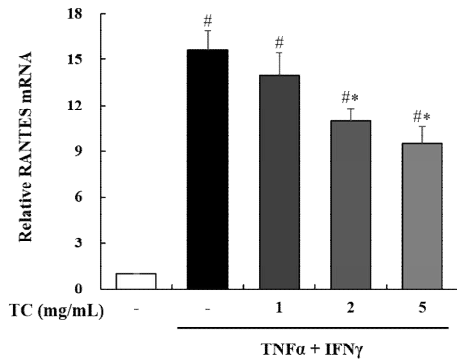


Fig. 2. Effects of TC on mRNA expression of RANTES chemokine in HaCaT cells.

HaCaT cells were pre-treated with TC (1, 2 or 5 mg/mL) for 1 h and incubation with TNF- α and IFN- γ (10 ng/mL) for 24 h. The mRNA levels of RANTES were measured by realtime RT-PCR. # $p < 0.05$ versus normal, * $p < 0.05$ versus TNF- α + IFN- γ alone. The values are means \pm S.D. of three independent experiments.

3. 가자의 TARC 및 MDC 생성에 미치는 영향

HaCaT 세포의 mRNA 수준에서 TARC 및 MDC 생성에 대한 분석 결과는 다음과 같다. 정상군과 비교하여 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 대조군에서 유의성 있는 TARC 생성이 증가하였다 ($p < 0.05$). 반면에 대조군과 비교하여 가자 추출물 1, 2 및 5 mg/mL 처리 시 가자 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$). 또한, 정상군과 비교하여 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 대조군에서 유의성 있는 MDC 생성이 증가하였으며 ($p < 0.05$), 대조군과 비교하여 가자 추출물 1, 2 및 5 mg/mL 처리 시 가자 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 3).

4. 가자의 STAT1 활성화에 미치는 영향

HaCaT 세포의 단백질 수준에서 STAT1 신호 전달 기전의 인산화(Phosphorylation)에 대한 분석 결과는 다음과 같다. 정상군과 비교하여 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 대조군에서 Phospho-STAT1 신호 전달 기전이 증가하였다, 반면에 대조군과 비교하여 가자 추출물 1, 2 및 5 mg/mL 처리 시 가자 농도 의존적으로 Phospho-STAT1이 감소하였다 (Fig. 4).

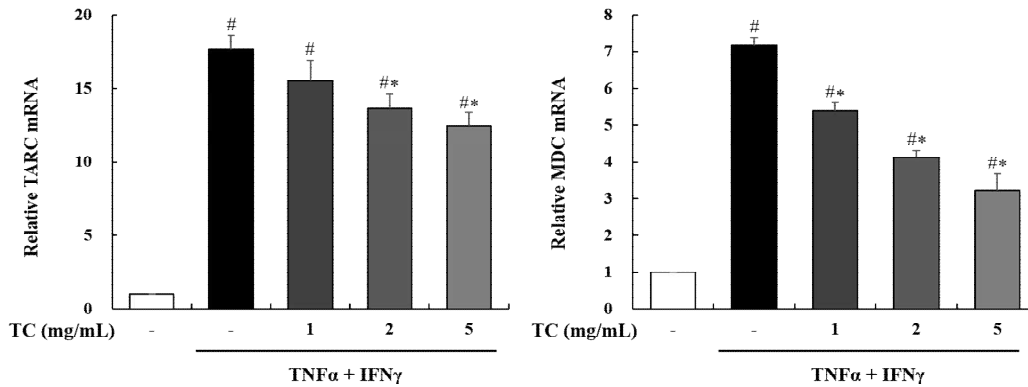


Fig. 3. Effects of TC on mRNA expression of TARC and MDC chemokines in HaCaT cells.

HaCaT cells were pre-treated with TC (1, 2 or 5 mg/mL) for 1 h and incubation with TNF- α and IFN- γ (10 ng/mL) for 24 h. The mRNA levels of TARC and MDC were measured by realtime RT-PCR. # $p < 0.05$ versus normal, * $p < 0.05$ versus TNF- α + IFN- γ alone. The values are means \pm S.D. of three independent experiments.

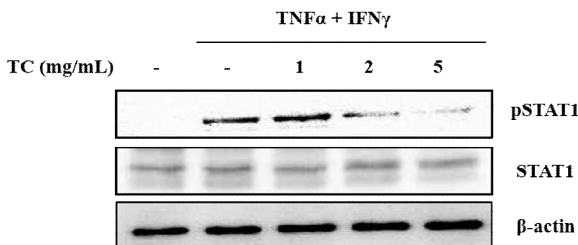


Fig. 4. Effects of TC on TNF- α and IFN- γ induced STAT1 phosphorylation in HaCaT cells.

HaCaT cells were pre-treated with TC (1, 2 or 5 mg/mL) for 1 h and incubation with TNF- α and IFN- γ (10 ng/mL) for 15 min. Phosphorylated and total expression of STAT1 and β -actin were detected by Western blot analysis using specific antibodies. The similar results were obtained from three additional experiments.

IV. 고찰

가자는 한의학에서 收斂, 장출혈, 치루 출혈, 지혈, 만성 후두염, 후두결핵, 만성자궁염, 대하, 이질 등의 치료에 다양하게 쓰이고 있다¹⁷⁾. 가자는 또한 tannin이 많아서 수렴, 지사작용이 있으며, 녹농균, 디프테리아균, 황색 포도상구균, 용혈성 연쇄상구균에 억제작용을 일으킨다고 보고되어 있다^{23,24)}. 또한, 가자 과실의 메탄올 추출물은 인간(MCF-7) 및 마우스(S115) 유방암 세포주, 인간 골육종 세포주(HOS-1)를 포함한 여러 악성 암세포주의 성장 억제 활성 효과가 보고되었으며²⁵⁾, 가자를 포함한 약용식물 추출물에서 항산화 효과 및 당뇨병 마우스 모델의 혈당 수치의 감소 효과가 보고되었다²⁶⁾. 이 외에도

헬리코박터 파일로리균에 대한 항균 활성 효과²⁷⁾와 항충제로서 증치 예방효과²⁸⁾ 등 다양한 생리활성 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있지만, TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 피부 염증 억제 효과에 대한 연구는 보고되어 있지 않았다. 이에 본 연구에서는 사람 피부각질형성세포인 HaCaT 세포의 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 피부 염증 반응에서 가자 추출물의 STAT1 신호전달 경로를 통한 케모카인 억제 효과에 대한 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 먼저 가자 추출물의 세포독성이 없는 유효 농도를 설정한 후 실험을 진행하였으며, TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 피부 염증 반응에서 Th2 케모카인의 생성 억제효과를 확인하였다. 피부 면역 반응은 병원성 미생물에 대한 숙주 방어에 매우 중요하며 피부 면역계의 붕괴는 염증성 피부 질환을 유도할 수 있다²⁹⁾. 피부 염증과 관련된 여러 세포 유형 중에서 각질형성세포는 면역학적 반응의 주요 유도인자 및 표적으로서 작용하며³⁰⁾, 각질형성세포는 염증 유발 인자 중 특히 케모카인을 생성하여 피부 염증을 유도한다³¹⁾. 케모카인 RANTES, TARC 및 MDC는 아토피 피부염을 포함한 피부 염증 유도에 작용하는 것으로 많은 연구를 통하여 보고되어 있다⁵⁻⁸⁾. 이전 보고서의 결과와 일관되게 본 연구 결과는 TNF- α 및 IFN- γ 에 의한 자극이 HaCaT 세포에서 RANTES, TARC 및 MDC의 생성을 현저하게 증가시키는 것으로 나타났다³²⁾. 반면에, 가자 추출물의 처리는 TNF- α 및 IFN- γ 처리 대조군과 비교하여 이들 케모카인의 생성을 모두 유의미하게 감소시켰다 (Fig. 2, 3).

RANTES는 피부 염증 반응 중 생성되는 케모카인으로 내피 세포 표면에 호산구 및 T 림프구의 이동과 접착 유도에 관여하여 염증을 유발하며, 피부 염증 환자에서 증가되어 나타나 피부 염증 관련 연구에 중요한 표적 분자로 인식되고 있다^{33,34)}. 따라서 HaCaT 세포에서 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 반응에서 RANTES의 생성에 대한 가자 추출물의 효과를 확인한 결과 대조군에 비하여 가자 추출물 처리군에서 RANTES의 생성이 억제됨을 확인할 수 있었다. 피부 염증 반응시 RANTES의 생성 억제는 염증성 세포들의 침윤으로부터 피부를 보호하고, 염증반응으로 인한 손상을 억제할 수 있다. 이러한 결과는 가자 추출물이 피부 염증 관련 케모카인인 RANTES의 억제를 통하여 피부 염증 반응 유도에 관여하는 T 림프구와 염증성 세포의 이동과 침윤 억제에도 관여하여 각질형성세포를 보호할 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 피부 염증이 발현하는 대표적인 Th2 chemokine인 TARC 및 MDC는 CCR4를 경유하여 염증 부위로 Th2 림프구의 이동과 침윤을 유도하여 염증 반응을 촉진하는 역할을 하며³⁵⁾, 염증성 피부 질환 환자의 혈청에서 TARC와 MDC의 발현이 증가되어 있는 것으로 보고되어 있다^{36,37)}. HaCaT 세포에서 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 반응에서 TARC 및 MDC의 생성에 대한 가자 추출물의 효과를 확인한 결과 대조군에 비하여 가자 추출물 처리군에서 TARC 및 MDC의 생성이 억제됨을 확인할 수 있었다. 많은 연구에서 TARC와 MDC가 피부 염증 병인에 주요한 역할을 하고 있으며, HaCaT 세포에서 TARC와 MDC의 생산 감소는 피부 염증 치료의 효과적인 표적이 될 수 있다고 보고하였다^{38,39)}. 이러한 결과는 가자 추출물이 피부 염증 관련 케모카인인 TARC 및 MDC의 억제를 통

하여 Th2 림프구의 이동과 침윤을 제한하여 피부 각질형성세포를 보호할 수 있을 것으로 판단된다.

STAT1 신호 전달 기전은 TNF- α 및 IFN- γ 와 같은 다양한 염증 자극에 활성화되는 중요한 전사 인자이다. JAK/STAT 신호 전달 기전의 활성화는 TNF- α 및 IFN- γ 로 매개된 HaCaT 세포에서 케모카인 및 사이토카인의 생성을 유도한다고 보고되어 있다⁴⁰⁾. 또한, RANTES와 MDC의 촉진 유전자는 STAT 및 NF- κ B 결합 부위를 포함하기 때문에, 케모카인의 생성은 STAT 및 NF- κ B 경로의 활성화를 통하여 조절될 수 있다⁴¹⁾. 따라서 HaCaT 세포에 TNF- α 및 IFN- γ 자극으로 유도된 STAT1 신호 전달 기전의 인산화에 가자 추출물의 영향을 확인한 결과, pSTAT1의 발현이 대조군에 비하여 가자 추출물에서 감소됨을 확인할 수 있었다. 이러한 실험결과는 TNF- α 및 IFN- γ 자극에 의한 가자 추출물의 케모카인 생성 억제가 STAT1 신호 전달 기전의 인산화를 억제함으로써 매개되는 것으로 판단된다.

본 연구의 실험 결과, 가자 추출물은 HaCaT 세포에서 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도한 피부 염증 반응에서 케모카인인 RANTES, TARC 및 MDC의 생성을 유의하게 억제함으로써 피부 각질형성세포를 보호할 수 있었으며 이러한 효과는 STAT1 신호 전달 경로의 활성화 억제를 통하여 나타나는 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 반응에서 가자의 케모카인의 생성 억제 효과와 그 기전에 대하여 확인하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가자 추출물은 HaCaT 세포에서 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 관련 케모카인인 RANTES를 유의하게 억제하였다.
2. 가자 추출물은 HaCaT 세포에서 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 관련 케모카인인 TARC 및 MDC를 유의하게 억제하였다.
3. 가자 추출물은 HaCaT 세포에서 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 pSTAT1 신호 전달 기전을 유의하게 억제하였다.

종합적으로 가자 추출물이 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 반응의 케모카인 생성 억제 효과는 STAT1 신호 전달 기전의 인산화 억제를 통하여 나타난 것으로 사료되며, 가자는 피부 염증 완화 효과를 가지는 천연물 원료로서, 항염증 소재로서 활용이 가능할 것으로 예상된다.

References

- Benedetto AD, Kubo A, Beck LA. Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *J Invest Dermatol*. 2012;132:949–963.
- Hudson TJ. Skin barrier function and allergic risk. *Nat Genet*. 2006;38(4):399–400.
- Mélik-Parsadaniantz S, Rostène W. Chemokines and neuromodulation. *J Neuroimmunol*. 2008;198(1–2):62–68.
- Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Li JH, Jin D, Teng YC, Kim SK, Lee KJ. Fluvastatin inhibits expression of the chemokine MDC/CCL22 induced by interferon- γ in HaCaT cells, a human keratinocyte cell line. *Br J Pharmacol*. 2009;157:1441–1450.
- Pivarsci A, Homey B. Chemokine networks in atopic dermatitis: traffic signals of disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005;5(4):284–290.
- Barker JN, Sarma V, Mitra RS, Dixit VM, Nickoloff BJ. Marked synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors. *J Clin Invest*. 1990;85(2):605–608.
- Amarbayasgalan T, Takahashi H, Dekio I, Morita E. Interleukin-8 content in the stratum corneum as an indicator of the severity of inflammation in the lesions of atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2013;16(10):63–74.
- Saeki H, Tamaki K. Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci*. 2006;43(2):75–84.
- Najjar I, Fagard R. STAT1 and pathogens, not a friendly relationship. *Biochimie*. 2010;92(5):425–444.
- Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*. 1999;17(3):138–146.
- Ju SM, Song HY, Lee SJ, Seo WY, Sin DH, Goh AR, Kang YH, Kang IJ, Won MH, Yi JS, Kwon DJ, Bae YS, Choi SY, Park JS. Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose via blockade of NF- κ B and STAT1 activation in the HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(1):115–120.
- Kwon DJ, Bae YS, Ju SM, Goh AR, Youn GS, Choi SY, Park J. Casuarinin suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production via blockade of NF- κ B and STAT1 activation in HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(4):1254–1259.
- Sung YY, Kim HK. *Illicium verum* extract suppresses IFN- γ induced ICAM-1 expression via blockade of JAK/STAT pathway in HaCaT human keratinocytes. *J Ethnopharmacol*. 2013;149(3):626–632.
- Kang GJ, Dang HT, Han SC, Kang NJ, Koo DH, Koh YS, Hyun JW, Kang HK, Jung JH, Yoo ES. Methyl 5-chloro-4,5-didehydrojasmonate (J7) inhibits macrophage-derived chemokine production via down-regulation of the signal transducers and activators of transcription 1 pathway in HaCaT human keratinocytes. *Chem Pharm Bull*. 2013;61(10):1002–1008.
- Han EH, Hwang YP, Choi JH, Yang JH, Seo JK, Chung YC, Jeong HG. *Psidium guajava* extract inhibits thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production in human keratinocytes by inducing heme oxygenase-1 and blocking NF- κ B and STAT1 activation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2011;32(2):136–145.
- Hongqin T, Xinyu L, Heng G, Lanfang X, Yongfang W, Shasha S. Triptolide inhibits IFN- γ signaling via the Jak/STAT pathway in HaCaT keratinocytes. *Phytotherapy Research*. 2011;25(11):1678–1685.
- Kim IR KH, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY. Boncho-Hak. Seoul : Young-Lim Press. 2007 : 671–2.
- Park JO. Effects of methanol extract from *Terminalia chebula* on renal and pulmonary toxicities induced by paraquat in rats. *J Life Sci* 2008;8:129–135.
- Lee KS, Kim SH, Sim KC, Park CS, Shin YS. Antimicrobial activity of *Terminalia chebula* Retz. extract of against intestinal pathogens. *Korean J Food & Nutr* 1997;10: 559–563.
- Achhari C, Reddy GV, Reddy TC, Reddanna P. Chebulagic acid synergizes the cytotoxicity of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma through COX-2 dependant modulation of MDR-1. *Med Chem*. 2011;7:432–442.
- Bag A, Kumar Bhattacharyya S, Kumar Pal N, Ranjan Chattopadhyay R. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. *Pharm Biol*. 2013;51(12):1515–1520.
- Silawat N, Gupta VB. Chebulic acid attenuates ischemia reperfusion induced biochemical alteration in diabetic rats. *Pharm Biol*. 2013;51:23–29.
- Kesharwani A, Polachira SK, Nair R, Agarwal A, Mishra NN, Gupta SK. Anti-HSV-2 activity of *Terminalia chebula* Retz extract and its constituents,

- chebulagic and chebulinic acids. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):110.
24. Patil VS, Harish DR, Vetrivel U, Roy S, Deshpande SH, Hegde HV. Hepatitis C Virus NS3/4A Inhibition and Host Immunomodulation by Tannins from *Terminalia chebula*: A Structural Perspective. *Molecules*. 2022;27(3):1076.
 25. Saleem A, Husheem M, Harkonen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. *J Ethnopharmacol*. 2002;81:327–336.
 26. Sabu MC, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol*. 2002;81:155–160.
 27. Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M, Colwell RR. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Ag*. 2001;18:85–88.
 28. Jagtap AG, Karkera SG. Potential aqueous extract of *Terminalia Chebula* as an anticaries agent. *J Ethnopharmacol*. 1999;68:299–306.
 29. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:289–301.
 30. Abramovits W. Atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:86–93.
 31. Pastore S, Mascia F, Girolomoni G. The contribution of keratinocytes to the pathogenesis of atopic dermatitis. *Eur J Dermatol*. 2006;16:125–131.
 32. Jo IJ, Choi MO. Protective Effects of Kyungohkgo on Atopic Dermatitis in HaCaT Cells. *J Kor Soc Cosmetol*. 2020;27(5):1286–1292.
 33. Wüthrich B. Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;90:3–10.
 34. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(1):129–135.
 35. Jahnz-Rozyk K, Targowski T, Paluchowska E, Owczarek W, Kucharczyk A. Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. *Allergy*. 2005;60(5):685–688.
 36. Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*. 1999;400(6746):776–780.
 37. Song TW, Sohn MH, Kim ES, Kim KW, Kim KE. Increased serum thymus and activation-regulated chemokine and cutaneous T cell-attracting chemokine levels in children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(3):346–351.
 38. Nakazato J, Kishida M, Kuroiwa R, Fujiwara J, Shimoda M, Shinomiya N. Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19(7):605–613.
 39. Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Li JH, Song SB, Jin D, Huang XZ, Teng YC, Lee KJ. The adenylyl cyclase-cAMP system suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production through p38 MAPK and NF- κ B in HaCaT keratinocytes. *Mol Immunol*. 2009;46(10):1925–1934.
 40. Kim WH, An HJ, Kim JY, Gwon MG, Gu H, Lee SJ, Park JY, Park KD, Han SM, Kim MK, Park KK. Apamin inhibits TNF- α -and IFN- γ -induced inflammatory cytokines and chemokines via suppressions of NF- κ B signaling pathway and STAT in human keratinocytes. *Pharmacol Rep*. 2017;69(5):1030–1035.
 41. Kovacic JC, Gupta R, Lee AC, Ma M, Fang F, Tolbert CN, Walts AD, Beltran LE, San H, Chen G, St Hilaire C, Boehm M. Stat3-dependent acute Rantes production in vascular smooth muscle cells modulates inflammation following arterial injury in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(1):303–314.