

## 인간섬유아세포 Hs68에서 esculetin이 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 발현에 미치는 효과

전보희 · 김용민\*

세명대학교 화장품과학과

### Effects of Esculetin on TNF- $\alpha$ Induced MMP-1 Expression in Human Fibroblasts Hs68

Bo Hee Jeon and Yong Min Kim\*

Department of Cosmetic Science, Semyung University, Chungbuk 27136, Korea

**Abstract** – The skin is an important barrier that protects the body from harmful environments such as UV rays. When the skin is repeatedly stimulated, such as UV rays, ROS and pro-inflammatory cytokines are overproduced. As a result, the proteins and nucleic acids that make up the skin are damaged, and aging occurs. Esculetin is known to have anti-inflammatory, antioxidant and UV-induced MMP-1 inhibitory effects. However, the inhibitory effect of MMP-1 on TNF- $\alpha$ -induced fibroblasts is not known. Therefore, in this study, the MMP-1 inhibitory effect of esculetin was confirmed in TNF- $\alpha$ -induced fibroblasts. As a result of confirming the cytotoxicity of esculetin in Hs68 cells by MTT assay, there was no significant toxicity up to 200  $\mu$ M. As a result of real-time PCR and ELISA, it was confirmed that esculetin inhibited the expression of MMP-1. Esculetin did not inhibit MAPK (ERK, JNK, p38) phosphorylation, but inhibited phosphorylation of the mTOR-p70S6k signaling pathway. In addition, it was confirmed that the phosphorylation of the transcription factor NF- $\kappa$ B was inhibited. These results suggest that esculetin has potential as an anti-aging material.

**Keywords** – Esculetin, MMP-1, MAPK, mTOR-p70S6K, NF- $\kappa$ B

노화는 시간의 흐름에 따른 내인성 노화와 자외선, 영양 부족, 환경 오염 등의 요인으로 발생하는 외인성 노화로 나뉜다. 외인성 노화의 요인 중 가장 많은 비중을 차지하는 것은 자외선으로 노화에서 가장 중요하게 다뤄진다. 내인성 노화에 비해 자외선으로 인한 노화는 더 깊고 깊은 주름이 발생하며 잔주름도 많이 발견된다. 피부 노화는 피부의 다양한 층에 영향을 미치는데 주요 변화는 진피의 ECM에서 관찰된다. 진피는 세포의 기질(extracellular matrix, ECM)로 구성되고 ECM은 콜라겐이 주성분이며 섬유아세포에 의해 합성되고 유지된다. 콜라겐의 합성이 감소하거나 콜라겐이 효소에 의해 분해되었을 경우 주름을 유발한다. 콜라겐을 비롯한 ECM 단백질을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현은 자외선에 의해 증가된다. MMPs는 기질 특이성에 따라 collagenase, gelatinase,

stromelysin 등으로 분류되며 상처치유, 염증, 혈관 신생 및 암을 비롯한 여러 생리학적 상황에서의 단백질 분해에 관여한다. 25종의 MMPs 중 세포 사이의 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1은 ECM의 주요 구성 성분인 type I 콜라겐을 분해하여 주름을 유발해 노화를 촉진한다.<sup>1-5)</sup>

표피는 자외선에 노출되는 가장 바깥쪽의 층으로, 자외선에 의한 자극은 reactive oxygen species(ROS)와 TNF- $\alpha$ , IL-1 등의 전염증성 사이토카인의 생성을 유도한다. 이는 표피의 아래쪽에 위치한 섬유아세포를 자극하게 되고, 자외선으로 유도된 사이토카인 수용체는 사이토카인을 통해 MAPK를 활성화시킨다. 활성화된 MAPK는 activator protein-1(AP-1), nuclear factor kappa B(NF- $\kappa$ B) 같은 전사인자들을 활성화시켜 MMP-1의 생성을 증가시킨다. 이는 콜라겐의 감소로 이어져 노화가 진행된다.<sup>6-8)</sup> 이로 인해 자외선 또는 염증성 사이토카인으로 유도된 MMP-1 발현 억제는 항노화의 중요한 부분일 수 있다.

Esculetin은 6,7-dihydroxycoumarin이라고 불리는 천연 쿠

\*교신저자(E-mail): dragonroom@semyung.ac.kr  
(Tel): +82-49-649-1616

마린 유도체로 항염, 항산화, 항암 등의 효과가 있다고 알려져 있다. Esculetin은 강력한 항산화 활성을 보유하고 있으며, 인간 각질형성세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 MMP-1의 mRNA, 단백질 발현 및 MAPKs 경로를 억제한다고 보고되었다.<sup>9-12)</sup> 하지만 인간 진피 섬유아세포에서 MMP-1 억제와 관련된 신호전달경로에 대한 연구는 이루어지지 않았으며, TNF- $\alpha$ 로 MMP-1을 유도하여 억제 효과를 확인한 연구 또한 보고되지 않았다.

UV로 인한 피부 광노화는 IL-1과 TNF- $\alpha$ 와 같은 전염증성 사이토카인과 ROS 및 prostaglandin 등의 염증 매개체를 생성한다. 가장 최외각층인 표피는 UV에 의해 IL-1과 TNF- $\alpha$ 를 생성하고 이는 다른 전염증성 사이토카인의 합성과 방출을 유도할 수 있다.<sup>6)</sup> 일차적으로 분비된 사이토카인은 자가 분비 및 주변 세포에 신호를 전달하여 ECM 및 MMP 생산을 조절하여 주름을 유발할 수 있다. 실제 조직과 유사한 3차원 섬유아세포 모델을 이용하여 진행한 연구에서 UVB, UVA의 직접적인 조사보다 UV로 유도된 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 가 ECM 단백질 및 MMP의 생성에 더 큰 영향을 끼쳤다고 보고하였다.<sup>13)</sup> 이는 UV조사에서 더 나아가 UV 조사로 인한 사이토카인의 조절 또한 MMP를 억제하는데 중요하다고 볼 수 있다.

따라서, 본 연구는 TNF- $\alpha$ 로 MMP-1이 유도된 섬유아세포에서 esculetin의 MMP-1 억제 효과와 그에 따른 신호전달경로를 새롭게 확립하였기에 이를 보고하기 위해 작성되었다.

## 재료 및 방법

**세포배양 및 실험재료** – Hs68 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 사용하였다. 10%의 FBS(GenDEPOT, USA)와 1% penicillin/streptomycin (GenDEPOT, USA)를 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GenDEPOT, USA)를 이용해 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 본 실험에서 사용한 esculetin은 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

**세포 독성 평가** – Esculetin에 대한 세포 독성은 MTT assay로 평가되었다. Hs68 세포를 96 well plate에 5 × 10<sup>3</sup> cells/well로 분주한 후 24 시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 esculetin을 농도별로 처리하고 24 시간 동안 배

양하였다. 5 mg/mL의 MTT를 처리하고 4 시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO)를 이용하여 용해시키고 spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**실시간 유전자 종합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR)** – Esculetin이 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 mRNA 발현에 미치는 효과를 확인하기 위해 real-time PCR을 진행하였다. Hs68 세포를 60 mm plate에 6 × 10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 뒤 24 시간 동안 배양하였다. 50, 100, 200  $\mu$ M 농도로 esculetin을 전처리한 후, TNF- $\alpha$ 를 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. RNA는 trizol reagent(Ambion, USA)를 이용하여 추출하였다. Diethylpyrocarbonate(DEPC, Sigma, USA)로 용해시키고 Nano Drop(Thermo fisher, USA)으로 정량하였다. cDNA는 cDNA합성 kit(Revertra ACR- $\alpha$ , Toyobo, Japan)를 이용하여 합성하였다. cDNA와 Taqman master mix(Thermo fisher, USA)를 이용해 real-time PCR을 진행하였다. real-time PCR은 Quantstudio 1(Thermo fisher, USA)를 이용하였다. 실험에 사용한 probe들은 Table I에 나타났다.

**Western blotting** – Esculetin의 MMP-1 억제 신호전달경로를 확인하기 위해 western blotting을 진행하였다. Hs68 세포를 60 mm plate에 6 × 10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 뒤 24 시간 동안 배양하였다. 50, 100, 200  $\mu$ M의 농도로 esculetin을 전처리한 후, TNF- $\alpha$ 를 15 분 동안 처리하였다. Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-free (Thermo fisher, USA)를 첨가한 RIPA Lysis Extraction Buffer (Thermo fisher, USA)를 이용하여 세포를 용해시키고 원심 분리 하였다. 얻은 단백질은 Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo fisher, USA)로 정량하고, 5X SDS-PAGE loading dye로 염색 후 전기영동 하였다. Membrane에 transfer하고 5% skim milk로 blocking 한 후, 1 차 항체를 처리하여 overnight 하였다. Tris buffered saline with tween 20(TBST)로 3 회 세척 후 2 차 항체를 3 시간 동안 처리하였다. TBST로 3 회 세척 후 단백질 발현을 확인하였다. 실험에 사용한 항체는 Table II에 나타났다.

**Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)** – Esculetin이 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 단백질 분비에 미치는 효과를 확인하기 위해 ELISA를 진행하였다. Hs68 세포를 60 mm plate에 6 × 10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 뒤 24 시간 동안 배양하였다. 50, 100, 200  $\mu$ M 농도로 esculetin을 전처리한 후, TNF- $\alpha$ 를 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 상층액을 이용하여 MMP-1 Human ELISA kit(GE healthcare Life

**Table I.** Gene name and Assay ID Number in real-time PCR

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1
MMP-1	matrix metalloproteinases-1	Hs00899658_m1

**Table II.** Antibody name and assay ID number in western blotting analysis

Symbol	Antibody name	Assay ID
$\beta$ -actin	$\beta$ -actin (13E5) Rabbit mAb	4970S
p-ERK	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	4370S
ERK	p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	4695S
p-JNK	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) Rabbit mAb	4668S
JNK	SAPK/JNK Antibody	9252S
p-p38	Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	4511S
p38	p38 MAPK (D13E1) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	8690S
mTOR	mTOR (7C10) Rabbit mAb	2983S
p-mTOR	Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	5536S
p70S6k	p70 S6 Kinase (E8K6T) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	34475S
p-p70S6k	Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (D5U1O) Rabbit mAb	97596S
NF- $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B p65 (D14E12) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	8242S
p-NF- $\kappa$ B	Phospho-NF- $\kappa$ B p65 (Ser536) (93H1) Rabbit mAb	3033S

Sciences, USA)의 지침에 따라 진행하였다.

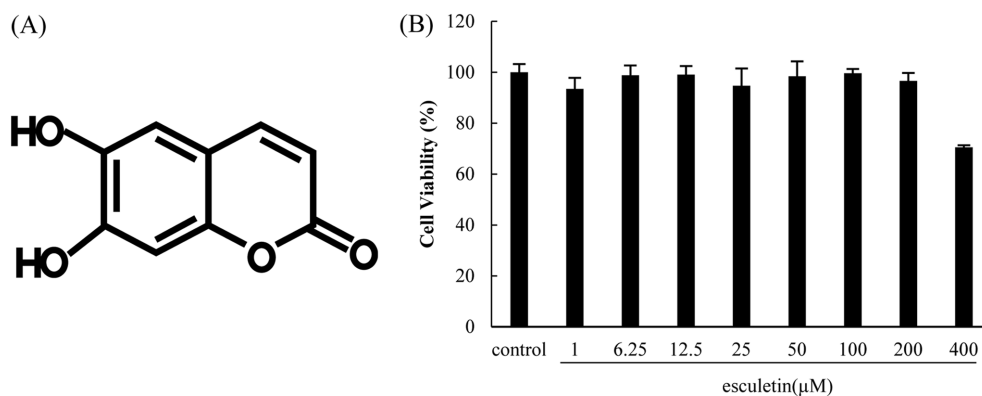
**통계분석** – 모든 실험은 3회 반복되었으며 student t-test를 통해 분석하였다. 통계적 유의수준은 \* $p < 0.05$ 로 검정하였다.

### 결과 및 고찰

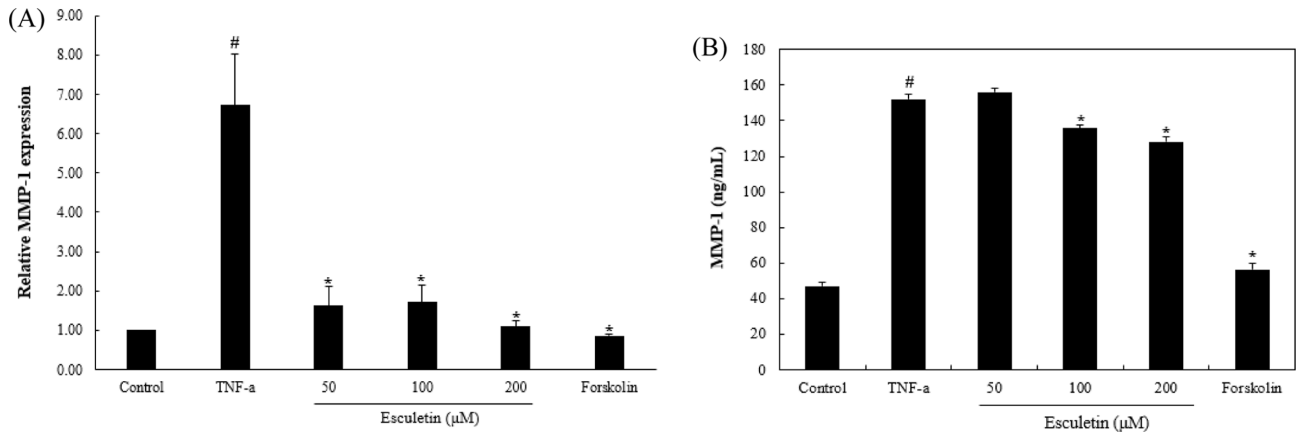
**세포 독성 평가** – Hs68 세포에서 esculletin의 세포 독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다. 농도별로 esculletin을 처리하여 esculletin을 처리하지 않은 대조군과 비교하였다. 그 결과, 50, 100, 200 및 400  $\mu$ M에서  $98.42 \pm 5.9\%$ ,  $99.64 \pm 1.64\%$ ,  $96.6 \pm 3.14\%$ ,  $70.49 \pm 0.88\%$ 로 200  $\mu$ M까지 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 1). 따라서 본 연구는 50, 100 및 200  $\mu$ M 농도로 진행하였다.

**실시간 유전자 증합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR) 및 ELISA** – 진피의 섬유아세포는 ECM을 생산하는 곳으로 피부의 탄력성과 관련이 있다. ECM에는 다양한 콜라겐들

이 존재하는데 그 중 type I 콜라겐이 구조적으로 가장 중요한 단백질이라고 여겨진다. 콜라겐 분해 효소인 MMP-1은 콜라겐 섬유를 분해시켜 노화를 가속화하기 때문에 노화를 예방하기 위해서는 MMP-1의 발현 조절이 중요하다. TNF- $\alpha$ 는 자외선에 의해 유도되는 사이토카인으로 인간 진피 섬유아세포인 Hs68 세포에서 ROS를 유도하고 MAPK를 활성화시켜 MMP-1의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다. Forskolin은 Hs68세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1의 발현을 억제하고 MAPK 인산화를 억제한다고 알려져 있기에 positive control로 사용하였다.<sup>14,15</sup> Hs68 세포에서 esculletin 처리에 따른 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 mRNA 발현 변화를 확인하기 위해 real-time RT-PCR을 진행하였고, 단백질 분비 변화를 확인하기 위해 ELISA를 진행하였다. TNF- $\alpha$ 를 처리한 군과 비교하였을 때, esculletin을 200  $\mu$ M 처리함에 따라 MMP-1의 mRNA 발현이  $83.06 \pm 2.28\%$  감소하였고, MMP-1의 단백질 분비는  $23.97 \pm 2.56\%$ 로 유의성 있게 감



**Fig. 1.** Chemical structure of esculletin and cell viability in Hs68 cell. (A) The chemical structure of esculletin. (B) cell viability of esculletin. Cell viability was measured by MTT assay.



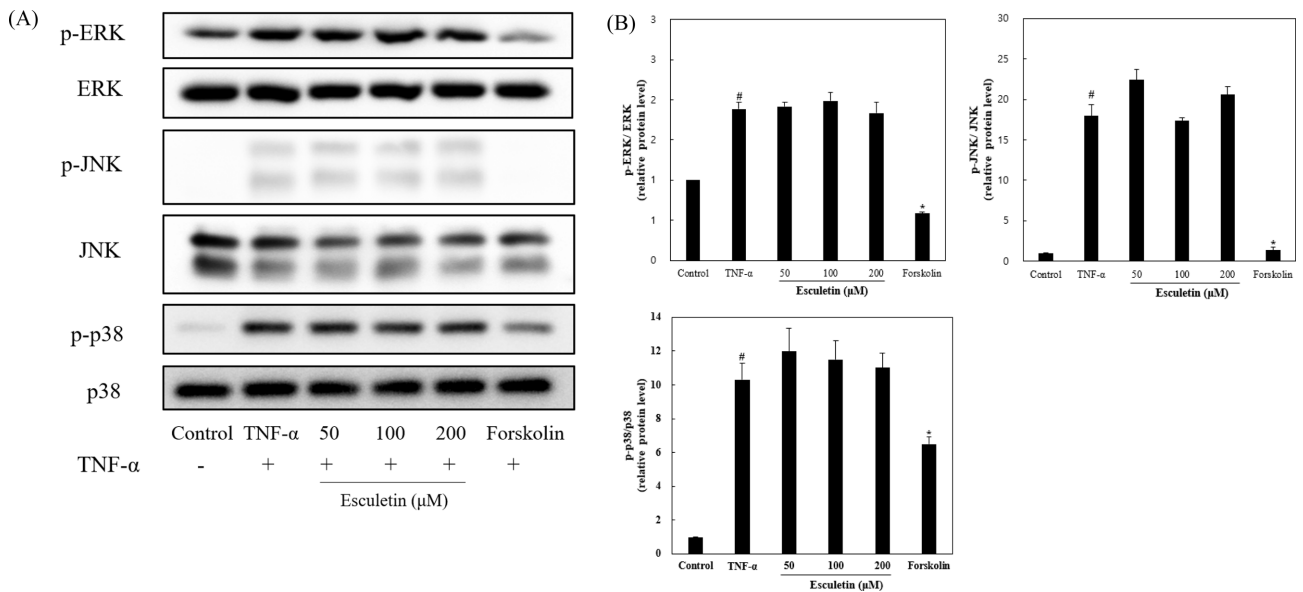
**Fig. 2.** Inhibitory effect of esculletin on MMP-1 mRNA expression and secretion in TNF-α induced Hs68 cells. Forskolin is positive control. (A) esculletin inhibits TNF-α-induced MMP-1 mRNA expression. (B) Esculetin inhibits TNF-α-induced MMP-1 secretion. #p<0.05, significantly different from the control. \*p<0.05, significantly different from the TNF-α-treated condition.

소하였다(Fig. 2).

**MAPK 신호전달경로에 대한 Esculetin의 효과** – Hs68 세포에서 esculletin 처리가 TNF-α로 활성화된 MAPK 신호전달경로의 단백질 발현에 미치는 효과를 확인하기 위해 western blotting을 진행하였다. Esculetin을 50, 100 및 200 μM로 처리한 군을 TNF-α를 처리한 군과 비교하였다. TNF-α를 처리하였을 때, p-ERK는 1.89 ± 0.07배, p-JNK는 16.1 ± 1.35배, p-p38은 10.31 ± 0.97배 증가하였으나 esculletin을 처리하여도 MAPK의 인산화 변화가 없음을 확인하였다. 그에 비해 positive control인 forskolin을 처리하였을 때, ERK,

JNK, p38 모두 인산화가 감소하였음을 확인하였다(Fig. 3). 결과적으로 esculletin의 MMP-1 억제 기전이 MAPK 신호전달경로가 아님을 확인하였다.

**mTOR-p70S6K 신호전달경로에 대한 Esculetin의 효과** – mammalian target of rapamycin(mTOR) 신호전달경로는 종양 형성, 사멸 및 혈관 신생 등의 다양한 세포 과정에서 활성화되고, 종양 및 류마티스 관절염 치료를 위해 mTOR 억제제가 사용된다. mTOR는 mTORC1과 mTORC2로 이루어진 복합체이다. mTORC1은 단백질, 지질 및 세포소기관의 생합성을 포함하여 여러 동화 과정을 촉진하고 자가포식



**Fig. 3.** Effect of Esculetin on MAPK signaling pathway protein expression in Hs68 cells. (A) Esculetin did not inhibit MAPK phosphorylation. (B) Data analyzed using image J. #p<0.05, significantly different from the control. \*p<0.05, significantly different from the TNF-α-treated condition.

등의 이화과정을 제어하여 세포 성장 및 증식을 조절한다. mTORC1은 다양한 하위신호전달경로를 통해 단백질의 합성을 제어하는데 그중 p70S6K가 대표적이다. mTORC1은 p70S6K의 인산화를 유도하여 단백질 합성을 촉진한다. mTORC1은 스트레스, 에너지 상태, 염증 등의 신호를 통해 단백질 및 지질 합성 등의 과정이 조절된다. TNF- $\alpha$ 와 같은 전염증성 사이토카인은 I $\kappa$ B kinase- $\beta$ (IKK $\beta$ )를 활성화하여 mTORC1의 활성화를 유도한다. 또한 p70S6K의 인산화를 자극하는데 있어서 상위신호전달경로인 mTOR가 TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화되는 신호전달경로의 필수적인 단백질임이 보고되었다.<sup>16-19)</sup>

세포는 다양한 외인성 및 내인성 자극에 의하여 노화가 발생한다. 세포 노화의 주된 특징 중 하나는 노화관련분비 표현형(senescence-associated secretory phenotype, SASP)을 분비하는 것이다. SASP는 섬유아세포, 내피세포 등에서 나타나며 염증성 사이토카인 및 MMP 등이 포함된다. SASP는 노화 및 조직의 손상에 관여하기 때문에 노화와 노화관련 질병을 예방하기 위해선 SASP의 조절이 필요하다. 피부 노화는 진피 섬유아세포의 노화와 밀접하게 관련되어 있다. 섬유아세포는 노화에 의해 SASP를 방출하기 때문에 SASP의 조절은 항노화에서 중요하게 여겨진다. 노화 세포에서 증가된 MMP의 발현은 ECM을 분해하여 조직의 물리적 특성에 영향을 끼치게 되어 결국 탄력이 감소된다. 노화된 섬유아세포에서 SASP의 마커인 MMP-1의 억제와 mTOR 및 NF- $\kappa$ B경로의 억제를 통해 항노화의 가능성을 확인한 연구가 보고되었다. SASP를 억제하여 노화 현상을 간접적으로 방해하는 물질에 대한 연구가 이루어지고 있으며 그중 라파마이신은 mTOR를 억제하여 SASP를 감소시켜 노화를 억제하는 물질로 알려져 있다. mTOR는 대사 및 노화를 조절하는 신호전달경로로서 SASP를 유도한다고 알려져 있다. mTOR 억제제인 라파마이신이 노화가 진행되고 있는 인간 섬유아세포에서 SASP 인자의 분비를 억제했다는 연구가 보고되었다. 또한 자외선에 노출된 마우스 진피 섬유아세포에서 MMP를 감소시켜 피부노화가 개선되었다는 연구가 보고되었다. 이외에도 라파마이신을 처리했을 때, mRNA 및 단백질 수준에서 MMP-1의 발현이 억제되었다고 밝혀졌다.<sup>20-25)</sup> 섬유아세포에서 자외선으로 활성화된 mTOR의 하위 표적인 p70S6K의 억제를 통해 MMP-1의 단백질 발현이 억제됨이 보고되었다. 또한 섬유아세포에서 AMPK 활성화 및 mTOR-p70S6K의 억제를 통해 MMP-1의 mRNA 발현 및 단백질 발현 억제에 대한 연구도 보고되었다.<sup>26,27)</sup> 이를 통해 mTOR를 활성화시키는 TNF- $\alpha$ 를 섬유아세포에 처리하였을 때, esculletin이 mTOR-p70S6K의 인산화를 억제하여 MMP-1을 억제할 것이라고 가정하였다.

AMP-activated protein kinase(AMPK)는 세포 에너지 상태를 조절하며 영양 결핍 및 산화 스트레스와 같은 세포의

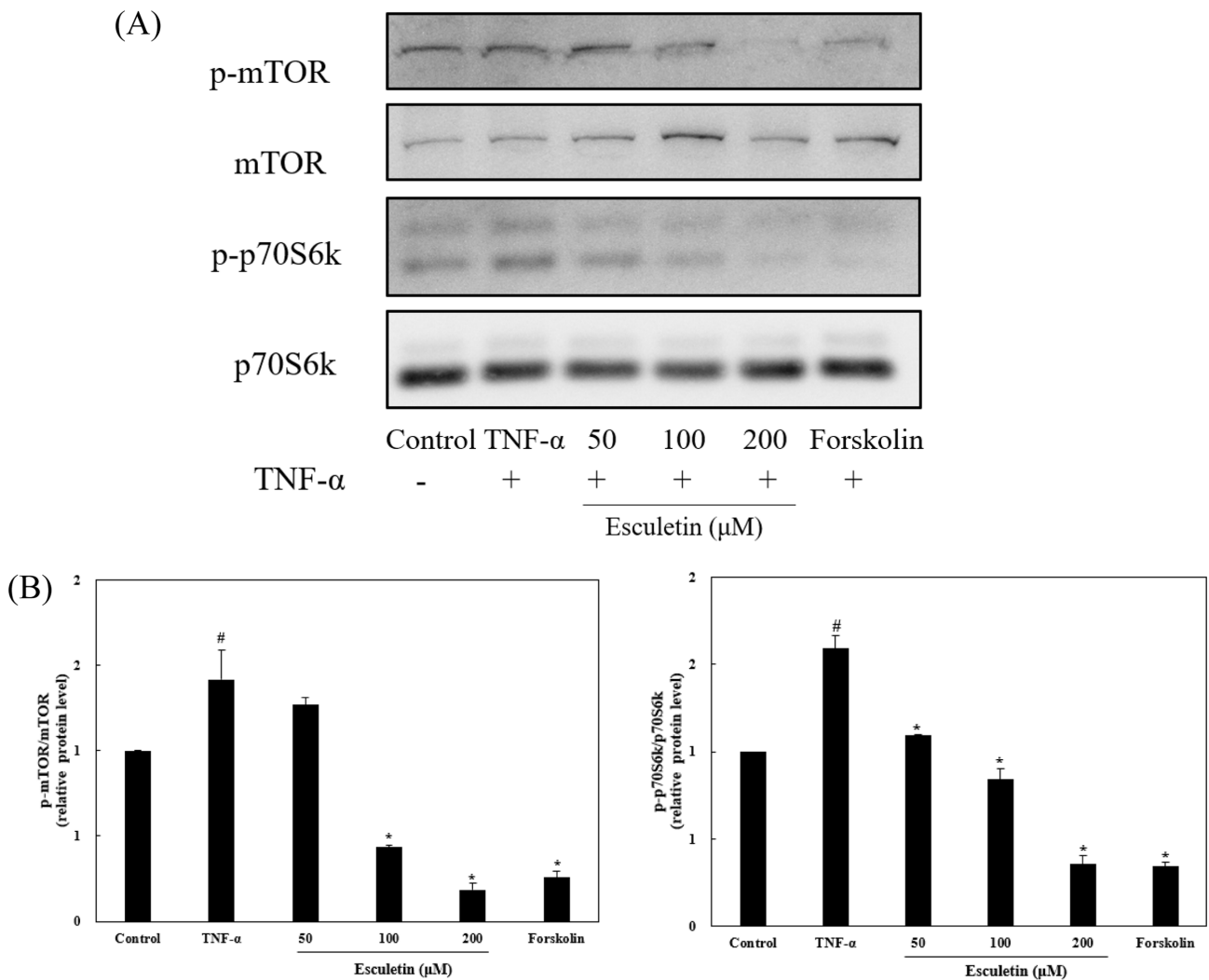
ATP를 소비하는 스트레스로 인해 활성화된다. AMPK는 LKB1에 의해 활성화되며 하류 표적으로 mTOR가 있다. AMPK는 mTORC1을 억제하기 때문에 AMPK의 활성화는 종양 치료에 효과적일 수 있다. Forskolin은 TNF- $\alpha$ 로 유도되었을 때, cAMP가 증가하여 MMP-1을 억제한다는 연구가 보고되었다.<sup>28)</sup> 이를 통해 AMPK의 활성화가 mTOR의 활성을 억제하여 MMP-1을 억제할 것이라고 가정하여 positive control로 사용하였다.

Hs68 세포에서 esculletin 처리가 TNF- $\alpha$ 로 활성화된 mTOR-p70S6K 신호전달경로의 단백질 발현에 미치는 효과를 확인하기 위해 western blotting을 진행하였다. Esculetin을 50, 100 및 200  $\mu$ M로 처리한 군을 TNF- $\alpha$ 를 처리한 군과 비교하였다. TNF- $\alpha$ 를 처리하였을 때, p-mTOR는  $1.42 \pm 0.17$ 배, p-p70S6K는  $1.59 \pm 0.07$ 배 증가하였다. esculletin을 200  $\mu$ M로 처리함에 따라 p-mTOR는  $86.86 \pm 2.6\%$ , p-p70S6K는  $77.66 \pm 3.09\%$  억제됨을 확인하였다. Positive control인 forskolin 또한 인산화가 억제됨을 확인하였다(Fig. 4). 이를 통해 mTOR/p70S6K 경로의 억제가 SASP의 인자인 MMP-1의 발현을 억제함으로써 항노화에 기여한다고 볼 수 있다.

**전사인자 NF- $\kappa$ B에 대한 Esculetin의 효과** - NF- $\kappa$ B는 전사인자로 RelA(p65), p50, p52와 같은 Rel 계열 단백질과 복합체를 형성한다. NF- $\kappa$ B의 활성화는 주로 inhibitor of  $\kappa$ B(I $\kappa$ B)에 의해 조절된다. I $\kappa$ B는 NF- $\kappa$ B와 결합하여 NF- $\kappa$ B의 핵 전위를 억제한다. 하지만 사이토카인 등의 자극에 의해 I $\kappa$ B kinase(IKK)가 활성화되어 I $\kappa$ B를 인산화하면 I $\kappa$ B는 분해되고 세포질에 있던 NF- $\kappa$ B는 핵으로 전위되어 MMP-1의 전사를 유도한다.<sup>29)</sup> 최근 mTOR가 I $\kappa$ B와 NF- $\kappa$ B를 활성화하여 MMP를 발현시킨다는 연구가 보고되었다.<sup>30)</sup> 또한 섬유아세포에서 mTOR의 억제를 통해 NF- $\kappa$ B 핵전위를 억제하여 노화를 예방 및 회복시킬 수 있다는 연구가 보고되었다.<sup>22)</sup> 이를 바탕으로 Hs68 세포에서 esculletin 처리를 통해 TNF- $\alpha$ 로 유도된 NF- $\kappa$ B 인산화가 감소할 것이라고 예상하였다.

NF- $\kappa$ B는 SASP 유도에 관여하는 전사인자로 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등의 염증성 사이토카인에 의하여 활성화된다. SASP의 분비 성분들은 사이토카인 및 MMP 등을 포함하는 것들로 대부분 염증을 일으키는 인자들이다. NF- $\kappa$ B는 염증 반응의 주요한 조절단백질로 SASP 유도에서 중요한 신호전달경로로 여겨진다. 젊은 인간 섬유아세포에서보다 노화된 섬유아세포에서 NF- $\kappa$ B가 인산화 된다는 연구가 보고되었다.<sup>31)</sup> 이는 NF- $\kappa$ B의 활성화가 SASP의 발현 증가와 관련이 있다는 결과로서 SASP를 억제하기 위해서는 NF- $\kappa$ B 활성화의 억제가 중요하다고 볼 수 있다.

Hs68 세포에서 esculletin 처리가 TNF- $\alpha$ 로 활성화된 NF- $\kappa$ B 신호전달경로의 단백질 발현에 미치는 효과를 확인하기



**Fig. 4.** Effect of Esculetin on mTOR-p70S6k signaling pathway protein expression in Hs68 cells. (A) Esculetin inhibited mTOR-p70S6k phosphorylation. (B) Data analyzed using image J. # $p < 0.05$ , significantly different from the control. \* $p < 0.05$ , significantly different from the TNF- $\alpha$ -treated condition.

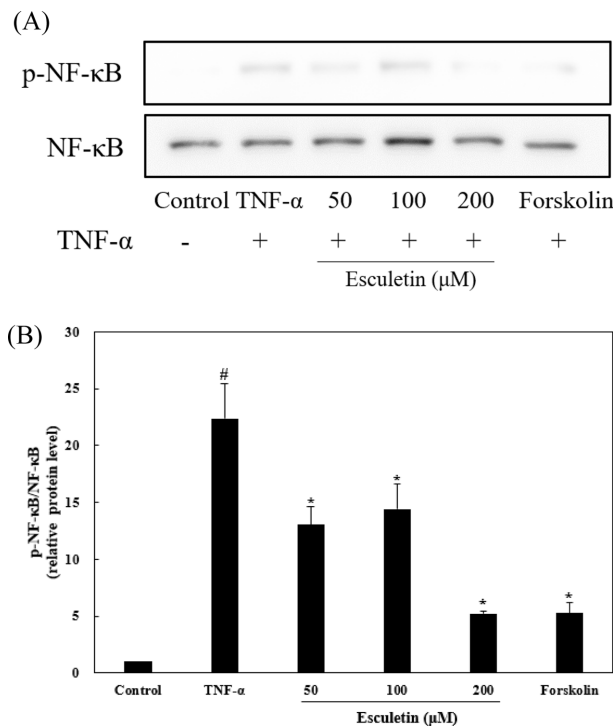
위해 western blotting을 진행하였다. Esculetin을 50, 100 및 200  $\mu\text{M}$ 로 처리한 군을 TNF- $\alpha$ 를 처리한 군과 비교하였다. TNF- $\alpha$ 를 처리하였을 때, p-NF- $\kappa\text{B}$ 는  $26.1 \pm 1.54$ 배 증가하였다. esculetin을 200  $\mu\text{M}$ 로 처리함에 따라  $72.65 \pm 1.61\%$  억제됨을 확인하였다(Fig. 5).

최근 마우스 대식세포 및 마우스 결장 조직에서 esculetin의 항염증 효과가 입증되었다. Esculetin은 LPS 자극으로 인한 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 발현을 유의하게 억제하였으며, NF- $\kappa\text{B}$ 의 핵전위 및 MAPK의 인산화를 억제하였다. 결론적으로 esculetin이 NF- $\kappa\text{B}$  및 MAPK 신호전달경로의 활성화를 억제하여 염증의 진행을 완하시켰다. 또한 *in vivo* 환경에서도 항염증 효과를 보여 esculetin이 대장염을 치료할 가능성이 있음을 나타냈다.<sup>32)</sup> 또한 esculetin이 마우스 대식세포에서 LPS와 유사한 LTA로 유도된 MAPK 인산화에 영향을 미치

지 않았지만, NF- $\kappa\text{B}$ 의 인산화를 억제하여 항염증 효과를 나타냈다고 보고하였다.<sup>33)</sup> 그리고 본 연구에서는 esculetin이 TNF- $\alpha$ 로 유도된 NF- $\kappa\text{B}$ 의 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 이는 esculetin이 NF- $\kappa\text{B}$ 경로의 억제와 연관되어 있으며, SASP 인자의 분비로 인한 염증을 억제하는데 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다.

## 결론

본 연구에서는 Hs68 세포에서 esculetin이 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1 발현에 미치는 효과를 확인하였다. Esculetin은 세포 독성을 보이지 않는 200  $\mu\text{M}$ 를 최고농도로 설정하여 진행하였다. Esculetin은 TNF- $\alpha$ 로 유도된 MMP-1의 mRNA 발현 및 단백질 분비를 억제하였다. 신호전달경로를 확인하



**Fig. 5.** Effect of Esculetin on NF-κB signaling pathway protein expression in Hs68 cells. (A) Esculetin inhibited NF-κB phosphorylation. (B) Data analyzed using image J. <sup>#</sup>p<0.05, significantly different from the control. <sup>\*</sup>p<0.05, significantly different from the TNF-α-treated condition.

기 위해 MAPK 경로를 확인하였으나 인산화의 변화가 없었다. 하지만 esculetin이 mTOR-p70S6K 및 NF-κB의 인산화를 억제하는 것을 확인하여 천연 항노화 소재로서의 가능성을 확인하였다.

### 인용문헌

1. Puizina-Ivić, N. (2008) Skin Aging. *Acta Dermatoven APA* **17**: 47-54.
2. 정진호 (2001) 한국인의 피부노화 특징 및 발생기전. *J. Soc. Cosmet.* **27**: 31-35.
3. Uitto, J. (1997) Understanding, premature skin aging, *N. Engl. J. Med.* **337**: 1463-1465.
4. Quan, T. and Fisher, G. J. (2015) Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review. *Gerontology* **61**: 427-434.
5. Quan, T., Qin, Z., Xia, W. and Shao, Y. (2009) Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **14**: 20-24.
6. Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. (2005) Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention

- of inflammation-induced matrix degradation – a review. – *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**: 17-34.
7. Jian, J., Pelle, E., Yang, Q., Pernodet, N., Maes, D. and Huang, X. (2011) Iron sensitizes keratinocytes and fibroblasts to UVA-mediated matrix metalloproteinase-1 through TNF-α and ERK activation. *Exp. Dermatol.* **20**: 249-254.
8. Rittie, L. and Fisher, G. J. (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **1**: 705-720.
9. Liang, C., Ju, W., Pei, S., Tang, Y. and Xiao, Y. (2017) Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: a mini-review. *Molecules* **22**: 387.
10. Lee, B. C., Lee, S. Y., Lee, H. J., Sim, G. S., Kim, J. H., Kim, J. H., Cho, Y. H., Lee, D. H., Pyo, H. B. and Choe, T. B. (2007) Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. *Arch. Pharm. Res.* **30**: 1293-1301.
11. Zhang, L., Xie, Q. and Li, X. (2022) Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. *PTR.* **36**: 279-298.
12. Zhen, I. A. X., Piao, M. J., Kang, K. A, Fernando, P. D. S. M., Kang, H. K., Koh, Y. S. and Hyun, J. W. (2019) Esculetin prevents the induction of matrix metalloproteinase-1 by hydrogen peroxide in skin keratinocytes. *J. Cancer Prev.* **24**: 123-128.
13. Kossodo, S., Wong, W. R., Simon, G. and Kochevar, I. E. (2004) Effects of UVR and UVR-induced cytokines on production of extracellular matrix proteins and proteases by dermal fibroblasts cultured in collagen gels. *J. Photochem. Photobiol. A.* **79**: 86-93.
14. Choi, J. W., Lee, J. and Park, Y. I. (2017) 7,8-Dihydroxyflavone attenuates TNF-α-induced skin aging in Hs68 human dermal fibroblast cells via down-regulation of the MAPKs/Akt signaling pathways. *Biomed. Pharmacother.* **95**: 1580-1587.
15. Won, H. R., Lee, P., Oh, S. and Kim, Y. M. (2021) Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of TNF-α-Induced MMP-1 via MAPK/ERK signaling pathways in human dermal fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **44**: 18-24.
16. Laplante, M. and Sabatini, D. M. (2009) mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* **122**: 3589-3594.
17. Laplante, M. and Sabatini, D. M. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**: 274-293.
18. Saxton, R. A. and Sabatini, D. M. (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* **168**: 960-976.
19. Glantschnig, H., Fisher, J. E., Wesolowski, G., Roda, G. A. and Reszka, A. A. (2003) M-CSF, TNFα and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ.* **10**: 1165-1177.
20. Herranz, N., Gallage, S., Mellone, M., Wuestfeld, T., Klotz, S., Hanley, C. J., Raguz, S., Acosta, J. C., Innes, A. J., Banito, A., Georgilis, A., Montoya, A., Wolter, K., Dharmalingam, G., Faull, P., Carroll, T., Martinez-Barbera, J. P., Cutillas, P., Reisinger, F., Heikenwalder, M., Miller, R. A., Withers, D.,

- Zender, L., Thomas, G. J. and Gil, J. (2015) mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat. Cell Biol.* **17**: 1205-1217.
21. Lee, K. S., Lin, S., Copland, D. A., Dick, A. D. and Liu, J. (2021) Cellular senescence in the aging retina and developments of senotherapies for age-related macular degeneration. *J. Neuroinflammation* **18**: 32.
  22. Davalos, A. R., Coppe, J. P., Campisi, j. and Desprez, P. Y. (2010) Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **29**: 273-283.
  23. Woo, J., Shin S., Ji, H., Ryu, d., Cho, E., Kim, Y., Kim, J., Park, D. and Jung, E. (2022) *Isatis tinctoria* L. Leaf extract inhibits replicative senescence in dermal fibroblasts by regulating mTOR-NF- $\kappa$ B-SASP signaling. *Nutrients* **14**: 1979.
  24. Fitsiou, E., Pulido, T., Campisi, J., Alimirah, F. and Demaria, M. (2021) Cellular senescence and the senescence-associated secretory phenotype as drivers of skin photoaging. *J. Invest. Dermatol.* **141**: 1119-1126.
  25. Qin, D., Ren E., Jia, C., Lu, Y., Yang, Q., Chen, L., Wu, X., Zhu, J., Guo, Y., Yang, P., Zhou, Y., Zhu, N., Bi, B. and Liu, T. (2018) Rapamycin protects skin fibroblasts from ultraviolet B-induced photoaging by suppressing the production of reactive oxygen species. *Cell. Physiol. Biochem.* **46**: 1849-1860.
  26. Newman, W. H., Castresana, M. R., Webb, J. G. and Wang, Z. (2003) Cyclic AMP inhibits production of interleukin-6 and migration in human vascular smooth muscle cells. *J. Surg. Res.* **109**: 57-61.
  27. Brenneisen, P., Wenk, J., Wlaschek, M., Krieg, T. and Scharfetter-Kochanek, K. (2000) Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **275**: 4336-4344.
  28. Shin, D. J., Kim, J. E., Lim, T. G., Jeong, E. H., Park, G., Kang, N. J., Park, J. S., Yeom, M. H., Oh, D. K., Bode, A. M., Zigang, D. and Lee, K. W. (2014) 20-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol suppresses UV-Induced MMP-1 expression through AMPK-mediated mTOR inhibition as a downstream of the PKA-LKB1 pathway. *J. Cell Biochem.* **115**: 1702-1711.
  29. Bae, S., Jung, Y., Choi, Y. M. and Li, S. (2015) Effects of Er-Miao-San extracts on TNF-alpha-induced MMP-1 expression in human dermal fibroblasts. *Biol. Res.* **48**: 8.
  30. Lee, J., Lim, J. W. and Kim, H. (2022) Astaxanthin inhibits matrix metalloproteinase expression by suppressing PI3K/AKT/mTOR activation in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Nutrients* **14**: 3427.
  31. Salminen, A., Kauppinen, A. and Kaamiranta, K. (2012) Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell. Signal.* **24**: 835-845.
  32. Wang, S. K., Chen, T. X., Wang, W., Xu, L. L., Zhang, Y. Q., Jin, Z., Liu, Y. B. and Tang, Y. Z. (2022) Aesculetin exhibited anti-inflammatory activities through inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPKs pathway in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol.* **296**: 115489.
  33. Jayakumar, T., Huang, C. J., Yen, T. L., Hsia, C. W., Sheu, j. r., Bhavan, P. S., Huang, W. C., Hsieh, C. Y. and Hsia, C. H. (2022) Activation of Nrf2 by esculetin mitigates inflammatory responses through suppression of NF- $\kappa$ B signaling cascade in RAW 264.7 Cells. *Molecules* **27**: 5143.

(2022. 10. 26 접수; 2022. 12. 1 심사;  
2023. 3. 15 게재확정)