

플라보노이드의 세포외 기질 관련 유전자 발현에 관한 연구

이재은^{1,*} · 박세연^{2,†}

¹오산대학교 뷰티코스메틱계열, 교수

²동덕여자대학교 자연정보대학 응용화학전공, 교수

(2023년 7월 24일 접수: 2023년 9월 25일 수정: 2023년 10월 25일 채택)

A Study on the Expression of Genes Related to Extracellular Substrates of Flavonoids

Jae-Eun Lee^{1,*} · Seyeon Park^{2,†}

¹Department of Beauty cosmetics, Osan University, Osan-si, Gyeonggi-do, Korea

²Department of Applied chemistry and Cosmetics, Dongduk Women's University, Seoul, Korea

(Received July 24, 2023; Revised September 25, 2023; Accepted October 25, 2023)

요약 : 본 연구에서는 flavonoid apigenin과 baicalein의 세포 실험으로 콜라겐 회복효과를 확인하고 전사체 비교 분석을 통하여 collagen 회복 효과를 뒷받침할 수 있는 결과를 제안하고자 한다. 연구 결과 apigenin과 baicalein은 HS68 세포주에서 UV에 의해 손상된 I형 collagen 회복에 효과를 보였으며, 두 물질 모두에서 ECM 관련 유전자들의 발현 변화를 확인하였다. ECM을 조절하는 공통적인 메커니즘을 보일 뿐 아니라 각각 다른 범주의 유전자들을 변화시키는 결과도 보여서, 세포에 다양한 영향을 미치는 것으로 예측할 수 있었다.

주제어 : 플라보노이드, 아피제닌, 바이칼레인, 콜라겐, 세포외기질

Abstract : In this study, we would like to confirm the collagen recovery effect through cell experiments of the flavonoid apigenin and baicalein and propose results that can support the collagen recovery effect through comparative transcriptome analysis. As a result of the study, it was confirmed that apigenin and baicalein were effective in recovering type I collagen damaged by UV in the HS68 cell line, and that both substances resulted in changes in the expression of ECM-related genes. Not only did it show a common mechanism for regulating the ECM, but it also showed the results of changing different categories of genes, making it possible to predict that it would have various effects on cells.

Keywords : Flavonoids, Apigenin, Baicalein, Collagen, ECM

[†]Corresponding author

(E-mail: sypark21@dongduk.ac.kr)

1. 서론

인체의 가장 바깥에 위치하는 피부는 여러 외부의 자극으로부터 인체를 보호하고 체온을 조절하며 영양 흡수와 체내의 노폐물을 배출하는 등 다양한 역할을 한다. 피부는 연령의 증가에 따라 생리적 기능이 저하되면서 피부가 건조해지고 잔주름이 생성되는 등의 내인성 노화현상이 나타난다. 일상생활에서 자외선 및 유해 물질에 노출되면서 피부세포들이 직접적으로 손상을 입게 되어 깊고 굵은 주름과 피부 건조, 색소성 질환 등을 일으키는 외인성 노화현상을 유발하기도 한다[1]. 이렇게 피부는 자외선에 과도하게 노출이 되면 신호전달 체계를 통해서 기질 금속단백질 분해 효소(matrix metalloproteinase, MMPs)가 활성화 되는데, 이 효소는 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)을 분해하여 피부의 구조를 변형시킨다. MMP-1은 피부세포에 존재하는 구조 단백질인 type I 과 III collagen을 분해하며[2], 피부에 주름을 생성하고 탄력을 저하시키는 등의 구조적인 변화를 일으켜 피부 노화 현상을 가져온다. ECM은 다양한 조직을 구성하는 세포들의 필요로 생성되는 물질로서, 구조적이며 기능적인 거대분자로 구성된 복잡한 혼합물로 세포 및 조직 구조의 기능 유지에 중요한 역할을 한다. 콜라겐(collagen)이나 엘라스틴(elastin)과 같은 구조 단백질(structural proteins)과 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan, GAG)과 같은 다당류(polysaccharides)로 구성되어 있으며, 세포의 부착을 돕는 단백질(adhesive proteins)로 고정되어 있다. 또한 성장인자(growth factors) 등 다양한 생화학적 인자들이 이동하며 분포되어, 세포막의 인테그린(integrin), 신데칸(syndecan) 등의 특정 수용체를 자극하여 세포 내 신호전달을 일으키는 중요한 리간드(ligands)로 작용한다[3]. 이렇게 세포들이 다양한 생물학적인 기능을 하기 위해서는 ECM의 존재가 필수적이며, 이러한 ECM을 함유한 결합 조직(connective tissue)은 물을 머금어 압축되는 힘을 지탱할 수 있도록 하여 신체 내 기관들의 모양을 유지하고 인장력과 탄성을 나타내는 데 매우 중요한 역할을 한다[4]. 그중에서도 피부 조직은 collagen이 ECM의 주성분이며, 그중 I형이 가장 많이 차지한다[5]. 이렇게 collagen과 elastin과 같은 구조 단백질이 손상되면 피부는 쉽게 손상되고 노화된다[6].

Flavonoids는 산화에 따른 스트레스를 막는 역

할을 함으로써 노화를 예방, 지연하는 효과가 있다고 알려져 있다[7, 8]. 그중에서 apigenin과 baicalein은 식물계에 널리 분포된 flavonoid이다. Apigenin(4',5, 7-trihydroxyflavone)은 여러 자연 발생 배당체의 아글리콘(aglycone)인 플라본 부류에 속하는 천연물로서[9], 다양한 과일, 채소, 기능성 식품 및 약용 식물에 존재하는 천연 flavonoid 화합물이며[10], baicalein(5,6,7-trihydroxyflavone)은 약용 식물인 황금(Scutellaria baicalensis, 黃芩)의 뿌리에서 분리된 flavonoid의 일종인 플라본(flavone)이다[11]. 연구에 의하면 flavonoids의 생체이용률을 높이기 위한 방법으로 cysteinyl β -cyclodextrin과 baicalein의 포접 복합체를 이용하여 UV에 노출된 Hs68(인간 섬유아세포)에서 collagen 합성을 유의하게 회복시켰으며, I형 collagen 단백질 발현을 상향 조절하지만 콜라겐 분해 효소인 MMP-1과 MMP-3의 발현을 하향 조절했다[12]. Apigenin은 UV 조사로 인한 세포독성으로부터 NHDFs(인간 진피 섬유아세포)의 생존력을 회복시켰고, collagenase와 MMP-1의 발현을 감소시켰다[13,14]. 이렇게 노화의 원인 분석과 노화를 예방하고 지연할 수 있는 성분과 방법에 관한 연구는 계속되고 있다.

본 연구에서는 HS68 세포주에 UV에 의한 산화스트레스를 주었을 때 flavonoid apigenin과 baicalein이 콜라겐 회복에 효과가 있을 것으로 판단하여 실험을 수행하였으며, 전사체 비교 분석을 통해 어떤 유전자들의 발현에 변화가 있는지 확인하고 공통으로 변화하는 유전자의 연관성에 대해 살펴보았다.

2. 실험

2.1. 세포배양과 RNA 추출

피부 세포 처리 방법으로는 HS68 세포를 100mm cell culture dish에 3×10^5 개로 seeding 하여 37°C, 5% CO₂ 상태의 incubator에서 48시간 동안 배양하였다. HS68 세포는 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다. Baicalein 30uM, apigenin 30uM 농도로 media에 희석하여 세포에 처리하고 37°C, CO₂ 5% 의 incubator에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 ice-cold PBS로 세척하고 Trizol 1.2ml를 가한 후 ice에 5분간 두었다. Scaper로 cell을 harvest한 후

Trizol을 이용하여 RNA를 추출하고, 유전자 발현을 분석하였다. 총 RNA는 RN easy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)의 프로토콜에 따라 분리되었다. 분리된 RNA의 순도는 RNA 6000 Nano-chip을 사용한 Agilent 2100 Bioanalyzer를 통해 분석하였다(Agilent Technologies, Böblingen, Germany).

2.2. RNA 추출

유전자 발현 양상 분석을 위한 RNA를 얻기 위해 피부 조직 조각을 용해했다. Total RNA는 RN easy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)의 protocol에 따라 분리되었다. 분리된 RNA의 무결성과 순도 확인은 RNA 6000 Nano-chip을 이용하여 Agilent 2100 Bioanalyzer를 통해 분석했다(Agilent Technologies, Böblingen, Germany). 대조군과 처리군의 total RNA는 전사체의 profiling에 사용되었다. Library는 Lexogen (Vienna, Austria)의 Quant-Seq 3'mRNA-Seq library prep kit에 의해 구축되었으며, sequencing platform으로 Next Seq 500(Illumina, San Diego, CA, USA), library layout으로 Illumina SE75가 이용되었다.

2.3. 전사체 분석

Quant Seq 3'mRNA-Seq 전사체(transcriptome) 분석은 이바이오젠(ebiogen Inc, Seoul, Korea)에서 수행하였다. Bewtie2를 이용하여 시퀀스를 정렬하였고, 정렬한 파일은 transcriptome를 조립하여, 양을 추정하며 차등 발현 유전자를 검출하는 데 사용되었다. 차등적으로 발현된 유전자는 Bedtools의 적용 범위를 사용하여 고유 및 다중 정렬의 수를 기반으로 결정되었다. Read count data는 bioconductor를 사용하여 R 내에서 EdgeR을 사용하는 분위의 수 정규화(normalization) 방법에 따라 처리하였다. DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)와 Medline 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 검색한 결과를 기반으로 유전자를 분류하였다. Apigenin과 baicalein에서 변화를 보인 관련 유전자들의 상관관계를 보기 위해 <http://string-db.org/>에서 다중 단백질의 network를 분석하였다.

2.4. 세포배양과 세포증식 측정

세포를 96well plate에 1.5×10^4 개씩 분주하고 apigenin과 baicalein을 24시간, 48시간 동안

각각 10, 20, 50 μ M 농도로 독립적으로 세 번씩 반복하여 처리하였다. MTS 용액을 well 당 20 μ L씩 넣고 1시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 ELISA reader기(Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 통계처리

본 연구의 결과값은 독립적인 반복 실험을 세 번씩 실시하여 mean \pm S.D로 나타냈다. ELISA 실험에 관하여 two way ANOVA 방법을 이용하여 검정하였으며, $p < 0.05$ 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

2.6. Western blot

세포 용해물(Cell lysate)와 세포질 분획(cytosol fraction)은 2X non-denaturing SDS buffer(1M Tris-Cl, 20% SDS, Glycerol, 1% BPB, ddH₂O, pH 6.8)와 1:1로 섞어준 후 100°C에서 5분간 끓였다. Mitochondria fraction은 2X SDS buffer(1M Tris-Cl, 20% SDS, Glycerol, β -mercaptoethanol, 1% BPB, pH 6.8)와 1:1로 혼합한 후 100°C에서 5분간 끓였다. 10% gel을 제조하여 180V로 80분간 SDS-PAGE한 후 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 90V로 100분간 transfer하였다. 항체(Antibody)의 비특이적 결합을 막기 위하여 Blocking Ace powder(KAC)로 1시간 동안 상온에서 블로킹(blocking)한 후 TBST로 washing 하였다. 1차 항체를 4°C에서 overnight 하여 붙였다. (DLP-1; BD biosciences, 611112, 1:1000, GAPDH; Abcam, ab8245 1:3000, VDAC-1; SantaCruz, sc-390996, 1:500, OPA1; SantaCruz, sc-393296, 1:500, Fis1; SantaCruz, sc-376447, 1:500) TBST로 세척 후 HRP-conjugated 2차 항체(antibody)를 상온에서 3시간 동안 붙인 후 다시 TBST로 세척하고 ECL solution으로 감광했다.

2.7. ELISA 분석

Apigenin, baicalein을 UV 450nm를 처리한 후 세포를 24시간 동안 배양했다. Type I procollagen ELISA assay 섬유아세포(fibroblast)를 48 well plate에 1×10^4 cells/well의 밀도로 분주하여, 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 24시간 동안 배양한 후에 시험 물질이 포함된 혈

청이 없는 배지에서 한 번 더 24시간 배양하였다. 배지 중에 유리된 procollagen의 양은 procollagen type I C-peptide EIA kit(MK101, Takara, Japan)을 사용하여 측정하였으며, fibroblast의 total 단백질량으로 보정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 자외선으로 산화적 스트레스를 유도한 피부세포에 flavonoid apigenin, baicalein, kaempferol의 보호 효과

피부세포에 산화적 스트레스를 주었을 때 apigenin, baicalein, kaempferol이 콜라겐 단백질을 보호하는지에 대해 확인하였다. 콜라겐 단백질 양을 측정하기 위해 Western blot assay를 수행하였다. Flavonoid 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군 중에서 50 μM 농도일 때 I형 콜라겐 단백질을 회복시켰으며, kaempferol보다 apigenin과 baicalein에서 콜라겐 보호 효과가 더 크게 나타났다(Fig. 1).

3.2. HS68 세포주에 대한 apigenin과 baicalein의 세포독성 효과

Apigenin과 baicalein의 HS68 세포주에 대한 독성 유무를 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. Apigenin과 baicalein을 10, 20, 50 μM 농도로 HS68 세포주에 처리하여 세포 생존율을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Apigenin은 10 μM 의 농도일 때 100 %, 20 μM 101 %, 50 μM 96 %의 세포 생존율을 나타내어 대조군에 비해서 세포독성을 크게 보이지 않았다. Baicalein에서도 20 μM 의 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다(Fig. 2). 선행 연구[13]에 의하면 UV에 노출된 apigenin이 HS68 세포에서, baicalein이 단핵구 세포주인 THP-1 세포에서도 세포 독성의 징후를 보이지 않았다고 보고하여 본 연구의 결과와 일치하였다.

3.3. Apigenin과 baicalein이 콜라겐 합성에 미치는 영향

콜라겐 단백질의 전구체 형태로서 피부세포에서 분비되는 procollagen type I의 생성량을 확인

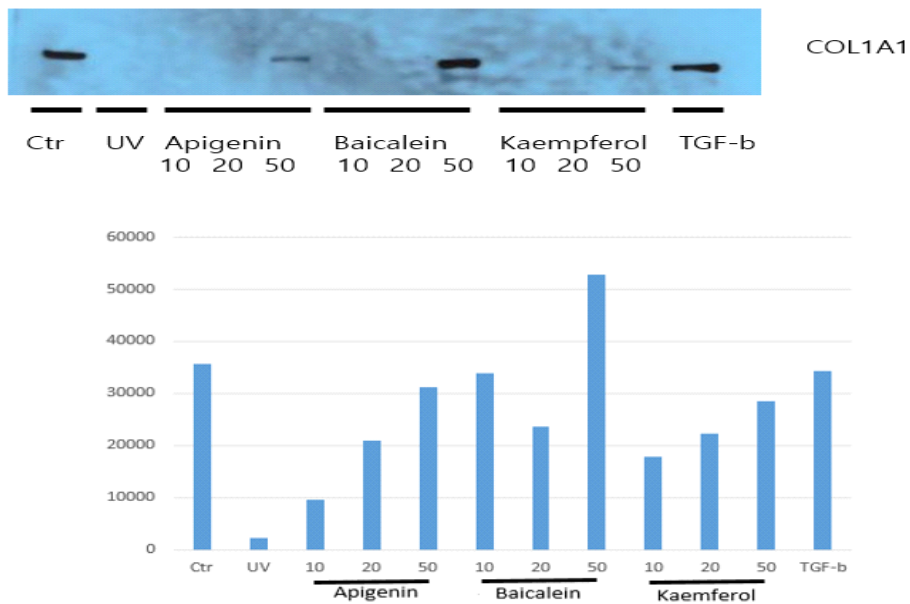


Fig. 1. Protective effect of flavonoids against UV-induced oxidative stress. HS68 cells were exposed to UVB and treated at concentrations of 10, 20, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The data shown are expressed as mean \pm S.D. from three repeated experiments with similar results.

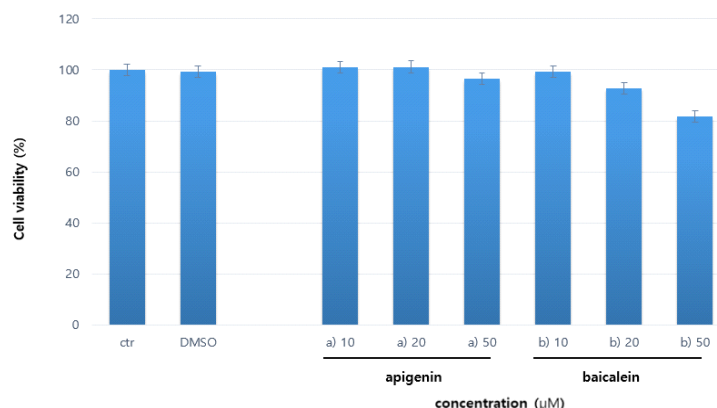


Fig. 2. Cytotoxicity effects of apigenin and baicalein in cell lines Hs-68. Apigenin and baicalein were treated with HS68 cell line at concentrations of 10 μ M, 20 μ M, and 50 μ M, and cell viability was measured.

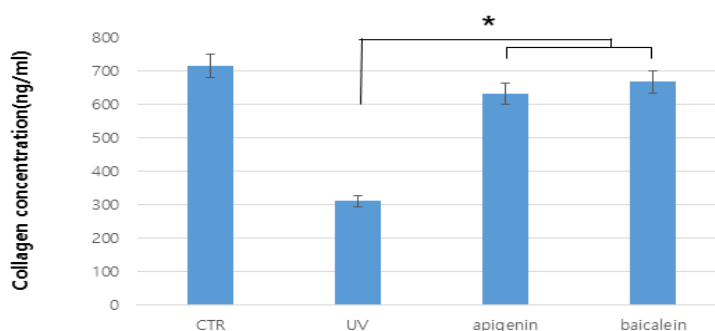


Fig. 3. Apigenin and baicalein effects on collagen synthesis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the amount of procollagen type I secreted from skin cells as a precursor form of collagen protein. HS68 cells were irradiated with ultraviolet (UV) light at 450 nm and then treated with apigenin and baicalein at a concentration of 50 μ M each(*p<0.05).

하기 위하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 법을 사용하였다. 본 연구에서 HS68 세포에 자외선(UV, ultraviolet ray) 450 nm를 조사한 후에 apigenin과 baicalein을 각각 50 μ M 농도로 처리하였다. UV를 조사한 상태에서는 정상 상태의 대조군 procollagen 분비량의 50 % 이하까지 감소하였으나, apigenin은 632 ng/ml로 48.59% 증가시켰고, baicalein은 669 ng/ml로 51.41 % 증가시키는 것으로 확인하였다(Fig. 3). 이러한 콜라겐 전구체인 procollagen tpe I의 발현량의 증가는 콜라겐

합성의 증가로 이어짐을 의미한다[15]. 이것으로 apigenin과 baicalein은 UV에 의해서 감소된 콜라겐을 복구시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. Baicalein에서 50 μ M의 농도에서 80% 초반의 생존율을 나타내고 있으나, procollagen 생성량은 총 단백질에 대비해서 비교하였으므로, 세포는 죽더라도, 50 μ M 농도에서 효능을 나타내고 있는 것으로 측정되었다. 이것은 flavonid들이 세포에 다양한 영향을 미치고 여러 세포 신호 전달에 관여하고 있으므로 얻어지는 결과로 볼 수 있다[16].

3.4. Apigenin과 baicalein에 의해서 발현이 변화한 유전자

Apigenin과 baicalein에 의해서 발현이 변화한 유전자들을 알아보기 위하여 gene ontology 분석을 통해 전사체 분석과 차이가 있는 유전자들에 대해서 기능별 clustering을 실시하였다. 본 연구에서는 유전자 발현량에서 대조군에 비해 4배 이상 높거나 낮게 발현된(up significant: Fold change ≥ 4 , down significant: Fold change ≤ 4) 유전자를 선별하였으며 이것을 유의미하다고 간주하였다. Apigenin과 baicalein이 동시에 증가되거나 감소된 유전자들을 나열한 결과를 Table 1에 나타내었다. 각질세포 분화에 관여하는 단백질인 KRT13(keratin 13), KRT6B(keratin 6B)가 높게 발현되었다. 피부의 세포골격 단백질은 세포 접착을 높여 케라틴 세포의 안정적인 골격을 구성하는 역할을 한다[17]. KRT6은 Src 단백질의 분리 및 Src 단백질의 격리와 Src 키나아제의 억제제를 포함하는 메커니즘에 의해 데스모솜(desmosome) 매개 세포 접착을 불안정하게 하여 각질 세포의 이동으로 상처치유를 가능하게 한다[18]. 반면 염증성 cytokine과 항염증성 myokine에 작용하여 사이토카인(cytokine) 역할을 하는 IL6(interleukin 6) 유전자의 경우 apigenin에서는 감소된 반면에 baicalein에서 증가되었다. IL-6은 피부의 염증반응을 일으키는데 중요한 cytokines로 알려져 있다[19]. 선행연구에서 IL-6 유전자 발현이 apigenin은 감소, baicalein은 증가되었다. THP-1 세포주에서 baicalein과 baicalin의 항염증 활성을 확인한 결과 baicalein은 baicalin보다 Src 티로신 키나제(tyrosine kinase) 및 사이토카인(cytokine)인 IL-6 모두에 대해 억제 활성이 높게 나타났다[20]. 피부에서 IL-6의 역할을 탐구하기 위해 human keratin 14(K14) promot를 활용하여 형질전환 마우스의 중층 편평 상피의 기저 세포에서 IL-6을 발현했다. 그 결과 K14, IL-6 유전자를 가진 마우스는 정상보다 작았고 모발 성장이 지연되었다. IL-6 발현은 표피 증식을 증가시키지 않았지만, 외관상으로 보았을 때 정상적인 분화를 보였으며 각질층이 두꺼워졌다. 이러한 결과는 IL-6이 각질층을 강화하여 유해한 자극이나 감염으로부터 더 많은 보호를 제공하는 것일 수 있다고 하였다[21].

3.5. Apigenin과 baicalein의 ECM(extracellular matrix)과 관련 있는 유전자들의 발현

대조군에 비교하여 발현이 변화된 유전자 중에서 ECM(extracellular matrix)과 관련된 유전자 범주 만으로 그린 유전자 clustering heatmap에서 확인할 수 있다(Fig. 4). Apigenin과 baicalein은 일부 ECM과 관련된 유전자의 범주 발현의 변화 패턴에 유사한 영향을 주기도 하지만, 일부 유전자의 발현 패턴에서는 완전히 반대로 영향을 보였다. 이러한 결과는 apigenin과 baicalein 모두 ECM과 관련 있는 단백질의 발현에 영향을 주지만, 세포에 다른 메커니즘도 가져오는 것으로 사료된다.

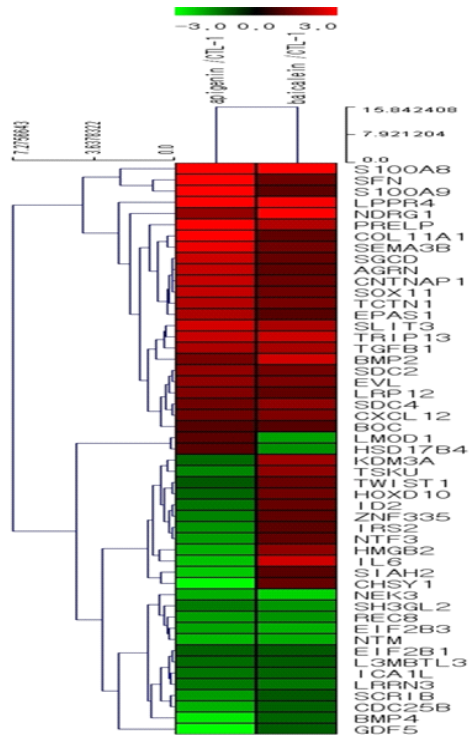


Fig. 4. ECM(extracellular matrix) related gene expression of apigenin and baicalein. Among the genes whose expression changed compared to the control group, only the gene categories related to ECM (extracellular matrix) were identified in the drawn gene clustering heatmap.

Table 1. Genes in which Apigenin and baicalein have been changed in common upward or downward.

ID	Gene symbol	Fold change ≥ 4 , Fold change ≤ 4		Description
		apigenin/CTL	baicalein/CTL	
2052	PPFIA4	7.882	35.276	PTPRF interacting protein alpha 4
9971	KRT13	21.513	20.422	keratin 13
11941	TMEM91	13.044	19.336	transmembrane protein 91
8179	ISG20	9.463	13.676	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
15736	BHLHE40	4.460	13.171	basic helix-loop-helix family member e40
1510	S100A8	201.392	9.988	S100 calcium binding protein A8
5927	OAS3	7.859	9.845	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3
264	HSPB7	30.754	8.334	heat shock protein family B (small) member 7
1090	LPPR4	20.147	7.169	lipid phosphate phosphatase-related protein type 4
17373	SRD5A3	10.607	6.368	steroid 5 alpha-reductase 3
22520	CPA4	17.979	5.746	carboxypeptidase A4
4098	TMEM216	7.397	5.741	transmembrane protein 216
15098	SIK1	17.206	5.365	salt inducible kinase 1
21759	IL6	0.214	5.244	interleukin 6
18022	TRIP13	5.042	5.147	thyroid hormone receptor interactor 13
971	IFI44L	5.030	5.068	interferon induced protein 44 like
21952	IGFBP3	13.444	4.972	insulin-like growth factor binding protein 3
5403	KRT6B	150.850	4.856	keratin 6B
19028	THOC3	5.044	4.689	THO complex 3
22692	RARRES2	9.697	4.461	retinoic acid receptor responder 2
7584	WHAMMP2	4.423	4.377	WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules pseudogene 2
24325	OLFML2A	9.934	4.344	olfactomedin like 2A
3432	IFITM1	9.218	4.283	interferon induced transmembrane protein 1
21783	NFE2L3	10.865	4.189	nuclear factor, erythroid 2 like 3
2062	PRELP	9.441	4.137	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein
12879	DHX57	0.073	0.248	DEAH-box helicase 57
4887	NTM	0.227	0.248	neurotrimin
14397	SYNDIG1	0.073	0.221	synapse differentiation inducing 1
13664	SLC25A12	0.058	0.208	solute carrier family 25 member 12
4597	WTAPP1	0.086	0.203	Wilms tumor 1 associated protein pseudogene 1
18200	HMGCS1	0.042	0.197	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1
10299	WFDC21P	0.140	0.197	WAP four-disulfide core domain 21, pseudogene
6413	NEK3	0.245	0.186	NIMA related kinase 3
17361	SCFD2	0.230	0.108	sec1 family domain containing 2
18656	PITX1	0.234	0.097	paired like homeodomain 1
2488	AKR1C1	0.232	0.086	aldo-keto reductase family 1, member C1

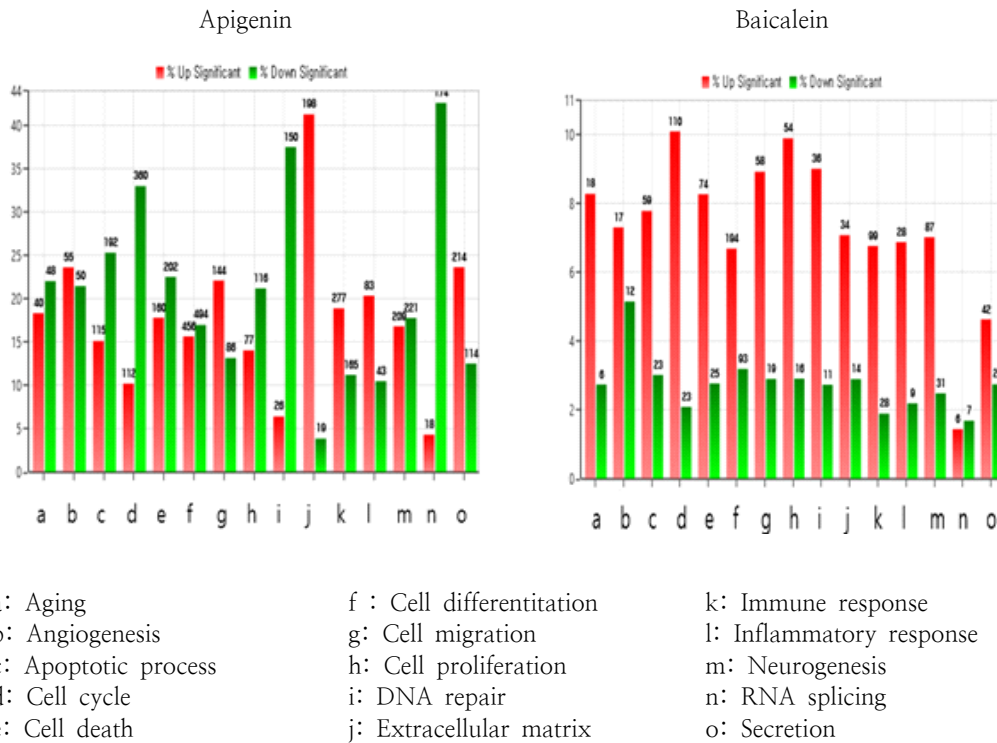


Fig. 5. Gene category chart for apigenin and baicalein. The results of comparing the categories of gene functions regulated by apigenin and baicalein and the gene category chart results of genes with decreased or increased expression in each individual were shown.

3.6. Apigenin과 baicalein의 Gene category chart

Apigenin과 baicalein이 조절하는 유전자 기능의 카테고리(category)를 비교한 결과, 각 개체에서 감소, 증가 발현한 유전자들의 gene category chart 결과는 Fig. 5와 같다. Apigenin과 관련이 있다고 알려진 유전자 기능 범주에는 aging(total gene number: 88), angiogenesis(105), apoptotic process(307), cell cycle(472), cell death(362), cell differentiation(950), cell migration(230), cell proliferation(193), DNA repair(217), extracellular matrix(217), immune response(442), inflammatory response(126), neurogenesis(430), RNA splicing (192), secretion(328)으로 나타났다. Baicalein과 관련이 있다고 알려진 유전자 기

능 범주에는 aging(total gene number: 24), angiogenesis(29), apoptotic process(82), cell cycle(133), cell death(99), cell differentiation (287), cell migration(77), cell proliferation(70), DNA repair(47), extracellular matrix(48), immune response(127), inflammatory response (37), neurogenesis(118), RNA splicing(13)이 있었다. Extracellular matrix, immune response, inflammatory response, secretion 범주에서는 apigenin과 baicalein 모두에서 증가한 유전자가 감소한 유전자보다 많다는 점이 일치 하였으나, 나머지 범주에서는 두 물질의 조절 패턴이 다르게 나타났다. 이러한 점에서도 apigenin과 baicalein이 세포에 미치는 영향의 메커니즘은 차이가 있는 것으로 보였다.

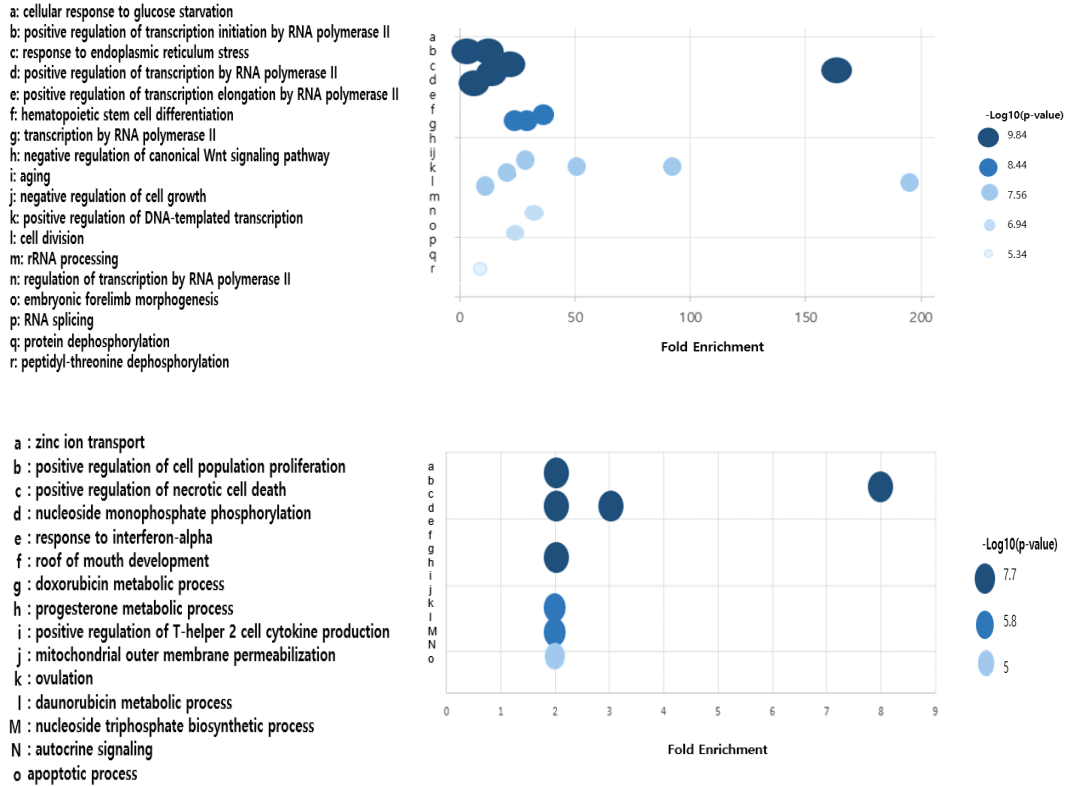


Fig. 6. Gene clustering chart related to apigenin, baicalein.

3.7. Apigenin, baicalein과 관련된 유전자 카테고리만을 선별한 유전자 클러스터링 차트

클러스터링 차트를 분석한 결과 apigenin은 노화, 세포와 세포 접착, 표피 발달, 각질세포 분화, 상피세포 분화에 관련되어 기능을 하는 유전자가 보였고, baicalein은 조직 복구, 상피세포의 분화, ECM과 관련된 유전자가 나타났다.

3.8. Apigenin과 baicalein에 동시 증가한 스트링 네트워크(String network)

Apigenin과 baicalein에 동시 증가한 유전자들의 상관관계를 분석하기 위해 <https://string-db.org/>에서 단백질-단백질 상호 작용(Protein-protein interaction: PPIs)의 network를 그린 결과는 Fig. 7과 같다. Apigenin과 baicalein의 동시에 증가한 유전자들의 상관관계를 그린 string database 결과에서는 41개의 node, 평균 node degree 1.61,

평균 local clustering coefficient 0.379 값으로 나타나, 유의미한 상호작용들을 보였다. IFITM1(Interferon-induced transmembrane protein 1), MX2(Interferon-induced GTP-binding protein MX2/MXB), IFI35(Interferon-induced 35 kDa protein), ISG20(Interferon-stimulated gene 20), IFI44L(interferon induced protein 44 like), ISG15(Interferon-stimulated gene 15), OAS3 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 3)과 같이 인터페론(interferon)의 기능을 하는 유전자들이 연관되어 있었다. P4HA1(Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1), P4HA2(Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2)과 같이콜라겐 합성의 핵심이 되는 효소 형성을 촉매하거나, ERO1L(endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha)과 같이 산화 환원 효소를 활성화하는 기능을 하는 유전자들이 연관되어 있었다.

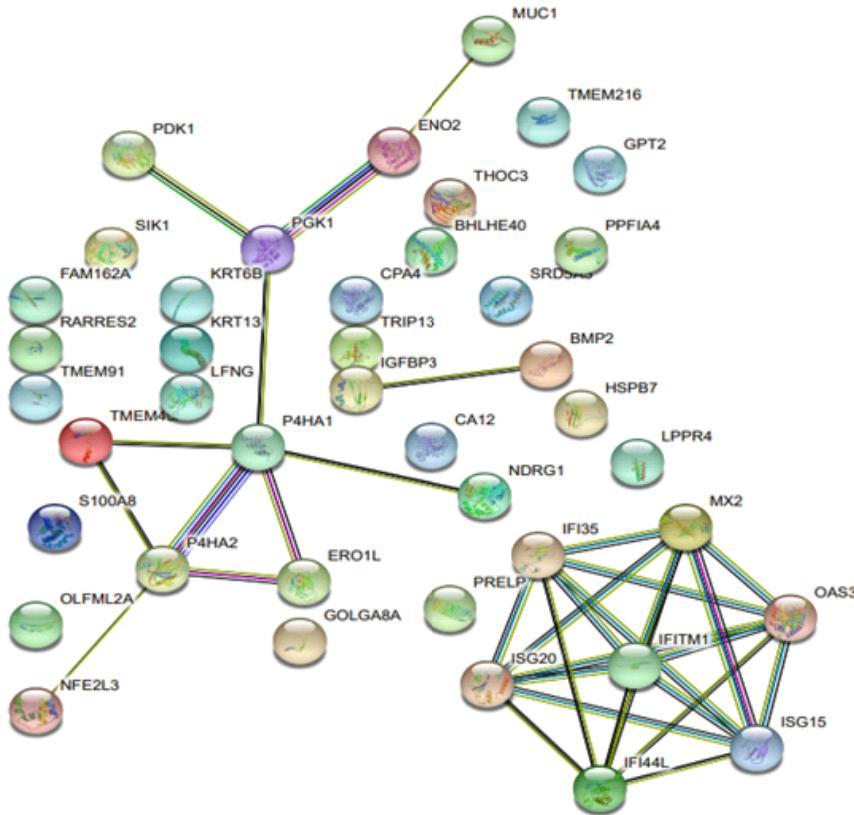


Fig. 7. Apigenin and baicalein simultaneously increased 41 gene string networks. To analyze the correlation between genes simultaneously increased in apigenin and baicalein, the results of a network of protein-protein interactions (PPIs) were drawn at <https://string-db.org/>.

4. 결론

본 연구에서는 flavonoids 성분 중 apigenin과 baicalein의 콜라겐 회복 효과 확인과 함께 전사체 비교 분석을 통해 어떤 유전자들의 발현에 변화가 있는지 확인하고, 공통으로 변화하는 유전자의 list를 나열하여 연관성에 대해 연구하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. HS68 세포주에 flavonoid apigenin, baicalein, kaempferol을 처리하여 콜라겐 단백질 회복을 평가한 결과 kaempferol보다 apigenin과 baicalein에서 콜라겐 복구효과가 더 크게 나타났다.
2. Apigenin과 baicalein의 HS68 세포주에 대한 독성 유무를 확인한 결과 apigenin과 baicalein은 대조군에 비해서 세포독성을 크게 보이지 않았다.
3. Apigenin과 baicalein이 콜라겐 합성에 미치는 영향을 확인한 결과 UV에 의해서 감소된 콜라겐을 복구시키는 효과를 확인할 수 있었다.
4. Apigenin과 baicalein에 의해서 발현이 변화한 유전자 분석 결과로 각질세포 분화에 관여하는 단백질인 KRT13(keratin 13), KRT6B(keratin 6B)가 높게 발현되어 피부의 세포 접착을 높여 케라틴 세포의 안정적인 골격을 구성하는 역할을 할 것으로 보였

다.

5. Apigenin과 baicalein의 ECM(extracellular matrix)과 관련 있는 유전자들의 발현을 확인한 결과 일부 ECM과 관련된 유전자의 범주 발현의 변화 패턴에 유사한 영향을 주기도 하지만, 일부 유전자의 발현 패턴에서는 완전히 반대로 영향을 나타냈다. 이러한 결과를 바탕으로 볼 때, apigenin과 baicalein은 둘 다 ECM과 관련 있는 단백질의 발현에 영향을 주지만, 세포에 다른 메커니즘을 가져오는 것으로 사료된다.
6. Apigenin과 baicalein이 조절하는 유전자 기능의 카테고리(category)를 비교한 결과 extracellular matrix, immune response, inflammatory response, secretion 범주에서는 apigenin과 baicalein 모두에서 증가한 유전자가 감소한 유전자보다 많다는 점이 일치하였으나, 나머지 범주에서는 두 물질의 조절 패턴이 다르게 나타났다. 이러한 점에서도 apigenin과 baicalein이 세포에 미치는 영향의 메커니즘은 차이가 있는 것으로 보였다.

이러한 연구 결과로 flavonoid apigenin과 baicalein의 collagen 회복 효과를 확인하고 유전자 비교 분석 결과에서 두 물질 모두 ECM 관련 유전자들의 발현 변화가 있었으며, 일부 ECM 관련 유전자들이 공통으로 변화했다는 점을 고려할 때, apigenin과 baicalein이 ECM을 조절하는 공통적인 메커니즘을 보였다. 그러나 apigenin과 baicalein은 각각 다른 범주의 유전자들을 변화시키는 결과도 보여서, 세포에 다양한 영향을 미치는 것으로 예측할 수 있어 향후 flavonoid의 항산화, 항노화 소재로의 활용 가능성에 도움이 될 것으로 기대한다.

References

1. J. I. Lee, J. H. Oh, S. Y. Park, H. R. Kim, K. I. Jeong, B. J. Jeon, D. M. Kim, C. S. Gong, "UV-induced Photodamage - attenuating Properties of Water Extract from *Lentinula edodes*", *Journal of Life Science*, Vol.30, No.10 pp. 877-885, (2020).
2. P. Pittayapruek, J. Meephansan, O. Prapapan, M. Komine, M. Ohtsuki, "Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis", *International Journal Of Molecular Sciences*, Vol.17, No.6 pp. 868-888, (2016).
3. F. Rosso, A. Giordano, M. Barbarisi, A. Barbarisi, "From cell-ECM interactions to tissue engineering", *Journal of Cellular Physiology*, Vol.199, No.2 pp. 174-180, (2004).
4. J. H. Lee, H. W. Kim, "Tissue Regeneration and Importance of Extracellular Matrices (ECMs)", *Journal of biochemistry & molecular biology*, Vol.31, No.3 pp. 40-48, (2011).
5. K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner, "Collagens structure, function, and biosynthesis", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.55, No.12 pp. 1531-1546, (2003).
6. C. L. Phillips, S. B. Combs, S. R. Pinnell, "Effects of ascorbic acid on proliferation and collagen synthesis in relation to the donor age of human dermal fibroblasts", *Journal Of Investigative Dermatology*, Vol.103, No.2 pp. 228-232, (1994).
7. E. R. Lee, G. H. Kang, Y. J. Kang, W. Y. Kim, H. Y. Choi, B. W. Kim, H. S. Jeong, S. G. Cho, "Regulation of Cellular Signal Transduction by Flavonoids", *Journal of Cancer Prevention*, Vol.12, No.3 pp. 163-173, (2007).
8. J. W. Kim, J. S. Moon, T. B. Choi, "Comparison of Antioxidant Activity of Kenaf Extract and its Flavonoids", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.12, No.2 pp. 203-210, (2014).
9. M. Venigalla, S. Sonogo, E. Gyengesi, G. Münch, "Curcumin and Apigenin - novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease", *Neural Regeneration Research*, Vol.10, No.8 pp. 1181-1185, (2015).
10. Q. Zhang, M. M. Zhou, P. L. Chen, Y.

- Y. Cao, X. L. Tan, "Optimization of Ultrasonic Assisted Enzymatic Hydrolysis for the Extraction of Luteolin and Apigenin from Celery", *Journal of Food Science*, Vol.76, No.5 pp. 680-685, (2011).
11. N. Y. Kim, J. S. Mun, T. B. Choi, "Effect of *Scutellaria baicalensis* extract metalloproteinase-1 on the expression of UV-Birradiated human dermal fibroblast", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.11, No.4 pp. 649-654, (2013).
 12. J. E. Lee, S. Y. Park, "Review of the Usability of Cyclodextrin as a Cosmetic Ingredient", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.17, No.4 pp. 545-553, (2019).
 13. S. G. Choi, J. Y. Youn, K. R. Kim, D. H. Joo, S. H. Shin, J. J. Lee, H. K. Lee, I. S. An, S. B. Kwon, H. J. Youn, K. J. Ahn, S. K. An, H. J. Cha, "Apigenin inhibits UVA-induced cytotoxicity in vitro and prevents signs of skin aging in vivo." *International Journal of Molecular Medicine*, Vol.38, No.2 pp.627-634, (2016).
 14. G. J. Fisher, Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, J. J. Voorhees, "Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light." *New England Journal of Medicine*, Vol.337, No.20 pp. 1419-1428, (1997).
 15. J. M. Jeong, "The protect effect of *Alpinia officinarum* hance extract against UVB-induced skin aging." Master's thesis, Incheon University Graduate School, Incheon. p.17, (2019).
 16. J. E. Lee, S. Y. Park, "Effects of Flavonoids on Skin according to Their Structural Characteristics: A Review" *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.20, No.1 pp. 133-143, (2022).
 17. T. M. Magin, P. Vijayaraj, R. E. Leube, "Structural and regulatory functions of keratins." *Experimental Cell Research*, Vol.313, No.10 pp. 2021-2053, (2007).
 18. J. D. Rotty, P. A. Coulombe, "A wound-induced keratin inhibits Src activity during keratinocyte migration and tissue repair." *The Journal of Cell Biology*, Vol.197, No.3 pp. 381-389, (2012).
 19. K. Abeyama, W. Eng, J. V. Jester, A. A. Vink, D. Edelbaum, C. J. Cockerell, P. R. Bergstresser, A. Takashima, "A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in Sunburn." *Journal Of Clinical Investigation*, Vol.105, No.12 pp. 1751-1760, (2000).
 20. D. Jelić, A. D. Lower-Nedza, A. H. Brantner, B. Blažeković, B. Bian, J. Yang, K. Brajša, S. V. Knežević, "Baicalin and Baicalein Inhibit Src Tyrosine Kinase and Production of IL-6." *Journal of chemistry*, Vol.2016 pp. 1-6, (2016).
 21. K. Turksen, T. Kupper, L. Degenstein, I. Williams, E. Fuchs, "Interleukin 6: Insights to Its Function in Skin by Overexpression in Transgenic Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.89, No.11 pp. 5068-5072, (1992).