

각질형성세포에서 왕불유행 핵산 분획물이 Laminin-332 발현에 미치는 효과

송혜진[†] · 김미선 · 이홍구 · 진무현 · 이상화

(주)LG생활건강 기술연구원
(2016년 4월 20일 접수, 2016년 6월 20일 수정, 2016년 6월 23일 채택)

Hexane Fraction of *Melandrium firmum* Extract Induces Laminin-332 Expression in Human Keratinocyte

Hye Jin Song[†], Mi-Sun Kim, Hong Gu Lee, Mu Hyun Jin, and Sang Hwa Lee

R&D Center, LG Household & Healthcare, Ltd., 175 Gajeong-Ro, Yuseong-Gu, Daejeon 34114, Korea
(Received April 20, 2016; Revised June 20, 2016; Accepted June 23, 2016)

요약: 피부 기저막(basement membrane, BM)이란 표피와 진피 사이에 존재하는 특별한 구조물로 표피와 진피를 단단히 고정시켜 피부 구조를 유지하는 데에 중요한 역할을 수행한다. 노화 및 자외선 노출에 의한 피부 기저막의 구조적 변화와 파괴는 피부 주름 형성과 탄력 저하를 포함하는 피부노화 현상의 요인으로 여겨지고 있다. Laminin-332 (LN-332)는 피부 기저막을 구성하는 주성분으로 피부에서 표피와 진피를 단단히 고정시키는데 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 왕불유행 핵산 분획물(*Melandrium firmum* hexane fraction, MFHF)이 각질형성세포에서 LN-332 발현에 미치는 효과를 확인하였다. 정량적 real-time PCR (RT-PCR)과 단백질 발현 분석을 통해서 MFHF가 LN-332의 mRNA 발현 및 단백질 발현을 촉진시키는 것을 확인하였다. 또한 MFHF가 어떤 신호전달 경로를 통해 LN-332 발현을 조절하는지 확인하기 위하여 p38 MAPK 억제제인 SB202190과 ERK1/2 억제제인 U0126을 처리한 결과, p38 MAPK 억제제에 의해서 LN-332 발현이 완벽히 억제됨을 확인하였다. 또한, 피부 기저막을 구성하고 있는 콜라겐 타입 VII과 integrin $\alpha 6$ 의 mRNA 발현 역시 MFHF에 의해 증가하는 것을 확인하였다. 우리는 본 연구를 통해 MFHF가 각질형성세포에 작용하여 피부 기저막을 구성하는 성분들의 생성을 촉진할 수 있는 소재로 작용할 수 있다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 기저막의 구조적, 기능적 이상에 의해 나타나는 피부노화 현상의 개선을 위해 활용할 수 있을 것이라 제안한다.

Abstract: Skin basement membrane (BM) is a specialized structure that binds dermis and epidermis of the skin and plays an important role in maintaining skin structure. Structural change and destruction of BM is reported to appear due to UV exposure and aging, which may contribute to skin aging including wrinkle formation and a decrease in elasticity of the skin. One of the key components of the BM is laminin-332 (LN-332), and is a major contributor to epidermal-dermal attachment. In this study, we elucidated the effects of *Melandrium firmum* hexane fraction (MFHF) on LN-332 expression in HaCaT, a human keratinocyte cell line. Quantitative real-time PCR (RT-PCR) and immunoblot analysis revealed that MFHF induced upregulation of LN-332 gene and protein expression. Next, cells were treated with p38 MAPK inhibitor (SB202190) prior to MFHF treatment to analyze the signaling pathway contributing to LN-332 expression. The mRNA and protein levels of LN-332 expression were suppressed completely by pretreatment with p38 MAPK inhibitor. Furthermore, MFHF also increased the mRNA level of collagen type VII and integrin $\alpha 6$ of skin BM component. These results collectively suggest that MFHF may have potential as an effective agent to stimulate the synthesis of BM components, and could be used to improve phenomenon of skin aging ascribed to the structural and functional impairments of BM in aged human skin.

Keywords: basement membrane, laminin-332, *Melandrium firmum*, skin aging

[†] 주 저자 (e-mail: hjjudy@lgcare.com)
call: 042)860-8727

1. 서 론

피부는 우리 몸을 둘러싸고 있는 가장 크고 복잡한 조직으로서 외부의 자극이나 균의 침입을 막고 체온을 조절하고 수분을 유지하는 등 다양한 기능을 수행한다. 피부는 표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있으며 [1-3], 표피와 진피 사이에는 피부 기저막(basement membrane)이란 특별한 구조가 표피와 진피를 구분 짓고 있다[4].

기저막은 피부에서 다양한 기능을 수행하고 있으며, 가장 중요한 역할은 표피와 진피를 단단히 고정시켜 피부의 강직함과 견고함(integrity)을 유지하는 것이다. 그 이외에 표피와 진피에 존재하는 서로 다른 세포 사이나 세포와 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 사이의 물리적인 장벽 역할, 표피와 진피 두 층 간의 선택적인 투과 기능 및 커뮤니케이션의 조절, 그리고 세포의 기능을 조절하는 등 다양한 역할을 수행한다 [4-10]. 피부 기저막을 구성하고 있는 주요성분으로는 콜라겐 타입 IV, laminin-332 (LN-332), 콜라겐 타입 VII, 페레칸(perlecan), 니도젠(nidogen) 등이며, 이런 성분들이 서로 그물 형태의 구조를 형성하고 있다 [11,12].

피부 노화는 내인성 및 외인성 기전이 복합적으로 작용하여 구조적, 기능적 혹은 생화학적 변화를 초래하는데, 그중 가장 대표적인 피부 노화 현상은 주름 형성 및 탄력 감소이다[1-3]. 피부 주름의 증가와 탄력 감소는 진피 내에 존재하는 세포외기질의 변형 및 감소로 인해 발생된다는 사실은 잘 알려져 있으나 표피와 진피 사이에 존재하는 기저막의 구조적, 기능적 변화 또한 피부 노화에 관여한다고 알려져 있다[5,6,11].

나이는 사람의 피부에서는 피부 기저막의 손상 및 파괴가 보고되었으며, 20대 젊은 사람의 피부에서도 자외선에 노출된 얼굴과 같은 피부에서는 기저막이 손상된 것이 보고되었다[12,13]. 피부 기저막의 구조적 형태 및 기능적 변화는 피부 기저막의 구성 성분들을 분해시키는 plasmin과 MMPs와 같은 단백질 분해 효소들의 활성이 자외선에 의해서 증가하여 기저막 구성성분들이 파괴되기 때문이며[6,12-14], 나이가 증가함에 따라 기저막 구성 성분들의 발현 또한 감소하기 때문이다[5]. 구체적으로, 콜라겐 타입 IV의 발현은 태아 섬유아세포에서는 높은 수준으로 발현되고 있지만 나이

가 증가함에 따라 크게 감소하며[15], 콜라겐 타입 VII 역시 사람 피부 세포에서 나이에 따라 발현이 감소되어 TGF- β 와 같은 콜라겐 생성을 유도하는 자극원에 의해서도 더 이상 반응하지 않는 등 생성 촉진이 저하됨이 보고되었다[16]. 또한 LN-332도 신피질(renal cortex)의 기저막에서 나이에 따라 발현이 감소하며[17], 사람의 피부 세포에서도 30대에 비해 60대 피부에서 LN-332의 발현이 감소된다는 보고가 있다[5]. 이러한 피부 기저막 구성성분의 분해 및 생성 감소에 따른 피부 기저막의 손상은 피부에서의 주름 형성이나 탄력 저하 등과 같은 피부 노화의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨지고 있다. 따라서 피부 노화를 예방하는 방법의 하나로 피부 기저막을 구성하고 있는 성분들의 발현을 증가시키는 물질들을 발굴하고자 하는 노력들이 다수 보고되고 있다[5,6,11,12,18,19].

라미닌(laminin, LN)은 세포 밖으로 분비되는 heterotrimeric glycoprotein으로 α , β , γ 세 개의 chain으로 구성되어 있다. 현재까지 보고된 바에 의하면, 5종의 α chain, 3종의 β , γ chain이 각각 존재하며, 세 가지 chain의 조합에 의해 적어도 16종의 다른 LN isoform이 존재한다. 이 중 LN-332는 피부 기저막을 이루는 주요 구성 성분으로서 표피와 진피를 단단히 고정시켜 표피와 진피 사이에 안정성을 부여하는데 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[20-22]. LN-332는 세포 밖으로 분비되는 당단백질(glycoprotein)로 각각 LAMA3, LAMB3, LAMC2 세 개의 다른 유전자에서 발현되는 $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$ chain으로 이루어진 heterotrimer 형태로 기저막에 존재하고 있다[4,20-23]. 또한 LN-332는 두 개의 기능적 도메인을 포함하고 있어 표피 쪽으로는 integrin $\alpha 6\beta 4$ 와, 진피 쪽으로는 콜라겐 타입 VII과 직접적으로 결합하고 있다[4,21-24]. 표피가 진피로부터 박리되어 수포가 생기는 질병인 수포성 표피박리증(epidermolysis bullosa)의 원인이 LN-332의 유전자에 생기는 돌연변이라는 연구 결과[25,26], 역시 표피와 진피의 고정에 있어서 LN-332의 역할이 중요함을 보여준다. 인공피부 모델에서도 외부에서 LN-332를 투여하면 피부 기저막의 assembly가 촉진된다는 보고가 있으며[4], 손상 입은 피부에서도 LN-332가 생성되면서 표피와 진피를 부착시켜 손상 부위의 재생이 촉진된다는 연구 결과 또한 보고된 바 있다[27].

우리는 본 연구에서 LN-332의 생성 촉진을 유도

하는 물질을 천연물로부터 확인하고자, 100여 종의 약용식물 추출물을 대상으로 스크리닝(screening)을 실시하였고, 이 중 효과가 가장 우수하였던 왕불유행(*Melandrium firmum*, *M. firmum*)을 연구대상 식물로 선정하여 연구를 진행하였다. 왕불유행은 패랭이꽃과에 속하는 이년생 초본인 장구채 및 애기 장구채의 종자로서 진통, 지혈, 최생, 하유소종 및 혈액순환에 효능이 있다고 알려져 있으며[28], 최근 연구에서는 항산화 물질로 알려진 linarin, schaftoside, orientin, homoorientin 등이 함유되어 있어[29], 항산화 효능을 보이는 것으로 보고되고 있다[30]. 그러나 지금까지 왕불유행에 대한 기초 연구는 많이 이루어지지 않고 있으며, 특히 피부세포에서의 효능 연구는 보고되지 않았다.

우리는 본 연구에서 왕불유행 추출물을 분획으로 나누고 그 분획 중에서 가장 효능이 우수한 핵산 분획물에 대하여 LN-332의 발현 변화에 미치는 영향 및 그 신호전달 경로를 각질형성세포에서 조사하였다. 또한 왕불유행 추출 분획물이 LN-332와 직접적으로 결합하고 있는 피부 기저막 구성 성분인 콜라겐 타입 VII과 integrin $\alpha 6$ 의 발현에 미치는 영향도 조사하였다. 그 결과 왕불유행 핵산 분획물(*M. firmum* hexane fraction, MFHF)이 피부 기저막을 구성하고 있는 주요 성분들의 발현을 촉진시킴으로써 피부 항노화를 위한 후보 소재로서 활용 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 시약 및 기기

본 실험에서 사용한 왕불유행은 휴먼허브(Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위해서 사용한 배지는 Gibco BRL (USA)로부터 구입하여 사용하였다. Cell Counting Kit (CCK-8)은 Dojindo Lab. (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 laminin- $\alpha 3$ (LN- $\alpha 3$) chain, laminin- $\beta 3$ (LN- $\beta 3$) chain 항체 및 2차 항체인 HRP-conjugated anti-rabbit IgG는 Abcam (USA)에서 구입하여 사용하였고, laminin- $\gamma 2$ (LN- $\gamma 2$) chain, β -actin 항체 및 2차 항체인 HRP-conjugated anti-goat IgG는 Santa Cruz (USA)에서 구입하여 사용하였다. SB202190 및 U0126은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 왕불유행 추출 및 분획

왕불유행 전초 1 kg에 메탄올 10 L를 가하여 4일간 냉침하여 추출하였다. 이를 여과해 얻은 추출액을 감압 농축하여 메탄올 추출물(102 g)을 얻었다. 얻어진 추출물을 증류수 1 L로 현탁시켜 동량의 n-hexane을 가하여 진탕 방치하여 분획하고, 순차적으로 methylene chloride (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (BuOH)을 가하여 진탕 방치하여 각각의 분획물을 얻었다.

2.3. 세포 배양

사람의 각질형성세포주인 HaCaT 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 50 U/mL, streptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%의 CO_2 가 공급되는 배양기에서 배양하였다.

2.4. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 CCK-8 kit를 이용하여 제조사가 제공한 프로토콜에 따라 측정하였다. 96-well에 키운 HaCaT 세포에 왕불유행 분획물들을 24 h 처리한 후 CCK-8 용액을 넣고 2 h 처리한 후 ELISA reader (Bio-tech Instruments Inc., USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 정량적 Real-Time PCR (RT-PCR)

HaCaT 세포를 4×10^5 cells/well 농도로 6-well plate에 접종하고 다음날 serum-free 배지로 교환하고 여기에 여러 농도(2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 왕불유행 분획물을 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 세포로부터 RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 total RNA를 추출한 뒤, 1 μg 의 RNA를 cDNA Synthesis kit (PhileKorea, Korea)를 이용하여 역전사(reverse transcription)시켰다. 역전사 반응은 Mycycler[®] PCR 기기 (Biorad, USA)를 이용하여 수행하였다. 합성된 cDNA를 Taqman universal master mix (USA)와 유전자 특이적인 probe와 반응시켜 StepOnePlus[™] RT-PCR system (Applied biosystems, USA)을 이용하여 유전자 발현의 변화를 측정하였다. RT-PCR에 사용된 probe는 GAPDH, LN- $\alpha 3$ chain (LAMA3), LN- $\beta 3$ chain (LAMB3), LN- $\gamma 2$ chain (LAMC2), collagen type VII

(COL7A1), integrin $\alpha 6$ (ITGA6)이다. RT-PCR을 통해 얻은 실험 결과는 housekeeping 유전자인 GAPDH를 기준으로 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 식으로부터 계산하여 상대적 값으로 나타내었다.

2.6. Western Blot법

HaCaT 세포를 60 mm plate에 8×10^5 cells 농도로 접종하고, 다음날 MFHF를 처리한 다음 24 h 동안 배양한 후 세포를 M-PER mammalian protein extraction reagent (Pierce, USA)로 용출시켜 단백질을 얻었다. 4 ~ 15% SDS-PAGE gel (Novex, USA)에 동량의 단백질을 loading하고 전기영동 후 nitrocellulose membrane으로 단백질을 이동시켰다. Membrane을 5% nonfat skim milk를 함유한 TBST buffer로 1 h 동안 blocking한 뒤, 1차 항체인 LN- $\alpha 3$ chain, $\beta 3$ chain, $\gamma 2$ chain 및 β -actin으로 4 °C에서 반응시켰다. 다음날 TBST로 3회 washing 후 2차 항체인 HRP-conjugated anti-rabbit IgG, anti-goat IgG와 반응시켰다(1 : 5000). 1 h 후 TBST로 씻어준 다음, ECL prime kit (Amersham, UK)를 사용하여 반응시키고, Fusion FX 5 image system (Vilber Lourmat, France)을 이용하여 immuno-reactive band를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 왕불유행 분획물의 세포 생존율 확인

우리는 LN-332 mRNA 발현을 증가시키는 천연물을 스크리닝하기 위해 100여 종의 천연물을 대상으로 각 질형성세포에서 LN-332의 $\alpha 3$ chain mRNA 발현 변화를 분석하였다. LN- $\alpha 3$ chain에 대한 정량적 RT-PCR 결과, 왕불유행 추출물이 LN- $\alpha 3$ chain의 mRNA 발현을 확연히 증가시키는 것을 확인하였다. 다음으로 왕불유행 추출물의 어떠한 분획물에서 LN- $\alpha 3$ 의 발현 증가 효능이 나타나는지 알아보기 위해 왕불유행 추출물을 n-hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc, n-BuOH, 물로 용매 분획을 실시하였다. 얻어진 분획물의 세포독성을 CCK-8 assay를 통해 측정하고 세포 생존율을 확인함으로써 향후 실험에 사용될 농도 범위를 결정하였다(Figure 1). HaCaT 세포를 24 h 배양한 후 왕불유행 추출물의 헥산 분획, CH_2Cl_2 분획, EtOAc 분획, BuOH 분획, 물 분획으로 얻어진 분획물들을 각각 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로

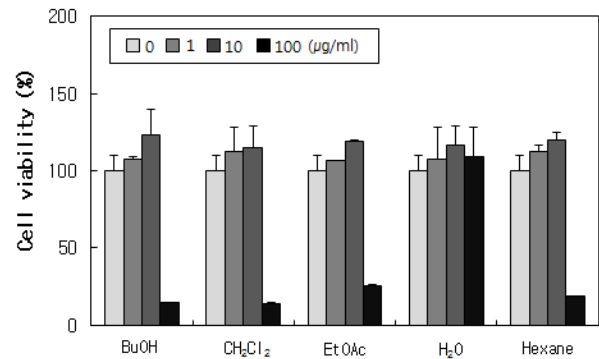


Figure 1. Effect of *M. firmum* extract fractions on cell viability. Cells were treated with various concentration (0 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$) of *M. firmum* extract fractions. Cell viability was measured by CCK-8 assay. The results are expressed as the means \pm S.D. of three experiments.

serum-free 배지에 24 h 처리한 뒤 세포 생존율을 확인하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 물 분획을 제외하고 나머지 4개의 분획물에서 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 독성이 나타났기 때문에 모든 분획물에서 독성을 나타내지 않는 10 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 다음 실험을 진행하였다.

3.2. 왕불유행 분획물이 LN- $\alpha 3$ Chain 발현에 미치는 효과

먼저 왕불유행의 어떤 분획이 LN- $\alpha 3$ mRNA의 발현량을 증가시키는지 알아보기 위하여 HaCaT 세포에 왕불유행 추출물로부터 얻은 5개의 분획물을 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 24 h 처리한 뒤 정량적 hPCR를 수행하였다. 어떤 처리도 하지 않은 음성 대조군의 LN- $\alpha 3$ mRNA 발현량을 기준하여 왕불유행 분획물을 처리한 각 실험군의 LN- $\alpha 3$ mRNA 발현량을 relative ratio로 수치화하여 분석하였다. 그 결과 Figure 2에서 보는 바와 같이, 음성 대조군 대비 CH_2Cl_2 분획물과 헥산 분획물에서 LN- $\alpha 3$ mRNA 발현이 두 배 이상 증가를 보였고, 그중 헥산 분획물이 음성 대조군 대비 4.3배의 높은 증가를 보여 분획물 중 LN- $\alpha 3$ mRNA 발현 증가를 가장 확연히 유도하였다. 이 실험 결과를 통해 왕불유행 추출물 분획 중 헥산 분획물(MFHF)이 가장 우수한 LN- $\alpha 3$ mRNA 발현 증가 효능을 가진 분획물임을 알 수 있었다.

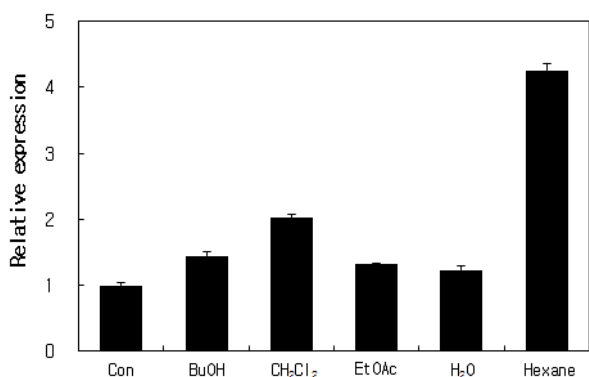


Figure 2. Effect of *M. firmum* extract fractions on the mRNA expression of LN- α 3 chain in HaCaT cells. HaCaT cells were treated with 10 μ g/mL of each fraction of *M. firmum* extract for 24 h. The mRNA expression level of LN- α 3 chain was measured and analyzed using quantitative hPCR with GAPDH as an internal control. The expression level was presented as relative ratio to non-treated control. Results are expressed as the means \pm S.D. of three experiments. LAMA3, gene of LN- α 3 chain.

3.3. 왕불유행 핵산 분획물(MFHF)이 LN-332의 발현에 미치는 효과

우리는 LN- α 3의 mRNA 발현 증가 분석에서 가장 뛰어난 효능을 나타낸 MFHF가 LN-332를 구성하는 나머지 두 개의 chain인 β 3, γ 2 chain에 대해서도 발현 증가 효능을 보이는지 알아보기 위해, MFHF 처리에 의한 각각의 시간별, 농도별 발현 변화를 분석하였다. 먼저, MFHF의 농도를 10 μ g/mL로 고정된 후 다양한 시간에서 LN-332의 mRNA 발현량을 분석하여 그 결과를 Figure 3A에서 보여주었다. 결과를 보면 α 3, β 3, γ 2에 해당하는 LAMA3, LAMB3, LAMC2의 세 유전자의 mRNA 발현 변화 모두 물질 처리 후 12 h부터 증가하기 시작하여 24 h에 최대치를 이루었고 그 이후로 감소하는 발현 양상을 보였다. 다음으로 MFHF 처리 농도별 효능을 알아보기 위하여 Figure 3A에서 발현 변화가 가장 높았던 24 h으로 처리 시간을 고정하고 MFHF 농도(2.5, 5, 10 μ g/mL)에 따른 발현 정도를 분석하였다. Figure 3B에서 보듯이 MFHF를 10 μ g/mL 처리했을 때, LAMA3, LAMB3 및 LAMC2 유전자 발현이 음성 대조군 대비, 각각 3.5배, 1.7배, 3.9배 증가하였다. LAMA3와 LAMC2 두 유전자에서 MFHF에 의한 확인한 농도 의존적 mRNA 발현 변화가 관찰되었으며, LAMB3의

경우 나머지 두 개 chain에 비해 MFHF에 의한 낮은 발현 변화를 보였다. 앞선 유전자 수준의 결과를 단백질 수준에서 다시 확인하기 위해, MFHF 10 μ g/mL을 24 h 처리한 세포에서 단백질을 얻고 western blot을 실시하여 단백질 발현 변화를 확인하였으며, Figure 3C에 그 결과를 나타내었다. 결과에서 보듯 MFHF 처리에 의해 LN- α 3, LN- β 3, LN- γ 2 chain의 단백질 발현에서도 LN- β 3 chain의 발현 증가는 미미한 반면, LN- α 3와 LN- γ 2 chain의 발현은 확연히 증가되었고, 이 결과는 mRNA 발현 양상과 일치함을 알 수 있었다.

3.4. MFHF에 의한 LN-332 발현 변화 시 p38 MAPK 활성이 미치는 효과

LN 발현 변화에 관여하고 있는 세포 내 신호전달에 대한 연구는 활발하지 않으나 최근 retinal pigmented epithelial (RPE) 세포에서 ERK1/2와 p38 MAPK 활성을 통해 LN 발현이 증가됨이 보고되었다 [31]. 따라서 우리는 MFHF에 의한 LN-332의 발현 증가에 관여하고 있는 세포 내 신호전달을 규명하기 위해 MAPK 활성 억제제들을 이용하여 다음 실험을 진행하였다. HaCaT 세포에 MAPK 억제제를 30 min 전 처리한 다음, MFHF 10 μ g/mL로 24 h 동안 반응시키고 hPCR 및 western blot 분석법을 통해 LN-332의 발현 변화에 미치는 효능을 분석하였다. 그 결과 MFHF에 의해 발현 증가가 유도되었던 LN- α 3 chain과 LN- γ 2 chain의 발현 증가는 p38 MAPK 억제제인 SB202190에 의해서 완벽히 억제되어 음성대조군 수준과 유사하게 나타났고(Figure 4), ERK1/2 억제제인 U0126 전처리에 의해서는 확인한 발현 억제가 관찰되지 않았다(data not shown). MFHF에 의해 유도된 LAMA3와 LAMC2 유전자 발현 증가는 p38 MAPK 억제제에 의해 각각 93.1%, 72.5%의 억제율을 보였으며(Figure 4A), LN- α 3 chain과 LN- γ 2 chain의 단백질 발현 증가는 p38 MAPK 억제에 의해 완벽하게 억제되었다(Figure 4B). 이러한 결과는 MFHF가 p38 MAPK activation 경로를 통하여 LN-332의 발현을 증가시킨다는 것을 보여준다.

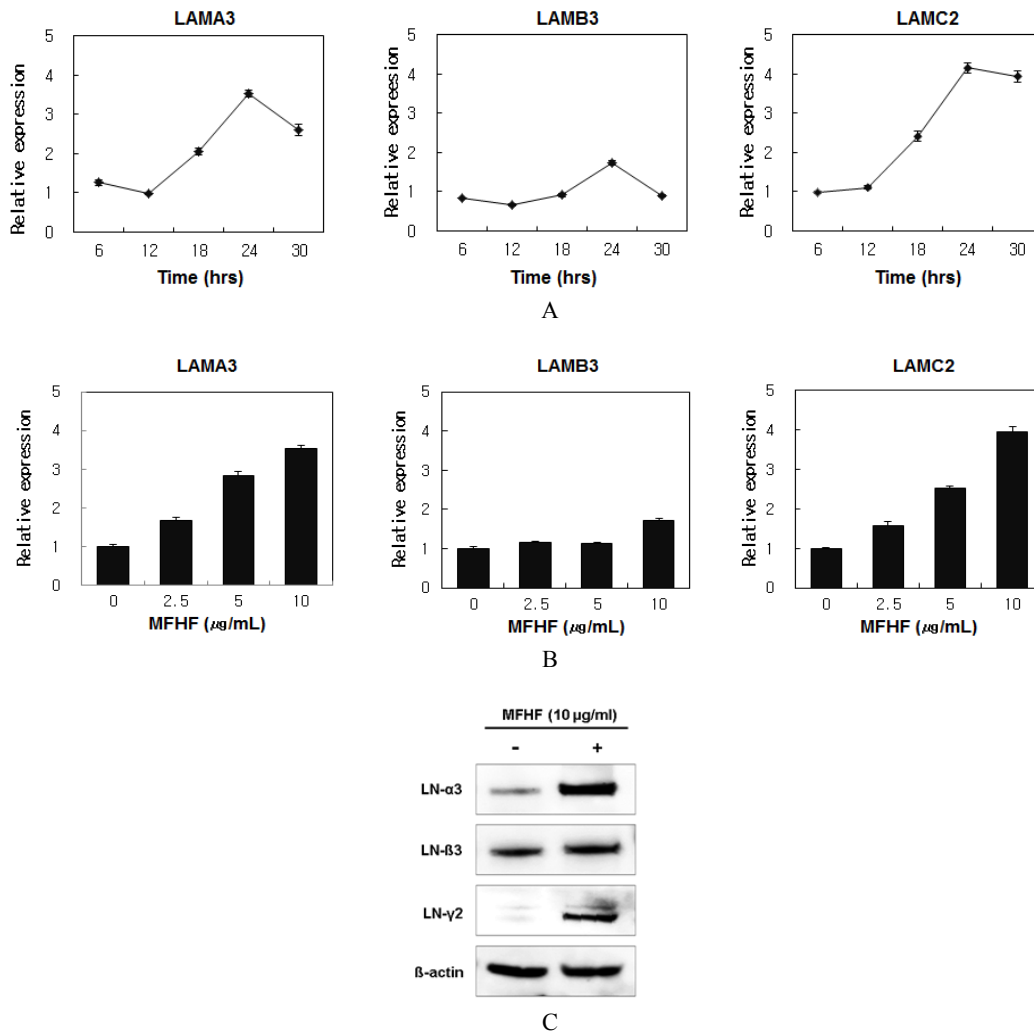


Figure 3. Effect of MFHF on the expression of LN-332. (A) Time course analysis of LN-332 mRNA expression in HaCaT cells. Cells were treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ of MFHF for indicated times. The mRNA expression level of LN- α 3, N- β 3, and LN- γ 2 chains at each time point represents the fold differences compared with the untreated control at the same time point. (B) Dose-dependent analysis of LN-332 mRNA expression in HaCaT cells. Cells were treated with the indicated concentrations of MFHF for 24 h. The mRNA expression of LN- α 3, LN- β 3, and LN- γ 2 chains was analysed by quantitative RT-PCR using probes specific to human LAMA3, LAMB3, LAMC2 genes. The mRNA expression levels of each LN-332 gene were normalized against the expression level of GAPDH. (C) Representative immunoblot bands are shown as protein level of each 3 chain of LN-332 in cell lysates treated with 10 $\mu\text{g/mL}$ of MFHF for 24 h. LN- α 3: laminin- α 3 chain, LN- β 3: laminin- β 3 chain, LN- γ 2: laminin- γ 2 chain

3.5. MFHF가 콜라겐 타입 VII 및 Integrin α 6 발현에 미치는 효과

피부 기저막에서 LN- α 3 chain의 C-terminal 말단에는 5개의 laminin globular (LG) domain인 LG1-5가 존재하며, 이 중 LG1-3가 integrin α 6 β 4와 결합하고 있다 [23,32]. 반대쪽 LN-322의 N-terminal은 콜라겐 타입 VII과 직접적으로 결합하여 anchoring filament를 이루

고 있다[22,33]. 따라서 우리는 추가적으로 MFHF가 LN과 직접적으로 결합하고 있는 콜라겐 타입 VII과 integrin α 6 β 4의 발현에도 영향을 주는지 알아보기 위해 정량적 hPCR을 이용하여 발현 변화를 확인해 보았다(Figure 5). MFHF 10 $\mu\text{g/mL}$ 을 세포에 처리했을 때 콜라겐 타입 VII의 경우 음성 대조군 대비 1.6배, integrin α 6의 경우 1.7배 만큼 유전자 발현양이 증가하

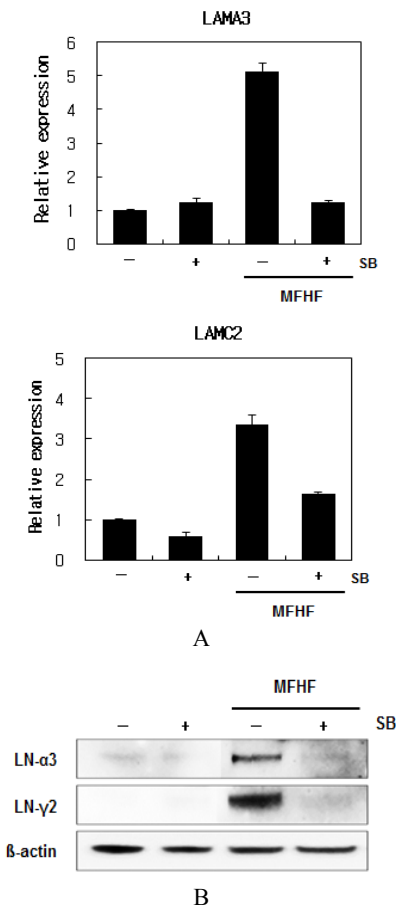


Figure 4. Involvement of p38 MAPK activation in MFHF-induced LN-332 upregulation. (A) Effect of SB202190 on MFHF-induced LN-332 mRNA expression. HaCaT cells were treated for 30 mins with 10 μ M of SB202190 prior to 10 μ g/mL of MFHF treatment. After 24 h incubation, total RNA was extracted and mRNA expression of LN- α 3 and LN- γ 2 chains was analysed by quantitative RT-PCR using probes specific to human LAMA3 and LAMC2 genes. The mRNA expression level of each gene was normalized against the expression level of GAPDH. (B) Cells were pretreated with SB202190 (10 μ M) and then detected by western blotting at 24 h after MFHF treatment. Bands were shown as protein level of LN- α 3 chain and LN- γ 2 chain in cell lysates. SB: SB202190, LN- α 3: laminin- α 3 chain, LN- γ 2: laminin- γ 2 chain

였고, 모두 농도 의존적 경향을 나타내었다. 그러나 MFHF의 처리에 의해서 integrin β 4의 발현에는 변화가 없었다(data not shown).

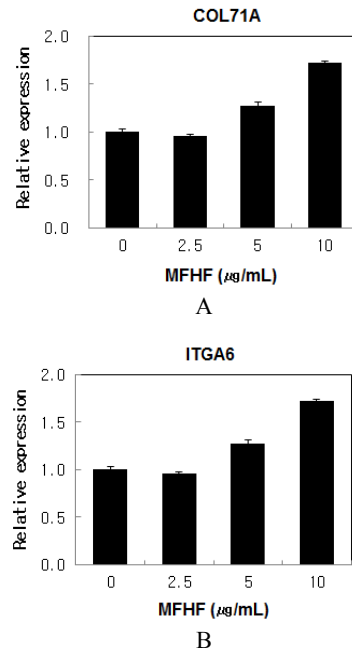


Figure 5. Effect of MFHF on the mRNA expression of collagen type VII and integrin α 6 in HaCaT cells. Cells were treated with indicated concentration of MFHF for 24 h. The mRNA expression level of collagen type VII and integrin α 6 was measured and analyzed using quantitative RT-PCR with GAPDH as internal control. The expression level was presented as relative ratio to non-treated control. Results are the means \pm S.D. of three experiments. COL71A: collagen type VII, ITGA6: integrin α 6

4. 결 론

내인성 및 외인성 요인에 의한 피부 기저막의 파괴 및 손상에 의해 주름 형성, 탄력 감소와 같은 피부노화가 유발될 수 있으므로 피부 기저막을 구성하고 있는 LN-332, 콜라겐 타입 VII, 콜라겐 IV와 같은 성분들의 생성을 촉진하여 기저막을 회복시켜주기 위한 물질들을 항노화 소재로 활용하기 위한 연구가 보고되고 있다[6,18,19]. 우리는 본 연구에서 피부 진피와 표피 사이의 부착 및 고정에 있어서 주요한 역할을 하는 LN-332의 발현을 증가시키는 성분을 찾고자 하였다. 그 결과 왕불유행 분획물 중 핵산 분획물(MFHF)이 HaCaT 세포에서 LN-332의 유전자 및 단백질 발현량을 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 MFHF에 의한 LN-332의 발현 증가가 p38 MAPK activation을 통한다는 사실을 확인하였다. 추가적으로 LN-332 뿐만 아니

라 기저막의 주요 구성 성분인 콜라겐 타입 VII 및 integrin $\alpha 6$ 의 발현 역시 MFHF에 의해 증가된다는 사실을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 MFHF가 피부 기저막의 주요 구성성분의 발현을 증가시켜 노화나 자외선 노출에 의한 피부 기저막의 구조적, 기능적 변화에 의해 나타나는 피부 노화 현상을 회복시키는데 도움을 줄 수 있는 소재로서 개발 가능성을 보여주었다. 향후 추가 효능 성분 분석 및 임상 연구 등을 통해 피부 항노화를 위한 역할을 규명한다면 피부 기저막 개선을 통한 항노화 소재로 개발될 수 있을 것이다.

Reference

1. J. H. Chung, Photoaging in asians, *Photodermatol. photoimmunol. photomed.*, **19**(3), 109 (2003).
2. G. J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees, Mechanism of photoaging and chronological skin aging, *Arch. Dermatol.*, **138**(11), 1462 (2002).
3. P. U. Giacomoni and G. Rein, Factors of skin ageing share common mechanisms, *Biogerontology*, **2**(4), 219 (2001).
4. T. Nishiyama, S. Amano, M. Tsunenaga, K. Kadoya, A. Takeda, E. Adachi, and R. E. Burgeson, The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane, *J. Dermatol. Sci.*, **25**, S51 (2000).
5. C. Reymermier, A. Guezennec, J. E. Branka, J. Guesnet, and E. Perrier, *In vitro* stimulation of synthesis of key DEJ constituents in a reconstructed skin model: a quantitative study, *Int. J. Cosmetic Sci.*, **25**(1-2), 55 (2003).
6. S. Amano, Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **14**(1), 2 (2009).
7. M. C. Ryan, A. M. Christiano, E. Engvall, U. M. Wewer, J. H. Miner, J. R. Sanes, and R. E. Burgeson, The functions of laminins: lessons from *in vivo* studies, *Matrix Biol.*, **15**(6), 369 (1996).
8. F. M. Watt, Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis, *J. Cell Biol.*, **98**(1), 16 (1984).
9. A. Bohnert, J. Hornung, I. C. Mackenzie, and N. E. Fusenig, Epithelial- mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and trasplanted mouse keratinocytes, *Cell Tissue Res.*, **244**(2), 413 (1986).
10. Y. Barrandon and H. Green, Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**(8), 2302 (1987).
11. K. Muta-Takada, T. Terada, H. Yamanishi, Y. Ashida, S. Inomata, T. Nishiyama, and S. Amano, Coenzyme Q10 protects against oxidative stress-induced cell death and enhances the synthesis of basement membrane components in dermal and epidermal cells, *Biofactors*, **35**(5), 435 (2009).
12. S. Amano, Basement membrane damage, a sign of skin early aging, and laminin 5, a key player in basement membrane care, *SCCJ.*, **35**(1), 1 (2001).
13. S. Amano, Y. Ogura, N. Akutsu, Y. Matsunaga, K. Kadoya, E. Adachi, and T. Nishiyama, Protective effect of matrix metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process, *Br. J. Dermatol.*, **153**(S2), 37 (2005).
14. Y. Ogura, Y. Matsunaga, S. T. Nishiyama, and S. Amano, Plasmin induces degradation and dysfunction of laminin 332 (laminin 5) and impaired assembly of basement membrane at the dermal-epidermal junctions, *Br. J. Dermatol.*, **159**(1), 49 (2008).
15. D. Olsen and J. Uitto, Differential expression of type IV procollagen and laminin genes by foetal vs adult skin fibroblasts in culture; determination of subunit mRNA steady state level, *J. Invest. Dermatol.*, **93**(1), 127 (1989).
16. Y. Chen, A. Mauviel, and J. Rynanen, Type VII collagen gene expression by human fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of donor age on cytokine response, *J. Invest. Dermatol.*, **102**(2), 205 (1994).
17. T. Karttunen, J. Risteli, H. Autio-Harmainen, and L. Risteli, Effect of age and diabetes on type IV colla-

- gen and laminin in human kidney cortex, *Kidney Int.*, **30**(4), 586 (1986).
18. M. Y. Seo, S. Y. Chung, W. K. Choi, Y. K. Seo, S. H. Jung, J. M. Park, M. J. Seo, J. K. Park, J. W. Kim, and C. S. Park, Anti-aging effect of rice wine in cultured human fibroblasts and keratinocytes, *J. Biosci. Bioeng.*, **107**(3), 266 (2009).
 19. J. Sok, N. Pineau, M. Dalko-Csiba, L. Breton, and F. Bernerd, Improvement of the dermal epidermal junction in human reconstructed skin by a new c-xylopyranoside derivative, *Eur. J. Dermatol.*, **18**(3), 297 (2008).
 20. M. Yamaguchi, N. Ebihara, N. Shima, M. Kimoto, T. Funaki, S. Yokoo, A. Murakami, and S. Yamagami, Adhesion, migration and proliferation of cultured human corneal endothelial cells by laminin-5, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **52**(2), 679 (2011).
 21. S. Amano, N. Akutsu, Y. Ogura, and T. Nishiyama, Increased of laminin 5 synthesis in human keratinocytes by acute wound fluid, inflammatory cytokines and growth factors, and lysophospholipids, *Br. J. Dermatol.*, **151**(5), 961 (2004).
 22. P. Rousselle, G. P. Lunstrum, D. R. Keene, and R. E. Burgeson, Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filament, *J. Cell Biol.*, **114**(3), 567 (1991).
 23. M. Aumailley, A. E. Khal, N. Knoss, and L. Tunggal, Laminin 5 processing and its integration into the ECM, *Matrix Biol.*, **22**(1), 49 (2003).
 24. M. F. Champlaud, G. P. Lunstrum, P. Rousselle, T. Nishiyama, D. R. Keene, and R. E. Burgeson, Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment, *J. Cell Biol.*, **132**(6), 1189 (1996).
 25. L. Pulkkinen, A. M. Christiano, T. Airene, H. Haakana, K. Tryggvason, and J. Uitto, Mutations in the gamma 2 chain gene (LAMC2) of kalinin/laminin 5 in the junctional forms of epidermolysis bullosa, *Nat. Genet.*, **6**(3), 293 (1994).
 26. D. F. Aberdam, J. Galliano, J. Vailly, L. Pulkkinen, J. Bonifas, A. M. Christiano, K. Tryggvason, J. Uitto, E. J. Epstein, J. P. Ortonne, and G. Meneguzzi, Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is linked to mutations in the gene for gamma 2 subunit of nicotin/kalinin (laminin-5), *Nat. Genet.*, **6**(3), 299 (1994).
 27. A. Takeda, K. Kadoya, N. Shioya, M. Tsunenaga, T. Nishiyama, S. Amono, and R. E. Burgeson, Pretreatment of human keratinocyte sheets with laminin 5 improves their grafting efficiency, *Invest. Dermatol.*, **113**(1), 38 (1999).
 28. K. H. Lee and S. I. Lee, Comparison of pharmacological effects of melandrii herba and semen in Korea, *Kyunghee Univ. Oriental. Med. J.*, **7**(1), 353 (1984).
 29. M. H. Lee, H. S. Han, and Y. J. Lee, Comparison studies on the hyperlipidemia of melandrii herba and vaccariae semen, *Kor. J. Herbology.*, **25**(3), 81 (2010).
 30. Y. K. Lee, B. O. Jung, and S. J. Chung, Antioxidant activity of water-soluble chitosan with *Melandrium firmum* extract, *J. Chitin. Chitosan.*, **19**(3), 201 (2014).
 31. N. Nagai, A. Klimava, W. H. Lee, K. Izumi-Nagai, and J. T. Handa, CTGF is increased in basal deposits and regulates matrix production through the ERK (p42/p44 mapk) MPAK and the p38 MAPK signaling pathways, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**(4), 1903 (2009).
 32. M. Yamada and K. Sekiguchi, Molecular basis of laminin-integrin interactions, *Curr. Top. Membr.*, **76**, 197 (2015).
 33. M. Chen, M. P. Marinkovich, A. Veis, X. Cai, C. N. Rao, E. A. O'Toole, and D. T. Woodley, Interaction of the amino-terminal noncollagenous (NC1) domain of type VII collagen with extracellular matrix components. A potential role in epidermal-dermal adherence in human skin, *J. Biol. Chem.*, **272**(23), 14516 (1997).