

메틸말리올라이드의 NRF2/ARE 유도를 통한 피부 세포 보호 효과

이 준·김기성*·이현기·박창호**·구민수**·김영삼[†]

동국대학교 약학과

*골드레벤

**태남메디코스

(2018년 7월 30일 접수, 2018년 11월 5일 수정, 2018년 11월 12일 채택)

Skin Protective Effect of Methylated Marliolide through Induction of NRF2/ARE

June Lee, Ki Seong Kim*, Hyun Gy Lee*, Changho Park**, Minsu Ku** and Young-Sam Keum[†]

College of Pharmacy, Dongguk University, 32 Dongguk-ro, Goyang, Gyeonggi-do 10326, Korea

(Received July 30, 2018; Revised November 5, 2018; Accepted November 12, 2018)

요약: 본 연구진은 메틸말리올라이드가 인간 피부 세포주인 HaCaT 세포에서 NRF2를 유도하고 이를 통하여 항산화 효과를 나타내는지 알아보았다. MTT assay를 통하여 메틸말리올라이드는 10 μ M 농도에서 24 h 동안 HaCaT 세포에 처리하여도 HaCaT 세포 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다. 본 연구진이 구축한 HaCaT-ARE-GFP-luciferase 세포에 메틸말리올라이드를 처리하고 루시페라아제 활성을 측정한 결과 메틸말리올라이드는 양성 대조군인 레스베라트롤보다 ARE 결합에 따른 루시페라아제 활성을 더욱 강하게 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 HaCaT 세포에 메틸말리올라이드 처리 시 NRF2에 의하여 유도되는 항산화 단백질인 HO-1과 NQO1 mRNA 및 단백질 발현이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 마지막으로 메틸말리올라이드는 HaCaT 세포에서 TPA에 의해서 유도된 DNA 및 지질의 산화를 강력하게 억제하였다. 결론적으로 본 연구는 메틸말리올라이드가 NRF2 유도를 통하여 피부 산화적 스트레스를 억제하며 이는 메틸말리올라이드가 신규 항산화 화장품의 소재로 적합하다는 것을 시사한다.

Abstract: In the present study, we have investigated whether methylated marliolide could induce NRF2 thereby exerting anti-oxidant effects. MTT assay showed that methylated marliolide did not exhibit cytotoxicity on HaCaT cells. Methylated marliolide induced a higher ARE-dependent luciferase activation in HaCaT ARE-GFP-luciferase cells, compared with resveratrol. In addition, exposure of methylated marliolide to HaCaT cells significantly induced NRF2 and transcriptionally activated HO-1 and NQO1, both of which are target genes of NRF2. Finally, methylated marliolide protected HaCaT cells against TPA-induced oxidative damages on nucleotides and lipids. Together, results shows that methylated marliolide could suppress oxidative damages through induction of NRF2 which implies that methylated marliolide might serve as a good candidate for novel cosmetic ingredient with anti-oxidant effects.

Keywords: Oxidative stress, NRF2 (NF-E2-related factor 2), ARE (antioxidant response element), methylated marliolide

1. 서 론

활성 산소는 산화적 스트레스를 유발하고 피부 노화 및 질환을 촉진하는 주요 인자이다[1]. 따라서 피부는 항상성 유지를 위하여 활성 산소를 제거해야 하고 이

[†] 주 저자 (e-mail: keum03@dongguk.edu)
call: 031)961-5215

를 위하여 두 가지 방법을 사용한다. 첫 번째로 피부는 항산화 기능을 갖는 비타민이나 단백질을 세포 내에 보관하고 활성 산소에 노출 시 이를 이용하여 활성 산소를 환원시킨다[2]. 두 번째로 피부 세포는 활성 산소 노출 시 항산화 기능을 갖는 다양한 효소의 전사 및 활성을 촉진하여 활성 산소를 효소 반응을 통하여 제거한다. 최근 선행 기전 연구를 통하여 두 번째로 기술한 항산화 효소의 전사를 조절하는 인자로 NRF2가 제시되었다[3].

활성 산소에 노출되지 않았을 때 NRF2는 세포질에서 KEAP1이라는 단백질에 의해 바로 제거된다. KEAP1은 Cullin3의 결합 단백질로서 NRF2 단백질 유비퀴틴화를 촉진한다. 하지만 세포가 산화적 스트레스에 노출되면 Cullin3와 KEAP1에 의한 NRF2의 유비퀴틴화는 저해되고 이후 NRF2가 세포질 내 축적된다. 축적된 NRF2는 바로 핵 내로 이동하고 ARE라고 하는 항산화 효소 단백질 프로모터에 존재하는 특이한 서열에 결합한다. 이후 ARE에 결합한 NRF2는 통하여 항산화 기능을 갖는 효소의 전사를 조절하여 활성 산소의 제거를 돕게 된다[4].

선행 연구를 통하여 NRF2 발현을 유도하는 다양한 항산화 화합물이 많이 발굴되었다[5]. 이러한 추세에 발맞춰 최근 본 연구진은 천연물인 말리올라이드가 강력한 NRF2 활성을 갖고 이를 통하여 피부암 예방 효과를 갖는 사실을 발견하였다[6]. 본 연구에서는 말리올라이드 유도체인 지용성을 높인 메틸말리올라이드가 피부 세포에서 NRF2를 유도하고 이를 통하여 항산화 효과를 보이는지 여부를 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

RPMI, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Welgene (Korea)에서 구입하여 사용하였다. Phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA)와 MTT 시약은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)에서 구입하여 사용하였다. NRF2, Actin, 8-OH-G 항체는 Santa Cruz biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였다. HO-1 항체는 Enzo Life Science (USA)에서 구입하여 사용하였다. 4-HNE와 NQO1 항체는 Abcam (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 세포배양

HaCaT 세포는 한국세포주은행(Korea)에서 구입하였다. HaCaT 세포는 RPMI에 10% FBS, penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 배지를 사용하였고 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 본 연구진이 이전에 확립하여 본 연구에 사용한 HaCaT-ARE-GFP-luciferase 세포 또한 HaCaT 세포와 동일한 조건으로 배양하였다.

2.3. MTT를 사용한 세포 독성 측정

HaCaT 세포를 96-well plate에 3×10^4 cells/well로 seeding 후 24 h 동안 배양하였다. 이후 메틸말리올라이드를 여러 농도로 24 h 동안 처리하고 세포를 PBS로 3회 씻은 후 200 μ M MTT 용액(5 mg/mL)을 well에 첨가하였다. MTT 용액을 4 h 처리 후 DMSO를 100 μ L 첨가하여 37 °C에서 30 min 동안 세포를 녹인 후 spectrophotometer를 이용 560 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 루시페라아제 활성 측정

본 연구진이 구축한 HaCaT-ARE-GFP-luciferase 세포를 24-well plate에 1×10^5 cells/well로 깔고 24 h 동안 배양하였다. 메틸말리올라이드와 레스베라트롤을 10 μ M 농도로 처리하고 12 h 또는 24 h 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 씻은 후 luciferase lysis buffer [0.1 M potassium phosphate buffer at pH 7.8, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 2 mM EDTA] 100 μ L로 세포를 30 min 동안 4 °C에서 용해하였다. Lysate를 얻어 GLOMAX Multi-system (Promega, Madison, USA)을 이용해서 루시페라아제를 측정하였다. 측정된 루시페라아제 값은 단백질 농도로 보정하였다.

2.5. 면역 형광법

HaCaT 세포를 cover glass를 부착한 24-well plate에 5×10^4 cells/well로 seeding 후 24 h 배양하였다. 이후 TPA (100 nM) 단독 또는 메틸말리올라이드를 같이 처리 후 4 h 또는 8 h 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 씻은 후 4% para-formaldehyde 250 μ L로 15 min 동안 세포를 고정한 후 면역형광 wash buffer 500 μ L로 30 min간 씻었다. 그 후 1차 항체를 4 °C에서 8 h 배양한 후 면역형광 wash buffer로 3회 씻은 후 DAPI와 fluorescein iso-

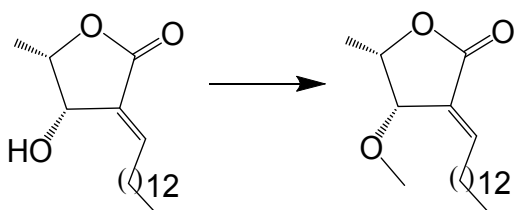


Figure 1. A single step synthesis of methylated marliolide from marliolide whose synthetic scheme was previously reported[8].

thiocyanate (FITC)-conjugated 된 rabbit 2차 항체 (Jackson-Immuno Research, USA)를 1 : 1,000 비율로 면역형광 wash buffer에 첨가시켜 4 h 동안 빛이 차단된 상태에 배양하였다. 최종 형광 이미지는 C2 confocal microscope (Nikon Korea, Korea)를 이용해 촬영하였다.

2.6. Western Blotting을 통한 단백질 발현 측정

HaCaT 세포를 100 mm 지름 plate에 1×10^6 개로 seeding 후 24 h 동안 배양하였다. 이후 메틸말리올라이드와 레스베라트롤을 $10 \mu\text{M}$ 농도로 정해진 h에 따라 처리하였다. 세포를 PBS로 3회 씻은 후 세포를 얻고 이를 원심 분리 후 $200 \mu\text{L}$ RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] 4°C 에서 1 h 동안 배양하여 단백질을 획득하였다. 단백질의 농도는 BCA protein assay kits (Thermo-Fisher Scientific, USA)를 이용해서 단백질의 농도를 측정하였다. 동량의 단백질을 12% SDS-PAGE에 전기영동 후 PVDF membrane에 transfer 이후 membrane을 blocking buffer (5% skin milk in 1x PBS-T)에 1 h 동안 4°C 에서 배양하였다. 1x PBS-T로 3회 씻은 후 membrane을 1차 항체가 1 : 1,000 비율로 혼합된 PBS에 4°C 에서 8 h 동안 배양하였다. 1x PBS-T로 3회 씻은 후 membrane을 HRP-conjugated된 2차 항체가 1 : 5,000 비율로 혼합된 blocking buffer를 첨가하여 1 h 동안 4°C 에서 배양하였다. 1x PBS-T로 3회 씻은 후 ECL을 이용해서 단백질 발현을 film을 이용하여 현상하였다.

2.7. Real-time RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정

HaCaT 세포를 6-well culture plate에 5×10^5 /well로

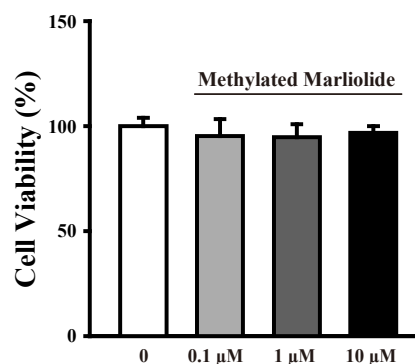


Figure 2. MTT assay shows that methylated marliolide does not affect the viability of HaCaT cells.

seeding 후 24 h 동안 배양하였다. 메틸말리올라이드를 $10 \mu\text{M}$ 농도로 4 h, 8 h, 12 h 동안 처리 후 PBS로 3회 씻고 세포를 얻어냈다. 이후 total RNA를 Hybrid-R RNA extraction kit (GeneAll, Korea)를 이용하여 획득하였다. Total RNA의 농도를 측정하여 $1 \mu\text{g}$ 의 RNA를 PrimeScript RT-PCR kit (TAKARA Korea, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하고 이후 cDNA를 SYBR green mix, forward primer, reverse primer 및 증류수와 섞은 후 real-time PCR을 진행하였다. PCR은 95°C 에서 5 min으로 1 사이클 진행 후 95°C 에서 10 s, 59°C 에서 10 s 그리고 72°C 에서 30 s로 총 40 사이클 진행 후 72°C 에서 5 min간 1 사이클 진행하였다. 최종 mRNA 레벨은 GAPDH mRNA로 최종 보정하였다.

2.8. 통계 처리

모든 실험은 3회 이상 반복하였고 평균과 표준편차로 값을 나타내었다. 유의성은 Student's *t*-test로 진행하였으며 유의성에 따라서 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. MTT를 사용한 피부 세포 독성 측정

본 연구에서 사용된 메틸말리올라이드의 합성은 선행 연구에서 사용했던 말리올라이드를 이용하여 진행되었다(Figure 1). 합성된 메틸말리올라이드가 HaCaT 세포에서 독성을 나타내는지 알아보려고 MTT assay를 시행하였다. 결과적으로 메틸말리올라이드는 HaCaT 세포에서 24 h 동안 $10 \mu\text{M}$ 농도로 처리하여도 세포독

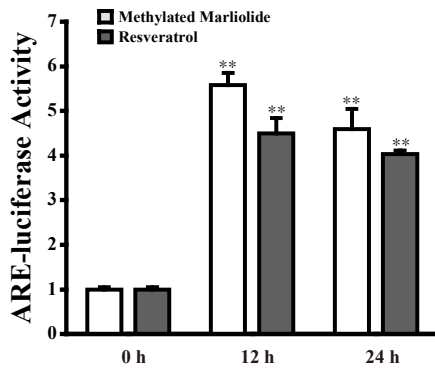


Figure 3. Luciferase assay shows that methylated marliolide significantly activates ARE-luciferase activity in HaCaT-ARE-GFP-luciferase cells. Resveratrol was included as a positive control.

성을 나타내지 않았다(Figure 2).

3.2. 피부 세포에서 ARE 루시퍼라아제 활성 측정

상기한대로 NRF2에 의한 항산화 단백질 전사 조절은 ARE (antioxidant response element)의 결합을 통해 이루어진다[7]. 메틸말리올라이드에 의한 ARE 활성을 알아보기 위해 메틸말리올라이드와 함께 양성 대조군으로 레스베라트롤을 각각 10 μM의 농도로 HaCaT-ARE-GFP-luciferase 세포에 처리하여 루시퍼라아제 활성을 확인하였다. 결과적으로 메틸말리올라이드와 레스베라트롤 모두 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의한 루시퍼라아제 활성을 나타내었다. 특히 메틸말리올라이드는 12 h 또는 24 h 처리 시 레스베라트롤보다 높은 루시퍼라아제 활성을 나타내는 것을 관찰하였다(Figure 3).

3.3. 피부 세포에서 NRF2 및 타겟 단백질인 HO-1 및 NQO1 발현 변화 측정

메틸말리올라이드에 의한 ARE 유도 효과가 NRF2 유도 효과에 의하여 나타나는지 여부를 조사하기 위하여 HaCaT 세포에 메틸말리올라이드 처리 후 NRF2 및 타겟 단백질인 HO-1과 NQO1의 변화를 western blot으로 측정하였다. 본 실험에서 레스베라트롤은 양성 대조군으로 첨가하였다. 결과적으로 메틸말리올라이드 처리 시 HaCaT 세포에서 NRF2, HO-1 그리고 NQO1 단백질 통계적으로 유의성 있게 증가하는 것을 관찰하였다(Figure 4).

마찬가지로 메틸말리올라이드에 의한 HO-1 및

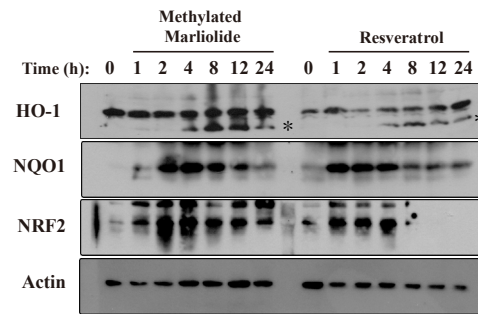


Figure 4. Western blot shows that methylated marliolide induces HO-1, NQO1, and NRF2 in HaCaT cells. Resveratrol was included as a positive control.

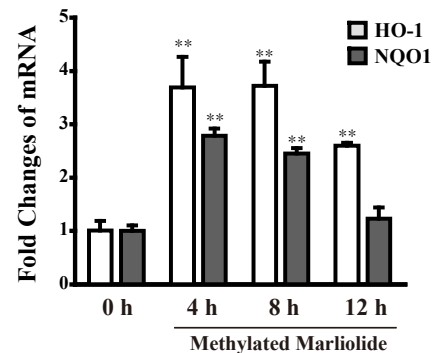


Figure 5. Methylated marliolide transcriptionally induces HO-1 and NQO1 in HaCaT cells.

NQO1 증가가 전사 레벨에서 이루어지는지를 real-time RT-PCR 기법을 통하여 확인하였다. 결과적으로 양성 대조군과 비교하였을 때 HO-1 및 NQO1 mRNA가 모두 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(Figure 5). 이러한 결과들은 HaCaT 세포에서 메틸말리올라이드가 NRF2 활성 증가를 통해 HO-1과 NQO1의 전사를 촉진하였다는 것을 시사한다.

3.4. 피부 세포에서 메틸말리올라이드에 의한 산화적 스트레스 보호 효과

메틸말리올라이드가 NRF2/ARE 활성을 통해 항산화 단백질의 발현을 증가시키는 결과에 기반하여 메틸말리올라이드가 세포 내 산화적 스트레스를 억제할 수 있는지 확인하였다. 이를 위하여 산화적 스트레스를 유발하는 phorbol ester인 TPA를 단독 처리하거나 또는 메틸말리올라이드와 동시 처리하여 DNA와 지질의 산화 마커인 8-OH-dG 와 4-HNE레벨을 면역 형광법을 이용

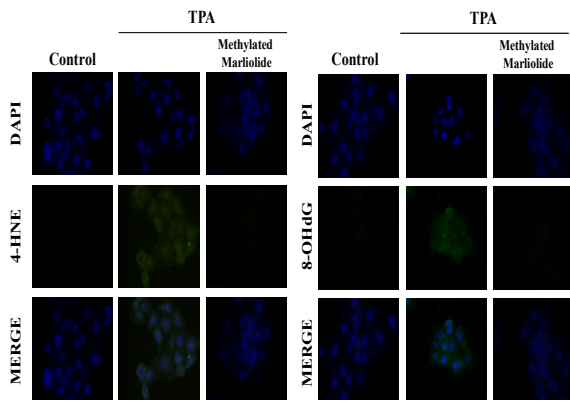


Figure 6. Immunofluorescence study shows that methylated marliolide suppress TPA-induced generation of 4-hydroxynonal (4-HNE, Left Panel) and 8-oxodeoxyguanosine (8-OHdG, Right Panel) in HaCaT cells.

하여 관찰하였다. 메틸말리올라이드를 HaCaT 세포에 처리 시 TPA로 유도한 8-OH-dG와 4-HNE 레벨을 저해하였다(Figure 6). 이는 메틸말리올라이드가 NRF2/ARE 활성을 통하여 세포 내 산화적 스트레스를 억제한다는 사실을 시사한다.

4. 결론

본 연구진은 메틸말리올라이드가 NRF2/ARE 활성을 통하여 항산화 단백질의 발현을 증가시키고 이를 통하여 피부 세포의 산화적 스트레스를 억제한다는 사실을 발견하였다. 이는 구조 변경에 따라서 메틸말리올라이드보다 더욱 강력한 피부 항산화 효과를 갖는 말리올라이드 유도체를 합성할 수 있다는 것을 시사한다. 화장품 재료로 사용할 수 있는 신규 말리올라이드 유도체를 합성하기 위하여 어떻게 메틸말리올라이드가 구조 변경을 통하여 피부 세포 내에서 NRF2/ARE 활성을 나타내고 산화적 스트레스를 억제하는지에 대한 기전적 이해가 필요하다. 본 연구진은 최근 말리올라이드가 KEAP1 단백질에 michael 반응을 통해서 KEAP1 단백질에 직접적으로 결합하고 이를 통하여 NRF2 활성을 증가시키는 것으로 보고하였다[6]. 따라서 말리올라이드의 KEAP1 단백질에 대한 반응기를 수정하지 않고 지용성을 높이고자 hydroxyl기에 메틸

화를 시도하였고 이를 통해서 산화적 스트레스로부터 피부를 보호하는 신규 말리올라이드 유도체를 합성하였다. 본 논문에 제시한 연구 결과는 신규 항산화 화장품 소재로서 메틸말리올라이드가 사용될 수 있는 과학적인 근거를 제시한다.

Acknowledgement

본 연구는 산업단지공단 연구비로 수행되었습니다 (KICOX 1415153325).

Reference

1. J. K. Kundu and Y. J. Surh, Inflammation: gearing the journey to cancer, *Mutat. Res.*, **659**, 15 (2008).
2. C. R. Reczek and N. S. Chandel, ROS-dependent signal transduction, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **33**, 8 (2015).
3. S. K. Niture, R. Khatri, and A. K. Jaiswal, Regulation of Nrf2-an update, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 36 (2014).
4. Y. S. Keum and B. Y. Choi, Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway, *Molecules*, **19**(7), 10074 (2014).
5. S. Magesh, Y. Chen, and L. Hu, Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents, *Med. Res. Rev.*, **32**, 687 (2012).
6. J. Lee, K. Mailar, O. K. Yoo, W. J. Choi, and Y. S. Keum, Marliolide inhibits skin carcinogenesis by activating NRF2/ARE to induce heme oxygenase-1, *Eur. J. Med. Chem.*, **150**, 113 (2018).
7. T. Suzuki and M. Yamamoto, Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 93 (2015).
8. K. Mailar and W. J. Choi, The first asymmetric synthesis of marliolide from readily accessible carbohydrate as chiral template, *Carbohydr. Res.*, **432**, 31 (2016).