

蘇木과 그 지표물질인 brazilin이 인간 유래 각질 형성 세포의 tight junction 유전자 발현에 미치는 영향

천성혜 · 최선경 · 조남준 · 김기광 · 이윤희^{1,2} · 황형서³ · 김균연* · 한효상^{4*}

충남대학교 생화학과, 1: 충남대학교 생물공학연구소, 2: (주)모든바이오, 3: 세명대학교 한방화장품과학과, 4: 중부대학교 보건행정학과

Investigation of the Effect of Sappan Lignum and Brazilin on Expression of Tight Junction Related-genes in Human Keratinocyte

Seong Hye Cheon, Sun Kyung Choi, Nam Joon Cho, Kee Kwang Kim, Woong Hee Lee^{1,2}, Hyung Seo Hwang³,
Kyoon Eon Kim*, Hyosang Han^{4*}

Department of Biochemistry, 1: Institute of Biotechnology, Chungnam National University, 2: MODNBIO Inc.,
3: Department of Oriental Cosmetic Science, Semyung University,
4: Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University

The aim of this research was to determine the diverse effects of Sappan Lignum extract and brazilin on human keratinocyte HaCaT cells. We confirmed the antioxidant effect of Sappan Lignum extract and brazilin was analyzed by using an ABTS assay, confirming the efficacy of water extraction method. Also, we examined effect of Sappan Lignum extract and brazilin on the cell viability, using the MTS assay in HaCaT cells. mRNA expression levels of tight junction-related genes associated with skin barrier in HaCaT cells were analyzed using quantitative real-time PCR analysis. Sappan Lignum extract increased the cellular activity of HaCaT cells and the expression of the tight junction-related genes claudin 3, claudin 6, and ZO-2. Brazilin displayed the same effects as that of the extract on HaCaT cells activity and tight junction-related genes expression. Furthermore, dispase assay demonstrated altered cell-cell adhesion strength of Sappan Lignum extract or brazilin treated HaCaT cells. Sappan Lignum extract or brazilin might be an useful ingredient in skin-mosturizing and anti-wrinkle cosmetics, given its effects of altering mRNA expression of tight junction-related genes and enhancing cell-cell adhesion strength of HaCaT cells.

keywords : Sappan Lignum, Brazilin, Human keratinocyte cells, Tight junction

서론

蘇木은 新修本草에 처음 收載되었으며, 임상에서 活血破瘀, 消腫止痛의 효능이 있어 經閉痛經, 產後瘀阻, 胸腹刺痛, 外傷腫痛, 破傷風의 증상을 치료하는 데 사용되고 있다¹⁾. 蘇木은 대한민국약전²⁾에 소목 (蘇木) *Caesalpinia sappan* Linné (콩과 Leguminosae)의 심재라고 收載되어 있다.

蘇木의 주성분은 brazilin으로 알려져 있는데, 이 성분은 천연 색소로 더 많이 알려져 있다. 이 외에도 hematoxylin 및 항산화 활성을 가지는 성분으로서 hematein이 분리되어 있고³⁾, saponin과 정유성분인 α -1-phellandrene과 ocimene를 함유한다⁴⁾. 蘇木

의 약리작용으로는 항균활성 작용^{5,6)}, 항산화 및 간보호 작용⁷⁾, 항암활성^{8,9)}, 항염증¹⁰⁾, 염증성 관절염의 소염, 해열, 진통작용¹¹⁾, U937세포의 성장억제 효과¹²⁾ 등 여러 연구들이 보고되었다.

표피세포의 80%를 차지하는 각질 형성 세포는 주로 피부 외측에 위치하여 피부 각질을 형성하고 장벽의 기능을 담당하는 것으로 알려졌으나, UV에 의한 면역학적 반응을 조절하는 사이토카인 분비와 염증성 인자를 유도하는 생리조절물질을 생성하고 분비하는 역할도 하는 것으로 알려져 있다¹³⁾.

Tight junction은 세포-세포 간 결합을 연계하는 다중 단백질 복합체 (multiprotein complexes)로 외부 환경으로부터 물리화학적 공격을 방어하는 피부 장벽의 역할과 함께 상피의 전해질과

* Corresponding author

Kyoon Eon Kim, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.

E-mail : kyoonkim@cnu.ac.kr Tel : +82-42-821-5484

Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Tourism Health, Joongbu University, Geumsan 32713, Republic of Korea.

E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr Tel : +82-41-750-6292

Received : 2017/12/26 Revised : 2018/02/07 Accepted : 2018/03/06

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2018.04.32.2.106

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

수분의 이동을 조절하며 세포 내 신호 전달을 조절하는 등 다양한 생물학적 기능을 수행한다^{14,15}. Tight junction의 대표적인 단백질인 occludin과 claudin은 transmembrane domain을 포함하고 있어 세포막 내에 강하게 박혀 있으며 zona occludens-1 (ZO-1), ZO-2, cingulin 뿐만 아니라 actin cytoskeleton과 결합하여 다양한 신호 전달 단백질과의 상호작용을 통해 세포 간 부착과 수분 및 이온 등의 물질 이동을 조절하는 기능을 가진다¹⁶⁻¹⁸. Tight junction 관련 단백질은 표면의 약산성 (pH 5.5) 유지와 외부 박테리아와 바이러스의 침입을 막고 각질 세포의 분열과 분화를 조절하며 자외선과 같은 외부적인 요소들과 세포 노화와 같은 내부적인 요소의 복합적인 작용으로 파괴될 수 있는 피부 장벽을 유지하는 중요한 역할을 수행하고 있다^{19,20}. 노화 및 외부 여러 요소들에 의해 파괴된 피부 장벽 손상은 결국 피부 수분량 감소와 주름 발생의 원인이 될 수 있으며²¹⁻²³ claudin 1 단백질이 knock out 된 마우스가 탈수 증상을 보이며 생후 1일 이내에 사망한 연구 결과와 더불어 tight junction 단백질의 피부 보습의 효과 및 아토피 치료와 관련된 연구도 이루어지고 있다²⁴⁻²⁷. 그러므로 피부 장벽 강화 및 보습 조절을 위한 유용성 소재 물질을 탐색 및 실용화하기 위해서는 tight junction 유전자 발현 조절에 대한 연구가 중요하다.

최근 식의약품 및 화장품 분야에서 천연에 존재하는 식물의 항산화, 항염증, 미백 및 항균 효과를 바탕으로 유용성 물질 소재들을 탐색하고, 이를 실용화하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 한의학에서 통경제, 진통제, 항염제의 역할과 더불어 농양과 종부, 파상풍과 같은 전염성 질병과 혈전증, 종양을 치료하는 약재로 사용되고 있는 蘇木 (Sappan Lignum)은 항산화, 항균, 미백 효과가 있어 화장품의 천연 보조제로 사용 가능성이 제시되고 있다^{28,29}. 하지만 tight junction 유전자의 mRNA 발현 조절에 따른 피부 장벽 강화 및 개선에 미치는 蘇木의 영향은 잘 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 tight junction 유전자의 mRNA 발현에 미치는 蘇木과 그 지표물질 brazilin의 영향을 조사하였고, 추가적으로 蘇木과 brazilin 처리에 의한 인간 유래 각질 형성 세포 (human keratinocyte cell line)인 HaCaT 세포의 세포-세포 부착 강도 강화 효과를 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 蘇木은 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 2017년 8월에 구매 (NO: 2017-0812)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과 대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였고, brazilin은 ChemFaces (China)를 통해 개별 구매하여 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 Dulbecco's modified Eagle medium

(WELGENE, Korea), fetal bovine serum (WELGENE, Korea), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (WELGENE, Korea), filter paper (Advantec No. 2, Japan), DPBS (Corning, USA), Trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), potassium persulfate (Sigma, USA), ABTS (Sigma, USA), MTS solution (Promega, USA), eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea), 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzymomics, Korea), 2X Prime Q-mater Mix (GENET BIO, Korea), RiboEX 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (Thermo Fisher Scientific, USA), water bath (HAAKE, Germany), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA) 등이다.

2. 방법

1) 蘇木 열수추출물 제조

蘇木 약재를 50 g으로 중량을 측정된 뒤, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣어주었다. 탕액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열한 뒤, 추출액을 filter paper에서 감압하여 여과액을 제작한 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 제작하였다. 동결건조 추출물은 10.2 g으로 측정되었으며, 수율은 20.4%였다.

2) 세포 배양

실험에 사용된 세포주는 HaCaT (Thermo Fisher Scientific, USA)으로 Dulbecco's modified Eagle medium에 10% fetal bovine serum과 1% 항생제를 첨가하여 표준 세포 배양법인 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3) 항산화 효능 평가

ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay를 이용하여 蘇木과 brazilin의 항산화 효능을 측정하였다. Potassium persulfate 2.4 mM과 ABTS 7 mM을 1:1 부피 비로 맞추어 혼합해두고 24 시간 동안 실온에서 차광된 상태로 반응시켜 주어 ABTS free radical을 만들어주었다. 그 후 ABTS free radical을 D.W로 희석하여 650 nm 흡광도가 0.7 부근이 되도록 ABTS working solution을 만들었다. 96 well plate의 각 well에 ABTS working solution 80 µl와 sample 20 µl를 혼합하고, 4 min 동안 차광된 상태로 반응시킨 후 microplate reader로 650 nm의 흡광도를 측정하였다. 항산화 효능은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$ABTS\ radical\ scavenging\ activity(\%) = \left(1 - \frac{A_{sample} - A_{sampleblank}}{A_{blank}}\right) \times 100$$

4) 세포 생존율 평가

蘇木과 brazilin이 HaCaT 세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) assay를 수행하였다. 96-well plate에 HaCaT 세포를 5,000 cells/well로 분주한 뒤 24 h 동안 배양한 뒤 각각의 well을 시료가 농도 별로 처리된 배지로 교환해 준 뒤 다시 24 h 동안 배양해 주었다. 그 후 MTS 시약을 첨가하고 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료를 처리한 세포의 생존율을 백분율로 표시하여 상대적인 독성을 측정하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료첨가군의흡광도} - \text{시료자체의흡광도}}{\text{대조군의흡광도}} \times 100(\%)$$

5) RNA 추출 및 quantitative real-time PCR

6-well culture dish에 HaCaT 세포를 1×10^5 cells/well로 분주하고 24 h 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 蘇木과 brazilin을 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 다시 48 h 동안 배양하였다. 시료가 첨가된 배지를 제거한 후 PBS로 세척한 뒤 RiboEx 1 ml로 세포를 lysis 한 다음, hybrid-R RNA purification kit (Geneall, Korea)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Qubit 2.0 fluorometer로 정량하였고, 이렇게 추출하여 정량한 total RNA로 cDNA를 합성하기 위하여 total RNA 2 μg , dNTP mix (10 mM) 2 μL , random hexamer (100 pmol/ μL) 2 μL 를 넣은 후 DEPC-treated water로 총 부피 20 μL 가 되도록 하였다. 65°C에서 5 min간 반응시킨 후 즉시 얼음에 냉각시킨 다음, 각각 5X M-MLV RT reaction buffer 8 μL , M-MLV reverse transcriptase 2 μL , RNase inhibitor 2 μL , DEPC-treated water 8 μL 를 추가적으로 첨가해 주었다. 그 뒤 실온에서 10 min간 둔 후에 50°C에서 1 h 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 추후 실험에는 이렇게 합성한 cDNA를 1/5로 희석시켜 사용하였다. 蘇木과 brazilin 처리에 의해 tight junction 관련 유전자의 mRNA 발현량을 비교해 보기 위하여 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 실시하였다. 2X Prime Q-master mix 10 μL , 10 pmol/ μL 의 forward primer와 reverse primer를 각각 1.5 μL , nuclease free water 2 μL , 합성한 후 1/5로 희석시킨 cDNA 5 μL 를 넣은 뒤 95°C에서 denaturation 20 s, 58°C에서 annealing 20 s, 72°C에서 elongation 20 s를 40 cycle 실시하는 조건 하에서 AriaMx 를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 실험군과 대조군의 internal standard로 β -actin을 사용하였고, 실험에 사용한 primer의 염기 서열은 Table 1과 같다.

6) Dispase 기반 해리 분석

12-well culture dish에 2×10^5 cells/well 로 분주하고 24 h 동안 배양한 후 각각의 well에 蘇木과 brazilin을 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였다. 24 h 후 시료가 첨가된 배지를 2.4 U/ml의 dispase II가 포함된 배지로 교환하고, 37°C에서 30 min 동안 배양하여 비 접착 세포 단층을 얻었다. 이후 dispase II가 포함된 배지를 제거하고, 세포 단층을 PBS로 조심스럽게 세척 한 후 12-well culture dish에 물리적인 충격을 주어 단편을 얻고 이를 디지털 카메라를

사용하여 사진을 촬영하였다. 각각의 well에서 얻은 단편의 개수를 셀 후 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 蘇木과 brazilin을 처리한 단편의 수를 백분율로 표시하여 상대적인 단편의 수를 확인하였다.

Table 1. Primers used for quantitative analysis of gene expression

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
Claudin 1	F	GCA GAT CCA GTG CAA AGT CT	136	58
	R	CAT ACA CTT CAT GCC AAC GG		
Claudin 3	F	GCA TGG ACT GTG AAA CCT CA	145	58
	R	AAT ATC AAG TGC CCC TTC CA		
Claudin 4	F	CGC ATC AGG ACT GGC TTT AT	131	58
	R	AGT TGA GGA CCT GGA AGG CT		
Claudin 6	F	GGC CCT CTG AGT ACC CTA CC	136	58
	R	GCA GGA GGC AGA AAC AAA AG		
Claudin 7	F	ATG TAC AAG GGG CTG TGG AT	132	58
	R	CAC CAG GGA GAC CAC CAT TA		
Claudin 8	F	GGC TGT TTC TTG GTG GTG TT	137	58
	R	CAC GCA ATT CAT CCA CAG TC		
Occludin	F	TTT GTG GGA CAA GGA ACA CA	137	58
	R	ATG CCA TGG GAC TGT CAA CT		
JAM-A	F	TGC CTC TTC ATA TTG GCG AT	144	58
	R	TGT CAC GGA CTT GAA GGT GA		
ZO-1	F	AGA GCA CAG CAA TGG AGG AA	133	58
	R	GAC GTT TCC CCA CTC TGA AA		
ZO-2	F	AGC AGG AGC AGA AGC AGA AG	148	58
	R	CAT ATC AGC TCT TCC ATG CC		
Tricellulin	F	GGC AGC TCG GAG ACA TAG AG	147	58
	R	TTT GCT GTT CTC AGT TCC TTG A		
β -actin	F	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

결 과

1. 蘇木과 brazilin의 항산화 효능 측정

추출 방법에 따른 蘇木의 뛰어난 항산화 효능과 brazilin의 항산화 효능은 기존 연구를 통해 널리 규명되어있다³⁰⁾. 우리는 蘇木의 다양한 유효 성분들이 열수 추출에 의해 효과적으로 추출되었는지 검증하기 위하여 ABTS assay를 통해 蘇木과 brazilin이 가지는 항산화 효능을 검증하였으며, 항산화 효능이 입증된 resveratrol을 이용하여 실험의 신뢰성을 확보하였다. 그 결과, resveratrol의 항산화 효능은 농도 의존적으로 증가하여 100 μM 에서 81.23%로 나타났으며, 蘇木과 brazilin에서도 농도 의존적인 항산화 효능이 보였으며 특히 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 93.07%, 84.20%의 항산화 효능을 보였다.

2. 蘇木이 tight junction 유전자 발현에 미치는 영향

본 연구에서는 蘇木이 피부를 구성하는 각질 형성 세포에서 피부 장벽과 밀접한 연관이 있는 tight junction에 미치는 영향을 알아보기 위해 대표적인 tight junction 관련 유전자의 발현량을 확인하였다. qRT-PCR을 통해 tight junction 유전자의 mRNA 발현 변화를 확인하기에 앞서 蘇木이 HaCaT 세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 MTS assay를 통해 확인하여, 이후 HaCaT 세포에 처리할 수 있는 蘇木의 유효한 농도를 설정하였다. 蘇木 처

리에 의해 HaCaT 세포의 세포 생존율은 점차 증가하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 141.43%로 가장 높은 세포 생존율을 보였고, 이 결과를 바탕으로 세포 증식에 영향을 주지 않으면서 蘇木의 효과를 극대화 할 수 있는 농도인 1 $\mu\text{g/ml}$ 조건 하에서 qRT-PCR을 진행하였다. 蘇木을 처리하지 않은 대조군 대비 실험군의 tight junction 유전자의 mRNA 발현량을 비교해 본 결과, 蘇木의 처리에 의해 HaCaT 세포의 claudin 3, claudin 6, ZO-2의 mRNA 발현량이 증가하였으며 특히 claudin 6의 mRNA 발현량은 蘇木 처리에 의해 4.06배로 크게 증가하였고, 蘇木 처리에 의한 HaCaT 세포의 claudin 6 mRNA 발현량은 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

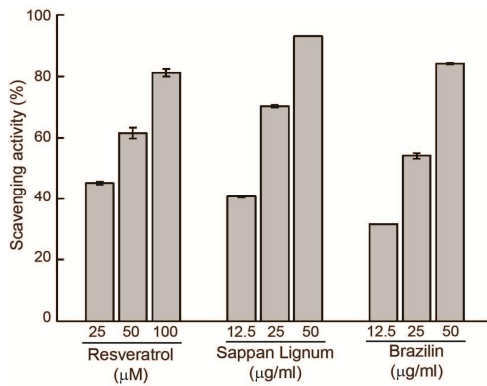


Fig. 1. Anti-oxidant activities of the Sappan Lignum and brazilin. ABTS free-radical scavenging activity of Sappan Lignum and brazilin. n=3 (biological replicates), Average \pm S.E.M.

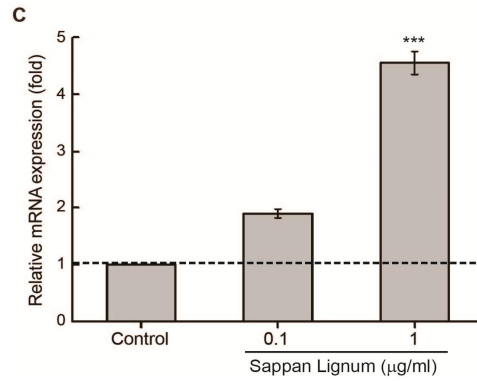
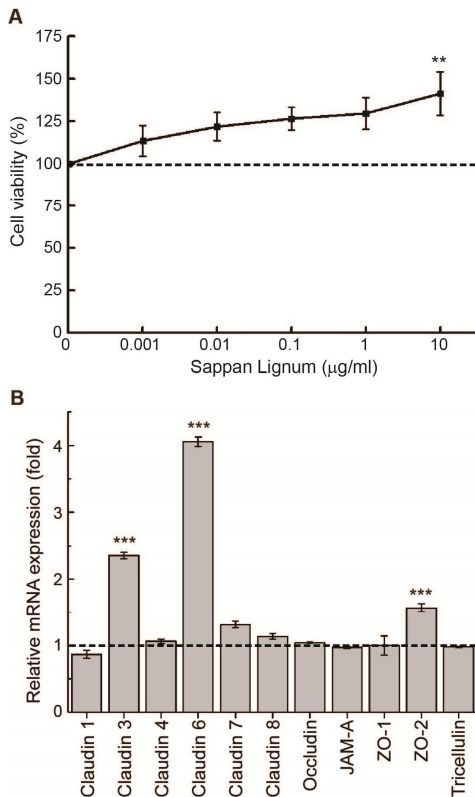


Fig. 2. (A) Cell viability of HaCaT cells after Sappan Lignum treatment. HaCaT cells were treated with indicated concentrations of Sappan Lignum for 24 h and cell viability was measured by MTS assay. (B) Effect of Sappan Lignum on tight junction-related mRNA expression level. HaCaT cells were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ Sappan Lignum for 48 h (C) Effect of claudin 6 mRNA expression level by Sappan Lignum treatment in concentration-dependent manner. HaCaT cells were treated with indicated concentrations of brazilin for 48 h. mRNA expression level was measured by qRT-PCR. **P<0.01, ***P<0.005 versus control.

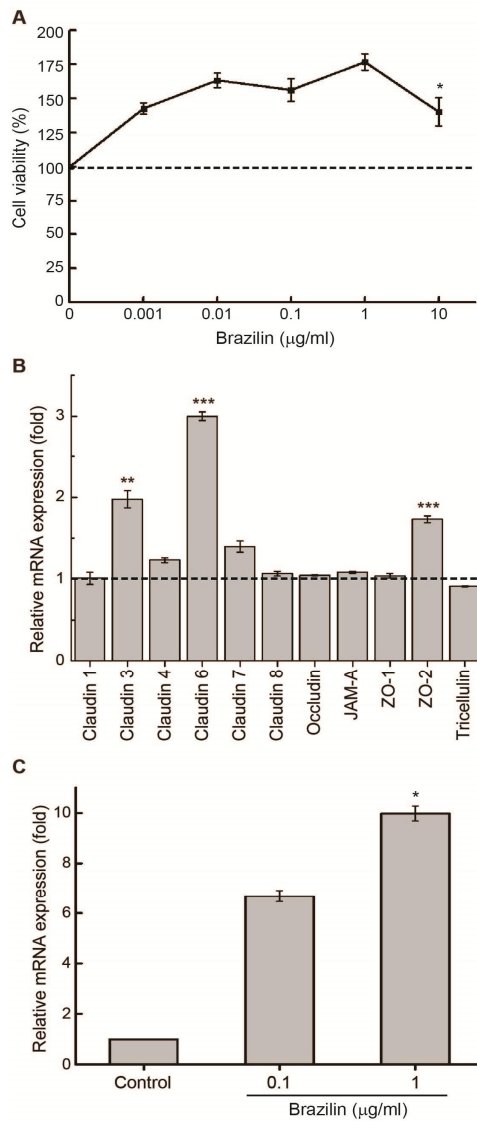


Fig. 3. (A) Cell viability of HaCaT cells after brazilin treatment. HaCaT cells were treated with indicated concentrations of brazilin for 24 h and cell viability was measured by MTS assay. (B) Effect of brazilin on tight junction-related mRNA expression level. HaCaT cells were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ brazilin for 48 h (C) Effect of claudin 6 mRNA expression level by brazilin treatment in concentration-dependent manner. HaCaT cells were treated with indicated concentrations of brazilin for 48 h. mRNA expression level was measured by qRT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ versus control.

3. Brazilin이 tight junction 유전자 발현에 미치는 영향

앞 선 연구에서 蘇木의 처리에 의해 HaCaT 세포의 claudin 3, claudin 6, ZO-2의 mRNA 발현이 증가한 것을 확인하였다. HaCaT 세포의 tight junction 유전자 발현 변화에 미친 蘇木의 효과가 蘇木 추출물에 포함된 다양한 유효 물질 중 대표적인 지표 물질인 brazilin과 연관이 있는 것인지 확인하기 위해 brazilin을 이용하여 같은 실험을 수행하였다. Brazilin 처리에 의해 HaCaT 세포의 세포 생존율이 증가하는 것을 MTS assay를 통해 확인하였으며, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 177.39%로 가장 높은 세포 생존율이 나타났다. MTS assay 결과를 바탕으로 세포 증식에 영향을 주지 않으면서 brazilin의 효과를 극대화 할 수 있는 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도 조건 하에서 brazilin을 처리하지 않은 대조군 대비 실험군의 mRNA 발현량을 비교하였고, HaCaT 세포의 claudin 3, claudin 6, ZO-2의 mRNA 발현량이 brazilin에 의해 각각 1.98배, 3.00배, 1.73배 증가하며 蘇木의 처리에 따른 claudin 3, claudin 6, ZO-2의 mRNA 발현 변화와 유사한 결과를 얻었다. 또한 brazilin에 의한 HaCaT 세포의 claudin 6 mRNA 발현 변화는 처리해 준 brazilin의 농도에 의존적인 증가 양상을 확인하였다.

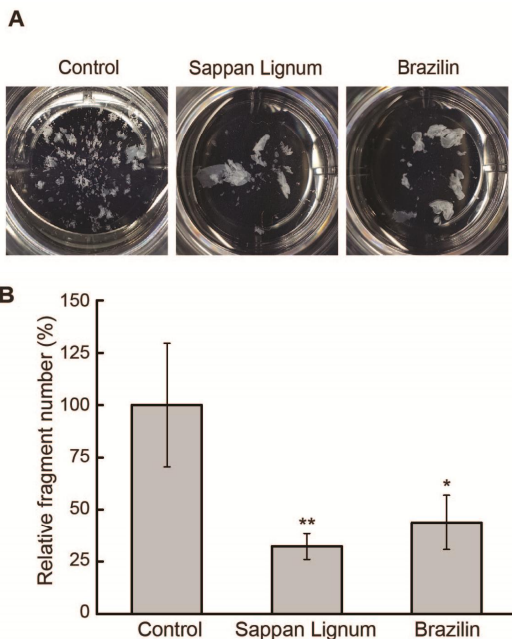


Fig. 4. Disperse-based dissociation assay in HaCaT cells treated with Sappan Lignum or brazilin. HaCaT cells were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ Sappan Lignum and brazilin, and after 24 h the disperse assay performed. (A) Culture wells photographed after performance of the disperse-based dissociation assay. (B) The resulting fragments were counted. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control.

4. 蘇木과 brazilin이 HaCaT 세포의 세포-세포 부착 강도에 미치는 영향

이 전 연구를 통해 蘇木과 brazilin의 처리에 의해 HaCaT 세포의 tight junction 유전자 중 claudin 3, claudin 6, ZO-2 유전자의 mRNA 발현이 촉진되는 것을 확인하였다. 추가적으로, 蘇木과 brazilin이 세포-세포 부착 강도에 미치는 영향을 조사하기 위해 disperse 기반 해리 실험을 수행하였다. HaCaT 세포에 disperse를 처리하여 비 접착 세포 단층을 얻고, 물리적인 충격을 가하여 얻은 단편의 수를 측정된 결과 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 蘇木과 brazilin을 처리한 시료의 세포 단편이 각각 32.10%, 43.67%로 감소하였다.

고 찰

蘇木은 재 조각으로 긴 원기둥모양, 반으로 자른 원기둥모양 또는 막대모양이다. 바깥면은 등적색~회갈색이나 때로 연한 갈색~회백색의 변제가 붙은 것도 있다. 흔히 가로 또는 세로로 잘려져 있고 질은 딱딱하나 세로로 잘린 것은 부스러지기 쉽다. 횡단면은 나이테를 뚜렷하게 볼 수 있다²⁾.

蘇木의 주요 성분은 brazilin, chalcones, rhamnetin, ombuin, quercetin, sappanchalcone, homoisoflavonoids, sappanin, caesalpins J and P, dibenz[b,d]oxocins(protosappanins A, B and C, protosappanin E-1 and E-2) 등이 함유되어 있으며³¹⁾ 蘇木과 대표적인 지표물질인 brazilin은 항산화 효능이 보고되고 있다^{32,33)}.

본 연구에서는 열수 추출 방법으로 얻은 蘇木 추출물에 항산화 효능을 나타내는 蘇木의 유효성분들이 효과적으로 추출되었는지에 대한 물성 검증을 위해 蘇木과 brazilin의 항산화 효능을 ABTS assay로 검증하였고, 蘇木과 brazilin 모두 농도 의존적인 항산화 효능을 가지는 것을 확인하였다.

각질 형성 세포가 화학물질이나 자외선 등의 환경적 스트레스에 지속적으로 노출되면 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 interleukin (IL)-1, -6, -7, -8, -10, -12, -15, -18 및 -20과 같은 여러 가지 종류의 염증성 cytokine들을 분비하여 피부 각질 형성 세포의 증식 속도를 감소시키고, 진피층의 기질형성을 방해함으로써 손상된 피부의 치유 속도를 저하시키는 것으로 알려져 있다³⁴⁾.

본 연구는 인간 유래 각질 형성 세포인 HaCaT 세포에서 tight junction 유전자의 mRNA 발현 조절에 미치는 蘇木의 영향을 확인하였고, 蘇木에 의해 HaCaT 세포의 tight junction 유전자 중 claudin 3, claudin 6, ZO-2의 mRNA 발현량이 증가한 결과를 얻었다. Tight junction 유전자의 mRNA의 발현 변화에 미치는 蘇木의 효과를 여러 분야에 적용하여 연구 및 개발하기 위해서는 蘇木의 다양한 유효 성분 중 단일 화합물에 대한 연구가 필요하다.

이에 본 연구는 蘇木의 대표적인 지표물질 brazilin을 HaCaT 세포에 처리하였고, 蘇木에 의한 claudin 3, claudin 6, ZO-2의 mRNA 발현 변화와 유사한 결과가 재현되었다. Tight junction은

인접하는 표피 세포 사이를 서로 연결 및 접합하여 전해질과 수분의 이동을 조절하고, 세포 내 신호 전달 및 외부 환경으로부터 물리화학적 공격을 방어하는 피부 장벽의 기능을 수행한다^{14,15}. 그러므로 이러한 결과는 tight junction 유전자의 발현에 영향을 미친 蘇木과 brazilin이 피부 장벽 강화에 유용한 소재 물질로 연구 및 개발할 가능성을 시사한다.

세포 부착 강도는 세포간의 커뮤니케이션 조절에 필수적인 역할을 하며 조직의 발달과 유지에 중요한 역할을 한다³⁵. Tight junction과 더불어 세포 사이의 결합을 연계하는 세포 부착 측면에서 蘇木과 brazilin의 역할을 알아보기 위해 dispase 기반 해리 분석을 수행하였다. 그 결과, dispase 처리와 물리적인 충격에 의해 생성된 HaCaT 세포 단편의 수가 蘇木과 brazilin 처리에 의해 감소하며 HaCaT 세포의 세포-세포 부착 강도가 강화된 것을 확인하였다. 蘇木과 brazilin에 의해 강화된 세포-세포 부착 강도는 피부 장벽을 약화시키는 외부적인 요인들로 부터 피부의 조직을 유지하며 보호할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

본 연구에서 蘇木과 그 지표물질 brazilin에 의한 HaCaT 세포의 tight junction 유전자 발현에 변화와 항산화 효능 및 HaCaT 세포의 세포-세포 부착 강도 강화 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

ABTS assay를 통해 蘇木과 brazilin의 농도 의존적인 radical 소거능이 확인되어 열수 추출 방법으로 얻은 蘇木과 brazilin이 항산화 효능이 있음을 확인하였다.

蘇木이 HaCaT 세포의 tight junction 유전자 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 蘇木의 처리에 의해 claudin 3, claudin 6, ZO-2의 mRNA 발현량이 각각 2.35, 4.06, 1.57 배 증가하였으며, 蘇木의 대표적 지표물질인 brazilin 또한 HaCaT 세포의 claudin 3, claudin 6, ZO-2의 mRNA 발현을 증가시키며 蘇木과 유사한 효과를 나타냈다.

HaCaT 세포에 蘇木과 brazilin을 처리 한 후 dispase를 처리하여 얻은 비 접착 세포 단층을 얻고, 물리적인 충격을 가하여 얻은 단편의 수를 측정한 결과 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 蘇木과 brazilin을 처리한 시료의 세포 단편이 각각 32.10%, 43.67%로 감소하며 세포-세포 부착 강도 강화 효과를 확인하였다.

蘇木은 다양한 tight junction 유전자의 mRNA 발현에 영향을 일으키며, 이 결과는 蘇木을 구성하는 대표적인 단일 화합물인 brazilin에서 재현되었다. 향후 tight junction 유전자 발현 조절 및 세포-세포 부착 강도의 강화를 통한 피부 장벽 강화 및 보습에 미치는 brazilin의 효능에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY. Boncho-Hak. Seoul:Young-Lim Press. 2007:476-7.
2. Korea Food and Drug Administration. The Korean Pharmacopoeia Eleventh Edition. Seoul:Korea Food and Drug Administration. 2015:58.
3. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Eom JY, Kim SC, Yang JH, Cho MK, Lim JP, Hong SH. Hanbangyakhak. Seoul:Shinilbukseu. 2007:50-3.
4. Kim HC. Hanbangyagli-Hak. Seoul:Jibmundang. 2001:341-2.
5. Kwon HJ, Kim YH, Nam KW, Kim SK, Bang IS, Han MD. Antibacterial Activities of Caesalpinia sappan L. Extract and Structural Analysis of Its Related Brazilin. Kor J Microbiol Biotechnol. 2010;38(1):105-11.
6. Lee JY, Min KJ. Antimicrobial Activity and Bactericidal Activity of Caesalpinia sappan L. Extract. J Environ Health Sci. 2011;37(2):133-40.
7. Ha H. Antioxidant and Liver-protective Effects of Caesalpinia sappan. Kor J Environ Toxicol. 2002;17(3):261-4.
8. Park MH, Kim BS. Antioxidant and Cytotoxic Activities of Hot Water and Ethanol Extracts From Caesalpinia sappan. Food Eng Prog. 2017;21(3):249-55.
9. Mun YJ, Nam YJ, Lee KG, Choi DH, Lee SW, Ahn SH, Choi MK, Woo WH. The Water Extract of Caesalpinia sappan Induces Apoptosis on Human Lung Cancer Cell Line, A549 cells. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2002;16(3):521-7.
10. Eum WS, Lee KJ, Kim DW, Lim SS, Kang IJ, Park JS, Choi SY. Anti-Inflammatory Effects of Extracts from Caesalpinia sappan L. on Skin Inflammation. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2013;42(3):384-8.
11. Park BS, Han YG, Lee MJ. The Effects of Caesalpinia sappan Lignum on Anti-inflammatory, Antifebrile and Analgesic Effects in Rats' Carrageenan Arthritis. J Oriental Rehab Med. 2004;14(4):37-46.
12. Jeon BJ, Ju SM, Yang HM, Kim BH, Kim WS, Jeon BH. Caesalpinia sappan L. Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest in Human Lymphoma U937 Cells. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2010;24(1):55-60.
13. Huang J, Qiu L, Ding L, Wang S, Wang J, Zhu Q, Song F, Hu J. Ginsenoside Rb1 and paeoniflorin inhibit transient receptor potential vanilloid-1-activated IL-8 and PGE2 production in a human keratinocyte cell line HaCaT. Int Immunopharmacol. 2010;10(10):1279-83.

14. Cereijido M, Anderson JM. Tight junctions. New York: Crc Press. 2001:39.
15. Morita K, Miyachi Y. Tight junctions in the skin. *Journal of Dermatological Science*. 2003;31(2):81-9.
16. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J physiol Cell Physiol*. 2004;286(6):1213-28.
17. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Bio*. 2003;81(1):1-44.
18. Lapiere LA. The molecular structure of the tight junction. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;41(3):255-64.
19. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(4):285-93.
20. Yu HY, Yang IJ, Lincha VR, Park IS, Lee DU, Shin HM. The effect of the fruits of *Foeniculum vulgare* on skin barrier function and hyaluronic acid production in HaCaT keratinocytes. *J Life Sci*. 2015;25(8):880-8.
21. Bonté F. Skin moisturization mechanisms: new data. *Ann Pharm Fr*. 2011;69(3):135-41.
22. Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest*. 1995;95(5):2281-90.
23. Lee SH, Min DJ, Na YJ, Shim JW, Kwon LK, Cho, JC, Lee and HK., The protective effect of mineral water against UVB irradiation. *J Soc Cosmet Scientists Korea*. 2013;39(1):39-46.
24. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*. 2002;156(6):1099-111.
25. Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, Murota H, Suzuki K, Tamura A, Bando K, Furuta Y, Katayama I, Tsukita S. Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *PNAS*. 2016;113(28):E4061-E4068.
26. Gruber R, Börnchen C, Rose K, Daubmann A, Volksdorf T, Wladykowski E, Vidal-Y-Sy S, Peters EM, Danso M, Bouwstra JA, Hennies HC, Moll I, Schmuth M, Brandner JM. Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *Am J Pathol*. 2015;185(10):2777-89.
27. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):773-86.
28. Batubara I, Mitsunaga T, Ohashi H. Brazilim from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent. *J wood Sci*. 2010;56(1):77-81.
29. Chun HJ, Hwang SG, Lee JS, Baek SH, Jeon BH, Woo WH. Inhibitory effects of butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanogenesis in Melan-a cells. *Kor J Pharmacognosy*. 2002;33(2):130-6.
30. Hong YJ, Jeong GH, Jeong YH, Kim TH. Evaluation of Antioxidant and Anti-diabetic Effects of Sappan Lignum by Extraction Method. *Kor J Herbology* 2017;32(6):1-7.
31. Nagai M, Nagumo S, Eguchi I, Lee SM, Suzuki T. Sappanchalcone from *Caesalpinia sappan* L the proposed biosynthetic precursor of brazilin. *Yakugaku Zasshi*. 1984;104:935-8.
32. Badami S, Moorkoth S, Rai SR, Kannan E, Bhojraj S. Antioxidant Activity of *Caesalpinia sappan* Heartwood. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(11):1534-7.
33. Choi BM, Lee JA, Gao SS, Eun SY, Kim YS, Ryu SY, Choi YH, Park R, Kwon DY, Kim BR. Brazilin and the extract from *Caesalpinia sappan* L. protect oxidative injury through the expression of heme oxygenase-1. *Biofactors*. 2007;30(3):149-57.
34. Grone A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002;88(1-2):1-12.
35. Amelia Ahmad Khalili, Mohd Ridzuan Ahmad. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Application. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):18149-84.