

## 대식세포에서 Nrf2/HO-1경로를 통한 청심연자음의 항산화효과

전 선 홍<sup>1</sup> · 오 솔 라<sup>1</sup> · 김 소 정<sup>1</sup> · 전 보 희<sup>2</sup> · 성 진 영<sup>2</sup> · 김 용 민<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>세명대학교 화장품과학과, 대학원생

<sup>2</sup>세명대학교 화장품뷰티생명공학부, 대학생

<sup>3</sup>세명대학교 화장품과학과, 교수

(2020년 6월 12일 접수, 2020년 7월 14일 수정, 2020년 7월 21일 채택)

### Anti-oxidative Effect of Chungsimyeonja-um (CSYJE) via Nrf2/HO-1 Pathway Activity in Lipopolysaccharide (LPS) Induced RAW 264.7 Macrophages

Seon Hong Jeon, Sol La Oh, So Jeong Kim, Bo Hee Jeon, Jin Young Sung, and Yong Min Kim<sup>†</sup>

Department of Cosmetic Science, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Korea

(Received June 12, 2020; Revised July 14, 2020; Accepted July 21, 2020)

**요약:** 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 우리 몸의 항상성 유지에 있어 중요한 역할을 한다. 그러나 과도한 ROS의 생성은 단백질, 지질, 핵산과 같은 세포 구성성분을 손상시키고 피부노화를 촉진시킨다. 이에 본 연구에서는 과도한 산화 스트레스를 예방하기 위해 Chungsimyeonja-um (CSYJE)의 항산화 효과를 확인하였다. 먼저 DPPH 및 ABTS assay를 실시하여 CSYJE의 항산화 효과를 확인한 결과 농도 의존적으로 radical 소거 활성을 확인하였다. 세포생존을 확인을 위해 MTT assay를 실시한 결과 1,000 µg/mL 농도에서 세포 독성이 없음을 확인하였다. 항산화 관련 단백질인 nuclear-E2-related factor 2 (Nrf2), Heme oxygenase-1 (HO-1)의 발현 수준을 확인하기 위해 western blotting을 실시한 결과 농도 의존적으로 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 세포 내 ROS유발 물질인 lipopolysaccharide (LPS)로 ROS를 유도한 후, ROS생성 억제효과를 확인하기 위해 DCF-DA 염색법을 실시한 결과 농도 의존적으로 ROS 생성 억제효과를 확인하였으며 ROS의 생성으로 인한 염증성 사이토카인과 염증인자의 mRNA발현 수준을 확인하기 위해 real-time RT-PCR을 실시한 결과 농도 의존적으로 염증성 사이토카인과 염증인자의 mRNA 발현을 억제시켰다. 따라서, 본 연구는 Nrf2/HO-1 신호 전달 경로 활성을 통해 CSYJE의 항산화효과를 확인했으며 이는 CSYJE가 활성산소를 억제하여 항산화 화장품의 재료로서 사용될 수 있음을 시사한다.

**Abstract:** Reactive oxygen species (ROS) plays an important role in maintaining homeostasis. However, excessive ROS production damages cellular components such as proteins, lipids, and nucleic acids and promotes skin aging. In this study, we confirmed the antioxidant effect of CSYJE to prevent excessive oxidative stress. First, DPPH and ABTS assays were performed to confirm the antioxidant effect of CSYJE and the radical scavenging activity was confirmed depending on the concentration. As a result of performing the MTT assay to confirm the cell viability, it was confirmed that there was no cytotoxicity at a concentration of 1,000 µg/mL. As a result of western blotting to confirm the expression levels of the antioxidant-related proteins nuclear-E2-related factor 2 (Nrf2) and Heme oxygenase-1 (HO-1), it was confirmed that the expression was increased in a concentration-dependent manner. After inducing ROS with lipopolysaccharide (LPS), an intracellular ROS-causing substance, DCF-DA was performed to confirm the inhibitory effect of ROS production, and the inhibition of ROS production was confirmed to concentration-dependent. Real-time

† 주 저자 (e-mail: dragonroom@hanmail.net)  
call: 043-649-1616

RT-PCR was performed to confirm the mRNA expression level of inflammatory cytokines and inflammatory mediator caused by ROS generation, mRNA expression was reduced in a dose dependent manner. Therefore, this study confirmed the antioxidant effect of CSYJE through the Nrf2/HO-1 signaling pathway, which suggests that CSYJE can be used as an antioxidant cosmetic material by inhibiting free radicals.

**Keywords:** anti-oxidative, Chungsimyeonja-um (CSYJE), HO-1, Nrf2, RAW 264.7

## 1. 서론

우리 몸의 항상성 유지를 위해 산화 및 환원 물질의 균형은 필수적이다. 대사 과정에서 발생하는 reactive oxygen species (ROS)는 산화적 스트레스로 알려진 반응성 분자로 정상상태에서는 세포 내 항상성을 유지하고 있으나 자외선과 같은 외부자극에 의해 과도하게 생성될 경우 세포 손상, 피부 노화를 활성화 시킨다[1]. nuclear-E2-related factor 2 (Nrf2)는 산화 스트레스에 대한 감지 역할을 하며 항산화 및 유전자 발현 경로에 사용하는 Phase II 효소의 활성을 조절하는 전사인자이다. 정상상태에서 Nrf2는 Kelch-like ECH associated protein 1 (keap1)과 복합체를 이루며 keap1 단백질에 의해 분해되어 세포질 내에서 낮은 수준으로 존재하지만 외부자극이나 산화적 스트레스에 의해서 keap1 단백질로부터 분리되어 핵으로 이동한다[2]. 핵에서 Nrf2는 small Maf 단백질과 이합체를 형성하여 항산화 반응 요소 (antioxidant response element; ARE)에 결합해 ARE 의존성 항산화 유전자인 heme oxygenase-1 (HO-1)를 활성화 시킨다[3]. HO-1은 세포 내 Phase II 효소 군의 구성원으로 ROS 생성과 산화 스트레스에 대한 항상성 유지에 중요한 역할을 하며 세포 보호 기작 중 하나이다. HO-1은 heme 분자를 분해하여 일산화탄소와 biliverdin으로 전환시키며 자극이 없는 상태에서는 낮은 수준으로 발현된다. LPS 및 자외선에 의해 ROS가 유도되면 HO-1이 발현되며 이 HO-1은 산화적 스트레스에 대한 보호 작용을 하고 세포와 조직의 항염증성 활성화에 기여한다[4]. 또한 HO-1의 산물인 bilirubin은 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines)의 생성을 감소시키는 것으로 알려져 있다[5]. 청심연자음(CSYJE)은 송대 태평혜민화제국방(太平惠民和劑局方)에 처음 기재된 처방으로 총 9 종 (연자, 적복령, 인삼, 황기, 황금, 차전자, 맥문동, 지골피, 감초)으로 구성되어 있다[6]. 이 처방은 만성 당뇨병으로 인해 나타나는 구강 건조나 황달에 의한 소변불순 등 치료에 폭넓게 사용됐으며, 전임상 및 임상 연구에서도 내당능 장애에 효과가 있는 것으로 보

고되었다[7]. 또한 CSYJE의 항염, 항산화의 주요성분으로는 liquiritin apioside, liquiritin, baicalin, wogonoside and glycyrrhizin 등이 있으며, 복합처방인 CSYJE은 LPS로 유도된 대식세포에서 항염증 효과에 관한 연구는 보고되었으나, 연구 결과에 따른 기전은 확인되지 않았으며 항산화 효과에 관한 연구도 보고된 바가 없다[8-10]. 이에 본 연구에서는 CSYJE의 항산화 효과와 그에 따른 기전을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

본 실험에서 사용된 약재는 (주)HMAX (Korea)에서 구입하였으며, 처방된 약재들의 구성비는 아래의 표에 표기하였다(Table 1). 처방된 한약재 170 g과 증류수 2,000 mL를 heating mantle (DM607, GTOPs, Korea)에 넣은 후 100 °C 조건에서 4 h 동안 환류냉각하며 추출하였다. Filter paper로 여과 후 60 °C에서 감압농축하고 초저온 냉동고에 24 h 보관 후 동결건조 시켰으며, 얻어진 분말을 시료로 사용하였다. 추출물은 26.5 g을 얻었고 수율은 약 15%이었다.

**Table 1.** Contents of CSYJE

Herbal name	Scientific name	Weight (g)
蓮子(연자)	<i>Nelumbo mucifera Gaertner</i>	40
赤茯苓(적복령)	<i>Poria cocos Wolf</i>	20
人參(인삼)	<i>Panax ginseng C.A Meyer</i>	20
黃耆(황기)	<i>Astragalus membranaceus Bunge</i>	20
黃芩(황금)	<i>Scutellaria baicalensis Georgi</i>	14
車前子(차전자)	<i>Plantago asiatica L.</i>	14
麥門冬(맥문동)	<i>Liriope platyphylla Wang et Tang</i>	14
地骨皮(지골피)	<i>Lycium chinense Miller</i>	14
甘草(감초)	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer</i>	14
	Total	170

## 2.2. DPPH 라디칼 소거능 측정

CSYJE의 항산화 효과를 측정하기 위해 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거능을 측정하였다. 보라색을 띠며 radical을 지닌 수용성 물질 DPPH와 항산화 물질을 반응시켜 radical이 소거되는 것을 확인하며 이 과정에서 노랗게 색이 변하는 것을 통해 radical 소거능을 확인하는 방법이다. 메탄올과 증류수를 동일한 비율로 섞은 용액을 용매로 사용하여 250  $\mu$ M의 DPPH용액과 농도별 CSYJE (200, 400, 800 및 1,000  $\mu$ g/mL)를 제조하고 96 well plate에 250  $\mu$ M DPPH용액과 농도별 CSYJE (200, 400, 800 및 1,000  $\mu$ g/mL)를 동일한 비율로 혼합하고 spectrophotometer (Synergy HT, bio-TEK, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도 측정을 하였다. 대조군으로 200  $\mu$ M ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하였다.

## 2.3. ABTS 라디칼 소거능 측정

CSYJE의 항산화 효과를 측정하기 위해 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 자체로 radical을 띠지 않는 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)를 potassium persulfate와 산화, 환원 반응을 통해 radical을 형성하고 이때 ABTS 용액은 청녹색을 띠게 되며 항산화 물질과 반응시켜 색의 변화를 확인하여 radical 소거능을 확인하는 방법이다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt 와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하고 빛을 차단한 조건에서 24 h 반응시켰다. 이후 ABTS의 흡광도 값이 0.7 - 0.8 사이의 값이 되도록 ABTS 용액의 농도를 맞추고, CSYJE를 농도별(200, 400, 800 및 1,000  $\mu$ g/mL)로 제조하여 ABTS 용액 100  $\mu$ L와 농도별 시료 30  $\mu$ L를 빛이 차단된 상온에서 30 min 후 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도 측정을 하였다. 대조군으로 200  $\mu$ M ascorbic acid를 사용하였다.

## 2.4. 세포 배양

본 연구에서는 American type culture collection (ATCC; Manassas, USA)에서 구입한 RAW 264.7 마우스 대식세포를 사용하였으며, 1% penicillin/streptomycin (Gen DEPOT, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Gen DEPOT, USA)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gen DEPOT, USA) 배양액에서 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기로 배양하였다.

## 2.5. 세포 독성 평가

CSYJE의 세포 독성을 측정하기 위해 MIT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에  $7 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 24 시간 배양하였다. 상등액을 걷어낸 후 CSYJE를 농도별 (200, 400, 800 및 1,000  $\mu$ g/mL)로 처리하고 24 h 반응시켰다. 이후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MIT, Bio basic, Canada)를 4 h 처리한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Bio basic, Canada)를 넣고 반응시킨 뒤 spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도 측정을 하였다.

## 2.6. ROS 생성 측정

세포 내 ROS 생성을 측정하기 위해 DCF-DA 염색법을 사용하여 확인하였다. RAW 264.7 대식세포를 6 well plate에  $5 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양하였다. 배양된 세포에 LPS (1  $\mu$ g/mL)를 30 min 동안 처리하여 ROS 생성을 유도한 후 CSYJE를 농도별(200, 400, 800, 1,000  $\mu$ g/mL)로 처리하고 24 h 배양하였다. 상등액을 걷어내고 PBS로 2 회 세척 후 10  $\mu$ M DCF-DA를 첨가한 DMEM을 넣고 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 30 min 배양하였다. PBS로 2 회 세척 후 형광현미경을 통해 ROS생성을 측정하였다.

## 2.7. Western Blotting

RAW 264.7 대식세포에서 CSYJE의 항산화 관련 유전자들의 단백질 발현 수준을 확인하기 위해 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하고 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양하였다. 24 h 후 상등액을 걷어내고 LPS (1  $\mu$ g/mL)와 CSYJE를 농도별(200, 400, 800 및 1,000  $\mu$ g/mL)로 처리하고 24 h 배양하였다. 상등액을 걷어내고 PBS로 2 회 세척 후 Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail kit (Thermo fisher, USA)를 첨가한 RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo fisher, USA)로 세포를 용해시켰다. 그 후 20 min 동안 4  $^{\circ}$ C, 12,000 rpm의 조건으로 원심 분리하고 단백질을 얻었다. 추출된 단백질을 BCA assay (Thermo fisher, USA)로 정량하였고, 정량된 단백질을 10% polyacrylamide gel에 loading하고 전기영동 시켰다. Gel을 membrane으로 transfer하고 5%의 skim milk로 50 min 동안 blocking한 후 1 차 항체와 함께 처리하여 overnight하였다. 그 후 membrane을 Tris Buffered Saline with Tween 20

(TBST)로 3 회 반복 세척한 후 2 차 항체를 2 h 동안 부착하여 단백질 발현을 확인하였다.

## 2.8. Real-time RT-PCR

RAW 264.7 대식세포에서 CSYJE의 항염증 관련 유전자들의 mRNA 발현 수준을 확인하기 위해 6 well plate에  $5 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양하였다. 이후 상등액을 걷어내고 CSYJE를 농도별(200, 400, 800 및 1,000 µg/mL)로 처리하고 24 h 반응시켰다. Trizol reagent (Ambion, USA)를 사용하여 RNA를 추출한 후 diethylpyrocarbonate (DEPC treated-water; Sigma, USA)로 용해하고 정량하였다. 정량된 RNA를 cDNA 합성 kit (Revertra ACE-A; Toyobo, Japan)와 혼합하여 역전사(reverse transcription)한 후 cDNA로 합성하였다. cDNA와 Taqman probe (ThermoFisher Co, USA), Universal master mix (ThermoFisher Co. USA)를 이용하여 real-time PCR을 진행하여 실시간으로 유전자별 mRNA 발현량을 분석하였다. 실험에 사용된 Taqman probe는 Table 2에 표기하였다.

**Table 2.** Gene name and assay ID number in real-time RT-PCR analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_m1
COX-2	Cyclooxygenase 2	Mm00478374_m1
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta	Mm004344228_m1
IL-6	Interleukin 6	Mm00446190_m1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Mm00440502_m1

## 2.9. 통계분석

모든 데이터는 3 회 반복하였으며 SPSS 12.0 version (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였다. Student t-test를 통하여 비교 분석하였고 모든 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였다( $p < 0.05$ ).

## 3. 실험 결과

### 3.1. DPPH 및 ABTS Radical 소거능 측정

CSYJE의 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 대조군으로는 ascorbic acid를

사용하였다. CSYJE를 농도별(200, 400, 800 및 1,000 µg/mL)로 처리했을 때 DPPH radical 소거능은 각각 20%, 43%, 72%, 76%로 나타났으며, ABTS radical 소거능은 각각 14%, 27%, 44%, 52%로 나타났다(Figure 1).

### 3.2. 세포 생존율 측정

CSYJE에 대한 RAW 264.7 세포의 세포 생존율을 농도별(200, 400, 800 및 1,000 µg/mL)로 확인한 결과 처리한 모든 농도에서 독성이 없음을 확인하였다. 이때의 세포 생존율은 각각  $100.03 \pm 0.6\%$ ,  $98.72 \pm 0.8\%$ ,  $99.27 \pm 0.8\%$ ,  $100.97 \pm 2.5\%$ 로 나타났으며, 이에 본 연구에서는 1,000 µg/mL를 최고 농도로 실험을 진행하였다(Figure 2).

### 3.3. Nrf2, HO-1 Western Blotting

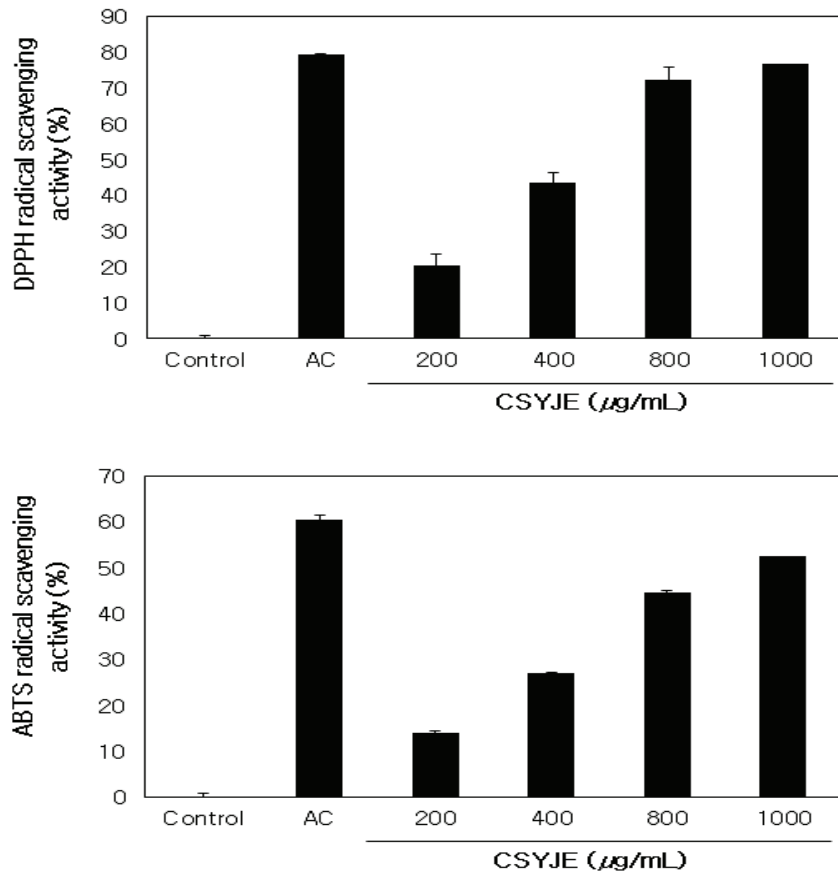
CSYJE에 대한 RAW 264.7 세포의 Nrf2, HO-1의 protein 발현 수준을 확인하였다. 시간대별로 확인한 결과 Nrf2와 HO-1은 각각 12, 24 h을 처리한 군에서 가장 많은 발현이 나타났다. CSYJE를 농도별(200, 400, 800 및 1,000 µg/mL)로 12 h 처리한 결과, CSYJE는 농도 의존적으로 Nrf2와 HO-1의 발현을 증가시켰다(Figure 3).

### 3.4. ROS생성 억제

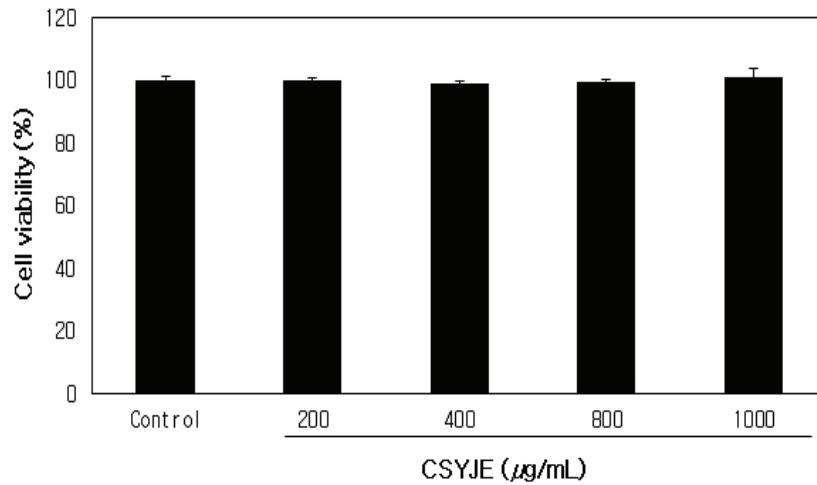
CSYJE의 ROS생성 억제능을 확인하기 위해 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 염색법을 이용하여 ROS생성량을 확인한 결과 control군에 비해 LPS만 처리한 군에서 ROS생성이 증가한 것을 확인했으며, CSYJE를 농도별 (200, 400, 800 및 1,000 µg/mL)로 처리한 군에서는 농도가 증가함에 따라 ROS생성량이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 4).

### 3.5. Real-time RT-PCR

CSYJE에 대한 RAW 264.7 세포의 iNOS, COX-2 및 pro-inflammatory cytokine (IL-6, IL-1 $\beta$ )의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과 LPS만 처리한 군은 control군에 비해 염증성 인자들의 mRNA 발현이 증가되었다. LPS와 CSYJE를 농도별(200, 400, 800 및 1,000 µg/mL)로 동시처리한 군은 LPS만 처리한 군에 비해 농도 의존적으로 mRNA 발현을 억제하였다(Figure. 5).

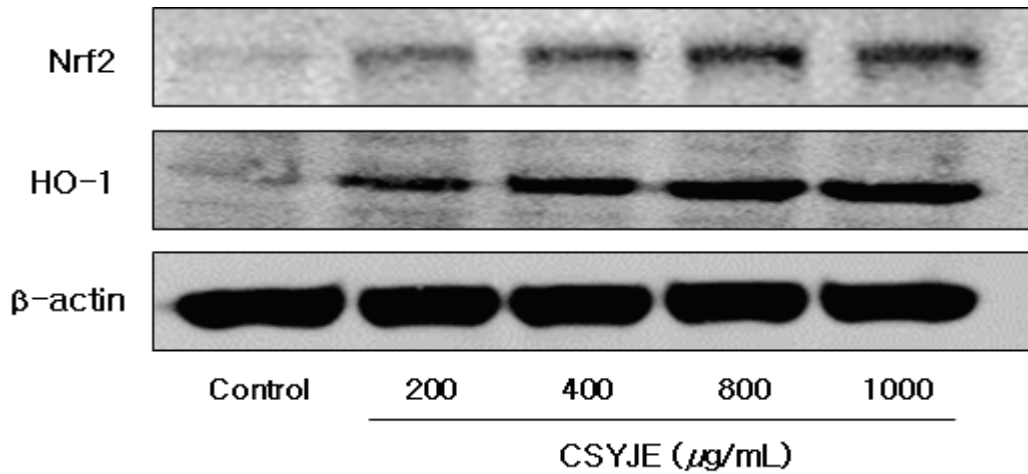
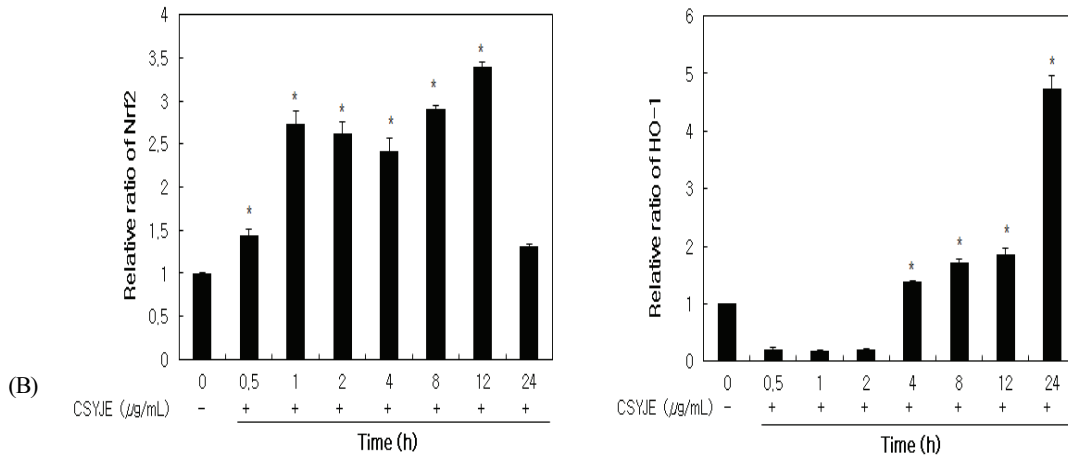
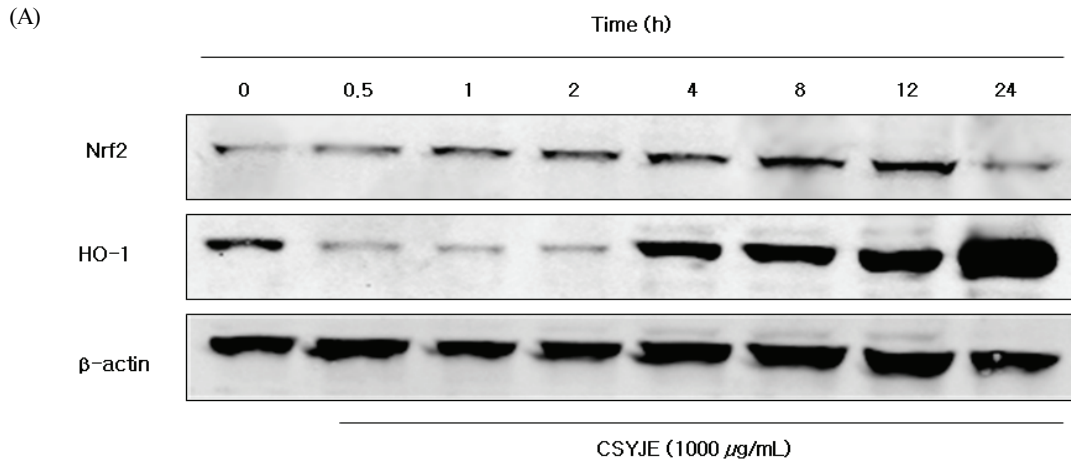


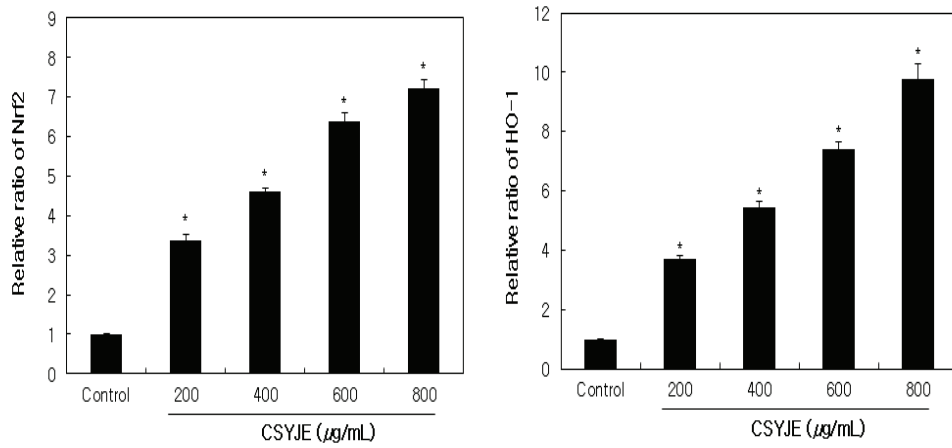
**Figure 1.** The effects of CSYJE on DPPH and ABTS radical scavenging. Control: untreated group. Positive control: 200 µM ascorbic acid (AC). 200, 400, 800 and 1,000 µg/mL: treated with various concentrations of CSYJE.



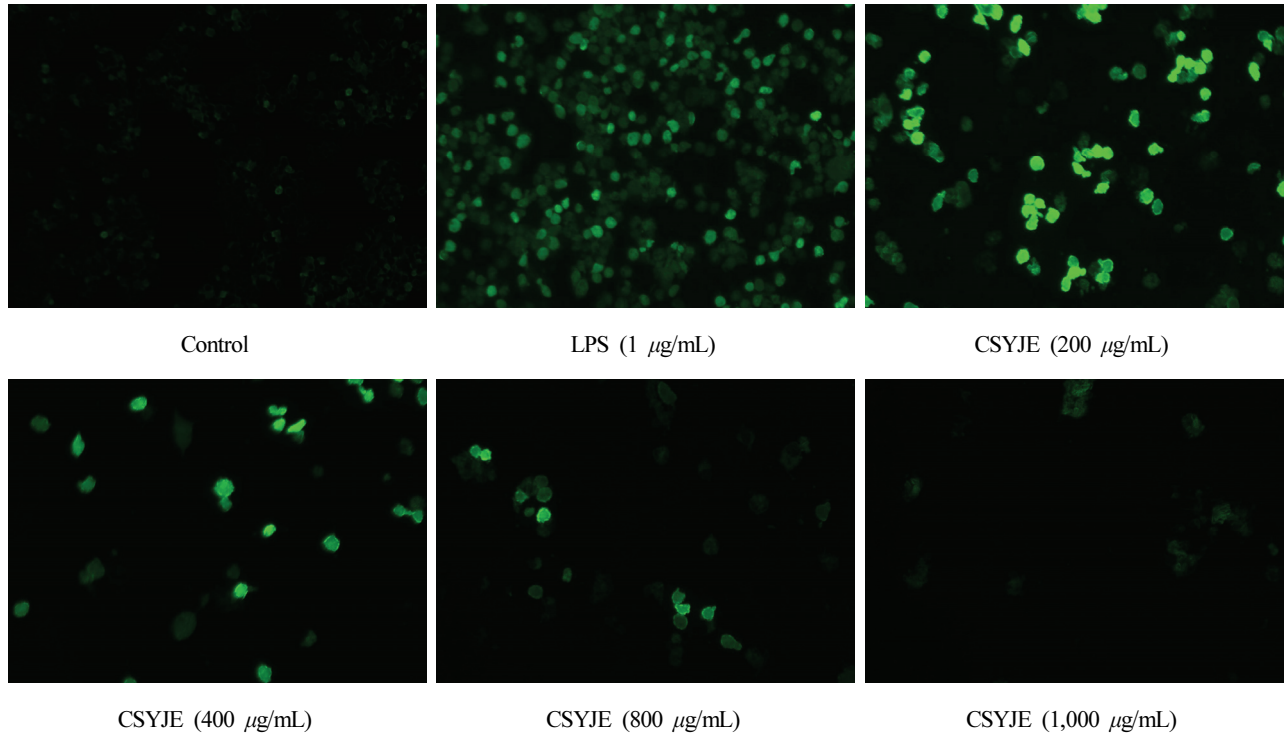
**Figure 2.** The effects of CSYJE on cell viability in RAW 264.7 macrophages. Control: untreated group. 200, 400, 800 and 1,000 µg/mL: treated with various concentrations of CSYJE.



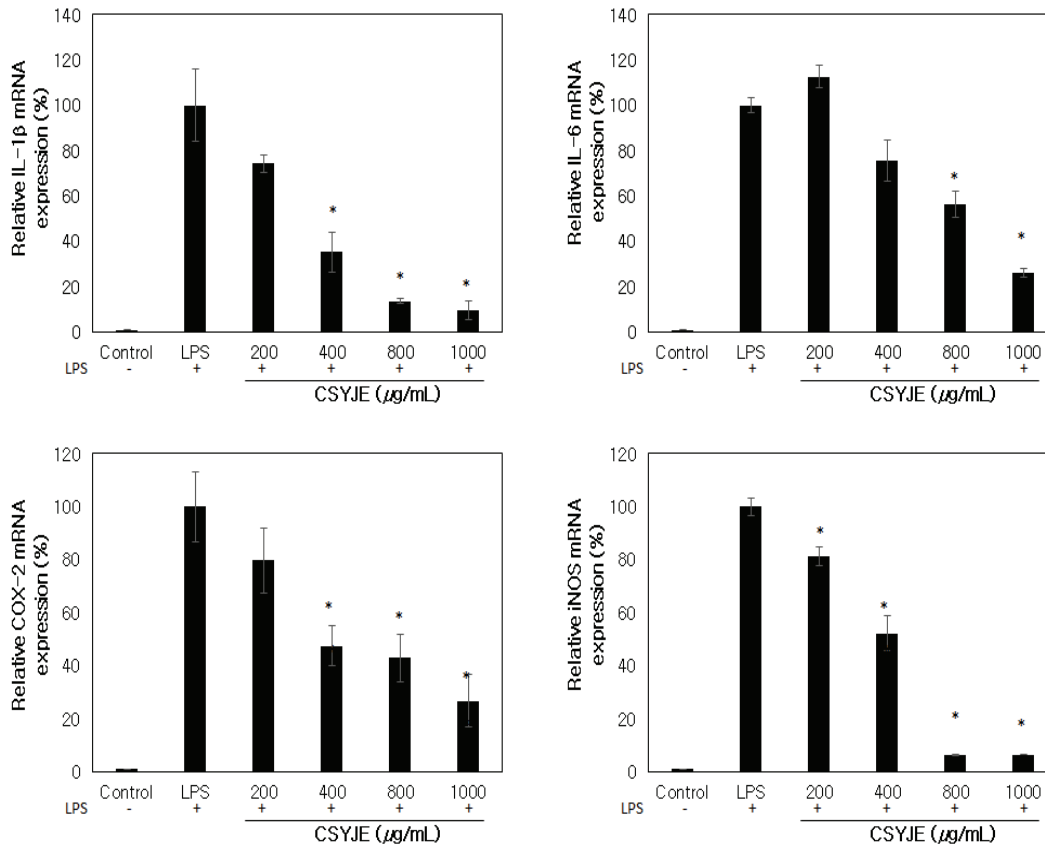




**Figure 3.** The effect of CSYJE on Nrf2 and HO-1 expression in RAW 264.7 macrophages in time-dependent manner and dose-dependent manner. Nrf2/HO-1 protein expression was analyzed by western blotting. (A) RAW 264.7 cells were treated with 1,000 µg/mL CSYJE for indicated durations (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24h). (B) RAW 264.7 cells were treated for 12h with CSYJE at the indicated concentrations (Control, 200, 400, 800 and 1,000 µg/mL). Control: untreated group. \**p* < 0.05 indicate a significant different compared with the control group of indicated proteins.



**Figure 4.** The effects of CSYJE on intracellular ROS generation in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Control : untreated group. LPS: treated with LPS (1 µg/mL); 200, 400, 800 and 1,000 µg/mL: treated with various concentrations of CSYJE with LPS (1 µg/mL).



**Figure 5.** The effects of CSYJE on LPS-induced iNOS, COX-2, IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA expressions in RAW 264.7 macrophages. Control : untreated group. LPS: treated with LPS (1  $\mu$ g/mL); 200, 400, 800 and 1,000  $\mu$ g/mL: treated with various concentrations of CSYJE with LPS (1  $\mu$ g/mL). Values are relative to the LPS. \* $p$  < 0.05 indicate a significant different from the LPS.

#### 4. 고 찰

본 연구는 CSYJE의 항염증 효과에 대한 기전 연구로 진행되었다[10]. 염증반응은 외부침입인자와 같은 자극에 의해 발생하는 손상과 생체내의 세포 손상을 국소화시켜 손상된 부위를 정상적으로 회복하고 유지하려는 생체의 방어기전이다. 면역을 담당하는 대표적인 세포인 대식세포는 동물 체내 모든 조직에 분포하며 침입한 세균 등을 잡아 소화시키고, 활성화된 대식세포는 체내 유입된 염증의 원인을 인식해 prostaglandin (PG), nitric oxide (NO)와 같은 염증 매개체 및 Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Interleukin 6 (IL-6)와 같은 pro-inflammatory cytokines 등의 염증 매개물질을 생성한다. LPS는 그람 음성균의 세포 외막에 존재하는 염증 유발물

질이며 대식세포 자극을 통해 NO, PGE<sub>2</sub> 및 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등의 염증 매개체들을 생성 시킨다[13]. 이러한 염증 매개체들의 과발현은 혈관투과성과 부종 등의 염증반응을 촉진시킨다[14]. IL-1 $\beta$ 는 염증성 자가 면역질환 치료와 관련 있지만 과도한 발현 시, 자가 면역장애, 관절염 및 피부염을 유도하며 TNF- $\alpha$  매개 염증성 질환을 조절한다[15]. IL-6는 선천성 및 후천성 면역 반응과 항상성 유지 역할을 하나, 과하게 생성되면 질환을 일으킨다[16-17].

대식세포에서 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)와 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)는 대표적 신호 전달 매개체의 역할을 하여 NO, COX-2 및 pro-inflammatory cytokines 발현과 생성에 관여한다[18]. 정상 상태에서 NF- $\kappa$ B는 inhibitory kappa B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ )에 의해 세포질에서 통제가 되며, 염증 반응 시에 I $\kappa$ B $\alpha$ 로부터 떨어져 활성화 된



다. 활성화된 NF- $\kappa$ B는 세포질에서 핵으로 전위되어 pro-inflammatory cytokines 발현의 전사 인자로서 중요한 역할을 한다[19]. MAPKs는 ERK, JNK, p38로 이루어져있으며, ERK 및 p38은 IL-1 $\beta$  방출에 관여하고, p38은 TNF- $\alpha$ , IL-6 방출에 관여하며 JNK는 iNOS, COX-2 발현에 관여한다[20]. 위 사실을 바탕으로 CSYJE의 항염증 기전을 확인하고자 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 경로를 western blotting으로 확인한 결과 MAPKs와 NF- $\kappa$ B의 경로에는 영향을 받지 않는 것으로 확인했다(Data not shown).

ROS는 생체 내 대사과정 중 산화반응에서 발생한다. 정상세포에서 ROS는 항상성 유지에 이로운 역할을 하지만 ROS가 과도하게 존재하게 되면 산화적 스트레스가 유발된다. ROS는 자외선, LPS, 스트레스 등과 같은 다양한 요인에 의해 과도하게 생성될 수 있으며 특히 태양으로부터의 자외선은 세포 내에서 cytokine인 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 를 생성하게 한다. 생성된 cytokine은 피부세포에서 collagen의 합성을 감소시키거나 collagen의 사슬 절단을 끊어 노화를 일으킨다[21-22]. 또한, LPS로 생성된 ROS는 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 다양하게 연구되어 왔으며 세포 성분손상 및 피부노화를 활성화시킨다[1]. Nrf2는 Phase II 효소의 활성을 조절하는 전사인자이다. 정상상태에서 Nrf2는 keap1과 복합체를 이루며 keap1 단백질에 의해 분해되어 세포질 내에서 낮은 수준으로 존재하지만 산화적 스트레스나 자외선, LPS와 같은 외부자극을 받게 되면 keap1 단백질로부터 분리되며 지속적으로 생성 및 활성화되며 핵으로 전위된다[2]. 활성화되어 핵으로 전위된 Nrf2는 small Maf 단백질과 이합체를 형성하여 ARE에 결합해 ARE 의존성 항산화 유전자인 HO-1를 활성화시킨다[3]. 또한 Nrf2 억제제인 brusatol을 이용한 연구에서 Nrf2의 억제제가 Nrf2의 산화 방어 기전을 억제시켜 항산화 효과를 약화시키는 것으로 확인했다. 이를 통해 항산화 활성화에서 Nrf2 역할의 중요성을 알 수 있었다[23]. Nrf2에 의해 생성된 HO-1은 LPS로 유도된 대식세포에서 ROS 생성과 염증 반응에 방어기작 역할을 하는 항산화 효소이며 HO-1에 의해 생성되는 일산화탄소, biliverdin, 철 등은 항산화와 항염 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다[24]. 위의 내용을 바탕으로 CSYJE의 항산화 효과를 확인하기 위해 DPPH와 ABTS radical 소거능을 확인한 결과 각각의 농도별(200, 400, 800 및 1,000  $\mu$ g/mL)로 처리했을 때, DPPH radical 소거능은 각각 20%, 43%, 72%, 76%로 나타났으며, ABTS radical 소거능은 각각 14%, 27%, 44%, 52%로 나타났다. 이후 세포 독

성 평가를 위해 MIT assay를 실시한 결과 CSYJE을 최고 농도로 처리한 1,000  $\mu$ g/mL의 농도에서도 세포 독성을 나타내지 않았다. 또한 항산화 활성화와 관련된 단백질인 Nrf2와 HO-1의 단백질 발현 수준을 확인하기 위해 western blotting을 진행하였다. 먼저 CSYJE를 시간대 별로 처리하여 발현량을 확인한 결과 Nrf2는 12 h을 처리한 군까지 발현이 증가하는 것을 확인했으며, CSYJE를 24 h 처리한 군에서 Nrf2의 발현은 CSYJE를 처리하지 않은 군과 비슷한 양상을 보여 CSYJE를 24시간 처리했을 때 Nrf2의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 확인했다. 하지만 전사인자인 Nrf2의 활성화로 인해 HO-1의 발현은 12 h이 아닌 24 h에서 가장 많은 발현량을 보였다. Nrf2의 발현에 따라 HO-1의 발현도 같이 증가할 것으로 예상했으나 CSYJE을 24시간 처리한 군에서는 Nrf2와 HO-1의 발현은 대조적인 경향을 보였다. 이는 이전연구에서도 밝혀진 바가 있다[25]. 실험 결과에서는 Nrf2의 발현이 가장 많았던 12 h에서 농도 별로 CSYJE를 처리하여 Nrf2와 HO-1의 단백질 발현량을 확인하였으며, 농도 의존적으로 Nrf2와 HO-1의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이후 LPS로 세포 내 생성된 ROS에 대한 CSYJE의 억제 효과를 확인하기 위해 DCF-DA 염색법을 실시한 결과 LPS처리군에서 ROS가 세포 내에 다량 생성된 것을 확인하였고, CSYJE 처리군에서는 농도 의존적으로 ROS생성이 억제되었음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 CSYJE의 항산화 효과를 확인했다.

CSYJE의 항산화 효과로 활성화된 Nrf2는 항산화 효소인 HO-1을 발현시키며, HO-1은 bilirubin을 생성하고 이는 염증성 사이토카인의 생성을 감소시키는 것으로 알려져 있다[5]. 이에 대한 CSYJE의 효과를 확인하기 위해 real-time RT-PCR을 실시한 결과 염증성 매개인자인 iNOS, COX-2와 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현은 억제시켰으나, 반대로 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현은 CSYJE의 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(Data not shown). 비록 CSYJE이 TNF- $\alpha$ 의 발현은 억제시키지 못했지만 항염증 효과를 확인 할 수 있었고, 이 결과로 선행된 연구에서 밝히지 못한 CSYJE의 항염증 기전이 염증기전에서 대표적으로 알려진 MAPKs, NF- $\kappa$ B의 경로가 아닌 Nrf2/HO-1 항산화 활성화 경로를 통해 항염증 효과를 나타낸 것으로 밝혀낼 수 있었다. 또한, CSYJE의 ROS 억제효과를 확인함으로써 CSYJE가 자외선과 같은 외부자극으로부터 세포 내 생성되는 cytokine을 억제하여 피부 노화와 같은 피부 손상을 방지할 수 있을 것이라 생각된다.

## Acknowledgement

본 연구는 2020년도 세명대학교 대학혁신 지원사업에 의해 수행되었습니다.

## Reference

1. K. J. Trouba, H. K. Hamadeh, R. P. Amin, and D. R. Germolec, Oxidative stress and its role in skin disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **4**(4), 665 (2002).
2. J. W. Kaspar, S. K. Niture, and A. K. Jaiswal, Nrf2:inrf2 (keap1) signaling in oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, **47**(9), 1304 (2009).
3. J. A. Johnson, D. A. Johnson, A. D. Kraft, M. J. Calkins, R. J. Jakel, M. R. Vargas, and P. C. Chen, The nrf2-are pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration, *Annals of The New York Academy of Sciences*, **1147**(1), 61 (2008).
4. L. Li, P. Grenard, J. T. Van Nhieu, B. Julien, A. Mallat, A. Habib, and S. Lotersztajn, Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts, *Gastroenterology*, **125**(2), 460 (2003).
5. A. Nakao, L. E. Otterbein, M. Overhaus, J. K. Sarady, A. Tsung, K. Kimizuka, and F. H. Bach, Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel, *Gastroenterology*, **127**(2), 595 (2004).
6. S. R. Yoo, H. K. Ha, N. R. Lee, H. K. Shin, C. S. Seo, A study on change of marker compounds and biological activity in *chungsimyeonja-eum* decoction depending on a storage temperature and periods, *The Korea Journal of Herbology*, **32**(4), 25 (2017).
7. I. J. Rhee and D. M. Lee, The effect of some antipolydipsia oriental prescriptions on experimental diabetic rats, *The Pharmaceutical Society of Korea*, **38**(4), 555 (1994).
8. Y. Z. Yang, Y. Z. Tang, and Y. H. Liu, Wogonoside displays anti-inflammatory effects through modulating inflammatory mediator expression using raw 264.7 cells, *Journal of Ethnopharmacology*, **148**(1), 271 (2013).
9. X. L. Li, A. G. Zhou, L. Zhang, and W.J. Chen, Antioxidant status and immune activity of glycyrrhizin in allergic rhinitis mice, *International Journal of Molecular Sciences*, **12**(2), 905 (2011).
10. H. S. Lim, Y. J. Kim, C. S. Seo, S. R. Yoo, H. K. Shin, and S. J. Jeong, *Chungsimyeonja-eum* inhibits inflammatory responses in raw 264.7 macrophages and haca2 keratinocytes, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **15**(1), 371 (2015).
11. P. Perer, Text of the immune system, third edition, 1, Lifescience, Seoul (2011).
12. I. S. Kim, S. H. Lee, K. J. Lee, D. S. Lee, J. S. Park, and N. K. Lee, Text of essential immunology, **28**, Daihak, Seoul (2017).
13. J. A. Smith, A. Das, S. K. Ray, and N. L. Banik, Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases, *Brain Research Bulletin*, **87**(1), 10 (2012).
14. M. Hori, M. Kita, S. Torihashi, S. Miyamoto, K. J. Won, K. Sato, and H. Karaki, Upregulation of inos by cox-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with lps, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **280**(5), 930 (2001).
15. C. A. Dinarello, Biologic basis for interleukin-1 in disease, *American Society of Hematology*, **87**(6), 2095 (1996).
16. T. Kishimoto, S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga, Interleukin-6 family of cytokines and gp130, *American Society of Hematology*, **86**(4), 1243 (1995).
17. D. Y. Kim, Anti-allergic effect of *sapindus mukorossi* fruits extract in human mast cells, *Journal of Investigative Cosmetology*, **15**(4), 389 (2019).
18. X. Xu, P. Yin, C. Wan, X. Chong, M. Liu, P. Cheng, J. Chen, F. Liu, and J. Xu, Punicalagin inhibits inflammation in lps-induced raw 264.7 macrophages via the suppression of tlr4-mediated maps and nf- $\kappa$ b activation, *Inflammation*, **37**(3), 956 (2014).
19. T. Lawrence, C. Fong, The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for nf- $\kappa$ b, *The International*

- Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42**(4), 519 (2010).
20. H. K. Kim, Role of erk/mapk signalling pathway in anti-inflammatory effects of ecklonia cava in activated human mast cell line-1 cells, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **7**(9), 703 (2014).
  21. M. Yoshizumi, T. Nakamura, M. Kato, T. Ishioka, K. Kozawa, K. Wakamatsu, and H. Kimura, Release of cytokines/chemokines and cell death in uvb-irradiated human keratinocytes, hacat, *Cell Biology International*, **32**(11), 1405 (2008).
  22. S. N. Lee, The antioxidant effect of rutin in human dermal fibroblasts damaged by reactive oxygen species, *Asian Journal of Beauty & Cosmetology*. **12**(6), 831 (2014).
  23. X. Xu, H. Li, X. Hou, D. Li, S. He, C. Wan, P. Yin, M. Liu, F. Liu, and J. Xu, Punicalagin induces nrf2/ho-1 expression via upregulation of pi3k/akt pathway and inhibits lps-induced oxidative stress in raw 264.7 macrophages, *Mediators of Inflammation*. **1**, 15 (2015).
  24. J. P. Roach, E. E. Moore, D. A. Partrick, S. S. Damle, C. C. Silliman, R. C. McIntyre, and A. Banerjee, Heme oxygenase-1 induction in macrophages by a hemoglobin-based oxygen carrier reduces endotoxin-stimulated cytokine secretion, *Shock*, **31**(3), 251 (2009).
  25. N. Li, J. Alam, M. I. Venkatesan, A.E. Fernandez, D. Schmitz, E. D. Stefano, N. Slauther, E. K. Xiaorong wang, A. Huang, M. Wang, A. H. Miguel, and A.E. Nelj, Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals, *Immunology*, **173**(5), 3467 (2004).