

當歸 추출물이 피부 각질형성세포의 염증반응에 미치는 영향

허정[#], 박호연, 김엄지, 김은영, 손영주, 정혁상^{*}

경희대학교 한의과대학 해부학교실

Effect of Angelicae Gigantis Radix for Inflammatory Response in HaCaT Cells

Jung Huh[#], Hoyeon Park, Eom Ji Kim, Eun-Young Kim
Youngjoo Sohn, Hyuk-Sang Jung^{*}

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero,
Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : Angelicae Gigantis Radix (AG) is a plant of the Ranunculus family. AG have been reported to have various pharmacological effects on human health which include uterine growth promotion, anti-inflammatory, analgesic, and immune enhancement. However, research on dermatitis disease is insufficient. Therefore, we investigated the effects of AG on tumor necrosis factor- α (TNF- α)/interferon- γ (IFN- γ) stimulated HaCaT cell.

Methods : To investigate the effect of AG on HaCaT cell, HaCaT cells were pre-treated with AG for 1 hour and then stimulated with TNF- α /IFN- γ . After 24 hours, media and cells were harvested to analyze the inflammatory mediators. Concentration of human interleukin-1beta (IL-1 β), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and TNF- α in the media were assessed by ELISA. mRNA expression of human thymus and activation-regulated chemokine (TARC), IL-6, and IL-8 were analyzed by RT-PCR. Additionally, the mechanisms of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signaling pathway were investigated by Western blot.

Results : The treatment of AG inhibited gene expression levels of IL-6, IL-8, and TARC and protein expression levels of IL-1 β , MCP-1, and GM-CSF. Also, AG significantly reduced extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation and NF- κ B translocation in TNF- α /IFN- γ stimulated HaCaT cell.

Conclusions : Taken together, these results demonstrate that AG can alleviate inflammatory diseases such as atopic dermatitis by regulating the expression of inflammatory cytokines. Also, it suggest that AG may a promising candidate drug for the treatment of inflammatory disease such as atopic dermatitis.

Key words : Angelicae Gigantis Radix, HaCaT cell, Atopic dermatitis, Cytokine, MAPKs

*Corresponding author : Hyuk-Sang Jung, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-9449

· Fax : +82-2-961-9449

· E-mail : jsh@khu.ac.kr

#First author : Jung Huh, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-0327

· E-mail : hjhj1877@naver.com

· Received : 11 April 2022

· Revised : 28 April 2022

· Accepted : 25 May 2022

I. 서론

아토피 피부염 (atopic dermatitis)은 가려움, 피부 건조, 습진, 염증 등을 주 증상으로 하는 질환으로¹⁾ 부종, 홍반, 찰상, 진물, 가피, 태선화 등의 증상이 동반될 수 있다²⁾. 현대인들은 생활 속에서 환경호르몬과 오염물질의 노출, 스트레스, 인스턴트 및 포화지방산이 함유된 식품의 섭취로 유발된 영양결핍과 같은 다양한 원인에 의해 면역기능이 저하되고, 이로 인해 아토피 피부염, 천식, 알레르기, 류마티스 관절염과 같은 염증성 면역 질환의 발병률이 증가하고 있다³⁾. 아토피 피부염은 소아 유병률이 높고 연령이 증가할수록 호전되는 경우가 많아 과거 소아 피부 질환으로 간주 되었으나, 최근에는 성인기까지 지속되거나 성인기에 초발하는 경우가 증가하고 있다⁴⁻⁵⁾. 또한 아토피 피부염의 특징인 소양감으로 인해 환자와 가족들은 정신적·사회적으로 불편함을 겪고 삶의 질에 있어 부정적 영향을 받는 것으로 나타났으나⁶⁾, 현재까지 완치 확률이 낮아 증상의 완화 및 장기적 관리를 목적으로 치료하고 있다⁵⁾.

아토피 피부염을 치료하기 위해서는 피부 장벽 기능의 회복과 감염의 방지, 피부염의 유발 및 악화요인의 회피, 염증 반응의 약화가 필요하다⁷⁾. 현재 피부 염증 질환 치료를 위해 스테로이드 및 항히스타민제, 면역억제제의 복용과 도포, 광선 치료 등을 사용하고 있으나, 장기 치료 시 피부 위축과 모세혈관 확장, 골다공증 및 근육 약화, 당뇨 및 심독성 작용 등의 심각한 부작용을 초래할 수 있으므로⁸⁻⁹⁾ 보다 안전한 한약제제를 이용한 한방치료 수요가 증가하고 있다¹⁰⁻¹¹⁾.

각질형성세포는 표피의 95% 이상을 차지하는 피부 주요 구성 세포로, 각질 형성을 통해 신체를 보호하고 수분 증발을 방지하며, 재생피화와 상처 치유에 중요한 역할을 한다. 또한 사이토카인 및 케모카인과 같은 염증 인자를 생산하여 피부 항상성을 유지하고 염증반응을 조절한다¹²⁻¹³⁾. 특히, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ)에 의한 자극은 각질형성세포로부터 염증성 사이토카인의 비정상적인 분비를 유발할 수 있고, 이러한 자극이 지속될 경우 노화, 아토피 피부염, 건선 등의 피부질환을 발생시키는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁵⁾. 대표적인 아토피 관련 Th2 케모카인 thymus and activation-regulated chemokine (TARC)와 macrophage-derived chemokine (MDC)는 염증 부위로 Th2 세포의 이동을 유도하는 것으로 알려져 있으며¹⁶⁾, 아토피 피부염 환자의 혈청에서 다량 검출되어 아토피 피부염 발생과 관계가 있다고 보고 되어왔다¹⁷⁾.

當歸 (Angelicae gigantis Radix)는 미나리과 (Umbelliferae)에 속한 다년생 본초인 참당귀의 뿌리로 1~2년생 뿌리를 꽃피기 전에 채취하여 건조한 것이다¹⁸⁾. 當歸의 약리작용으로는 자궁의 발육 촉진, 항염, 진통, 면역증강에 대한 효능이 있는 것으로 보고되었다¹⁹⁾.

當歸의 성분은 isoimperatorin, nodakenetin, angelinol, gigasol, prenyletin, nodakenin, decursinol, imperatorin, decursin, decursidin, decursinol angelate, choline 등으로 알려져 있다¹⁸⁾. 이들 중 decursin은 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) 경로를 통해 염증성 cytokine의 발현을 억제하는 효과가 있으며, nodakenin은 신경 보호, 항응집, 항균 등의 효과가 있는 것

으로 보고되었다²⁰⁾. 또한 當歸는 DNCB로 유발된 동물 모델 (BALB/c)에서 염증반응을 유도하는 immunoglobulin E (IgE)의 생성을 억제하고²¹⁾, LPS와 IFN- γ 로 자극된 RAW 264.7 대식세포를 대상으로 nitric oxide (NO), TNF- α 의 생산과 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 효과적으로 억제한다고 보고되었을 뿐 아니라²²⁾ 염증성 질환, 특히 알레르기 질환을 치료할 수 있다는 가능성이 보고되기도 하였다²³⁾. 그러나 피부의 면역반응 실험에 주로 사용되는 각질형성세포에 대한 연구는 진행되지 않았다. 이에 본 연구자는 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포에 염증을 유발하는 TNF- α 와 IFN- γ 를 자극하여, 當歸의 항염증 효능 및 기전을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

국내에서 재배한 當歸는 옴니허브 (Daegu, Korea)에서 구매하였다. HaCaT cell은 cell line service (CLS, Eppelheim, Germany)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)은 웰진 (Daejeon, Korea)에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)는 Atlas Biologicals (Fort Collins, CO, USA)에서, penicillin-streptomycin (P/S)은 Gibco (New York, USA)에서, TNF- α 와 IFN- γ 는 R&D System (MN, USA)에서 구입하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)인 CellTiter 96® Aqueous One solution cell proliferation assay 시약은 Promega (Wisconsin, USA)에서 구입하여 사용하였고, RNAiso Plus는 Takara Bio (Dalian, China)에서, SuperScript II Reverse Transcriptase kit와 SYBR green은 Invitrogen (California, USA)에서 구입하였다. Taq polymerase는 Kapa Biosystems (Massachusetts, USA)에서 구매하였으며, PCR primers는 Genotech (Daejeon, Korea)에서 제작하였다. GM-CSF, MCP-1, IL-1 β 와 TNF- α enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D system 사의 제품을 사용하였다. total-ERK-1,2 (T-ERK), phosphorylated ERK-1,2 (P-ERK), total-c-Jun N-terminal kinase (T-JNK), phosphorylated JNK (P-JNK), total-p38 (T-p38), phosphorylated p38 (P-p38), NF- κ B, phosphorylated NF- κ B (P-NF- κ B), nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha (I κ B α)와 phosphorylated I κ B α (P-I κ B α)의 항체는 Cell Signaling Tech (Beverly, MA)에서, Lamin B와 Actin 항체는 SantaCruz biotechnology (CA, USA)에서 구입하였다.

2. 재료 및 추출 방법

등근 플라스크에 當歸 100 g을 넣은 후, 80% (v/v) 에탄올 1 L를 가하여 초음파 분쇄 과정 없이 2주간 냉침하였다²⁴⁾. 추출액은 여과지로 여과하였고, 감압농축기를 이용하여 농축 후 동결 건조하여 13.4 g (수득률 13.4%)의 추출물을 얻었다. 當歸 추출물 (*Angelicae gigantis Radix*, AG)은 초저온 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

3. 세포 배양 및 세포 생존율 측정

HaCaT 세포는 10% FBS와 5% P/S가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C, 95% 습도 조건에서 배양하였으며, 2~3일 간격으로 배지를 교체하였다.

HaCaT 세포에서 AG의 독성을 분석하기 위해 MTS assay를 진행하였다. 96 well plate에 well 당 1.5 x 10⁴ cells/100 µl씩 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 안정화하였다. FBS가 포함되지 않은 DMEM을 이용해 AG를 농도별로 희석하여 처리한 후 24시간 동안 반응시킨다. 반응 종료 후 MTS solution을 Well 당 20 µl씩 처리하여 37°C에서 2시간 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정했다. 세포 생존율은 정상군 대비 백분율로 환산하였고, 세포 생존율이 90% 미만을 나타낼 때, 독성이 있다고 판단하였다.

4. 역전사 중합효소 연쇄반응

(reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

AG가 염증성 사이토카인의 messenger RNA (mRNA) 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HaCaT cell을 6 well plate에 1 × 10⁶ cells/well로 seeding하고 24시간 동안 안정화하였다. 그 후 AG를 농도별로 1시간 동안 처리 후, TNF-α/IFN-γ를 10 ng/ml 처리하고 24시간 동안 자극하였다. plate 내 media를 제거하고 세포를 DPBS로 3회 수세한 후 cell을 수확하였다. 수확한 세포는 RNAiso plus를 이용하여 RNA를 추출하였으며, SuperScript II Reverse Transcriptase kit를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR은 Kapa Taq PCR Kit를 사용하였다. 각 RNA 추출, cDNA 합성, PCR은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. PCR 조건 및 primer sequence는 table 1에 정리하였다.

Table 1. Primer Sequence for RT-PCR Analysis.

Primer	Primer Sequence (5'-3')	Annealing Temp.	Cycles	Accession No.
TARC	F: ACTGCTCCAGGGATGCCATCGTTTTT R: ACAAGGGGATGGGATCTCCCTCACTG	60°C	44	NM_002987.3
IL-6	F: GATGGCTGAAAAAGATGGATGC R: TGGTTGGGTCAGGGGTGGTT	59°C	45	NM_000600.4
IL-8	F: ACATGACTTCCAAGCTGGCCG R: TTTATGAATTCTCAGCCCTC	57.5°C	46	NM_000584.4
GAPDH	F: CGTCTAGAAAAACCTGCCAA R: TGAAGTCAAAGGAGACCACC	50°C	30	NM_001256799.3

5. 효소 면역 측정 (ELISA)

AG가 사이토카인 단백질의 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 HaCaT cell을 6 well plate에 1 × 10⁶ cells/well로 seeding하고 24시간 동안 안정화하였다. 그 후 AG를 농도별로 1시간 동안 처리 후, TNF-α/IFN-γ (10 ng/ml)를 처리하고 24시간 동안 자극하였다. 24시간 후 media를 4,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 분리하여, 배양액 내에 존재하는 GM-CSF, MCP-1, IL-1β와 TNF-α의 농도를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 실험 방법은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다.

6. Western blotting 분석

AG가 염증 억제 효능에 미치는 기전을 분석하기 위해, HaCaT 세포를 6 well plate에 1 × 10⁶ cells/well로 seeding하고 24시간 동안 안정화한 후 AG를 농도별로 1시간 전처리 하였다. 이후 TNF-α/IFN-γ 10 ng/ml을 처리하여 5분, 15분, 30분, 60분 시간별로 자극한 후 cell을 수확하여 radioimmunoprecipitation assay buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용하여 세포를 용해하였다.

용해된 세포를 4°C에서 30분 반응시킨 후 13,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하였고, 상층액은 bicinchoninic acid assay로 정량하였다. 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여

100 V에서 90분간 전개하였다. 전기영동 후 단백질을 gel에서 nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. 이후 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 membrane을 blocking buffer (5% skim milk in TBST)로 1시간 blocking한 후, T-ERK, P-ERK, T-JNK, P-JNK, T-p38, P-p38, NF- κ B, P-NF- κ B, I κ B α 와 P-I κ B α 의 항체를 1% bovine serum albumin 용액에 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 overnight

반응시켰다. 그 후 membrane을 TBST로 수세하고 적합한 2차 항체를 1:10,000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그 membrane을 다시 TBST로 10분간 6회, 총 1시간 동안 수세하였다. 반응이 끝난 membrane은 enhanced chemiluminescence solution에 반응시킨 후 X-ray film을 이용하여 현상하였다. 항체 정보 및 희석 배수는 table 2에 표기하였다.

Table 2. Summary of Antibodies Used in Western Blot

	Name of antibody	Origin	supplier	Cat. No	antibody dilution
Primary Antibodies	Actin	mouse	Santacruz	SC-8432	1:500
	T-ERK	Rabbit	Cell signalling	4965	1:1000
	P-ERK	Rabbit	Cell signalling	4307	1:1000
	T-JNK	Rabbit	Cell signalling	9258	1:1000
	P-JNK	Rabbit	Cell signalling	4668	1:1000
	T-p38	Rabbit	Cell signalling	9212	1:1000
	p-p38	Rabbit	Cell signalling	4511	1:1000
	NF- κ B	Rabbit	Cell signalling	8242	1:1000
	P-NF- κ B	Rabbit	Cell signalling	3033	1:1000
	I κ B α	Rabbit	Cell signalling	4814	1:1000
	P-I κ B α	Rabbit	Cell signalling	2859	1:1000
Secondary Antibodies	Lamin	Mouse	Santacruz	sc-374015	1:1000
	HRP-conjugated IgG	Rabbit	Jackson	111-035-045	1:10000
	HRP-conjugated IgG	Mouse	Jackson	115-035-062	1:10000

7. 통계분석

모든 실험에서 얻은 결과는 평균 \pm 표준오차 (Mean \pm SEM) 나타내었으며, Graph Pad PRISM Software (Version 5.01, Graphpad Software, Inc., CA, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 분석하였고, Dunnett's multiple comparison test를 실시하여 검정하였으며, P 값이 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. AG의 세포 독성 분석

AG가 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 분석하기 위해 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 그리고 500 μ g/ml의 농도 범위에서 MTS assay를 수행하였다.

AG를 처리한 결과, 125 μ g/ml 농도까지 세포 독성이 관찰되지 않았으나, 250 μ g/ml 농도부터 세포 독성을 보였다. 이에

100 μ g/ml 농도 이하의 AG를 염증 효능 분석에 사용하였다 (Figure 1).

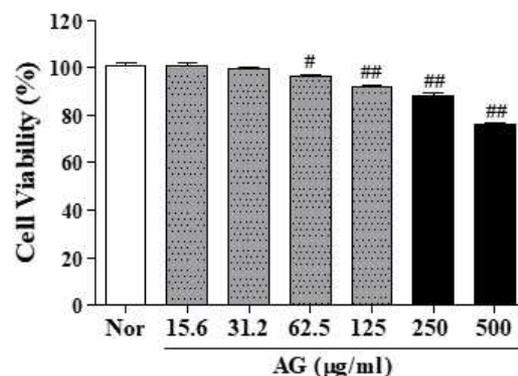


Figure 1. Cell viability of AG in HaCaT cells. Cell viability was determined with MTS assay. Cells were treated with AG from 15.6 to 500 μ g/ml for 24 h. Values are mean \pm SEM of three independent experiments. #p < 0.05 and ##p < 0.01 vs. Nor.

2. AG가 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인의 유전자 발현에 미치는 영향 분석

AG가 HaCaT 세포에서 염증에 관여하는 사이토카인인 TARC, IL-6 및 IL-8의 유전자 발현에 미치는 영향을 분석해 본 결과, 자극제를 처리하지 않은 군에 비해 TNF- α /IFN- γ 를

처리한 군의 TARC, IL-6 및 IL-8의 유전자 발현이 유의하게 증가하였다 (Figure 2). 반면 AG 100 μ g/ml 전처리를 통해 IL-6와 TARC의 유전자 발현은 유의하게 억제되었으며 (Figure 2B and 2D), IL-8의 유전자 발현은 감소하는 경향을 보였다 (Figure 2C).

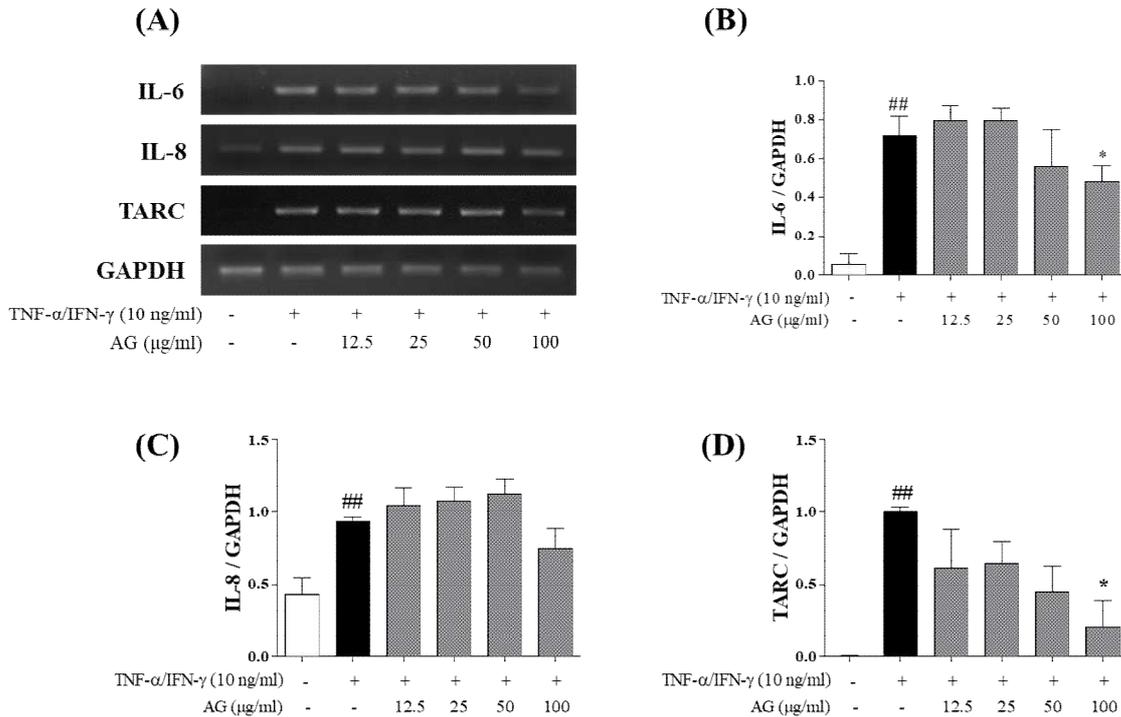


Figure 2. Effects of AG on TARC, IL-6, and IL-8 mRNA expression levels in HaCaT cells. Cells were pre-treated with various concentration of AG for 1 h prior to treated with TNF- α /IFN- γ (10 ng/ml) for 24 h. (A) mRNA expression of IL-6, IL-8, and TARC were examined by RT-PCR. (B-D) mRNA expressions were measured using Image J software. Values are mean \pm SEM of three independent experiments. ^{##}p < 0.01 vs. TNF- α /IFN- γ (-) and ^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01 vs. TNF- α /IFN- γ (+).

3. AG가 HaCaT 세포에서 사이토카인의 단백질 발현에 미치는 영향 분석

AG가 HaCaT 세포에서 염증에 관여하는 사이토카인인 IL-1 β , MCP-1, GM-CSF 및 TNF- α 의 단백질 발현에 미치는 영향을 분석해 본 결과, 자극제를 처리하지 않은 군에 비해 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 군의 IL-1 β , MCP-1, GM-CSF 및 TNF- α 의 발현이 유의하게 증가하였다 (Figure 3). 그러나 AG를 처리한 군의 IL-1 β 의 단백질 발현량은 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 군에 비해 50, 100 μ g/ml에서 유의한 감소를 보였으며 (Figure 3A), MCP-1의 단백질 발현은 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 군에 비해 AG를 처리한 군이 50, 100 μ g/ml에서 농도 의존적으로 유의한 감소를 보였다 (Figure 3B). 또한, GM-CSF의 단백질 발현은 AG를 처리한 군이 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 군에 비해 50, 100 μ g/ml에서 유의한 감소를 보였다 (Figure 3C). 그

러나 AG는 TNF- α 의 발현에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 3D).

4. AG가 MAPKs 신호 전달 경로의 인산화 억제에 미치는 영향

AG가 HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 의 자극에 의한 MAPKs의 신호전달 경로에 미치는 영향을 western blot으로 관찰한 결과, 자극제를 처리하지 않은 군에 비해 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 군의 P-ERK는 5, 15분에서, P-JNK와 P-p38은 15분에서 유의하게 증가하였다 (Figure 4). 반면, AG를 처리한 군에서 P-ERK는 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 군에 비해 5분에서 유의하게 감소하였다 (Figure 4B). 그러나 p38과 JNK의 인산화에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 4C and 4D).

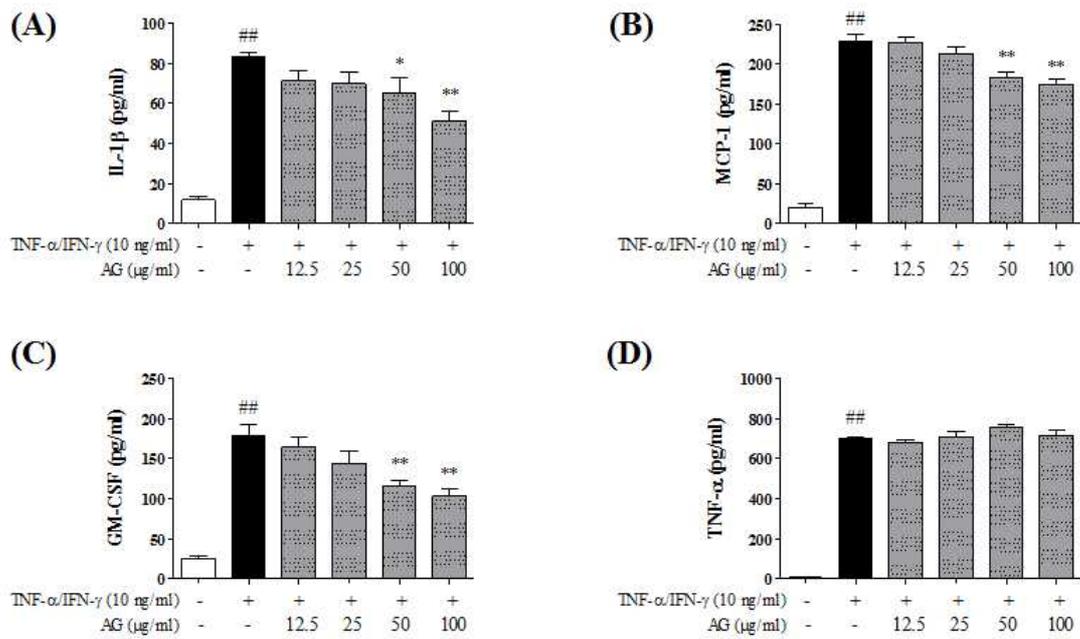


Figure 3. Effects of AG on IL-1 β , MCP-1, GM-CSF, and TNF- α protein expression levels in HaCaT cells. Cells were pre-treated with various concentration of AG for 1 h prior to treated with TNF- α /IFN- γ (10 ng/ml) for 24 hours. (A–D) Protein expressions of IL-1 β , MCP-1, GM-CSF, and TNF- α were measured by ELISA. Values are mean \pm SEM of three independent experiments. ^{##}p < 0.01 vs. TNF- α /IFN- γ (-) and ^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01 vs. TNF- α /IFN- γ (+).

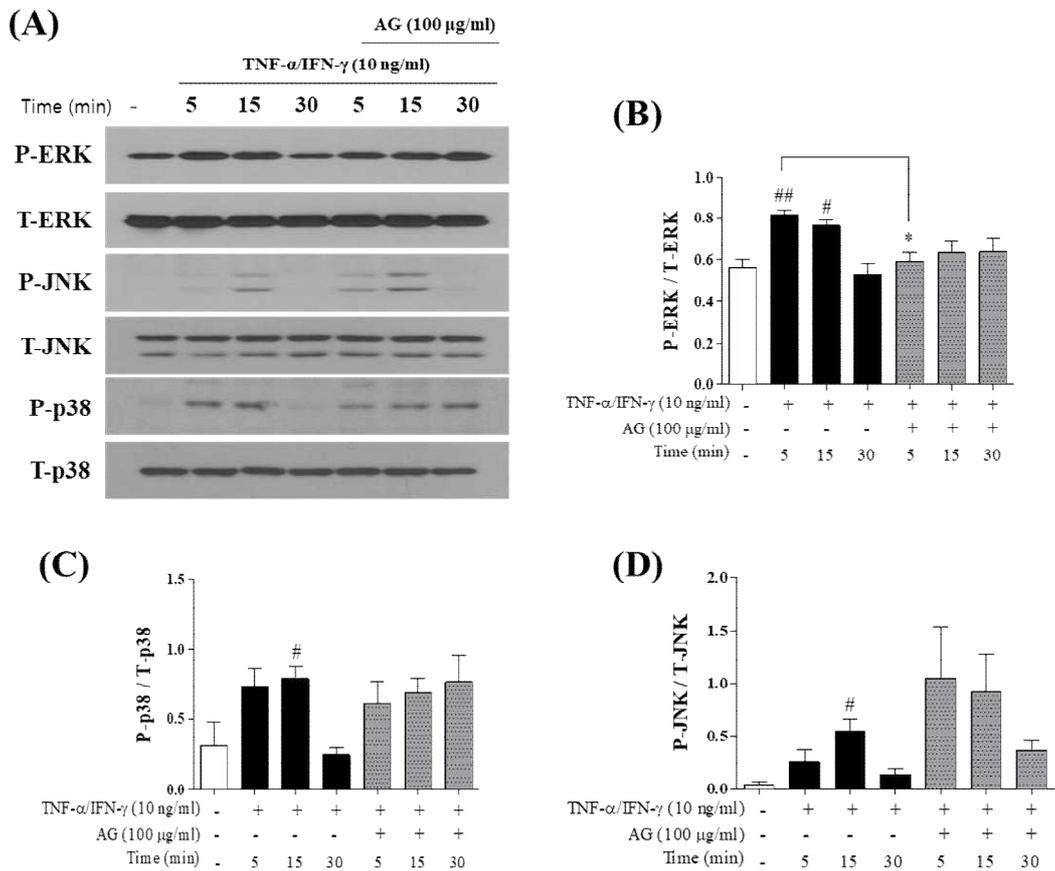


Figure 4. Effects of AG on phosphorylation of ERK, JNK, and p38 in HaCaT cells. Cells were pre-treated with various concentration of AG for 1 h prior to treated with TNF- α /IFN- γ (10 ng/ml) for indicated times. (A) Phosphorylation of MAPKs were detected by Western blot. (B–D) Phosphorylated-protein expressions were measured using Image J software. Values are mean \pm SEM of three independent experiments. [#]p < 0.05, ^{##}p < 0.01 vs. TNF- α /IFN- γ (-) and ^{*}p < 0.05 vs. TNF- α /IFN- γ (+).

5. AG가 NF-κB 신호 전달 경로에 미치는 영향

TNF-α/IFN-γ로 자극한 HaCaT 세포에서 AG가 NF-κB의 translocation에 미치는 영향을 western blot으로 관찰한 결과, 자극제를 처리하지 않은 군에 비해 TNF-α/IFN-γ를 처리한 군의 NF-κB는 15분, P-NF-κB는 5분과 15분에 발현이 유의하게 증가하였다. 하지만 AG를 처리했을 때, 60분에서 NF-κB의 translocation이 유의하게 감소되었고 (Figure 5B), P-NF-κB의 translocation은 5분에 감소하는 경향을

보였으나 유의하진 않았다 (Figure 5C).

또한, IκBα의 발현은 자극제를 처리하지 않은 군에 비해 TNF-α/IFN-γ를 처리했을 때, 5, 15, 30분에서 유의하게 감소되었고, P-IκBα의 발현은 5분에서 증가하였으나 유의하지 않았다 (Figure 5A). 하지만 AG는 5, 15분에서 IκBα의 발현을 유의하게 증가시켰으며 (Figure 5D), 15, 30, 60분에서 P-IκBα의 발현이 증가하는 경향을 보였으나 유의하지 않았다 (Figure 5E).

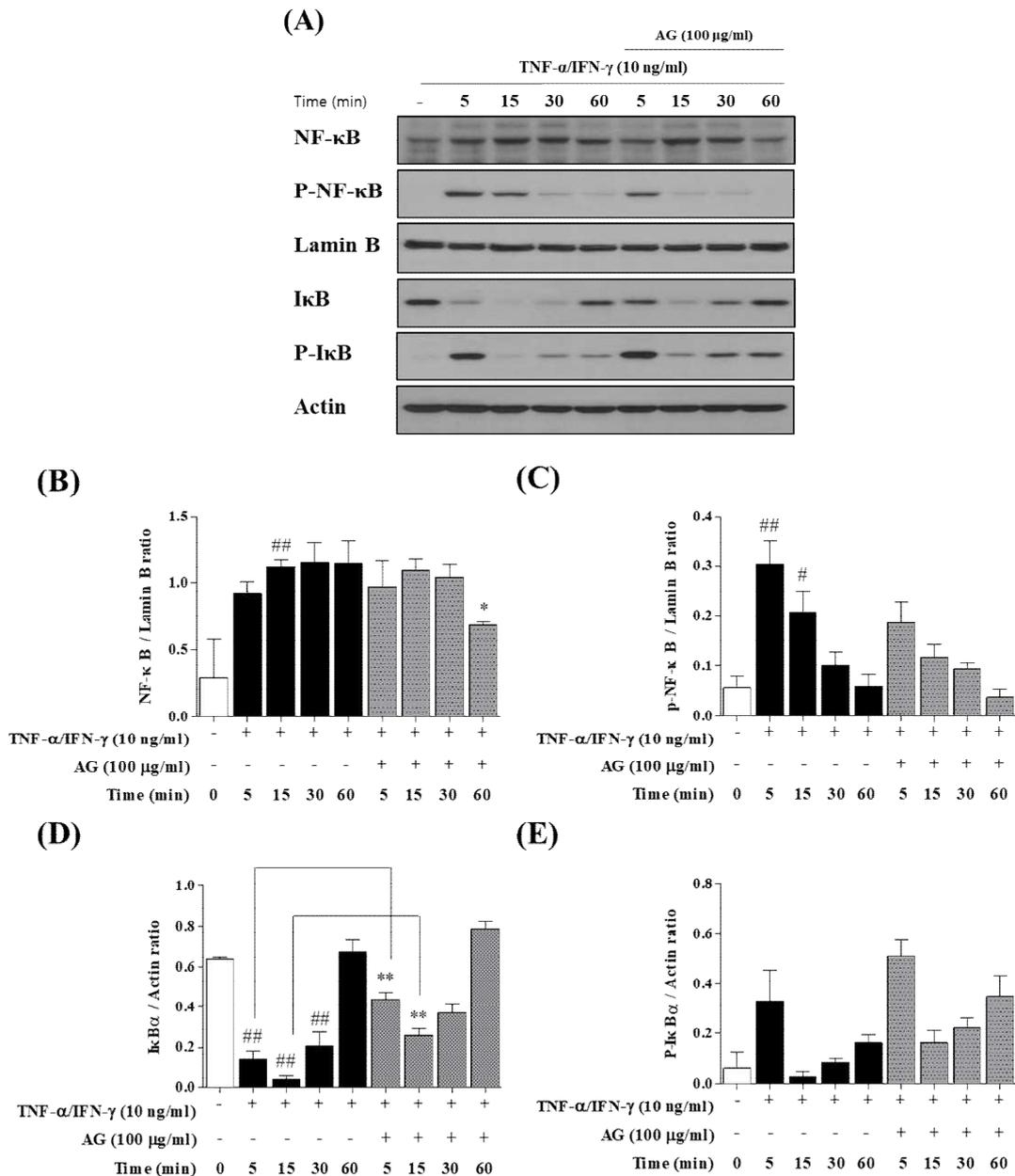


Figure 5. Effects of AG on translocation of NF-κB in HaCaT cells. Cells were pre-treated with various concentration of AG for 1 h prior to treated with TNF-α/IFN-γ (10 ng/ml) for indicated times. (A) The degree of NF-κB protein in nucleus and IκBα protein in cytosol were analyzed by Western blot, (B-D) NF-κB and IκBα expressions were measured using Image J software. Values are mean ± SEM of three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 vs. TNF-α/IFN-γ (-) and *p < 0.05, **p < 0.01 vs. TNF-α/IFN-γ (+).

IV. 고찰

최근 들어 아토피 피부염의 원인은 면역 이상 반응 외에도 피부 장벽의 기능 손상이 발병기전으로 제기되고 있어 각질형성세포를 이용한 아토피 피부염 연구의 필요성 또한 높아지고 있다. 선행 연구에 따르면, AG는 비만세포 매개 알레르기 염증 모델에서 JNK 및 NF- κ B의 활성화를 약화시켜 알레르기 반응을 억제시킨다고 보고하였으며²³⁾, RAW 264.7 세포에서도 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였으나²²⁾, 각질형성세포인 HaCaT 세포에서의 항염증 연구는 진행되지 않았다. 본 연구는 피부의 면역 실험에 주로 사용되는 각질형성세포를 이용하여 피부질환에 더 특이적으로 AG의 항염 기능을 분석한 논문으로, AG가 TNF- α /IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인의 유전자 발현과 사이토카인의 단백질 발현 및 MAPKs와 NF- κ B 신호 전달 경로에 미치는 영향에 대해 확인하였다.

피부는 인체의 가장 바깥에 존재하는 기관으로, 체내 수분 손실 및 외부 유해 물질의 침입을 막아주는 장벽 역할을 하며, 표피의 95%는 각질형성세포로 구성되어 있다²⁵⁻⁶⁾. 각질형성세포의 활성화와 피부 장벽의 결함²⁷⁾ 및 손상을 통해 알레르기 항원이 체내로 침투되어 염증을 유도할 수 있으며, 염증이 악화되면 아토피 피부염과 같은 염증성 피부 질환이 유발될 수 있다²⁸⁻²⁹⁾. 각질형성세포는 외부 자극과 스트레스에 의해 여러 케모카인과 사이토카인을 생산하고, 피부의 염증 및 면역반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며¹³⁾, 특히 TNF- α 와 IFN- γ 에 의한 자극은 염증성 사이토카인의 비정상적인 분비를 촉발하여 피부 염증을 가속화 하고, 아토피 피부염과 같은 피부질환을 발생시키는 것으로 보고된다¹⁴⁻¹⁵⁾.

한편, 아토피 피부염은 Th1과 Th2 세포 사이의 면역학적 균형이 무너지면서 특징적인 피부 염증이 발생하는 알레르기 질환으로, 아토피 피부염 만성 단계에서는 콜라겐의 침착이 증가하고, 진피가 두꺼워지는 Th1 반응이 나타난다³⁰⁾. 반면 아토피 급성 피부 병변에서는 Th2 사이토카인의 과발현이 나타나는데, 이는 알레르기 반응의 유발 뿐 아니라 선천성 면역 반응을 저하시킨다²⁶⁾. 아토피 피부염 피부 조직에서 염증반응이 일어나면 항원을 인지한 대식세포는 항원을 처리하고 제시하는 기능을 하며, 염증에 관여하는 염증성 사이토카인의 발현이 나타난다³¹⁻²⁾. 또한 아토피 피부염의 발병기전에 관여하는 피부 각질형성세포는 알레르기 항원과 환경 스트레스 등에 노출되면 TARC, IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, MCP-1 및 GM-CSF와 같은 염증성 사이토카인을 분비해 각질형성세포의 증식 속도를 감소시키고, 염증성 피부질환을 유발한다고 알려져 있다³³⁾. 이러한 염증성 사이토카인 중 TARC와 MDC는 Th2 케모카인으로, 피부 염증세포의 침윤을 조절하고³⁴⁻³⁵⁾, IL-6는 각질형성세포에서 iNOS와 COX-2의 발현량을 증가시켜 염증반응에 중요한 역할을 한다³⁶⁾. IL-8은 T세포 및 호중구의 화학주성에 관여하거나 히스타민의 분비를 조절하고 호중구를 활성화하며, TNF- α 와 같은 자극에 의해 분비되어 염증반응을 촉진하는 기능을 한다³⁷⁾. 본 연구에서 AG가 염증성 사이토카인인 TARC, IL-6 및 IL-8의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, AG는 IL-6, TARC 및 IL-8 유전자 발현을 감소시켰다.

TNF- α 는 염증반응 초기에 해당 부위로 호중구를 유도하며, 급성 염증반응을 일으키고 악화시키는 인자이며³⁸⁾, GM-CSF는 랑게르한스세포를 유도하여 염증의 시작과 유지에 관여하고, 각질형성세포의 과증식 (hyperproliferation)을 유발함으로써 아토피 피부염 환자의 피부에서 고농도로 관찰된다는 사실이 보고되었다³⁹⁾. IL-1 β 는 대식세포의 활성화, 림프구와 호중구의 내피세포 접착을 유도하며, 케모카인의 생성을 활성화하여 염증 부위에 염증세포의 침윤을 일으킨다⁴⁰⁾. 또한 IL-1 β 는 염증반응에서의 중요한 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 통해 MCP-1의 발현을 증가시키는데, MCP-1은 혈관 내부에서 염증이 발생하면 대식세포와 단핵구가 해당 염증 부위에 침윤되어 피부의 섬유화나 경화를 유발하는데 중요한 역할을 하는 케모카인이다⁴¹⁾. 본 연구에서 AG가 염증성 사이토카인의 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과, AG는 IL-1 β , MCP-1 및 GM-CSF의 단백질 발현량을 유의하게 억제시켰으나 TNF- α 의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이는 AG가 각질형성세포의 IL-1 β , GM-CSF 및 MCP-1의 발현 억제를 통해 염증반응을 억제함을 의미한다. 이상의 결과를 종합해 보면 AG는 TARC, IL-6, IL-8, IL-1 β , MCP-1 및 GM-CSF와 같은 염증성 사이토카인 또는 케모카인의 발현을 억제함으로써, 염증 관련 세포의 조직 내 침윤을 억제하여, 아토피 피부염을 완화시킬 수 있다는 것을 의미한다.

MAPKs는 세포 내 신호전달 체계로, 외부 자극에 의해 활성화되고 NF- κ B와 같은 전사인자들을 활성화하여 염증반응 유도에 관여한다. MAPKs는 ERK, JNK 및 p38로 이루어져 있으며, 면역반응에서 인산화 과정을 통해 면역매개체로서 중요한 역할을 한다⁴²⁻⁴³⁾. 따라서 MAPKs 신호전달 조절은 항염증 효능 분석에 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서 AG가 MAPKs 신호전달경로에 미치는 영향을 알아본 결과, AG가 P-ERK의 발현을 감소시켰다.

NF- κ B는 사이토카인의 합성을 조절하는 전사인자로, 일반적으로 NF- κ B는 세포질 내에서 inhibitor인 I κ B와 결합하여 비활성 상태로 존재하지만, 외부자극으로 I κ B가 인산화되면 I κ B가 분해되고, NF- κ B는 세포질에서 핵 안으로 이동한다⁴⁴⁾. 핵 안으로 이동한 NF- κ B는 DNA와 결합하여 유전자 전사를 활성화시켜 염증성 사이토카인의 발현을 촉진한다⁴⁵⁾. 본 연구에서 AG가 NF- κ B의 translocation에 미치는 영향을 분석한 결과, AG가 NF- κ B의 translocation을 감소시키는 것을 확인하였다. 이는 AG가 ERK의 인산화와 NF- κ B의 translocation을 억제하고, 이로 인해 염증성 사이토카인의 발현을 조절하여, 아토피 피부염과 같은 염증 질환을 완화시킬 수 있다는 것을 의미한다.

연구 결과를 종합해 보면, TNF- α /IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 AG는 IL-6, IL-8 및 TARC 유전자 발현을 감소시켰으며, IL-1 β , MCP-1 및 GM-CSF의 단백질 발현량을 감소시켰다. 또한, ERK의 인산화와 NF- κ B의 핵 내 translocation을 감소시켜 염증반응을 억제하였다. 이상의 결과로 當歸는 아토피 피부염의 증상 개선에 있어 임상적으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서 當歸의 항염 조절 효과를 살펴보기 위해 當歸가 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인의 유전자 발현과 사이토카인의 단백질 발현에 미치는 영향, MAPKs 신호 전달 경로와 NF- κ B 신호 전달 경로에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 當歸는 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 HaCaT 세포에서 IL-6, IL-8 및 TARC 유전자 발현을 유의하게 감소시켰다.
2. 當歸는 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 HaCaT 세포에서 IL-1 β , MCP-1 및 GM-CSF의 단백질 발현량을 유의하게 감소시켰다.
3. 當歸는 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 HaCaT 세포에서 ERK의 인산화를 유의하게 감소시켰다.
4. 當歸는 TNF- α /IFN- γ 를 처리한 HaCaT 세포에서 NF- κ B의 translocation을 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과로 當歸는 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-8 및 TARC 유전자 발현과 IL-1 β , MCP-1 및 GM-CSF의 단백질 발현을 감소시키고, MAPKs 신호 전달 경로에서 ERK의 인산화를 유의하게 억제하며, NF- κ B 신호 전달 경로에서 NF- κ B의 translocation을 억제하여 각질형성세포에서 항염에 효과가 있음을 증명하였다. 이는 當歸가 아토피 피부염의 증상 호전과 임상 활용의 근거가 될 수 있다는 것을 시사한다.

감사의 글

이 성과는 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2020R1A2C2005836).

이 논문은 2021년도 정부 (교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (2021R1I1A1A01043143).

References

1. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 2004;113(5):651-57.
2. EICHENFIELD, Lawrence F., et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis. *Journal*

- of the American Academy of Dermatology. 2014;70(2):338-51.
3. Lee EC. Health behavior theory. Gyeonggi: YAS media, 2007:18.
4. Sacotte R, Silverberg JI. Epidemiology of adult atopic dermatitis. *Clin Dermatol.* 2018;36(5):595-605.
5. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2016;387(10023):1109-22.
6. Mozaffari H, Pourpak Z, Pourseyed S, Farhoodi A, Aghamohammadi A, Movahadi M, Gharaghozloo M, Moin M. Quality of life in atopic dermatitis patients. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007;40(3):260-4.
7. Elias PM, Eichenfield LF, Fowler JF Jr, Horowitz P, McLeod RP. Update on the structure and function of the skin barrier: atopic dermatitis as an exemplar of clinical implications. *Semin Cutan Med Surg.* 2013;32(2):S21-4.
8. Yong Sung Choi, Yong Mean Park, Yeong Ho Rha, Sun Hee Choi. An overview and considerations in prescribing H1-antihistamine. *Journal of the Korean Medical Association* 2013;56(3):231-9.
9. Anna Kleiman, Jan P.Tuckermann. Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: Lessons from conditional knockout mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007;275(1-2):98-108.
10. Mohan GC, Lio PA. Comparison of dermatology and allergy guidelines for atopic dermatitis management. *JAMA Dermatol.* 2015;151(9):1009-13.
11. Lyons JJ, Milner JD, Stone KD. Atopic dermatitis in children: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2015;35(1):161-83.
12. Woo-Ram Lee, Kyung-Hyun Kim, Hyun-Jin An, Jung-Yeon Kim, Sang-Mi Han, Kwang-Gill Lee, Kwan-Kyu Park. The Effects of Bee Venom on Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Induced Inflammatory Human HaCaT Keratinocytes. *Kor. J. Pharmacogn.* 2014;45(3):256-61.
13. Shimauchi T, Sugita K, Nishio D, Isoda H, Abe S, Yamada Y, Hino R, Ogata M, Kabashima K, Tokura Y. Alterations of serum Th1 and Th2 chemokines by combination therapy of interferon- α and narrowband UVB in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol Sci.* 2008;50(3):217-25.
14. Lim HS, Ha H, Lee MY, Jin SE, Jeong SJ, Jeon WY, Shin NR, Sok ED, Shin HK. Saussurea lappa alleviates inflammatory chemokine production in HaCaT cells and house dust mite-induced atopic-like dermatitis in Nc/Nga mice. *Food Chem Toxicol.* 2014;63:212-20.
15. Yang JH, Hwang YH, Gu MJ, Cho WK, Ma JY.

- Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- α /IFN- γ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells. *Phytomedicine*. 2015;22(14):1262–8.
16. Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*. 1999;400(6746):776–80.
 17. Song TW, Kwon BC, Choi SY, Shin YH, Lee KE, Yang HS. Increased Serum Thymus and Activation-regulated Chimokine (TARC) Levels in Children with Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma & Respiratory Disease*. 2005;250–6.
 18. National College of Oriental Medicine Collaborative Textbook Compilation Committee. *herbal medicine*, 4th. Seoul: yeonglimsa. 2017:630–31.
 19. Jae-Joon Lee, Ah-Ra Kim, Young-Nam Seo, Myung-Yul Lee. Comparison of Physicochemical Composition of Three Species of Genus *Angelica*. *Korean J. Food Preserv.* 2009;16(1):94–100.
 20. Hong-Kun Rim, Woong Cho, Sang Hyun Sung and Kyung-Tae Lee. Nodakenin Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Macrophage Cells by Inhibiting Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 and Nuclear Factor- κ B Pathways and Protects Mice from Lethal Endotoxin Shock. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012; 342(3):654–64.
 21. Deok-Hyun Ryu, Sa-Rang Oh, Tae-Sung Jung, Deok-Seon Ryu. The Effect of *Angelica gigas* Nakai Extract and *Bacillus Polyfermenticus* KJS-2 on Atopic Dermatitis induced by DNCB in mice. *J Korean Med.* 2017;38(3):30–42.
 22. S.I. JANG, H.J. Kim, K.M Hwang, H.O. Pae, T.G. Tun, H.T. Chung, Y.C. Kim. Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract of *Angelica uchiyamana* in Activated Murine RAW 264.7 macrophages. *The Korean Journal of oriental medical prescription*. 2002;10(2):189–97.
 23. Sohn YJ, Lee HS, Park HJ, Lee HS, Lee HJ, Choi H, Jeong CH, Bu YM, Jung HS. *Angelicae Gigantis Radix* regulates mast cell-mediated allergic inflammation in vivo and in vitro. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(9):2987–95.
 24. LEE, Ju-Yong, et al. Effect of *Whitmania pigra* whitman on the allergic inflammatory response. *The Journal of Korean Medicine*. 2008;29(2):81–95.
 25. Jung Sook Oh, Hyun Hee Jang. Epidermal Differentiation and Skin Barrier. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 2015;13(6):713–20.
 26. Hyunjung Kim, Jung U Shin, Kwang Hoon Lee. Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction. *Allergy Asthma Respir Dis* 2013;1(1):20–28.
 27. Akiharu Kubo, Keisuke Nagao, Masayuki Amagai. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J Clin Invest.* 2012;122(2):440–7.
 28. M. Gschwandtner, M. Mildner, V. Mlitz, F. Gruber, L. Eckhart, T. Werfel, R. Gutzmer, P. M. Elias, E. Tschachler. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy.* 2013;68(1):37–47
 29. Ken Natsuga. *Epidermal Barriers*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4(4):a018218.
 30. Gabsik Yang, Se-Yun Cheon, Kyung-Sook Chung. *Solanum tuberosum* L. cv Jayoung Epidermis Extract Inhibits Mite Antigen-Induced Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice by Regulating the Th1/Th2 Balance and Expression of Filaggrin. *J Med Food.* 2015;18(9):1013–21.
 31. Baugh JA, Bucala R. Mechanisms for modulating TNF- α in immune and inflammatory disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2001;4(5):635–50.
 32. Mutou Y, Ibuki Y, Kojima S. Immunomodulatory effects of ultraviolet B irradiation on atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2007;23(4):135–44.
 33. Gunhyuk Park, Byeong Cheol Moon, Hye-Sun Lim. Effects of 14 Chung-bu Medicinal Materials Described in the Dongui Bogam on Inflammatory Cytokines Production in HaCaT Keratinocytes. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.* 2020;46(2):195–205.
 34. Nakazato, J., Kishida, M., Kuroiwa, R., Fujiwara, J., Shimoda, M., Shinomiya, N. Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology.* 2008;19(7):605–13.
 35. Il-Joo Jo, Mee-Ok Choi. Protective Effects of *Kyungohkgo* on Atopic Dermatitis in HaCaT Cells. *J. Kor. Soc. Cosmetol.* 2021;27(5):1286–92.
 36. Yayeh T, Oh WJ, Park SC, Kim TH, Cho JY, Park HJ, Lee IK, Kim SK, Hong SB, Yun BS, Rhee MH. *Phellinus baumii* ethyl acetate extract inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokine expression in RAW264.7 cells. *J Nat Med.* 2012;66(1):49–54.
 37. Roebuck KA. Regulation of Interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19(5): 429–38.
 38. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil

- recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*. 1992;258(5090):1957-9.
39. Leung DY. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:S99-108.
40. Suk-Yong Jo, Min-Seo Kang, Yong-Min Kim, Hee-Taek Kim. An Experimental Study on the Anti-inflammatory Effects of Cheonggisang Extract in Allergic Late Inflammation. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 2016;29(3): 95-105.
41. Jun Hee Lim, Taeg Kyu Kwon. Effects of Luteolin on IL-1 β -Induced MCP1 Protein Expression. *Journal of Life Science*. 2009;19(4):514-9.
42. Arbabi S, Maier RV. Mitogen-activated protein kinases. *Crit Care Med*. 2002;30(1):S74-9.
43. KIM, Eun-Young, et al. Effects of chloroform fraction of *Fritillariae Thunbergii* Bulbus on atopic symptoms in a DNCB-induced atopic dermatitis-like skin lesion model and in vitro models. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021;281:114453.
44. BAE, Gi-Sang; PARK, Sung-Joo. Anti-inflammatory Effect of *Nypa fruticans* Wurmb. on tumor necrosis factor (TNF)- α -induced Inflammatory response in HaCaT cells. *The Korea Journal of Herbology*, 2019;34(1):51-7.
45. Bell, S., Degitz, K., Quirling, M., Jilg, N., Page, S., & Brand, K.. Involvement of NF- κ B signalling in skin physiology and disease. *Cellular signalling*. 2003;15(1):1-7.