



작약이 HaCaT 세포에서 아토피 피부염 관련 염증 억제에 미치는 영향

이혜인^{ID} · 김엄지^{ID} · 손동빈^{ID} · 주병덕^{ID} · 손영주^{ID} · 김은영^{ID} · 정혁상^{ID}

경희대학교 한의과대학 해부학교실

Effect of *Paeonia Lactiflora* Pallas on Atopic Dermatitis-Related Inflammation in HaCaT Cell

Hye-In Lee, Eom Ji Kim, Dongbin Son, Byung Duk Joo, Youngjoo Sohn,
Eun-Young Kim, Hyuk-Sang Jung

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

Objectives : *Paeonia lactiflora* Pallas (PLP) have been reported to have pharmacological effects such as anti-inflammatory and analgesic. However, it is not yet known whether PLP extract has anti-inflammatory effect on HaCaT cells, human keratinocyte. **Methods :** To confirm the anti-inflammatory effect of PLP on keratinocyte, TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells were used. HaCaT cells were pre-treated with PLP for 1h before stimulation with TNF- α /IFN- γ . Then HaCaT cells were stimulated with TNF- α /IFN- γ for 24 h, the cells and media were harvested to measure the inflammatory cytokines levels. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin 1 beta (IL-1 β), and TNF- α were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the mRNA expression of thymus and activation-regulated chemokines (TARC), IL-6, and IL-8 were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). We also investigated the inhibitory mechanism of the mitogen-activated protein kinase (MAPKs) including ERK, JNK, and p38 and nuclear factor-kappaB (NF- κ B) by PLP using western blot. **Results :** PLP did not show cytotoxicity in HaCaT cells. In TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells, PLP significantly inhibited the expression of GM-CSF, MCP-1 IL-1 β , TNF- α , TARC and IL-6. PLP inhibited the phosphorylation of ERK and translocation of NF- κ B into the nucleus. **Conclusions :** These results indicate that PLP could ameliorate the TNF- α /IFN- γ -stimulated inflammatory response through inhibition of MAPK and NF- κ B signal pathway. This suggests that PLP could be used beneficial agent to improve skin inflammation.

Key words : *Paeonia Lactiflora* Pallas, HaCaT, pro-inflammatory cytokine, atopic dermatitis, anti-inflammatory

서론

아토피 피부염(Atopic Dermatitis)은 재발과 지속을 반복하는

만성 또는 만성 재발성 피부 질환으로, 일반적으로 가려움, 피부 건조, 염증 등의 증상을 나타낸다¹⁾. 아토피 피부염은 영유아기와 소아기에서 주로 발생하며, 전 세계적으로 15~20%는 소아기에

Received April 4, 2022, Revised May 3, 2022, Accepted May 5, 2022

Corresponding author: **Hyuk-Sang Jung**

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea
Tel: +82-2-961-9449, Fax: +82-2-961-9449, E-mail: jsh@khu.ac.kr

Corresponding author: **Eun-Young Kim**

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea
Tel: +82-2-961-0327, Fax: +82-2-961-0327, E-mail: turns@hanmail.net

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (MSIT) (No. 2020R1A2C2005836), and the Ministry of Education (No. 2021R111A1A01043143).

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1~3%는 성인기에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다²⁾. 또한 아토피 피부염을 갖는 소아는 알레르기성 비염 및 기관지 천식으로 이어지는 알레르기 행진을 겪을 가능성이 높다고 보고되었다²⁾. 소아기에 아토피 피부염에 대한 적절한 치료 시기를 놓치면 성인기 질환으로 넘어가며 만성화가 되는 경우가 많으므로 알레르기 행진을 조기에 차단하는 것이 중요하며, 성인에서 아토피 피부염 발병률이 높아지고 있는 만큼, 성인에서의 아토피 피부염 또한 심각한 문제로 대두되고 있다³⁾.

피부는 표피와 진피, 피하지방, 근육으로 구성되어 있으며, 표피는 피부의 가장 바깥층을 구성하는 조직으로 외부 자극으로부터 피부를 보호하는 1차 적인 장벽 기능을 수행한다. 표피는 95%의 각질형성세포로 구성되어 있으며, 이러한 각질형성세포는 분화과정을 통해 피부 장벽 인자들을 생성하여, 피부장벽 기능을 수행하며, 자극에 노출되면 염증 및 면역 반응에 중요한 역할을 수행한다⁴⁾. 각질세포가 TNF- α 및 IFN- γ 에 노출되면 TARC를 비롯한 사이토카인 및 케모카인의 비정상적인 발현이 유도되어, 백혈구와 같은 염증 세포가 염증 병변 부위로 침윤된다⁵⁾. TNF- α 와 IFN- γ 는 1차 인간 각질세포뿐 아니라 인간 각질세포 세포주인 HaCaT 세포에서도 염증성 사이토카인의 생성을 유도하는 것으로 보고되었으며⁶⁾, 이러한 염증성 사이토카인의 과도한 생산은 각질형성세포의 손상 및 세포증식 속도를 감소시키며, 각종 염증성 피부 질환들을 발생시킨다⁷⁾. 이런 이유로, TNF- α /IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포는 아토피 피부염과 같은 염증성 피부 질환 연구에서 주로 활용되고 있다⁸⁾.

한의학적으로 아토피 피부염은 奶癬(내선), 胎癬(태선), 胎癩瘡(태렴창), 胎熱(태열) 등의 범주에 속하며⁹⁾, 《諸病源候論·小兒雜病諸候·癬候》에서 乳癬(유선)은 小兒(소아)의 면부에 癬皮(선피)가 甲錯(갑작)되고 건조해지는 것으로 嬰兒濕疹(영아습진)과도 유사하다¹⁰⁾. 또한, 아토피피부염을 생애주기로 나누어 유아동기에는 胎熱(태열), 濕熱(습열), 脾虛風燥(비허풍조) 등으로 변증하였고, 성인기에는 風濕纏膚(풍습은부), 濕熱互結(습열호결), 脾虛濕蘊(비허습은), 血虛風燥(혈허풍조) 등으로 변증하여 적절한 처방을 사용하였다¹¹⁾. 일반적으로 血虛(혈허)한 상태에서는 혈액이 부족한 것을 보충하기 위해서 津液(진액)이 결핍되기 때문에 피부가 충분히 영양을 공급받지 못해서 皮膚乾燥(피부건조), 苔癬化(태선화), 搔痒感(소양감) 등의 증상이 생길 수 있다¹²⁾.

작약(芍藥, *Paeoniae radix Alba*)은 작약 *Paeonia lactiflora* Pallas 또는 기타동속근연식물(작약과 Paeoniaceae)의 뿌리를 건조한 것으로¹³⁾, 養血斂陰(양혈염음)하고 柔肝止痛(유간지통)하며 平肝抑陽(평간억양)하는 효능이 있어 복통, 진통, 고혈압 및 염증

에 대한 치료제로 사용되어 왔다¹⁴⁾. 최근 연구에 따르면 작약은 항염, 항산화 및 면역조절에 효과가 있다고 보고되었으며^{15,16)}, 작약의 구성 성분인 paeoniflorin은 염증성 통증 완화에 대한 효과가 있으며¹⁷⁾, paeonol은 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과가 있다고 보고되었다¹⁸⁾. 그러나 인간 각질형성세포에서 작약의 항염증 효능에 대한 연구는 아직 보고되지 않은 실정이다. 이에 저자는 작약이 피부염 발생에 관여하는 각질형성세포에서 염증을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각하여, 인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포를 이용하여 작약(*Paeonia lactiflora* Pallas, PLP)의 항염증 효능을 연구하였다. 본 연구에서는 HaCaT 세포에 작약 추출물을 처리한 후, TNF- α 및 IFN- γ 로 염증 반응을 유도하였을 때, 염증성 사이토카인인 GM-CSF, MCP-1, IL-1 β , TNF- α , TARC 및 IL-6의 발현과 ERK 및 NF- κ B의 인산화 발현 분석에서 유의한 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 Welgene (Daejeon, Korea)에서 구매하였다. Fetal bovine serum (FBS)는 Atlas Biologicals (Fort Collins, USA)에서, penicillin/streptomycin (P/S)는 Gibco (New York, 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 Promega에서 (WI, USA)에서 구입하였다. TNF- α , interferon-gamma (IFN- γ)는 R&D Systems (Minneapolis, USA)에서 구매하였고, biconchonic acid (BCA) solution 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Aldrich (MI, USA)에서 구입하였다. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), IL-1 β 그리고 TNF- α ELISA kit는 BD bioscience (NJ, USA)에서 구입하였다. SYBR green 및 SuperScript II reverse transcription kit (reverse transcriptase)는 Invitrogen (California, USA)에서 구입하였다. Taq extra PCR kit는 kapa biosystems; roche diagnostics (DE, USA)에서 구매하였고, Primer는 Genotech (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. NE-PER[™] nuclear and cytoplasmic extraction reagents는 Thermo Fisher Scientific (BO, USA)에서 구매하였고, phosphorylation (p)-extracellular signal-related kinase (ERK) antibody, ERK

antibody, p-c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) antibody, JNK antibody, p-p38 antibody, p38 antibody, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) antibody, p-NF- κ B (Ser536) antibody, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B α) antibody 그리고 p-I κ B α (Ser32) antibody는 Cell signaling technology (MA, USA)에서 구매하였다. Enhanced chemiluminescent (ECL) solution, Lamin B antibody 그리고 actin antibody는 Santa Cruz biotechnology (CA, USA)에서 구매하였으며, 모든 시약은 세포 실험 등급을 사용하였다.

2. PLP의 제조

실험에 사용된 작약은 옴니허브(Daegu, Korea)에서 구매한 것으로, 대한민국 경북에서 재배된 것을 사용하였다. 작약 100 g을 100% 에탄올 1 L에 넣어 2주간 냉침한 후, 거즈와 여과지(Whatman no.3, Maidstone, UK)를 사용하여 여과하였다. 이후 감압농축기를 이용하여, 농축한 후 동결건조하여 2 g의 추출물을 얻었다(수득률 2%). 추출물은 실험 전까지 -20°C의 냉동고에서 보관하였고, 실험 시 DMSO에 희석해 pore size 0.22 μ m의 멸균 필터로 여과하였다. 세포 내 DMSO의 부피는 전체 배지의 0.1% 이상을 초과하지 않도록 하였다.

3. HaCaT 세포 배양

실험에 사용된 HaCaT 세포는 Cell Lines Service (Eppelheim, Germany)에서 구매하였으며, 10% FBS와 1% P/S를 포함한 DMEM 배지에 배양하였다. 세포는 5% CO₂ 및 37°C가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였고, 세포 밀도가 90%에 도달했을 때, 계대배양을 하였다.

4. 세포 독성 평가

PLP가 HaCaT 세포 생존율에 미치는 영향을 검증하기 위해 MTS assay를 수행하였다. HaCaT 세포는 1.5×10^5 cells/well로 96-well-plate에 분주하였다. 24시간 동안 세포를 안정화 시킨 후, 다양한 농도의 PLP (12.5, 25, 50 그리고 100 μ g/ml)가 포함된 배지로 교환하여 24시간 동안 반응시켰다. 이후 MTS 용액을 각 well에 20 μ l 씩 처리하여 2시간 동안 반응시킨 후, Versamax microplate reader (Molecular devices CA, USA)를 이용해 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율을 정상군 대비 백분율로 환산하였고, 세포 생존율이 90% 미만을 나타낼 때, PLP가 독성을 나타낸다고 판단하였다.

5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

PLP가 HaCaT 세포 배양액 내 염증성 사이토카인에 미치는 영향을 분석하기 위하여, HaCaT 세포를 1×10^6 cells/well의 밀도로 6-well-plate에 분주하였다. 24시간 안정화를 진행한 후, 다양한 농도의 PLP (12.5, 25, 50 및 100 μ g/ml)가 포함된 배지로 교환하여 1시간 동안 전처리하였다. 이후, 염증성 사이토카인을 유도하기 위해 자극제인 TNF- α /IFN- γ 10 ng/ml을 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, 배양액을 수집하여 3,000 rpm 및 4°C에서 5분간 원심분리하여, 상층액을 분석에 사용하였다. 배양액 내 염증성 사이토카인 분석은 ELISA kit의 제조사에서 제공한 매뉴얼에 따라 수행하였다.

6. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

PLP가 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, RT-PCR을 수행하였다. HaCaT 세포를 1×10^6 cells/well의 밀도로 6-well-plate에 분주하여 24시간 동안 안정화 시켰다. 이후, 다양한 농도의 PLP (12.5, 25, 50 및 100 μ g/ml)가 포함된 배지로 교환하여 1시간 동안 전처리한 후, 염증 반응을 유도하기 위해 TNF- α /IFN- γ 10 ng/ml을 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 세포는, RNAiso (TAKARA bio, Shiga, JAPAN)을 이용해 세포 내 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Nanodrop (Thermo scientific, Waltham, USA)을 이용하여 정량하였고, SuperScript II reverse transcription kit을 사용해서 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA 2 μ g을 cDNA로 합성하였다. Taq extra PCR kit와 primer를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 PCR을 수행하였다. PCR로 인해 증폭된 산물은 SYBR green으로 염색하여 2% agarose gel에 전기영동 하였다. 이후, 화상 분석 시스템인 N α BITM (Neoscience, Suwon, Korea)을 이용해 이미지화한 후, 각 지표의 발현은 Image J software (version 1.53e, National Institute of Health, Washington D.C, USA)를 이용해 측정하다. 상대적인 유전자 발현량은 GAPDH를 이용하여 정량화하였다. 본 실험에 사용된 PCR 조건 및 primer sequence는 Table 1에 기재하였다.

7. Western blot 분석

PLP가 염증 신호 전달 기전인 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 및 NF- κ B 신호에 미치는 영향을 확인하기 위하여, western blot을 수행하였다. HaCaT 세포를 5×10^5 cells/well의 밀도로 60 π dish에 분주하여, 24시간 안정화를 진행한 후,

Table 1. Primer Sequence for RT-PCR Analysis

Name	Sequence	Base pair	Tm (°C)	Cycle	Accession No.
TARC/CCL17	F-ACTGCTCCAGGGATGCCATCGTTTT R-ACAAGGGGATGGGATCTCCCTCACTG	270	57.5	44	NM_002987.3
IL-6	F-GATGGCTGAAAAAGATGGATGC R-TGGTTGGGTCAGGGGTGGTT	230	59	45	NM_000600.4
CXCL8/IL-8	F-ACATGACTTCCAAGCTGGCCG R-TTTATGAATTCTCAGCCCTC	303	57.5	44	NM_000584.4
GAPDH	F-CGTCTAGAAAAACCTGCCAA R-TGAAGTCAAAGGAGACCACC	52	50	30	NM_001256799.3

TARC : thymus and activation-regulated chemokine, IL-6 : interleukin-6, IL-8 : interleukin-8, GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

PLP (12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$)가 포함된 배지로 교환하여 1시간 동안 전처리를 하였다. 이후 TNF- α /IFN- γ 10 ng/ml을 처리하여 5분, 15분, 30분 및 60분간 반응시켰다. 반응이 종료된 세포는 DPBS로 3회 세척하고, protease inhibitor 및 phosphatase inhibitor 2, 3가 포함된 RIPA buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 사용하여 세포를 용해시켜 전체 단백질을 추출하였다. 핵 단백질과 세포질 단백질은 NE-PER™ nuclear and cytoplasmic extraction reagents를 이용해 제조사의 매뉴얼에 따라 추출하였다. 추출된 단백질은 BCA solution을 사용하여 정량하였고, 이후 동량의 단백질 (30 μg)은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의해 크기별로 단백질을 분리한 후, nitrocellulose membrane에 transfer 시켰다. 비특이적 단백질의 결합을 방지하기 위해 membrane은 5% skim milk를 이용해 1시간 동안 blocking하고, 1차 항체를 1% BSA에 희석하여 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후, 2차 항체를 5% skim milk에 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질 발현은 ECL solution을 사용하여 x-ray 필름에 감광시켰다. 각 지표의 발현은 Image J software를 이용해 측정하였다.

8. 통계처리

모든 세포 실험은 최소 3회 이상 반복하였으며, 결과는 평균 \pm 표준오차로 표현하였다. 각 그룹간의 결과값에 대한 유의성은 One-way ANOVA 방법을 통해 평가하였고, Dunnett's 검정법으로 사후 검증하였다. *p* value가 0.05 미만일 때, 유의한 것으로 판단하였다.

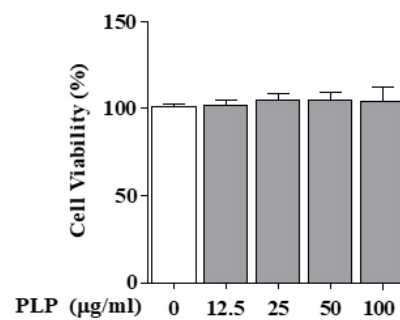


Fig. 1. The cytotoxicity of PLP in HaCaT cells.

HaCaT cells were treated with various concentrations (12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) of PLP for 24 h. The cytotoxicity of PLP in HaCaT cells was measured by the MTS assay. All experiments were conducted at least 3 times.

결 과

1. PLP가 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향

PLP의 HaCaT 세포에 대한 독성은 MTS assay를 통해 확인하였다. HaCaT 세포에 PLP 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하여 세포 생존율을 측정된 결과, PLP 12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 는 HaCaT 세포에서 독성을 나타내지 않았으며, 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서 PLP 처리 농도는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 진행하였다(Fig. 1).

2. PLP가 염증성 사이토카인의 수준에 미치는 영향

PLP의 항염증 효과를 규명하기 위해, 염증성 사이토카인의 수준을 측정하였다. HaCaT 세포에 자극제인 TNF- α /IFN- γ 를 처리하였을 때, GM-CSF, MCP-1, IL-1 β 및 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 수준이 자극제를 처리하지 않은 군에 비해 유의하게 증가하였다. 그러나 PLP의 전처리에 의해 GM-CSF의 수준은 모든 농도(12.5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$)에서 유의하게 감소하였으며, MCP-1의 수준은 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 감소하였

다. 또한, IL-1 β 의 수준은 PLP 50 및 100 μ g/ml에서 유의하게 감소하였고, TNF- α 의 수준은 PLP 12.5 μ g/ml에서만 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

3. PLP가 TARC, IL-6 및 IL-8의 유전자 발현에 미치는 영향

PLP가 염증성 사이토카인인 TARC, IL-6 그리고 IL-8의 유전자

발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 RT-PCR을 진행하였다. HaCaT 세포에 자극제인 TNF- α /IFN- γ 를 처리하였을 때, TARC, IL-6 및 IL-8의 유전자 발현이 유의하게 증가하였으며, PLP의 전처리에 의해 TARC의 발현은 PLP 100 μ g/ml에서 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다. 또한, IL-6의 발현은 PLP 25, 50 및 100 μ g/ml에서 유의하게 감소하였으나, PLP의 전처리는 IL-8의 발현에 유의한 영향을 나타내지 않았다(Fig. 3).

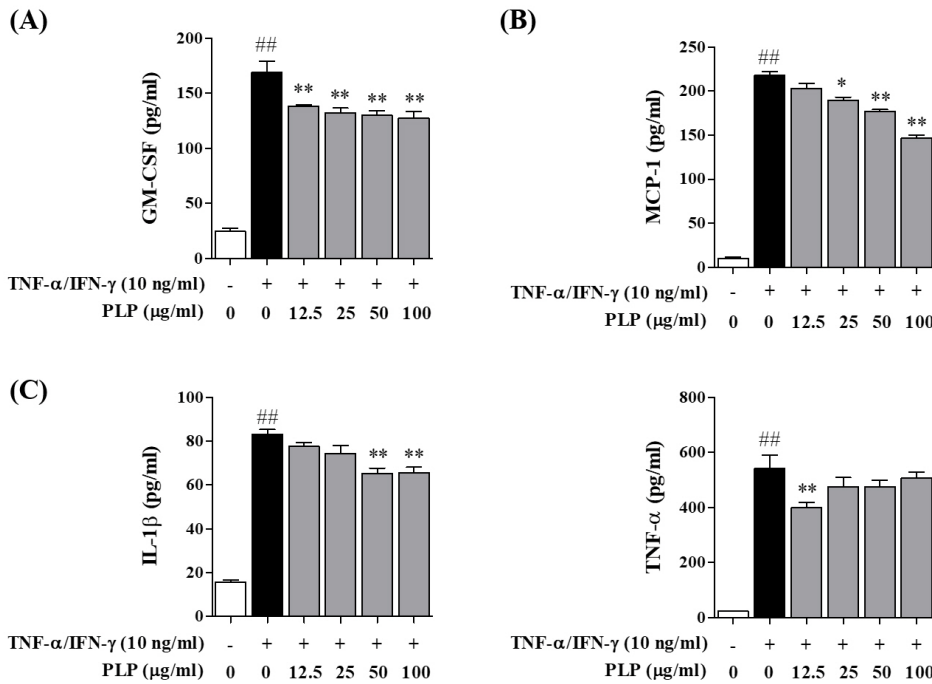


Fig. 2. The effect of PLP on the expression of pro-inflammatory cytokines in HaCaT cells.

To analyze the effect of PLP on cytokine expression, HaCaT cells were treated with PLP (12.5, 25, 50 and 100 μ g/ml) for 1 h and then treated with TNF- α /IFN- γ (each 10 ng/ml) for 24 h. The concentration of (A) GM-CSF, (B) MCP-1, (C) IL-1 β and (D) TNF- α in the cell culture medium was determined by ELISA. All experiments were conducted at least 3 times. All data represent the means \pm SEM. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ versus non-treated group; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus only TNF- α /IFN- γ -treated group.

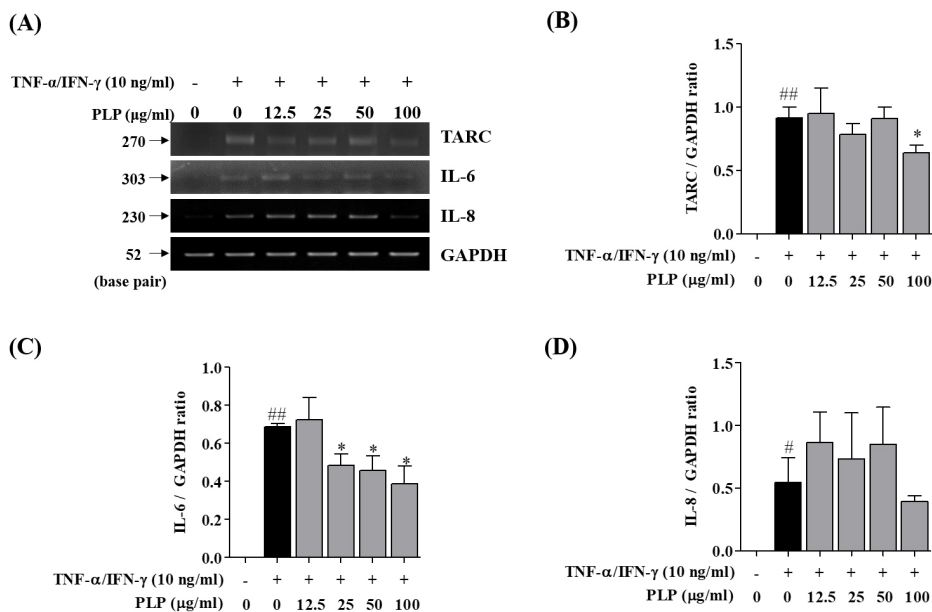


Fig. 3. The effect of PLP on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in HaCaT cells.

To analyze the effect of PLP on mRNA expression of pro-inflammatory cytokine, HaCaT cells were treated with PLP (12.5, 25, 50 and 100 μ g/ml) for 1 h and then treated with TNF- α /IFN- γ (each 10 ng/ml) for 24 h. (A) The effect of PLP on the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines was measured by RT-PCR. The mRNA expressions of (B) TARC, (C) IL-6, and (D) IL-8 were normalized to GAPDH expression. All experiments were conducted at least 3 times. All data represent the means \pm SEM. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ versus non-treated group; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus only TNF- α /IFN- γ -treated group.

4. PLP가 MAPKs 신호 전달에 미치는 영향

PLP가 MAPKs의 인산화에 미치는 영향을 western blot을 이용하여 분석한 결과, TNF- α /IFN- γ 5분 및 10분 자극에서 ERK의 인산화 정도가 유의하게 증가하였으며, PLP 100 μ g/ml은 자극 5분에서 ERK의 인산화 정도를 유의하게 억제하였다. 그러나, PLP 100 μ g/ml은 TNF- α /IFN- γ 자극에 의해 증가된 JNK와 p38 인산화 정도를 유의하게 감소시키지 않았다(Fig. 4).

5. PLP가 NF- κ B 신호전달에 미치는 영향

PLP가 MAPKs 하위 기전인 NF- κ B의 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석해본 결과, PLP 100 μ g/ml은 TNF- α /IFN- γ 자극 후 15분에 증가한 핵 내 NF- κ B의 양에는 영향을 미치지 않았다. 또한, PLP 100 μ g/ml은 TNF- α /IFN- γ 자극 후 5분, 30분 및 60분에 증가한 핵 내의 NF- κ B 인산화 정도를 유의하게 감소시켰다. 세포질 내 I κ B α 의 양을 분석한 결과, PLP 100 μ g/ml은 TNF- α /IFN- γ 자극에 의해 감소한 I κ B α 의 양을 증가시키는 경향을 보였으나 유의하지는 않았으며, 또한, 세포질 내 I κ B α 의 인산화 정도를 증가시키는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다(Fig. 5).

고찰

본 연구는 TNF- α /IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포를 이용하여 PLP의 염증성 사이토카인의 발현 억제 효과와 염증 관련 기전인 MAPKs 및 NF- κ B 신호 전달에 미치는 영향을 분석하였다.

아토피 피부염은 T-helper (Th) 1 세포와 Th2 세포 사이의 불균형으로 인해 발생되며, Th2 세포의 활성이 증가되면 나타나는 피부 질환이다. Th2 세포에 의해 분비되는 염증성 사이토카인들은 각질형성세포와 같은 피부 세포에 직접적으로 영향을 끼친다¹⁹. 각질형성세포는 피부의 가장 바깥쪽에 존재하는 세포로, 각질형성 세포의 각질화는 피부보호 장벽기능을 수행한다²⁰. 이러한 피부장벽이 손상되어 알레르겐이 피부 조직으로 침투되면, 염증 반응을 통해 GM-CSF, MCP-1, TNF- α , TARC 및 IL-6와 같은 염증성 사이토카인을 유도하여 아토피 피부염과 같은 피부 염증 질환을 유발한다²¹. 각질세포형성 세포주인 HaCaT 세포는 TNF- α 및 IFN- γ 와 같은 염증 자극에 반응하여 시험관 내에서 아토피 피부염 염증 증상을 유도하는데 사용되는 세포주 중 하나로²³, 약물의 염증 효능 검증 및 염증 억제 신호전달 경로 분석을 위한 모델로 주로 사용되고 있다²². 이에 본연구에서도 TNF- α /IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포를 실험 모델로 선정하였다.

GM-CSF는 림프구에서 분비되는 사이토카인으로 조직의 염증 부위에서 국소적으로 생성, 활성화되며²⁴, 골수세포에 작용하여

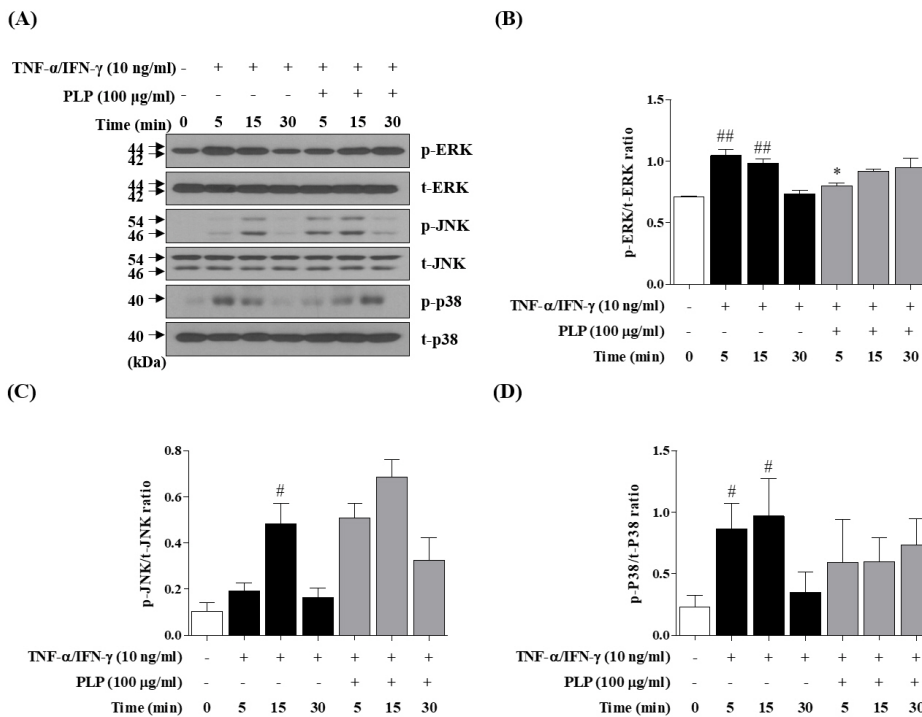


Fig. 4. The effect of PLP on the phosphorylation of MAPKs in HaCaT cell.

To analyze the effect of PLP on MAPKs signaling pathway, HaCaT cells were treated with PLP 100 μ g/ml for 1 h and then treated with TNF- α /IFN- γ (each 10 ng/ml) for 5, 15 and 30 min. The phosphorylation of MAPKs were analyzed in whole protein lysates. (A) Total MAPKs (t-ERK, t-JNK and t-p38) and phosphorylated MAPKs (p-ERK, p-JNK and p-p38) were determined by western blot analysis. (B) p-ERK, (C) p-JNK and (D) p-p38 were quantified in each total form. All experiments were conducted at least 3 times. All data represent the means \pm SEM. [#] $p < 0.05$ and ^{##} $p < 0.01$ versus non-treated group; ^{*} $p < 0.05$ versus only TNF- α /IFN- γ treated group.

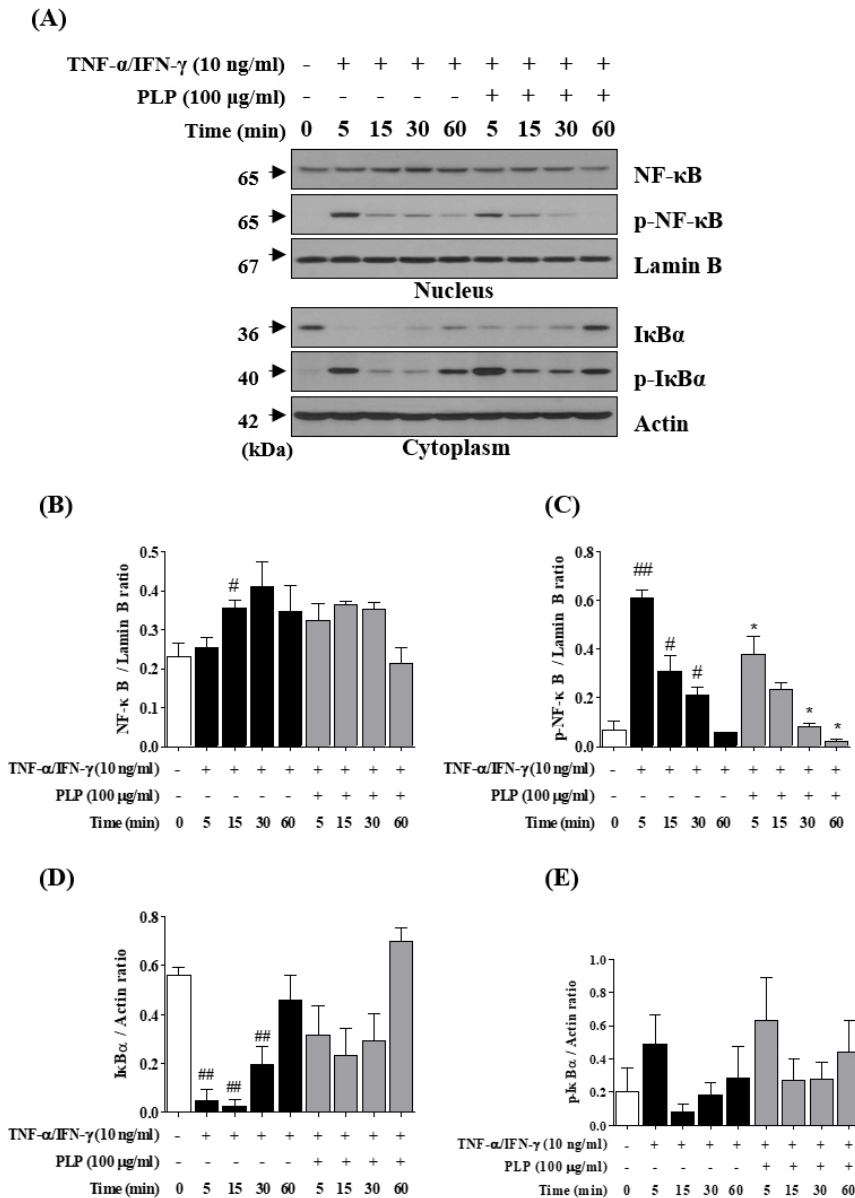


Fig. 5. The effect of PLP on NF- κ B signaling pathway in HaCaT cell. To analyze the effect of PLP on NF- κ B signaling pathway, HaCaT cells were treated with PLP 100 μ g/ml for 1 h and then treated with TNF- α /IFN- γ (each 10 ng/ml) for 5, 15, 30 and 60 min. NF- κ B and p-NF- κ B were analyzed in nuclear proteins. I κ B α and p-I κ B α were analyzed in cytoplasmic proteins. (A) The effect of PLP on NF- κ B signaling pathway was investigated by western blot analysis. The expressions of (B) NF- κ B and (C) p-NF- κ B were quantified with lamin B. The expression of (D) I κ B α and (E) p-I κ B α was quantified with actin. All experiments were conducted at least 3 times. All data represent the means \pm SEM. # p <0.05 and ## p <0.01 versus non-treated group; * p <0.05 versus only TNF- α /IFN- γ -treated group.

과립구와 대식세포의 분화를 촉진하고, 림프구의 사멸을 억제하여 세포 생존을 증가시켜 만성 피부 염증을 유도하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 본 연구에서 PLP가 GM-CSF의 발현에 미치는 영향을 분석해 본 결과, TNF- α /IFN- γ 에 의해 증가된 GM-CSF 수준은 PLP에 의해 유의하게 감소하였으며, 이는 PLP가 GM-CSF 발현을 억제하여 염증세포의 분화 및 생존을 조절하고, 만성 피부 염증을 억제한다는 것을 나타낸다.

염증세포에 화학 주성을 갖는 C-C 케모카인 계열 중 하나인 MCP-1은 주로 단핵구나 섬유아세포, 혈관 내피세포에서 분비되며, 백혈구와 같은 염증세포를 염증 부위로 이동시켜 염증을 지속시키는 화학적 유인물질이다²⁶⁾. 또한, MCP-1은 TNF- α , IFN- γ

및 IL-1 등의 자극에 의해 생성이 되며, 아토피 피부염 동물모델의 혈청에서 높은 수준으로 검출되어 다양한 염증성 질환들과도 관련되어 있다^{26,27)}. 본 연구에서 PLP가 MCP-1의 발현에 미치는 영향을 분석해 본 결과, TNF- α /IFN- γ 에 의해 증가된 MCP-1 수준은 PLP에 의해 유의하게 감소하였고, 이는 PLP가 MCP-1을 억제하여 염증세포의 이동을 조절할 수 있음을 나타낸다.

TNF- α 와 IL-1 β 는 초기 염증반응에 관여하는 대표적인 염증성 사이토카인으로, TNF- α 는 선천성 및 후천성 면역, 세포 증식과 사멸에 중요한 역할을 하며 대식세포나 림프구 등의 백혈구에 의해 생성된다³⁰⁾. IL-1 β 는 급성 또는 만성 염증반응 개시에 중요한 역할을 하며, 다양한 염증성 사이토카인의 생성을 유도하여 염

증세포를 피부 병변으로 이동시킨다²⁸). 또한, IL-1 β 는 염증 반응의 매개체로, 만성질환 및 급성 조직 손상 시에 손상을 악화시키는 요인중 하나이다²⁹). 본 연구에서 PLP가 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현에 미치는 영향을 분석해 본 결과, TNF- α /IFN- γ 에 의해 증가된 TNF- α 와 IL-1 β 수준은 PLP에 의해 유의하게 감소하였으며, 이는 PLP가 TNF- α 와 IL-1 β 수준을 억제하여 초기 염증반응 및 면역 반응을 조절할수 있음을 나타낸다.

TARC는 Th2 세포를 염증 병변으로 이동 및 침윤을 유도하는 대표적인 Th2 케모카인으로, 염증성 피부질환에 중요한 케모카인이다³⁰). 혈청내 TARC의 농도는 아토피 피부염 환자에서 유의하게 증가할 뿐 아니라, 아토피 피부염의 중증도와 비례하여, TARC가 아토피 피부염의 중증도 검사에 사용되고 있다³¹). 또한, IL-6는 섬유아세포 및 각질세포에 의해 생성되는 사이토카인으로, Th2 세포의 성숙 및 호산구와 비만세포의 활성화를 유도하여 염증과 면역 반응에 중요한 역할을 할 뿐 아니라, 급성 알레르기 반응도 유도할 수 있다³²). 또한, IL-8은 각질형성세포에서 생성되는 염증성 사이토카인으로 염증 세포를 동원하여 아토피 피부염과 같은 염증성 질환에 중요한 역할을 한다³³). 본 연구에서 PLP가 TARC, IL-6, IL-8의 유전자 발현에 미치는 영향을 분석해 본 결과, TNF- α /IFN- γ 에 의해 유의하게 증가한 TARC와 IL-6 유전자 발현은 PLP에 의해 유의하게 감소하였으나, IL-8의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 PLP가 TARC 및 IL-6 유전자의 발현을 억제하여 염증세포 이동 및 활성화를 조절하였음을 나타낸다. 따라서 PLP는 TNF- α /IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 분비되는 염증성 사이토카인을 억제함으로써 초기 염증반응 조절 및 염증세포의 활성화와 이동을 조절하여 항염증 효능을 가지고 있음을 시사한다.

MAPKs는 인산화 과정을 통해 세포의 증식, 분화, 염증 및 면역 반응 등에 다양한 세포 과정 및 질병의 발병기전에 관여하며, ERK, JNK 및 p38의 복합체로 구성되어 있다³⁴). ERK는 세포 스트레스에 의해 인산화되어 IL-1 β , TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 발현을 유도하고^{35,36}), JNK는 세포 사멸과 자멸 조절 및 T세포를 활성화시키며, p38은 세포 스트레스에 의해 활성화되며 세포의 사멸 및 생존에 관여한다^{34,37}). 또한, MAPKs는 하위기전인 NF- κ B 신호의 활성화를 조절하며, 이는 염증성 사이토카인 발현 및 매개체 생산을 조절한다³⁷). NF- κ B 신호는 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 자극으로 인해 NF- κ B 경로가 활성화되며³⁸), 이를 I κ B kinase (IKK)가 조절한다. 일반적인 조건에서 NF- κ B는 I κ B α 와 결합하여 비활성 상태로 존재하지만, 여러 자극에 의해 활성화된 IKK는 I κ B α 단백질을 인산화시키고, I κ B α 의 유비퀴틴화와

NF- κ B에서의 탈부착 및 프로테아좀에 의한 I κ B α 의 최종적인 분해를 초래하여 분리된 NF- κ B는 세포질에서 핵 내로 이동하여 염증성 사이토카인을 유도하여 염증 반응을 촉진한다³⁹). 본 연구에서 PLP가 MAPKs와 NF- κ B의 신호전달기전에 미치는 영향을 분석해 본 결과, PLP는 ERK 및 NF- κ B의 인산화 발현을 유의하게 억제하였고, IkB의 분해는 억제하는 경향을 보였다. 그러나 PLP는 IkB의 인산화 억제에는 영향을 미치지 않았다. 이렇듯 PLP가 I κ B α 의 분해는 억제하였으나, I κ B α 의 인산화를 억제하지 않은 것으로 보이는 이유는 작약이 I κ B α 의 프로테아좀의 매개 분해를 억제하여 나타난 결과로 예상되며, 이로 인해 PLP가 NF- κ B의 핵 내 전이를 억제한 것으로 보인다⁴⁰). 이러한 결과는 PLP가 ERK 및 NF- κ B의 인산화 신호 전달 경로를 억제함으로써, 항염증 효능을 나타내는 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해보면, PLP가 TNF- α /IFN- γ 로 자극한 HaCaT 세포에서 ERK 및 NF- κ B의 인산화 신호전달경로를 억제하고, 이를 통해 염증성 사이토카인인 GM-CSF, MCP-1, IL-1 β , TNF- α , TARC 및 IL-6의 발현을 억제함으로써 염증 반응을 완화시켜 항염증 효능을 나타내는 것으로 보여진다. 이상의 결과를 볼 때 PLP는 아토피 피부염에서 염증을 완화시키는 치료 후보 물질로서의 가능성을 시사한다.

결론

본 연구에서는 PLP의 항염증 효과를 연구하기 위해 TNF- α /IFN- γ 로 염증을 유도한 HaCaT 세포에서 염증성 사이토카인 (GM-CSF, MCP-1, IL-1 β , TNF- α , TARC, IL-6 및 IL-8)의 발현과 세포 내 신호 전달(MAPKs 및 NF- κ B)에 대해 연구하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PLP는 TNF- α /IFN- γ 로 염증을 유도한 HaCaT 세포에서 GM-CSF, MCP-1, IL-1 β , TNF- α 의 발현을 유의하게 억제하였다.
2. PLP는 TNF- α /IFN- γ 로 염증을 유도한 HaCaT 세포에서 TARC와 IL-6의 유전자 발현을 유의하게 억제하였다.
3. PLP는 TNF- α /IFN- γ 로 염증을 유도한 HaCaT 세포에서 ERK의 인산화를 유의하게 억제하였다.
4. PLP는 TNF- α /IFN- γ 로 염증을 유도한 HaCaT 세포에서 핵 내의 NF- κ B의 인산화를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과에서 PLP는 각질형성세포에서 ERK 및 NF- κ B의 인산화 신호 경로를 억제하고, 이를 통해 염증성 사이토카인의 수준을 억제하여 염증 반응을 완화시켰다. 따라서 PLP는 항후에 아

토피 피부 질환의 증상 중 염증을 개선 시키는 치료제로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

None.

Funding

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korean government (MSIT) (No. 2020R1A2C2005836), and the Ministry of Education (No. 2021R1I1A1A01043143).

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

1. Avena-Woods C. Overview of atopic dermatitis. *Am J Manag Care.* 2017 ; 23(8 Suppl) : S115-S123.
2. Kim M, Kim J. Phenotypes and endotypes of atopic dermatitis: Clinical implications. *Allergy Asthma Respir Dis.* 2020 ; 8(1) : 9-14. <https://doi.org/10.4168/aard.2020.8.1.9>
3. Kim JY, Yang Y. Effects of Atopic Dermatitis on Suicidal Ideation, Plans and Attempts in Young Adult. *J Korean Acad Community Health Nurs.* 2017 ; 28(4) : 504-12. <https://doi.org/10.12799/jkachn.2017.28.4.504>
4. Zaidi Z, Lanigan SW. *Skin: Structure and Function, Dermatology in Clinical Practice* Springer. 2010: 1-15. https://doi.org/10.1007/978-1-84882-862-9_1
5. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DYM. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 ; 118(1) : 178-89. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.03.047>
6. Saeki H, Tamaki K. Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2006 ; 43(2) : 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.06.002>
7. Avgerinou G, Goules AV, Stavropoulos PG, Katsambas AD. Atopic dermatitis: new immunologic aspects. *Int J Dermatol.* 2008 ; 47(3) : 219-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2008.03471.x>
8. Jung MR, Lee TH, Bang MH, Kim H, Son Y, Chung DK, et al. Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 3-O-β-D-glucopyanosylspinasterol via blocking NF-κB and STAT1 signaling pathways in TNF-α and IFN-γ-induced HaCaT keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 ; 427(2) : 236-41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.087>
9. Son KH, Lee JG, Jee SY. A philological study on demonstration of Atopic dermatitis. *J East-West Med.* 2009 ; 34(4) : 15-24.
10. Gong NM, Jee SY. A Literature study about comparison of Eastern-Weatern medicine on the Atopic dermatitis. *J Korean Med Ophtahlmol Otolaryngol Dermatol.* 1999 ; 12 (1) : 241-53.
11. Yun YH, Choi IH. A study on the Development of Traditional Korean Medicine Clinical Practice Guideline for Atopic Dermatitis. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2012 ; 25(2) : 38-48. <https://doi.org/10.6114/JKOD.2012.25.2.038>
12. Lee SY, Yoon HD, Shin OC, Park CS. A Case Report of Skin Scale Treated with Hyulbuchukeotang. *Korean J Oriental Int Med.* 2005;26(3):720-4
13. *Herbology Editorial Committee of Korean Medicine : Herbology.* 2nd ed. Seoul : Younglimsa. 2009 ; 637-8.
14. Kim SJ, Lee AR, Kim SH, Kim KJ, Kwon OJ, Choi JY, et al. Skin Wrinkle Improvement Effect of Paeoniae radix and processed Paeoniae radix Through inhibition of Advanced glycation end products (AGEs). *Kor J Herbology.* 2017 ; 32(4) : 53-60. <https://doi.org/10.6116/KJH.2017.32.4.53>
15. Kim KH, Choi YG, Hong YM, Yeo SJ, Choi JH, Kim TH. Gene expression microarray analysis of Paeoniae radix on IL-1β-stimulated

- primary human gingival fibroblast. *J Korean Med.* 2010 ; 31(2) : 91-108
16. He DY, Dai SM. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of paeonia lactiflora pall., a traditional chinese herbal medicine. *Front Pharmacol.* 2011 ; 2 : 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00010>
 17. Hu B, Xu G, Zhang X, Xu L, Zhou H, Ma Z, et al. Paeoniflorin Attenuates Inflammatory Pain by Inhibiting Microglial Activation and Akt-NF- κ B Signaling in the Central Nervous System. *Cell Physiol Biochem.* 2018 ; 47(2) : 842-50. <https://doi.org/10.1159/000490076>
 18. Jin X, Wang J, Xia ZM, Shang CH, Chao QL, Liu YR, et al. Anti-inflammatory and Anti-oxidative Activities of Paeonol and Its Metabolites Through Blocking MAPK/ERK/p38 Signaling Pathway. *Inflammation.* 2016 ; 39(1) : 434-46. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0265-3>
 19. Berke R, Singh A, Guralnick M. Atopic dermatitis: an overview. *Am Fam Physician.* 2012 ; 86(1) : 35-42
 20. Eckert RL. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev.* 1989 ; 69(4) : 1316-46. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.4.1316>
 21. Cha KJ, Im MA, Gu A, Kim DH, Lee D, Lee JS, et al. Inhibitory effect of *Patrinia scabiosifolia* Link on the development of atopic dermatitis-like lesions in human keratinocytes and NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol.* 2017 ; 206 : 135-43. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.045>
 22. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* 2017 ; 2017 : 7435621. <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>
 23. Lim JY, Lee JH, Lee DH, Lee JH, Kim DK. Umbelliferone reduces the expression of inflammatory chemokines in HaCaT cells and DNCB/DFE-induced atopic dermatitis symptoms in mice. *Int Immunopharmacol.* 2019 ; 75 : 105830. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105830>
 24. Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity.* 2016 ; 45(5) : 963-73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>
 25. Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.* 2006 ; 16(2) : 126-33. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310017>
 26. Kaburagi Y, Shimada Y, Nagaoka T, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Enhanced production of CC-chemokines (RANTES, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , and eotaxin) in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 2001 ; 293(7) : 350-5. <https://doi.org/10.1007/s004030100230>
 27. Thompson WL, Van Eldik LJ. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-7 through NF κ B and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. *Brain Res.* 2009 ; 1287 : 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.081>
 28. di Giovine FS, Duff GW. Interleukin 1: the first interleukin. *Immunol Today.* 1990 ; 11(1) : 13-20. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90005-t](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90005-t)
 29. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 ; 22(4) : 189-95. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
 30. Popa C, Netea MG, van Riel PLCM, van der Meer JWM, Stalenhoef AFH. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007 ; 48(4) : 751-62. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600021-JLR200>
 31. Shimada Y, Takehara K, Sato S. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2004 ; 34(3) : 201-8. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2004.01.001>
 32. Neurath MF, Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 ; 22(2) : 83-9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.02.003>
 33. Amarbayasgalan T, Takahashi H, Dekio I, Morita E. Interleukin-8 content in the stratum corneum as an indicator of the severity of inflammation in the lesions of atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013 ; 160(1) : 63-74. <https://doi.org/10.1159/000339666>
 34. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002 ; 298(5600) : 1911-2. <https://doi.org/10.1126/science.1072682>
 35. Lu N, Malesud CJ. Extracellular Signal-Regulated Kinase: A

- Regulator of Cell Growth, Inflammation, Chondrocyte and Bone Cell Receptor-Mediated Gene Expression. *Int J Mol Sci.* 2019 ; 20(15) : 3792. <https://doi.org/10.3390/ijms20153792>
36. Masuda K, Shima H, Katagiri C, Kikuchi K. Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446. *J Biol Chem.* 2003 ; 278(34) : 32448-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213254200>
37. Venuprasad K, Elly C, Gao M, Salek-Ardakani S, Harada Y, Luo JL, Yang C, Croft M, Inoue K, Karin M, Liu YC. Convergence of Itch-induced ubiquitination with MEKK1-JNK signaling in Th2 tolerance and airway inflammation. *J Clin Invest.* 2006 ; 116 : 1117-26. <https://doi.org/10.1172/JCI26858>
38. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 ;1(6) : a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
39. Celec P. Nuclear factor kappa B--molecular biomedicine: the next generation. *Biomed Pharmacother.* 2004 ; 58(6-7) : 365-71. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.12.015>
40. Durand JK, Baldwin AS. Targeting IKK and NF- κ B for Therapy. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017 ; 107 : 77-115. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2016.11.006>