Anti-inflammatory effects of the *Rubus occidentalis* seed extracts on UV-B induced inflammation in HaCat cells

Dong-Hee Kim¹ · Tae-Soon Park¹ · Jun-Ho Son¹

각질형성세포에서 UV-B와 사이토카인에 의하여 유도되는 염증 반응에 대한 복분자 씨앗 추출물의 항염증 효과

김동희¹ · 박태순¹ · 손준호¹

Received: 12 April 2016 / Accepted: 8 June 2016 / Published Online: 30 September 2016
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

Abstract It confirmed the applicability as an anti-inflammatory material from *Rubus occidentalis* seed (RSE) extract. In HaCaT cells to evaluate the anti-inflammatory potential as a material RSE extract on the activity of the inflammatory factors caused by UVB and IFN- γ /TNF- α . We measured the activity of ROS, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) by ROS-Glo H₂O₂ assay and ELISA kit. Our results showed that the RSE extracts inhibit the UVB and IFN- γ /TNF- α -induced ROS activities and expression of IL-1 β , IL-6 and IL-8 in a dose-dependent manner. Also it was found that inflammatory mediators of the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition were also brought, the expression of which is increased PGE₂ by COX-2 also inhibited. Finally RSE extracts measure the seed expression of filaggrin in the skin barrier, the main factor of the extract could be confirmed to increase the expression of the filaggrin damaged as a result of this concentration-dependent manner. Through this, it was able to confirm that the efficacy RSE extract to protect the inflammation by restoring the damaged layers of the epidermis. Results from more than RSE extract was able to confirm that the

extract that has anti-inflammatory effects by improving the inflammation being produced from UVB.

Keywords Anti-Inflammatory · HaCaT cell · PGE₂ · cyclooxygenase-2 · *Rubus occidentalis* Seed

서론

피부의 가장 표면층인 표피는 각질세포, 모낭, 멜라닌세포, 랑겔한스 세포로 이루어져 있으며 피부의 중요한 기능 중 하나인 외부환경으로부터 신체를 보호하는 역할과 내부 체액의 소실을 막는 장벽기능을 제공하는 것이다(Ishida 등, 2008). 피부장벽 기능이 피부 내외부의 다양한 자극에 의해 손상되면 피부가 건조해 지거나 가려움 및 염증반응을 일으키게 된다(Denda 등, 1996; Goldstein와 Abramovits 2003; Welss 등, 2004; Lynde 2008; Yeom 등, 2012). 특히 각질형성세포는 표피세포의 대부분을 구성하는 성분으로서 각질을 형성하고 IL-1 α , TNF- α , interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) 등의 cytokine 분비를 유도하고, 심한 경우에 다양한 피부 염증반응과 관련되어 있으며(Beissert 등, 2006) 이러한 각질형성세포의 염증반응은 피부의 노화, 아토피성 피부염, 건선등과 같은 피부질환과 밀접한 관련이 있다. 피부의 염증반응은 여러 가지 복합적인 유전자들에 의해 조절되며 주요한 유전자로 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthases (iNOS)가 알려져 있다(Aktan 2004; Hur 등, 2010). 그 중 COX-2는 염증 유발 사이토카인, 세포성장인자, 암세포촉진인자, 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등에 의한 PGE₂ 생성과 건선, 마름버짐, 홍반성

Jun-Ho Son (✉)
E-mail: bio115@nikom.or.kr

¹Traditional Korean Medicine Technology Division R&D Department Applied Product Development Team, National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongbuk 38540, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

낭창과 같은 염증성 피부질환을 유발하는 것으로 밝혀져 있다 (Masferrer 등, 1994; Seibert 등, 1994; Hong 등, 2002; Jean 등, 2008). 또한, 각질세포 외막과 케라틴 중간 미세섬유를 연결하는 중요한 역할을 하는 단백질 중 하나인 filaggrin은 최근 아토피피부염의 유전적 소인 중 하나로 주목을 받고 있다. Filaggrin이 유전적 변이나 후천적으로 감소되었을 때 피부보습을 유지하는 기능과 함께 각질층의 약산성을 유지 및 자외선에 의한 손상으로부터 피부를 보호하는 기능이 감소되며, 염증 발현, SC cohesion 및 permeability barrier가 감소된다(Fuchs 1993; Steinert 1995; Ishida-Yamamoto 등, 1997). 복분자는 한방에서 보간신, 명목, 이노제의 효능이 있고, 정력 감퇴, 유정, 빈뇨를 치료한다고 알려져 있다. 복분자 딸기의 생리활성과 관련한 연구로는 줄기로부터 2종의 flavan-3-ol과 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin의 분리와 잎으로부터 4종의 flavonoid등의 phenolic 화합물등의 연구가 되어져 있으며 (Shin 등, 2002; Yoon 등, 2002; Yoon 등, 2003; Han 등, 2013) 복분자 과실의 특성이나 항산화 활성 또는 식품, 화장품 소재로의 개발에 대한 연구가 주를 이루고(Oh 등, 2007; Park 등, 2007; Lee 등, 2011), 있다. 또한 복분자 씨앗을 동결건조하여 마쇄한 뒤 70 % 에탄올을 추출을 하여 안토시아닌 계열인 cyanidin-3-O-glucoside와 Phenolic acid 계열인 gallic acid와 p-coumaric acid, gallic acid, ellagic acid등이 보고되어 있으며, 다량의 지방산이 함유되어 있다(Choi 2012). 복분자 씨앗의 효과에 관한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구는, 복분자 씨앗의 항염증 소재로서의 활성평가를 하기 위하여 피부 각질형성세포에 UV-B와 TNF- α /IFN- γ 를 처리하여 염증을 유도한 후 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay를 통한 독성 평가, ROS 활성 억제 평가, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, PGE₂, COX-2, filaggrin 발현에 복분자 씨앗 추출물이 미치는 영향을 측정하여 항염증 소재로서의 가능성에 대해 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 시료 추출물의 제조

실험에 사용된 복분자 씨앗은 경상북도 김천시 삼도봉 오미자 농장에서 구입하여 세척 후 건조하여 분쇄한 후 실험재료로 사용하였다. 분쇄된 씨앗(100 g)을 70 % EtOH에 24시간 침적시키고 추출된 여액을 감압 농축하였다. 70 % EtOH 용매 침적추출과 농축하는 과정을 3회 반복 하였으며 동결건조를 통하여 건조된 70 % EtOH 에탄올 추출물(3.9 g)을 얻었다.

시약

세포배양에 사용된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, 0.4 % trypan blue stain은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, haemocytometer (Marienfeld, Germany), MTT는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항산화와 mRNA 발현에 측정된 시약인 ROS-Glo assay, GoScript™ Reverse Transcriptase, GoTaq® Flexi DNA Polymerase는 Promega Corporation (Madison, WI, USA)에서 구입하였으며, 그 외 항

염증 및 피부 장벽 측정에 사용된 시약인 PGE₂ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서, RIPA buffer, Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit, BSA kit는 Thermo scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였고 antibody중 COX-2 cyaman chemical (Ann Arbor, MI, USA), iNOS BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg, Germany) filaggrin antibody와 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody는 Santa cruz Biotechnology (Santa cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

세포배양

사람의 각질형성세포주(human keratinocyte cell)는 HaCaT세포는 계명대학교로부터 분양 받아 사용하였다. 세포는 10 % FBS와 1 % penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5 % CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 독성 측정

HaCaT 세포를 96 well plate에 5×10^3 cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 복분자 씨앗 추출물을 각각 5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 mL를 가하여 실온에서 15 분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

ROS 생성량 측정

HaCaT 세포에 복분자 씨앗 추출물을 농도별로 처리했을 때 ROS의 생성량을 측정하기 위해 96-well white plate에 각 well당 2×10^5 cells/well 세포가 되도록 심어준 후 24시간을 안정화하였다. 이후, 배양된 배지를 제거하고 복분자 씨앗 추출물을 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 그 후 제조사의 매뉴얼에 따라 ROS Glo H₂O₂ assay를 수행하였다.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성량 측정

세포배양액 내의 PGE₂ 생성량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 cell은 DMEM배지를 이용하여 5×10^4 cells/mL로 조절한 후 12 well plate에 접종하고, 5 % CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 세포에 1 μ g/mL의 LPS를 처리 한 뒤 1시간 후에 5, 10, 25 μ g/mL의 복분자 씨앗 추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 상등액을 취하여 PGE₂를 측정하였다.

RNA 분리 및 mRNA 발현 측정

RNA는 UVB와 IFN- γ /TNF- α 를 조사한 후 24시간 뒤에 TRI-solution™ (BioScience Technology)시약을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분리하였다. 5×10^5 세포에 1 mL의 Trizol 시약을 넣고 세포를 용해시켜 상온에 5분간 방치한 후, 여기에 0.2 mL의 chloroform을 추가하고 잘 혼합한 후 13,000 rpm로 10분간 원심 분리하였다. 분리된 RNA는 diethyl procarbonate가 첨

Table 1 The sequences of the primers of the IL-1 β , IL-6, IL-8 and GAPDH for HaCaT cells

Gene	Primer	Sequence (5' 3')
IL-1 β	Forward	CTTCTCTGCAGCACATCC
	Reverse	AAGACCTCTCAAGGCTTTG
IL-6	Forward	GTCTGTGCTGATCCCAGTGA
	Reverse	TTGTCACCAGACGCGGTGTG
IL-8	Forward	AAGCTGGCCGTGGCTCTCTTG
	Reverse	AGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC
GAPDH	Forward	TGCACCACCACCTGCTTAGC
	Reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Fig. 1 Effect of 70 % EtOH extract from *Rubus occidentalis* Seed 70 % EtOH on proliferation of human keratinocyte cell (HaCaT). HaCaT cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10 % FBS, were treated with various concentrations of RSE for 24 h and cell viability was measured by MTT reagent. The values shown represent mean $\pm$ SEM of three different assays. * p < 0.01, ** p < 0.005 compared with absence of RSE

가된 증류수에 용해시킨 후 ELISA reader로 RNA purify를 측정 한 뒤, 260 nm에서 흡광도를 측정하고 농도를 정량하여 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 GoScript™ Reverse Transcriptase를 사용하여 합성하였으며, PCR은 GoTaq® Flexi DNA Polymerase와 각각의 primer를 이용하여 실험하였으며, 실험에 사용된 primer 염기서열은 Table 1과 같다.

Western blot을 이용한 단백질의 발현 측정

COX-2, filaggrin 활성을 보기 위하여 HaCaT 세포를 6-well plate에 각 well당 5×10^5 cells/well이 되도록 seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 복분자 씨앗 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척한 뒤, RIPA buffer를 이용하여 HaCaT세포를 분해하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 정량하여 20 μ L의 단백질을 10%의 SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5 % skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. COX-2와 filaggrin protein 각각의 1차

Fig. 2 Effect of 70 % EtOH extract from *Rubus occidentalis* Seed on UVB and IFN/TNF α -induced expression of ROS in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10 % FBS, were treated with various concentrations of RSE for 24 h. ROS level was determined by ROS-Glo H₂O₂ assay kit. The values shown represent mean $\pm$ SEM of three different assays. * p < 0.01, ** p < 0.005 compared with absence of RSE **Fig. 3** Effect of 70 % EtOH extract from *Rubus occidentalis* Seed on UVB and IFN/TNF α -induced expression of PGE₂ in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10 % FBS, were treated with various concentrations of RSE for 24 h. The supernatant was collected from each well and PGE₂ was determined by ELISA kit. The values shown represent mean $\pm$ SEM of three different assays. * p < 0.01, ** p < 0.005 compared with absence of RSE

항체를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing 하고 mouse anti-rabbit IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 3회 washing한 뒤 LAS 4,000 image analyzer (Fugifilm life science, Tokyo, Japan) 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량 하였다.

통계처리

결과 통계처리는 SPSS 12.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)프로그램을 이용하여 t-test를 이용하여 통계적 유의수준 p < 0.01, 0.005, 0.001에서 검증하였다.

Fig. 4 Effect of 70 % EtOH extract from *Rubus occidentalis* Seed on UVB and IFN/TNF α -induced expression of pro-inflammatory cytokines mRNA in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10 % FBS, were treated with various concentrations of RSE for 24 h. mRNA level was determined by western blot. The values shown represent mean $\pm$ SEM of three different assays. * p < 0.01, ** p < 0.005, *** p < 0.001 compared with absence of RSE

결과 및 고찰

Human keratinocyte (HaCaT)의 생존율 확인

HaCaT 세포를 이용하여 복분자 씨앗 추출물에 대한 세포생존율을 확인하고자 MTT assay를 수행하였다. 복분자 씨앗 추출물을 농도별(5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL)로 처리한 결과 추출물에서 5, 10, 25 μ g/mL 처리 시 HaCaT 세포의 생존율에 큰 영향을 나타내지 않았지만, 50, 100 μ g/mL의 농도 별 처리 시에는 세포의 생존율이 72.3, 65.3 %로 감소되는 것을 확인 할 수 있어 복분자 씨앗 추출물의 고농도로 처리 시 세포의 viability를 저해하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

ROS 생성 억제 효과

피부에 UV-B의 노출은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)생성을 야기시키며(Fisher 등, 1997; Yoon 등, 2003; Han 등, 2013), 이때 생성되어지는 ROS는 피부세포 내에서의 mitogen-activated protein kinase 신호전달 과정화에 영향을 미쳐 피부손상과 관련된 전사인자들을 활성화 시킨다(Di Girolamo 등, 2006; Shimauchi 등, 2008). 이러한 피부 세포 손상의 원인이 되는 ROS의 발현억제율을 살펴보고자 HaCaT 세포내 UVB와 IFN- γ /TNF- α 를 조사하여 ROS를 유도한 뒤 복분자 씨앗 추출물을 처리하여 항산화능을 측정하였다. 대조군은 UVB와 IFN- γ /TNF- α 를 처리하지 않은 그룹에 비해 ROS 생성량이

1.7배 증가되었으며, 복분자 씨앗 추출물의 경우 농도 의존적으로 ROS 생성량이 감소되는것을 확인 할 수 있었다. 특히 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 25 % 감소를 나타내었으며 정상군과 비슷한 ROS 발현을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 이처럼 복분자 씨앗 추출물은 자외선으로 유도한 ROS의 생성을 세포 독성 없이 각질형성세포내에서의 효과적으로 감소 시킴으로 ROS로 인하여 활성화 되는 피부 손상인자들의 활성화 억제에 영향을 미쳐 피부 염증에도 효과가 있을 것이라 판단된다.

PGE₂ 생성 억제 효과

체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 PGE₂등의 염증인자가 iNOS 및 COX-2에 의해 형성된다. 이 중 PGE₂는 염증반응, 면역반응, 그리고 angiogenesis를 촉진하는 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(Masferrer 등, 1994; Beissert 등, 2006). HaCaT 세포에서 UV-B와 IFN- γ /TNF- α 를 처리한 후 PGE₂ 억제효과를 ELISA kit로 측정하였다. HaCaT 세포에 UV-B 와 IFN- γ /TNF- α 를 처리하여 PGE₂의 생성을 유도한 후 복분자 씨앗 추출물 5, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 PGE₂ 생성억제를 측정한 결과 Fig. 3과 같이 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 15 %, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 30 %에 가까운 높은 억제 효과를 나타내었다. 이는 복분자 씨앗 추출물이 UV-B와 IFN- γ /TNF- α 에 의해 발현되는 PGE₂ 발현 억제 조절을 통해 항염증 효과를 나타낼 수 있다는 것을 보여주며, 염증매개물질인 PGE₂ 분비량 조절 효과를 통하여 각질형성세포 내에서의 피부 염증 완화에 중요한 영향을 주는 것을 의미한다.

IL-1 β , IL-6, IL-8 mRNA 발현에 미치는 영향

UVB는 피부의 가장 바깥쪽인 표피층에 주로 작용하여 cytokine과 chemokine의 분비를 통해 염증반응을 일으키며(Fisher 등, 1997; Di Girolamno 등, 2006; Shimauchi 등, 2008) 특히 UVB로 유도된 IL-1 β , IL-6, IL-8과 같은 pro-inflammatory cytokine의 발현이 피부 손상과 밀접한 관련이 있다(Granstein and Matsui 2004). 각질형성세포에서 복분자 씨앗 추출물이 염증을 일으키는 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, IL-8의 mRNA에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 UVB와 IFN- γ /TNF- α 에 의해 증가된 IL-1 β , IL-6, IL-8의 mRNA의 발현이 복분자 추출물의 최고 농도인 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 35, 28, 42 %의 발현 억제율을 나타내는 것으로 확인하였다(Fig. 4). 따라서 복분자 씨앗 추출물이 피부 자극 시에 초기 염증 유발 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, IL-8의 발현을 억제 시킴으로써 염증 초기 작용 기전을 억제함으로써 피부 자극 완화 효과를 줄 수 있을것으로 기대되어 진다. 또한 대표적인 염증 유발 효소인 사이토카인 하위 인자(iNOS, COX-2, PGE₂)들을 억제할 것으로 생각되어 진다.

COX-2 및 Filaggrin 단백질 발현에 미치는 영향

UV-B의 노출된 피부는 ROS의 한 형태인 COX-2를 생성하여 피부 염증 반응의 매개물질들의 발현이 증가되어지고(Welss 등, 2004), 피부세포내에서의 사이토카인의 발현 또한 염증 매개 인자인 COX-2의 발현을 증가시켜 피부염을 일으키게 된다(Hong 등, 2002; Hur 등, 2010). 표피의 각질형성세포로 분화되는 과정에서 각질형성세포는 납작한 모양의 핵이 없는 각질세포로 변형되고, 동시에 표피의 과립층과 유극층 상부에서 involucrin

Fig. 5 Effect of 70 % EtOH extract from *Rubus occidentalis* Seed on UVB and IFN/TNF α -induced expression of COX-2 and filaggrin protein in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10 % FBS, were treated with various concentrations of RSE for 24 h. Protein level was determined by western blot. The values shown represent mean $\pm$ SEM of three different assays. * p < 0.01, ** p < 0.005, *** p < 0.001 compared with absence of RSE

(Elias 등, 1999), 표피의 과립층과 각질층에서 loricrin, 피부보습에 중요한 역할을 하는 filaggrin (Fuchs 1993; Steinert 1995; Ishida-Yamamoto 등, 1997) 등 분화를 촉진하여(Steven와 Steiner 1994; Steinert와 Marekov 1995), 각질 내 keratin

filament를 응집함으로써 단단하고 평편한 구조인 각질세포막을 형성, 피부의 강력한 물리적인 장벽과 투과장벽기능에 기여하게 된다(Tarib 1999). 이러한 피부장벽을 구성하는 주요 인자들의 발현이 감소되면 인체와 외부환경 사이의 투과막인 피부각질장벽이 손상되고 이에 따른 경표피수분손실의 증가와 수분결합력이 감소에 따른 피부 염증 질환을 악화시킬 수 있다. HaCaT 세포내에서의 UVB조사와 사이토카인 처리에 따른 피부 염증과 피부 장벽에 주요한 인자인 COX-2와 filaggrin의 발현에 복분자 씨앗이 미치는 영향을 측정하였다. 복분자 씨앗 추출물을 처리하지 않은 그룹에서는 정상세포군에 비해 COX-2의 발현이 3배정도 증가하는 것을 확인하였으며, 복분자 씨앗 추출물을 농도별로 처리시 5 µg/mL의 농도에서는 20 % 이하의 낮은 COX-2 발현 억제율을 나타내었지만 10, 25 µg/mL의 농도에서는 25, 58 %의 높은 발현 억제율을 나타내었다. 또한 피부장벽에 주요한 인자인 filaggrin의 발현을 측정결과 복분자 씨앗 추출물 25 µg/mL의 농도에서 대조군에 비해 2배 이상 filaggrin 발현이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5). 복분자 씨앗 추출물은 각질형성세포층에서 filaggrin 발현을 증가 시킴으로써 UV에 의해 발생된 각질형성세포의 구조 손상에 따른 염증발생을 완화시킬 뿐만 아니라 피부의 수분 함유 능력 증강, 피부 건조의 방지 등의 표피 보호 효능을 가질 수 있음을 의미한다. 그러므로 복분자 씨앗 추출물이 피부 각질형성세포의 피부 장벽을 개선시켜 피부 염증 보호에 영향을 주는 것을 의미한다. 따라서 복분자 씨앗 추출물은 HaCat 세포내에서 염증 매개 인자의 발현 억제시켜줌과 동시에 피부 장벽 개선 효능을 갖는 것으로 확인하여 항염증 소재로써 이용 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

초 록

HaCaT 세포에서 UVB와 IFN- γ /TNF- α 에 의한 염증 관련 인자의 활동에 복분자 씨앗 추출물의 항염증 소재로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 복분자 씨앗 추출물은 HaCaT 세포에서 UVB와 IFN- γ /TNF- α 에 의한 ROS 유도 활성화와 interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8의 발현을 억제 하였다. 또한 염증 매개인자인 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 또한 억제 시켰으며, COX-2에 의해 증가되어 지는 PGE₂의 발현 또한 억제 시키는 것으로 확인 되었다. 마지막으로 복분자 씨앗 추출물의 피부장벽의 주요 인자인 filaggrin의 발현을 측정해 본 결과 농도 의존적으로 손상된 filaggrin의 발현을 증가 시키는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 복분자 씨앗 추출물이 표피 층의 손상을 회복함으로써 염증을 보호하는 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 부터 복분자 씨앗 추출물은 UV로부터 발생되어지는 염증을 개선시킴으로써 항염증에 효능이 있는 추출물임을 확인할 수 있었다.

Keywords 복분자 씨앗 · 항염증 · 휴먼각질형성 세포 · cyclooxygenase-2 · PGE₂

감사의 글 본 논문은 보건복지부 한의약선도기술개발 사업의 사업비지원(HI3C0556)에 의해 수행되었습니다.

Rererences

- Aktan F (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci 75: 639–653
- Beissert S, Cavazzana I, Mascia F, Meroni P, Pastore S, Tessari G, Girolomoni G (2006) Mechanisms of immune-mediated skin diseases: an overview. Clin Exp Rheumatol 24: S1–6
- Choi MH (2012) Protective effects of ethanolic extract from Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) seeds against oxidative stress. Dissertation, University of Duksung women's
- Denda M, Wood LC, Emami S, Calhoun C, Brown BE, Elias PM, Feingold KR (1996) The epidermal hyperplasia associated with repeated barrier disruption by acetone treatment or tape stripping cannot be attributed to increased water loss. Arch Dermatol Res 288: 230–238
- Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT (2006) UVB mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. Invest Ophthalmol Vis Sci 47: 2430–2437
- Elias PM, Wood LC, Feingold KR (1999) Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. Am J Contact Dermat 10: 119–126
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. New Engl J Med 337: 1419–1428
- Fuchs E (1993) Epidermal differentiation and keratin gene expression. J Cell Sci 17: 197–208
- Goldstein AM, Abramovits W (2003) Ceramides and the stratum corneum: structure, function, and new methods to promote repair. Int J Dermatol 42: 256–259
- Granstein RD, Matsui MS (2004) UV radiation-induced immuno-suppression and skin cancer. Cutis 74: 4–9
- Han SB, Kwon SS, Kong BJ, Kim KJ, Park SN (2013) Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of the unripened fruit extract of *Rubus coreanus* Miquel. J Soc Cosmet Sci Kor 39: 295–302
- Hong CH, Hur SK, Oh OJ, Kim SS, Nam KA, Lee SK (2002) Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. J Ethnopharmacol 83: 153–159
- Hur S, Lee YS, Yoo H, Yang JH, Kim TY (2010) Homoisoflavanone inhibits UVB-induced skin inflammation through reduced cyclooxygenase-2 expression and NF-kappaB nuclear localization. J Dermatol Sci 59: 163–169
- Ishida H, Ray R, Ray P (2008) Sulfur mustard downregulates iNOS expression to inhibit wound healing in a human keratinocyte model. J Dermatol Sci 49: 207–216
- Ishida-Yamamoto A, Kartasova T, Matsuo S, Kuroki T, Izuka H (1997) Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. J Invest Dermatol 108: 12–16
- Jean YH, Chen WF, Duh CY, Huang SY, Hsu CH, Lin CS, Sung CS, Chen IM, Wen ZH (2008) Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory and analgesic effects of the natural marine compound lemnalol from Formosan soft coral *Lemnalia cervicorni*. Eur J Pharmacol 14: 323–331
- Lee KI, Kim SM, Kim SM, Pyo BS (2011) Comparison of fatty acids and antibacterial activity against pathogen of acne in different parts of ripened black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). J Kor Soc Food Sci Nutr 40: 466–469

- Lynde C (2008) Moisturizers for the treatment of inflammatory skin conditions. *J Drugs Dermatol* 7: 1038–1043
- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3228–3232
- Oh SM, Mun YJ, Woo WH (2007) Effects of *Rubus coreanus* Miquel on the expressions of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16 melanoma cells. *Kor J Ori Physiol Pathol* 21: 1456–1461
- Park CM, Joung MS, Yang DO, Choi JW (2007) The study on the effect of *Rubus coreanus* Miquel extract as a cosmetic ingredient. *J Soc Cosmet Sci Kor* 33: 41–45
- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12013–12017
- Shimauchi T, Sugita K, Nishio D, Isoda H, Abe S, Yamada Y, Hino R, Ogata M, Kabashima K, Tokura Y (2008) Alterations of serum Th1 and Th2 chemokines by combination therapy of interferon- α and narrowband UVB in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol Sci* 50: 217–225
- Shin TY, Kim SH, Lee ES, Eom DO, Kim HM (2002) Action of *Rubus coreanus* extract on systemic and local anaphylaxis. *Phytother Res* 16: 508–513
- Steinert PM, Marekov LN (1995) The proteins elatin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Bio Chem* 270: 17702–17711
- Steven AC, Steiner PM (1994) Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocyte. *J Cell Sci* 107: 693–700
- Steinert PM (1995) A model for the hierarchical structure of the human epidermal cornified cell envelope. *Cell Death Differ* 2: 33–40
- Taïieb A (1999) Hypothesis: from epidermal barrier dysfunction to atopic disorders. *Contact Dermatitis* 41: 177–180
- Welss T, Basketter DA, Schröder KR (2004) *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro* 18: 231–243
- Yeom M, Kim SH, Lee B, Han JJ, Chung GH, Choi HD, Lee H, Hahm DH (2012) Oral administration of glucosylceramide ameliorates inflammatory dry-skin condition in chronic oxazolone-induced irritant contact dermatitis in the mouse ear. *J Dermatol Sci* 67: 101–110
- Yoon I, Cho JY, Kuk JH, Wee JH, Jang MY, Ahn TH, Park KH (2002) Identification and activity of antioxidative compounds from *Rubus coreanus* fruit. *Kor J Food Sci Technol* 34: 898–904
- Yoon I, Wee JH, Moon JH, Ahn TH, Park KH (2003) Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanus* Miquel. *Kor J Food Sci Technol* 35: 499–502