

Cytoprotective and Anti-inflammatory Effects of 6-Shogaol on Human Dermal Fibroblasts

Na-Kyeong Lee¹, Jung-Eun Ku², Hyo Sun Han^{3,4*}

¹Department of Cosmetics, JEI University, Incheon, Korea

²Department of Cosmetology, Kyung-In Women's University, Incheon, Korea

³Korea Institute of Dermatological Sciences, Seoul, Korea

⁴Department of Biological Engineering, Konkuk University, Seoul, Korea

*Corresponding authors: Hyo Sun Han,
Department of Biological Engineering,
Konkuk University, 120 Neungdong-ro,
Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea
Tel.: +82 70 7707 4564
Email: dang0602@hanmail.net

Received June 19, 2017

Revised July 6, 2017

Accepted July 11, 2017

Published September 30, 2017



Abstract

Purpose: 6-Shogaol is one of the spicy flavor ingredients of ginger and hydrolysis product of gingerols. The purpose of this study is to investigate the potential of 6-shogaol as a natural cosmetic raw material by examining cell protection and inflammation inhibitory activity in human dermal fibroblasts (HDFs). **Methods:** To verify the cytoprotective effects of 6-shogaol, cell viability was measured by water-soluble tetrazolium salt (WST-1) assay. To verify the anti-inflammatory effects of 6-shogaol, we performed nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (*NFKB*) promoter luciferase assay to check the expression of *NFKB*. Additionally, the expression of inflammation related gene such as cyclooxygenase 2 (*COX2*), receptor for advanced glycation end product (*RAGE*), tumor necrosis factor alpha (*TNFA*), interleukin 6 (*IL6*), and interleukin 8 (*IL8*) mRNA was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results:** 6-Shogaol showed no toxicity in HDFs at concentrations of 5, 10, 20, and 40 μ M, respectively and the cell viability was increased in a dose dependent manner. qRT-PCR analysis showed 6-shogaol treatment downregulated the expression of *NFKB*, *COX2*, *RAGE*, *TNFA*, *IL6*, and *IL8* in a dose dependent manner, resulting that 6-shogaol leads to protective activities against inflammatory responses in HDFs. **Conclusion:** As mentioned above, 6-shogaol restored cell viability and decreased the expression of inflammatory factors in a dose dependent manner. Consequently, these results suggest the possibility of 6-shogaol as cosmetic material preventing skin aging, through identified functions on cytoprotection and anti-inflammation.

Keywords: Human dermal fibroblast, Cytoprotection, Anti-inflammation, 6-Shogaol, Cosmetic

Introduction

피부에 다양한 산화적 스트레스가 증가하면 홍반, 부종, 발열과 같은 염증반응이 유발된다. 인체에서 가장 흔하게 발생하는 염증반응은 조직에 화학 물질, 세균 감염, 물리적 작용 등의 기질적 변화를 가져오는 자극이 가해졌을 때 그 상처 부위를 복구하고 재생하는 일련의 과정 중에 일어난다(Greaves & S øndergaard, 1970; Hruza & Pentland, 1993). 면역 관련 세포인 대식세포 (macrophage)는 lipopolysaccharide (LPS) 또는 interferon gamma ($IFN\gamma$)와 같은 자극에 의해 염증반응 전사인자인 NF κ B를 활성화시키고, 결과적으로 inducible nitric oxide synthase (iNOS),

prostaglandins (PGs), nitric oxide (NO), COX2를 만들어내어 염증반응을 일으킨다(Nathan, 1987). NF κ B는 염증반응에 관여하는 대표적인 전사인자로(Gomez-Nicola *et al.*, 2010), 정상 시에는 inhibitor of kappa B ($I\kappa$ B)와 복합체를 이루어 비활성 상태로 존재하다가 자외선(ultraviolet, UV)과 같은 외부 자극을 받으면 활성화된 후 핵으로 이동하여 *COX2*, *RAGE*, *TNFA*, *IL6*, *IL8* 등과 같은 염증반응을 일으키는 유전자의 발현을 촉진시킨다(Baerle, 1998; Longley *et al.*, 1988).

외인성 노화의 가장 대표적 원인 중 하나인 자외선은 그 파장 길이에 따라 UVA와 UVB 그리고 UVC로 나뉘는데, 이 중 320-400 nm의 장파장인 UVA는 UVB보다 에너지 레벨 자체는 낮지만 지구

상에 20배 가량 더 많이 존재하고, 비교적 파장이 길어 대기 중에서 거의 소실되지 않고, 진피층까지 침투하는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2011). 이러한 UVA의 지속적인 노출은 진피섬유아세포에 산화적 스트레스를 유발하여 피부의 DNA, 지질, 단백질을 손상시키고(Cha & Kim, 2015), NFκB, p53과 같은 여러 전사인자들을 조절하여 세포사멸과 염증 등을 일으킨다(Yoon *et al.*, 2013).

특유의 매운 맛과 향으로 전 세계적으로 오랫동안 사용되어 온 생강(*Zingiber officinale*)은 특히 항염증, 항산화, 항혈전, 항암 그리고 관절염 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2010). 이러한 생강의 효능을 나타내는 주요 성분은 gingerols, shogaols, paradols 등이고, 이 중 신선한 생강에 가장 많이 함유되어 있는 gingerols의 가수분해 산물이 바로 shogaols이다(Bak *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014). 생강의 심미 성분 중 하나인 6-shogaol의 최근 연구동향을 살펴보면, 의학학, 생명과학, 식품분야에서의 항암, 항염증, 항산화, 항균 효능에 관한 것이 대부분이고, 화장품 분야에서의 연구는 극히 미미하며 특히 인간진피섬유아세포에서의 6-shogaol의 효능에 대한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 본 논문에서는 자외선에 의해 노화된 인간진피섬유아세포에서 6-shogaol의 세포보호 효과와 염증반응 전사인자인 NFκB의 활성화, COX2, RAGE, TNFA, IL6, IL8 유전자의 발현을 살펴보고자 한다. 이를 통해 향후 6-shogaol의 노화예방 화장품 원료로서의 활용가능성을 살펴보고자 한다.

Methods

1. 세포배양 및 시료처리

본 연구에서는 인간진피섬유아세포(human dermal fibroblast, HDF; Lonza, Switzerland)와 NFκB reporter NIH3T3 stable cell line (Affymetrix®, Thermo Fisher Scientific, USA)이 사용되었다. 세포배양은 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM; HyClone™, GE Healthcare Life Sciences, UK)에 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone™), 1% antibiotics (penicillin 100 IU/mL, streptomycin 100 µg/mL; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific)를 함유한 배지가 사용되었고, 37°C, 5% CO₂가 유지되는 조건에서 배양되었다.

6-Shogaol (Sigma-Aldrich, USA)은 순수정제(>90%)된 가루 형태로 실험에 사용될 때는 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich)에 적정 농도로 용해하여 사용하였다. 세포배양접시에 HDF (2×10⁵ cells/well)를 24 h 배양한 후 적정 농도의 6-shogaol을 배지에 첨가하여 6 h 동안 전처리 한 후, 세포에 UV-A lamp (UVP, USA)를 사용하여 UVA를 조사하였으며, UVA 파장은 Fiber Optic Spectrometer (USB2000; Ocean Optics, USA)으로 측정하였다. HDF에 UVA를 조사하기 위해 세포배양접시의 배지를 제거

하고 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척한 후 세포가 건조되지 않도록 PBS 1 mL을 세척된 HDF에 넣은 후 세포 배양접시의 뚜껑을 열고 UVA를 조사하였다. UVA 조사 후 pH 7.4의 PBS를 제거하고 다시 새로운 배지를 첨가하여 배양기에서 24 h 추가 배양한 후 실험에 사용하였다.

2. Cell viability 측정

6-Shogaol과 UVA의 세포독성을 확인하기 위해서 WST-1 assay 원리를 이용하였다. 먼저, 6-shogaol 자체의 세포독성은 96-well plate에 HDF를 3×10³ cells/well의 농도로 100 µL씩 접종하여 24 h 배양 후 6-shogaol을 각각 5, 10, 20, 40, 80 µM 농도로 6 h 처리하여 확인하였다. UVA의 세포독성은 HDF를 동일 농도, 동일 시간 동안 배양한 후 UVA 조사한 다음 24 h 동안 배양하였다. 배양된 well에 각각 EZ-Cytox cell viability assay kit reagent (ItsBio, Korea) 10 µL를 첨가하여 1 h 배양 후 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6-Shogaol이 UVA로 손상된 세포에 미치는 보호 효과를 확인하기 위하여 WST-1 assay 방법을 이용하여 세포생존율을 확인하였다. 96-Well plate에 HDF (3×10³ cells/well)의 농도로 100 µL씩 접종하여 24 h 배양 후 6-shogaol을 각각 5, 10, 20, 40, 80 µM 농도로 6 h 처리하고, UVA 조사 후 24 h 동안 추가 배양하였다. 배양된 well에 동일한 cell viability assay kit reagent를 처리한 다음 흡광도를 측정하였다.

3. RNA 추출과 cDNA 제조

세포배양이 끝난 세포를 포집하여 TRIzol® reagent (Invitrogen™)를 이용하여 용해한 후, 0.2 mL chloroform (Biopure, Canada)를 첨가하여 상온에 방치하였다. 12000 rpm, 4°C 조건으로 20 min 간 원심분리하여 단백질이 포함된 하등액과 mRNA가 포함된 상등액을 분리한 후 상등액은 0.5 mL isopropanol (Biopure)을 첨가하여 10 min 간 상온에 방치한 다음 12000 rpm, 4°C 조건으로 원심분리하여 RNA를 침전시키고, 75% ethanol (Biopure)을 이용하여 세척 후 ethanol을 제거하고 상온에서 건조시켰다. 건조된 mRNA는 diethylpyrocarbonate (DEPC; Biopure) water로 녹여 실험에 사용하였으며, 추출된 RNA는 MaestroNano® microspectrophotometer (Maestrogen, USA) 이 용하여 260/280 nm의 ratio 1.8 이상의 순도의 RNA만을 실험에 사용하였다. 이렇게 추출된 RNA로부터 cDNA를 제작하기 위해서 PCR tube에 1 µg RNA, 0.5 ng oligo dT18, DEPC water를 total 10 µL로 제조 후 70°C에서 10 min 간 처리하여 RNA 변성을 유도한 다음 M-MLV reverse transcriptase (Enzynomics, Korea)을 이용하여 37°C에서 1 h 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

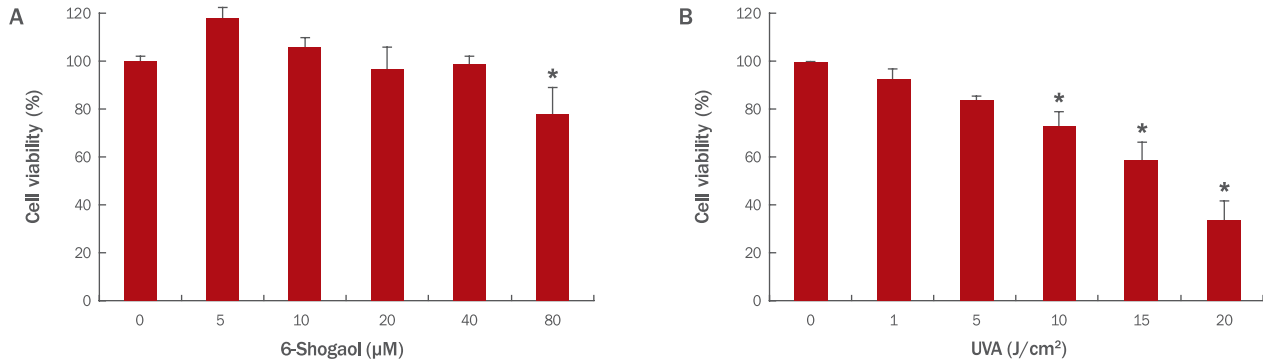


Figure 1. The cellular toxicity of 6-shogaol and UVA in HDFs.

Cell viability of 6-shogaol and UVA on HDFs (2×10^5 cells/well) was measured by the WST-1 assay. (A) 6-Shogaol was non-toxic to HDF at the 5, 10, 20, and 40 μM concentrations. (B) Cell viability was decreased with increasing UVA intensity. The graph represents the $M \pm S.D.$ of the relative cell viability in each sample from triplicate experiments. The student's t-test was conducted to determine statistical significance. * Significantly different from control ($p < 0.05$). UVA, ultraviolet A; HDF, human dermal fibroblast; WST-1, water-soluble tetrazolium salt; $M \pm S.D.$, mean \pm standard deviation.

4. qRT-PCR

6-Shogaol에 의한 HDF 내에서 일어나는 유전자 발현패턴을 정량적으로 분석하기 위하여 qRT-PCR을 이용하였다. qRT-PCR은 PCR tube에 0.2 μM primers, 50 mM KCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8.4), 0.8 mM dNTP, 0.5 U Ex Taq DNA polymerase, 3 mM MgCl, $1 \times$ SYBR green (Invitrogen™)을 혼합하여 반응액을 제조하였으며, Line-Gene K (Hangzhou Bioer Technology, China)를 사용하여 94°C에서 3 min 간 denaturation 후, denaturation (94°C, 30s), annealing (58°C, 30s), extension (72°C, 30s)을 40 cycle 수행하여 PCR을 진행하였다. PCR의 유효성은 melting curve로 검증하였고, 각 유전자의 발현은 actin beta (*ACTB*)의 발현을 표준화하여 비교 분석하였으며 실험에 사용된 primer는 Table 1과 같다.

5. NF κ B luciferase assay

6-Shogaol이 *NF κ B*의 promoter 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 *NF κ B* promoter luciferase assay를 이용하였다. 본 실험에서는 promoter 부분에 *NF κ B* promoter consensus sequence

를 가진 reporter 유전자(luciferase 유전자)가 내재되어 있는 *NF κ B* reporter NIH3T3 stable cell line을 60 mm 배양접시에 2×10^5 cells/well의 농도로 접종하여 24 h 배양 후 적절한 조건으로 NIH3T3 세포를 처치하고, 24 h 추가 배양하였다. 배양된 세포를 수확하여 passive lysis buffer (Promega, USA)를 첨가하고 ice에서 10 min 간 방치하여 용해한 다음 12000 rpm, 4°C로 30 min 간 원심 분리하여 상등액을 회수하였다. 동량의 단백질이 포함된 시료군을 각각 80 μL 씩 black 96-well plate에 넣은 후 luciferin (Promega)을 첨가하여 혼합한 직후 luminometer (Veritas Technologies, USA)를 이용하여 luciferin의 발광 정도를 측정하였다.

6. 통계처리

모든 실험들은 독립적으로 3회 반복 수행하였으며, 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 실험 결과는 Unpaired student's t-test로 검증하였고, p -value 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

Table 1. List of primers used in this study

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
COX2	CGCGGATCCGCGGTGAGAACCGTTTAC	GCGAGGAAGCGGAAGAGTCTAGAGTCGACC
RAGE	CCTGGGAAGCCAGAAATT	GCACAGGTCAAGGTCACA
IL6	TAACAGTTCTGCATGGGCGGC	AGGACAGGCACAAACACGCACC
IL8	CTCTCTTGGCAGCCTTCC	CTCAATCACTCTCAGTTCTTTG
TNFA	CCCAGGGACCTCTCTAATC	GGTTTGCTACAACATGGGCTACA
ACTB	GGATTCTATGTGGGCGACGA	CGCTCGGTGAGGATCTTCATG

COX2, cyclooxygenase 2; RAGE, receptor for advanced glycation end product; IL6, interleukin 6; IL8, interleukin 8; TNFA, tumor necrosis factor alpha; ACTB, actin beta.

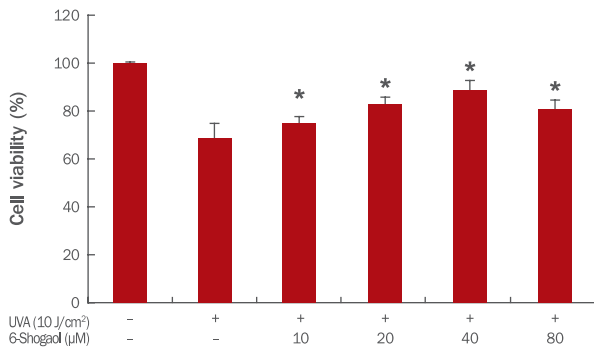


Figure 2. Effects of 6-shogaol on cell viability in UVA-irradiated HDFs.

Cellular toxicity was measured by the WST-1 assay. Cell viability by 6-shogaol was increased in a dose dependent manner up to 40 µM concentration in UVA-irradiated HDFs. The graph represents the M±S.D. of the relative cell viability in each sample from triplicate experiments. The student's t-test was conducted to determine statistical significance. * Significantly different from control ($p < 0.05$). UVA, ultraviolet A; HDF, human dermal fibroblast; WST-1, water-soluble tetrazolium salt; M±S.D., mean±standard deviation.

Results and Discussion

1. 6-Shogaol 및 UVA의 세포독성

인간진피섬유아세포에 6-shogaol을 5, 10, 20, 40, 80 µM 농도로 처리하여 6-shogaol 자체의 세포독성을 확인한 결과, 5-40 µM 농도까지는 각각 118%, 106%, 97%, 99%의 세포생존율을 보였으나, 80 µM에서 세포생존율이 78%까지 감소되었다. 그러므로 이후 실험에서는 세포독성이 없다고 판단되는 6-shogaol 40 µM을 최대 사용농도로 적용하였다(Figure 1A).

인간진피섬유아세포에서 UVA의 강도에 따른 세포생존율은 1 J/cm²에서 93%, 5 J/cm²에서 84%를 보여 실험적으로 자연회복될 가능성이 높아 세포독성이 미미하다고 판단하였다. 또한 15 J/cm²의 UVA에서 59%, 20 J/cm²에서 34%의 세포생존율을 보여 실험적으로 자연 사멸할 가능성이 높아 세포독성이 너무 강하다고 판단하였다. 세포노화란 세포가 재생능력을 잃고, 더 이상의 세포분열을 안 하는 것을 말하며 세포사멸을 일으키는 것보다 조금 약한 DNA 손상을 주는 경우 나타난다(Campisi, 1998). 그러므로 본 실험에서는 약 73%의 세포생존율을 보이는 10 J/cm²의 UVA를 세포노화의 적정 강도로 설정하였다(Figure 1B).

2. 6-Shogaol의 세포보호 효과

선행 연구에 따르면 UVA는 세포 내 활성산소를 유도하여 DNA 손상 및 세포사멸을 초래한다고 하였으므로(Jaszewska *et al.*, 2013), 이에 근거하여 10 J/cm²의 UVA에 손상된 인간진피섬유

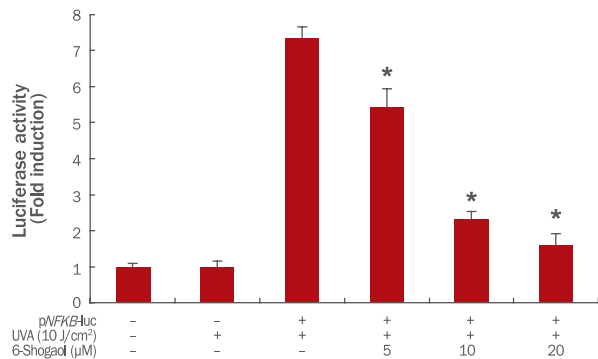


Figure 3. 6-Shogaol regulates NFKB expression in UVA-irradiated HDFs.

NFKB reporter NIH3T3 stable cell line (2×10^5 cells/well) was seeded on 60 mm culture dish and then incubated for 24 h. The cells were pre-treated with various concentrations of 6-shogaol for 6 h. Then, the cells were washed by PBS and irradiated by 10 J/cm² UVA. After further incubation for 24 h, inhibition of NFKB promoter activity by 6-shogaol was determined by the NFKB promoter luciferase assay. 6-Shogaol pre-treatment downregulated the expression of NFKB in a dose dependent manner. The graph is representative of three independent experiments (M±S.D.). The student's t-test was conducted to determine statistical significance. * Significantly different from control ($p < 0.05$). pNFKB, NFKB promoter; Luc, luciferase; UVA, ultraviolet A; HDF, human dermal fibroblast; PBS, phosphate buffered saline; M±S.D., mean±standard deviation.

아세포에서 6-shogaol이 이를 얼마나 회복시키는지 알아보았다. 그 결과 UVA만 조사된 대조군의 세포생존율(69%)에 비해 6-shogaol을 10 µM 전 처리한 경우 75%, 20 µM에서 83%, 40 µM에서 89%의 세포생존율을 보여 6-shogaol에 의해 농도의존적으로 세포생존율이 회복되는 것이 확인되었다(Figure 2). 이를 통해 6-shogaol은 UVA에 의해 발생된 세포손상으로부터 인간진피섬유아세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

3. NFKB의 promoter 활성억제 효과

6-Shogaol이 염증반응 전사인자인 NFKB의 promoter 활성에 미치는 영향력을 알아보기 위해 NFKB promoter luciferase assay를 이용하여 luciferin의 발광 정도를 측정하였다. 그 결과 10 J/cm² UVA에 의해 NFKB의 promoter 활성은 7.3배 증가되었으나, 6-shogaol 각각 5, 10, 20 µM 전처리 후 10 J/cm² UVA 조사 시 NFKB의 promoter 활성이 5.4, 2.3, 1.6배로 감소되었다. 즉 6-shogaol이 농도의존적으로 염증반응 전사인자인 NFKB의 promoter 활성을 감소시키는 것이 확인되었다(Figure 3). NFκB는 세포의 성장 및 분화, 염증반응, 면역반응에 중요한 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자로서 특히 자외선에 의해 활성화되어 TNFα, IL6, IL8와 같은 염증성 사이토카인과 COX2, RAGE 등의 염증 관련 유전자의 발현을 증가시키고, 이는 궁극적으로 피부노화를 촉

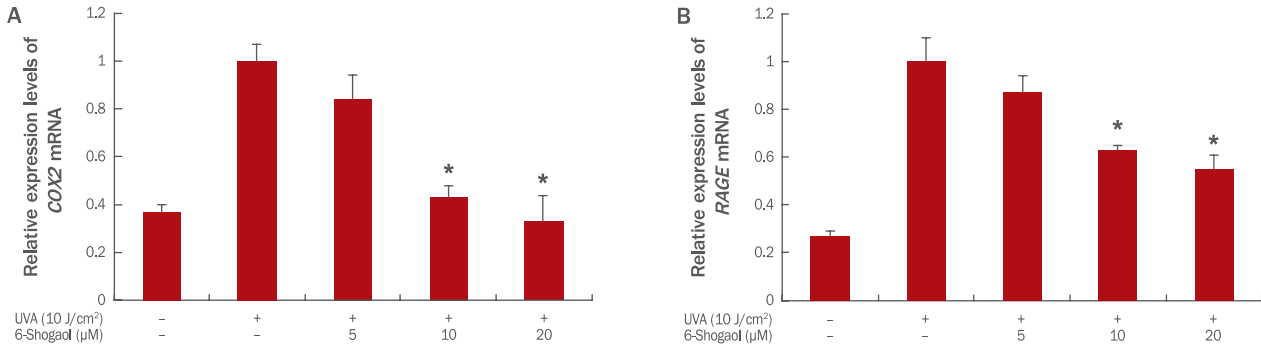


Figure 4. Effects of 6-shogaol on expression of COX2, RAGE mRNA in UVA-irradiated HDFs.

HDF cells (2×10^5 cells/well) were seeded on 60 mm culture dish and then incubated for 24 h. The cells were pre-treated with various concentrations of 6-shogaol. Then, the cells were washed by PBS and irradiated by 10 J/cm² UVA. After further incubation for 24 h, the expression level of COX2 (A), RAGE (B) mRNA was measured by the qRT-PCR. 6-Shogaol pre-treatment downregulated the expression of COX2 and RAGE mRNA. The graph is representative of three independent experiments (M±S.D.). The student's t-test was conducted to determine statistical significance. * Significantly different from control ($p < 0.05$). COX2, cyclooxygenase 2; RAGE, receptor for advanced glycation end product; UVA, ultraviolet A; HDF, human dermal fibroblast; PBS, phosphate buffered saline; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; M±S.D., mean±standard deviation.

진시킨다(Oh *et al.*, 2004). 그러므로 6-shogaol은 염증반응의 첫 단계인 NFκB의 활성을 억제하여 염증을 직접적으로 발생시키는 데 관여하는 유전자의 발현을 차단하고 궁극적으로 피부노화를 억제하는 것으로 보인다.

4. COX2 mRNA, RAGE mRNA 발현 변화

UVA에 의해 증가된 염증유발 유전자인 COX2 mRNA, RAGE mRNA가 6-shogaol에 의해 어느 정도 억제되는지 qRT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 염증매개물질인 prostaglandin E2 (PGE2)를 생성하는 것을 촉매하는 효소로 일명 '염증유발 유전자'라고 불리는 COX2 (Mendes *et al.*, 2009)는 10 J/cm² UVA에 의해 그 발현이 0.37에서 1로 약 2.7배 증가되었으나, 6-shogaol 전처리 후 UVA 조사 시에는 그 발현이 0.84, 0.43, 0.33배로 감소되었다. 즉, 6-shogaol이 농도의존적으로 염증유발 유전자인 COX2 mRNA 발현을 감소시키는 것이 확인되었다(Figure 4A). 또 다른 염증관련 유전자인 RAGE는 세포막 표면에 존재하는 최종 당화산물(advanced glycation end product, AGE) 수용체로 최종 당화산물에 의한 세포손상을 매개한다. 이는 염증이 있거나 암세포 존재 시 발현이 증가하는 유전자로 다양한 리간드와 결합하여 염증을 발생시키고, 세포를 손상시킨다(Xie *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014). 이러한 RAGE 유전자도 10 J/cm² UVA에 의해 그 발현이 대조군 대비 3.7배 증가되었으나, 6-shogaol 5, 10, 20 μM 전처리 후 UVA 조사 시 그 발현이 0.87, 0.63, 0.55배로 감소되었다. 즉 6-shogaol이 농도의존적으로 RAGE mRNA 발현을 감소시키는 것이 확인되었다(Figure 4B).

그러므로 6-shogaol은 농도의존적으로 COX2 mRNA와 RAGE mRNA의 발현을 감소시켜 이로 인해 발생하는 인간진피섬유아세포 내 염증반응 및 세포손상을 감소시키는 것으로 보인다.

5. TNFA mRNA, IL6 mRNA, IL8 mRNA 발현 변화

UVA에 의해 증가된 염증성 사이토카인인 TNFA mRNA, IL6 mRNA, IL8 mRNA가 6-shogaol에 의해 어느 정도 억제되는지 qRT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 염증성 질환의 주요 조절 인자이자 종양 발생 시에 세포사멸(necrosis)을 유도하여 종양 발생의 감시 기전으로 사용되기도 하는(Agarwal *et al.*, 1988) TNF A mRNA의 발현은 10 J/cm² UVA에 의해 6.9배 증가되었으나, 6-shogaol 전처리 후 UVA 조사 시 그 발현이 3.6, 2.3, 1.2배로 감소되었다(Figure 5A). 또한 염증 시 과잉 생산되어 염증 정도를 나타내는 마커로도 이용되는 사이토카인(Frydas *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 1986)인 IL6 mRNA의 발현은 10 J/cm² UVA에 의해 대조군 대비 8.1배 증가되었으나, 6-shogaol 전처리 후 UVA 조사 시 그 발현량이 6.7, 4.3, 1.8배로 감소되었다(Figure 5B). 염증부위에 중성구가 침윤되도록 하는 역할을 하는 IL8 mRNA의 발현은 10 J/cm² UVA에 의해 대조군 대비 7.6배 증가되었으나, 6-shogaol을 각각 5, 10, 20 μM 전처리 후 10 J/cm² UVA 조사 시 IL8 mRNA의 발현이 5.1, 2.3, 1.2배로 감소되었다(Figure 5C). 그러므로 6-shogaol이 농도의존적으로 UVA에 의해 증가된 염증성 사이토카인인 TNFA mRNA, IL6 mRNA, IL8 mRNA 발현을 감소시켜 인간진피섬유아세포 내 염증반응이 감소될 것으로 보인다.

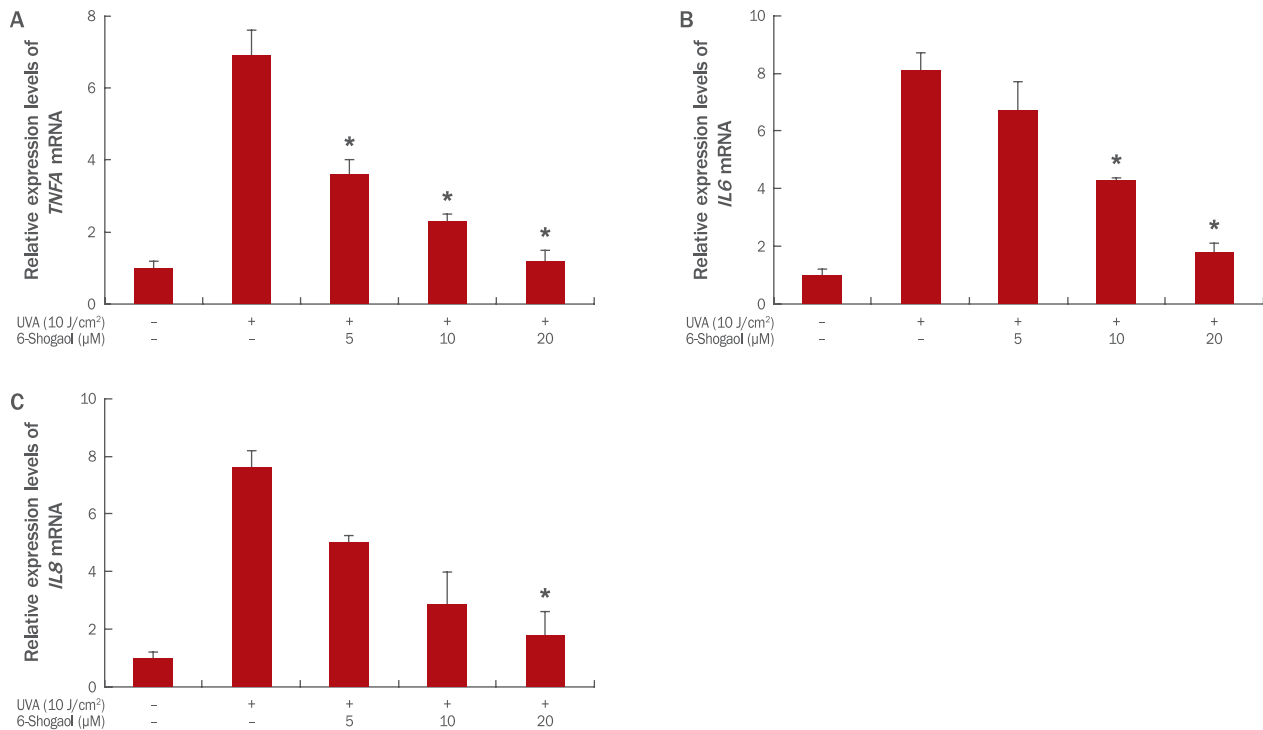


Figure 5. Effects of 6-shogaol on expression of *TNFA*, *IL6*, and *IL8* mRNA in UVA-irradiated HDFs.

HDF cells (2×10^5 cells/well) were seeded on 60 mm culture dish and then incubated for 24 h. The cells were pre-treated with various concentrations of 6-shogaol. Then, the cells were washed by PBS and irradiated by 10 J/cm² UVA. After further incubation for 24 h, the expression level of *TNFA* (A), *IL6* (B), and *IL8* (C) mRNA was determined by the qRT-PCR. 6-Shogaol treatment downregulated the expression of *TNFA*, *IL6*, and *IL8* mRNA in a dose dependent manner. The graph is representative of three independent experiments (M±S.D.). The student's t-test was conducted to determine statistical significance. * Significantly different from control ($p < 0.05$). *TNFA*, tumor necrosis factor alpha; *IL6*, interleukin 6; *IL8*, interleukin 8; UVA, ultraviolet A; HDF, human dermal fibroblast; PBS, phosphate buffered saline; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; M±S.D., mean±standard deviation.

Conclusion

화장품 산업은 인류의 오랜 꿈 가운데 하나인 미(美)에 대한 욕망을 바탕으로 지금까지 꾸준히 발전해 왔다. 특히 21세기에 들어서고령인구의 증가로 인한 소비자층의 확대와 환경, 화장품 원료의 안전성에 대한 관심 급증으로 인해 현재 노화예방 효능이 우수하면서도 안전한 천연 유래 화장품 원료 개발이 시급한 실정이다.

6-Shogaol은 생강(*Zingiber officinale*)의 매운맛을 내게 해주는 주성분 중 하나로 신선한 생강에 가장 많이 들어있는 gingerols의 가수분해산물이다. 최근 6-shogaol이 gingerol보다 항염증, 항산화, 항암 효과가 더 뛰어나다는 연구보고가 잇따르고 있으나 이와 관련한 대부분의 연구는 식품이나 의·약학, 생명과학 분야에 국한되어 있다. 현재 화장품 분야에서의 6-shogaol에 대한 연구는 극히 미미하며, 특히 인간진피섬유아세포에서의 6-shogaol에 대한 연구는 전무한 실정이다.

본 논문에서는 항염증, 항산화, 항암 효과가 있다고 알려진 6-shogaol을 인간진피섬유아세포에 적용하여 세포보호 및 항염증

효과를 기초로 한 항노화 화장품 원료로서의 가능성을 알아보고자 한다.

첫째, 인간진피섬유아세포에서 6-shogaol 자체의 세포독성 및 UVA에 대한 세포보호 효능을 알아보았다. 그 결과 6-shogaol 각각 5, 10, 20, 40 μM 농도에서는 인간진피섬유아세포에 대한 독성을 보이지 않았으나 80 μM 농도에서 세포생존율이 78%까지 감소되어 세포독성이 있는 것으로 판단되었고, 이후 실험에서는 6-shogaol 40 μM을 최대 사용농도로 적용하였다. 또한 약 73%의 세포생존율을 보인 10 J/cm²의 UVA가 실험적으로 세포노화의 적정강도로 설정되었으며 6-shogaol의 최대 사용농도인 40 μM 이내에서는 농도가 증가될수록 10 J/cm²의 UVA에 의해 손상된 인간진피섬유아세포의 세포생존율이 회복되는 것이 확인되었다. 이를 통해 6-shogaol은 UVA에 의해 발생된 세포노화로부터 인간진피섬유아세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

둘째, 6-shogaol이 UVA에 의해 손상된 인간 진피섬유아세포의 염증억제에 미치는 영향을 확인한 결과, 10 J/cm²의 UVA는 대표적인 염증반응 전사인자인 *NFKB*의 promoter 활성을 급격히

증가시켰지만 6-shogaol은 농도의존적으로 이를 감소시켰다. 즉, 6-shogaol은 *NFKB*가 핵 속으로 이동하여 활성화되는 것을 억제시켜 각종 염증관련 물질의 발현을 감소시킨 것으로 판단되었다. 특히 *NFKB*의 활성화로 인해 발현이 시작되는 *COX2*, *RAGE*, *TNFA*, *IL6*, *IL8*의 경우도 6-shogaol의 농도가 증가됨에 따라 그 발현이 감소되었다. 이상의 실험 결과들을 통해 6-shogaol은 UVA에 의해 발생된 인간진피섬유아세포의 염증발생을 억제시키는 효능이 있음이 확인되었다.

결론적으로 본 실험을 통해 6-shogaol은 농도의존적으로 UVA에 의해 손상된 인간진피섬유아세포를 보호하고, 염증을 억제하는 효능을 가진 천연유래 화장품 원료로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

This work is part of the Hyo Sun Han's Ph.D thesis at Konkuk University, Seoul, Korea.

References

- Agarwal S, Drysdale BE, Shin HS. Tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity involves ADP-ribosylation. *The Journal of Immunology*, 140: 4187-4192, 1988.
- Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Current Biology*, 8: 19-22, 1998.
- Bak MJ, Ok S, Jun M, Jeong WS. 6-Shogaol-rich extract from ginger up-regulates the antioxidant defense systems in cells and mice. *Molecules*, 17: 8037-8055, 2012.
- Campisi J. The role of cellular senescence in skin aging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 3: 1-5, 1998.
- Cha HJ, Kim YJ. Procyanidin B1 regulates matrix metalloprotease 1 mRNA expression using JNK-AP1-TRE axis in normal human dermal fibroblasts. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 13: 761-765, 2015.
- Frydas S, Karagouni E, Dotsika E, Reale M, Barbacane RC, Vlemmas I, Anogianakis G, Trakatellis A, Conti P. Generation of TNF α , IFN γ , IL-6, IL-4 and IL-10 in mouse serum from trichinellosis: effect of the anti-inflammatory compound 4-deoxypyridoxine (4-DPD). *Immunology Letters*, 49: 179-184, 1996.
- Gomez-Nicola D, Valle-Argos B, Nieto-Sampedro M. Blockade of IL-15 activity inhibits microglial activation through the NF κ B, p38, and ERK1/2 pathways, reducing cytokine and chemokine release. *Glia*, 58: 264-276, 2010.
- Greaves MW, Søndergaard J. Pharmacologic agents released in ultraviolet inflammation studied by continuous skin perfusion. *Journal of Investigative Dermatology*, 54: 365-367, 1970.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324: 73-76, 1986.
- Hruza LL, Pentland AP. Mechanisms of UV-induced inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, 100: 35-41, 1993.
- Huang HC, Chang SJ, Wu CY, Ke HJ, Chang TM. [6]-Shogaol inhibits α -MSH-induced melanogenesis through the acceleration of ERK and PI3K/Akt-mediated MITF degradation. *BioMed Research International*, 2014: 842569, 2014.
- Jaszewska E, Soin M, Filipek A, Naruszewicz M. UVA-induced ROS generation inhibition by *Oenothera paradoxa* defatted seeds extract and subsequent cell death in human dermal fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 126: 42-46, 2013.
- Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, Kim HK, Char K, Jang YP, Kim JW. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 427-433, 2011.
- Kim JS, Lee SI, Park HW, Yang JH, Shin TY, Kim YC, Baek NI, Kim SH, Choi SU, Kwon BM, et al. Cytotoxic components from the dried rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe. *Archives of Pharmacal Research*, 31: 415-418, 2008.
- Ling H, Yang H, Tan SH, Chui WK, Chew EH. 6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor- κ B activation. *British Journal of Pharmacology*, 161: 1763-1777, 2010.
- Longley BJ, Braverman IM, Edelson RL. Immunology and the skin: current concepts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 548: 225-232, 1988.
- Mendes RA, Carvalho JF, Waal Iv. An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumors of the head and neck. *Oral Oncology*, 45: 124-128, 2009.
- Nathan CF. Secretory products of macrophages. *The Journal*

Cytoprotective and Anti-inflammatory Effects of 6-Shogaol

of Clinical Investigation, 79: 319-326, 1987.

- Oh JH, Chung AS, Steinbrenner H, Sies H, Brenneisen P. Thioredoxin secreted upon ultraviolet A irradiation modulates activities of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 423: 218-226, 2004.
- Xie J, Méndez JD, Méndez-Valenzuela V, Aguilar-Hernández MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cellular Signalling*, 25: 2185-2197, 2013.

Yang WI, Lee D, Lee DL, Hong SY, Lee SH, Kang SM, Choi DH, Jang Y, Kim SH, Park S. Blocking the receptor for advanced glycation end product activation attenuates autoimmune myocarditis. *Circulation Journal*, 78: 1197-1205, 2014.

Yoon Y, Bae S, An S, Choe YB, Ahn KJ, An IS. Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 11: 417-426, 2013.

국문초록

인간진피섬유아세포에서 6-Shogaol의 세포보호 및 항염증 효과

이나경¹, 구정은², 한효선^{3,4*}¹인천재능대학교 화장품과, 인천, 한국²경인여자대학교 피부미용과, 인천, 한국³한국피부과학연구원, 서울, 한국⁴진국대학교 생물공학과, 서울, 한국

목적: 6-Shogaol은 생강(*Zingiber officinale*)의 매운맛을 내는 성분인 gingerols의 가수분해 산물로서, 본 연구에서는 6-shogaol의 인간진피섬유아세포에서의 세포보호와 염증억제 효능을 검증함으로써 천연유래 화장품 원료로서의 사용가능성을 알아보고자 한다. **방법:** 6-Shogaol의 세포보호 효과를 검증하기 위하여, water-soluble tetrazolium salt (WST-1) assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 6-Shogaol의 항염증 효과를 검증하기 위하여, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (*NFKB*) promoter luciferase assay를 이용하여 염증반응 전사인자인 *NFKB*의 발현을 측정하였으며 염증관련 유전자들인 cyclooxygenase 2 (*COX2*), receptor for advanced glycation end product (*RAGE*), tumor necrosis factor alpha (*TNFA*), interleukin 6 (*IL6*), interleukin 8 (*IL8*) 발현량을 quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)를 이용하여 측정하였다. **결과:** 6-Shogaol은 5, 10, 20, 40 μ M 각각의 농도에서 인간진피섬유아세포에 대한 독성을 보이지 않았으며 농도의존적으로 10 J/cm²의 ultraviolet A (UVA)에 의해 손상된 인간진피섬유아세포의 생존율을 회복시켰다. 대표적인 염증반응 전사인자인 *NFKB*의 promoter 활성이 6-shogaol에 의해 농도의존적으로 감소되었으며, 염증유발 유전자인 *COX2*, *RAGE* mRNA와 각종 염증관련 사이토카인인 *TNFA*, *IL6*, *IL8* mRNA의 발현도 6-shogaol에 의해 농도의존적으로 감소되었다. **결론:** 6-Shogaol은 세포보호 및 항염증에 대한 확인된 효능을 통해 피부노화를 예방하는 화장품 원료로서의 가능성을 보여줄 수 있으리라 사료된다.

핵심어: 인간진피섬유아세포, 세포보호, 항염증, 6-Shogaol, 화장품

참고문헌

윤영민, 배승희, 안성관, 최용범, 안규중, 안인숙. 자외선(Ultraviolet)이 피부 및 피부세포 내 신호전달체계에 미치는 영향. *아시안뷰티화장품학술지*, 11: 417-426, 2013.

차화준, 김영주. 인간진피섬유아세포에서 코코아 주요성분인 Procyanidin B1이 JNK-AP1-TRE Axis를 통한 Matrix-Metalloprotease 1 발현조절에 미치는 영향. *아시안뷰티화장품학술지*, 13: 761-765, 2015.

中文摘要

6-Shogaol 对人皮肤成纤维细胞的细胞保护和抗炎功效

李奈耿¹, 具贞恩², 韩孝仙^{3,4*}

¹仁川才能大学化妆品学科, 仁川, 韩国

²敬仁女子大学皮肤美容科, 仁川, 韩国

³韩国皮肤科学研究院, 首尔, 韩国

⁴建国大学生物工学科, 首尔, 韩国

目的: 6-Shogaol是生姜 (*Zingiber officinale*) 的辛辣成分gingerols的水解产物。探讨6-shogaol对人皮肤成纤维细胞的细胞保护和抗炎功效, 从而鉴定6-shogaol作为天然化妆品原料的应用可行性。**方法:** 为确认6-Shogaol的细胞保护效果, 采用water-soluble tetrazolium salt (WST-1) 法测定细胞生存率实验。为验证6-Shogaol的抗炎功效, 采用 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (*NFKB*) promoter luciferase assay测定炎症反应转录因子*NFKB*的表达, 以及采用 quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法确定炎症相关遗传因子 cyclooxygenase 2 (*COX2*), receptor for advanced glycation end product (*RAGE*), tumor necrosis factor alpha (*TNFA*), interleukin 6 (*IL6*), interleukin 8 (*IL8*) 的表达量。**结果:** 6-Shogaol在5、10、20、40 μM 的浓度下, 对人皮肤成纤维细胞没有毒性。6-Shogaol对被10 J/cm² ultraviolet A (UVA) 损伤的人皮肤成纤维细胞的生存率呈浓度依赖性恢复。代表性的炎症转录因子*NFKB*的promoter活性被6-shogaol呈浓度依赖性降低。炎症诱发遗传因子*COX2*, *RAGE* mRNA和各种炎症相关细胞因子*TNFA*、*IL6*、*IL8* mRNA的表达被6-shogaol呈浓度依赖性降低。**结论:** 通过以上研究确认了6-Shogaol具有细胞保护和抗炎功效, 因此作为预防抗衰老的化妆品原料充分具有可行性。

关键词: 人皮肤成纤维细胞, 细胞保护, 抗炎症, 6-Shogaol, 化妆品