

Suppression of TNF- α -induced Inflammation by Extract from Different Parts of Moringa in HaCaT Cells

Hyo-Jin Lee^{1,2} and Young-Chae Chang^{1,2*}

¹Research Institute of Biomedical Engineering and ²Department of Medicine, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

Received August 11, 2012 / Revised August 29, 2012 / Accepted August 29, 2012

The moringa (*Moringa oleifera* Lam.) plant is used both as food and an anti-allergic agent. In this study, we investigated skin protection effects of methanol extracts from the root, seed, fruit, and leaves of moringa in HaCaT keratinocyte cells. To investigate the pharmacological potential of various moringa extracts on TNF- α -induced collagen degradation in HaCaT cells, we measured the activity of matrix metalloproteinase-9,2 (MMP-9,2) by zymography analysis. Our results showed that all the moringa extracts inhibit the TNF- α -induced enzyme activity of MMP-9. In particular, moringa root extracts significantly suppressed MMP-9 and MMP-2 in a dose-dependent manner. Next, to investigate the anti-inflammation effect of the moringa extracts, we examined cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and interleukin-6 (IL-6) expression of the extracts. The results showed that both the root extracts and the seed extracts decreased the TNF- α -induced expression of COX-2. In addition, the root and leaf extracts reduced the expression of IL-6. However, none of the moringa extracts affected the expression of iNOS. The results suggest that moringa root extracts down-regulate MMP-9, COX-2, and IL-6 and that the root extracts offer superior skin protection effects compared with other extracts of moringa in HaCaT cells.

Key words : Inflammation, metalloproteinase-9,2 (MMP-9,2), cyclooxygenase-2 (COX-2), moringa (*Moringa oleifera* Lam.)

서 론

피부의 가장 표면층인 표피는 각질세포, 모낭, 멜라닌세포, 랑겔한스세포로 이루어져 있으며 외부의 자극으로부터 신체를 보호하는 역할을 한다[17]. 그 중 각질형성세포는 표피세포의 대부분을 구성하는 성분으로서 각질을 형성하고 여러 cytokines를 생산하여 다양한 염증반응과 면역반응에 관여한다[6]. 이런 보호기능에 반해 각질형성세포는 정기적 연속적으로 자외선뿐만 아니라 화학물질을 포함한 다양한 환경적, 생리적 스트레스에 노출되어 있다[8]. 이와 같은 유해한 자극으로 유발되는 염증반응, 세포자가사멸(apoptosis)과 같은 현상으로 인하여 피부의 노화 또는 아토피성 피부염, 건선 등과 같은 피부 질환이 발생되므로 각질형성세포의 염증반응은 피부질환과 밀접한 관련이 있다[23].

피부의 염증반응은 여러 가지 복합적인 유전자들에 의해 조절되며 주요한 유전자로 matrix metalloproteinase-9,2 (MMP-9,2), cyclooxygenase-2 (COX-2) [2], nitric oxide synthases (iNOS) [15]가 알려져 있다. 먼저 MMP는 피부의 각질형성세포와, 섬유아세포(fibroblasts)를 비롯한 많은 세포들로부터 분비된 세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막

(basement membrane, BM)을 구성하는 주요단백질 구성요소들을 가수분해[35] 함으로서 피부탄력을 유지하는 결합조직을 파괴하여 주름과 탄력저하 및 피부 처짐의 원인이 되는 것으로 알려져 있다[20]. MMP 중 gelatinase-A, gelatinase-B라고 불리는 MMP-9과 MMP-2은 아연에 의존적인 펩티드 중간분해 효소이며 타입III, IV콜라겐, 엘라스틴과 같은 세포외기질의 단백질을 가수분해하여 피부 노화에 주요한 역할을 한다. 특히 MMP-9은 cytokines과 growth factor와 같은 여러 자극에 의하여 합성되고 분비되어 세포구조 변화에도 영향을 미친다고 보고되었다[35].

COX와 NOS는 염증반응 매개물질인 PGE₂와 NO를 각각 생성하는 효소로서 건선, 마름버짐, 홍반성 낭창과 같은 염증성 피부질환을 일으킬 수 있다[1,16]. COX는 COX-1, COX-2 두 종류가 존재하며, COX-1은 생체 내의 대부분의 조직에서 발현하는 반면 COX-2는 growth factor, mitogenes, cytokines 등과 같은 요인에 의해 발현이 증가되어 염증반응을 조절하는데 중요한 역할을 담당한다. NOS 또한 그 특징에 따라 inducible NOS (iNOS), neuronal NOS (nNOS) 그리고 endothelial NOS (eNOS)로 나뉘어 진다. 그 중 iNOS는 피부각질형성세포에서 발현이 되며 COX-2와 같이 cytokines과 growth factor들에 의해 발현이 증가되어 염증관련 질병을 유발하는 것으로 밝혀져 있다[21,30].

한편, 모링가(*Moringa oleifera* Lam.)은 일반적으로 하와이에

*Corresponding author

Tel : +82-53-650-4848, Fax : +82-53-650-4849
E-mail : ycchang@cu.ac.kr

서 'Malunggay'로 불리는 식물로써 생장이 빠른 장식용 나무로 열대지역에 널리 분포되어 있다[31]. 이 식물은 또한 비타민과 단백질의 함량이 높아서 높은 영양가를 지닌 것으로 알려져 있다. 어린 잎과 꽃, 꼬투리는 채소로 이용되며, 모링가의 뿌리는 필리핀에서 서양 고추냉이 대체용으로 사용된다[3]. 또한 씨앗은 통증, 염증과 관련된 다양한 질병에 민간요법으로 사용되어 왔다[10,11,13]. 특히 잎은 모링가 잎 추출물은 rats의 피부 상처 치유에 효과가 있다는 것이 밝혀진 바 있다[26]. 그러나 피부 염증과 노화방지에 관련하여 모링가의 부위별 효능 비교에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 모링가를 함유한 피부 보호제 개발을 위해서 HaCaT 각질형성세포에 TNF- α 를 처리하여 염증을 유도한 후 MMP-9의 활성 및 COX-2, iNOS, IL-6 발현에 부위별 모링가 추출물이 미치는 영향을 비교하여 효능이 높은 부위를 선별 및 규명하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

모링가 추출물 제조 및 세포배양

본 실험에 사용한 모링가는 스리랑카에서 구입하여 부위별로 분말화 된 시료를 주식회사 유림물산(대구기 달서구 월암동 1-83)에서 제공받아 사용하였다. 시료 무게의 10배 (w/v)의 80% 메탄올에 가하여 24 시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액을 여과하여 rotary vacuum evaporator (R-3000, Büchi Switzerland)로 55°C에서 농축한 다음 건조하여 사용하였다. 실험에 사용한 각질형성세포주인 HaCaT세포는 American type culture collection (Rockville, MD, USA)에서 분양 받아 사용하였으며 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Tnvitrogen co., Grand Island, USA)과 1% antibiotic/antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GibcoBRL, Braunschweig, Germany) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다.

세포 생존율 측정

시료에 대한 세포 생존율은 MTT colorimetric assay 방법으로 실험하였다. 세포는 2.5x10⁴ cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하여 24 시간 배양한 다음 새로운 DMEM high glucose 배지 200 μ l에 농도별로 희석한 시료를 각각 첨가하여 24 시간 배양하였다. 그 후 5 mg/ml 농도의 MTT용액 10 μ l를 각 well에 가하고 4 시간 동안 반응시켰다. 반응종료 후 상등액을 제거하고 100 μ l의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Gelatin zymography 분석을 이용한 MMP 활성확인

6 well plate에 10% FBS가 첨가된 배지를 이용하여 세포를

1x10⁶ cells/well의 농도로 24 시간 동안 부착시킨 후 혈청이 없는 배지로 갈아준 다음 추출물과 TNF- α 를 처리하였다. 24 시간 후 상층액을 취하여, 0.1% gelatin을 포함한 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel을 2.5% triton X-100 용액에서 30 분 동안 씻어 낸 다음, 10 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃와 50 mM tris-HCl (pH 7.5)가 함유된 buffer에서 24 시간 동안 37°C incubator에서 반응시켰다. 반응 후 gel을 0.2% coomassie brilliant blue 용액으로 염색한 다음 탈색하여 MMP-9과 MMP-2의 활성 정도를 확인하였다.

Western blot 분석을 통한 염증관련 단백질의 발현 측정

각질형성세포를 60 mm culture dish에 2x10⁶ cells/well이 되도록 분주하여 부착시킨 다음 모링가 추출물과 TNF- α 를 처리하여 24 시간 배양하였다. 배양된 세포를 회수하여 lysis buffer (50 mM tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 mM PMSF, 1 μ g/mlleupeptin, 1 μ g/mlaprotinin)를 넣고 4°C에서 30 분간 단백질을 용해시켰다. 13,000 rpm으로 15 분간 원심분리 하여 상층액을 얻은 다음 bradford assay를 이용하여 정량 하였다. 단백질은 각각 30 μ g씩 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 전기영동하고 Immobilon-P-membrane (Millipore, Billerica, USA)에 단백질을 흡착시켰다. 특히 단백질을 탐색하고자 1차 항체와 2차 항체를 반응시킨 후 ECL kit (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England)을 사용하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 정도를 확인하였다.

RNA 분리 및 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

6 well plate에 10% FBS가 첨가된 배지를 이용하여 세포를 2x10⁶ cells/well의 농도로 부착시킨 후 혈청이 없는 배지로 갈아준 다음 추출물과 TNF- α 를 처리하였다. 12 시간 후 세포를 회수하여 trizol reagent (Molecular Research center, Inc., New York, USA)를 사용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 spectrophotometer와 2% agarose gel 전기영동을 통하여 정량, 확인하였다. 확인된 RNA 1 μ g과 oligo DT (100 pM) 1 μ l를 포함하여 총량이 12 μ l 되도록 DEPC를 첨가하여 합성한 cDNA에 2.5 μ g mix buffer (10X PCR buffer, 50 mM MgCl₂ 10mM dNTP mix, DEPC)와 sense, antisense primer (IL-6; sense: 5'-CCA GTA CCC CCA GGA GAA GA -3' antisense: 5'-CAG CTC TGG CTTGTT CCT CA -3', β -actin; sense: 5'-AGG GTG TGA TGG TGG GTA TGG G -3' antisense: 5'-CAG GAT CTT CAT GAG GTA GTC -3')를 혼합한 후 증폭시킨 다음 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel로 전기영동을 실시하여 분석하였다.

통계처리분석

실험 결과의 통계적 처리는 student's t test 및 analysis of

variance (ANOVA)로 하였으며, $p < 0.05$ 을 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means±S.E로 하였다.

결과 및 고찰

모링가 추출물의 세포 생존율 검색

모링가 추출물의 항염증 효과를 규명하기 위해 앞서 모링가 추출물이 각질형성세포에 독성을 통한 염증매개물질 저해의 가능성을 배제하고 또한 용량 범위를 설정하기 위해 뿌리, 씨앗, 열매, 잎의 부위별 모링가에서 얻어진 4가지 추출물에 대한 HaCaT세포 생존율은 MTT assay를 통해 검색하였다. 모링가 추출물을 종류별로 각각 0-800 µg/ml의 농도에서 관찰한 결과 뿌리와 열매, 씨앗 추출물에서는 약 86.9-102.0%의 생존율을 보여 HaCaT 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 잎 추출물에서는 0-400 µg/ml의 농도에서 86.7-100%의 생존율을 보였으나 800 µg/ml의 농도에서 64.0%의 생존율을 보여 독성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 모링가 추출물의 항염증 효과를 세포 독성이 없는 범위 내에서 실험하기 위해 각질형성세포에서 부위별 모링가 추출물을 각각 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 설정하고 이후 실험을 진행하였다.

모링가 추출물의 MMP-9활성 억제 효과 검색

각질형성세포에서 염증발현은 자외선 뿐만 아니라 여러가지 cytokines, prostaglandins (PGs) 등에 의해 일어난다[34]. 그 중 interleukin-1β (IL-1 β) [9], epidermal growth factor (EGF) [22], tumor growth factor β1 (TGF- β1) [19], TNF-α

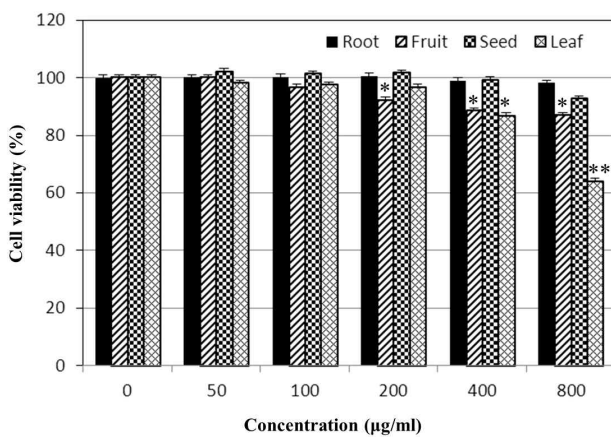


Fig. 1. The effect of extracts from different parts of moringa on cell survival in HaCaT keratinocyte. HaCaT keratinocytes were cultured in the presence of the indicated concentrations of moringa extracts for 24 hr. Cell survival was determined using an MTT assay. The values shown represent means±SE of three independent experiments and are expressed relative to controls; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[14]와 같은 다수의 cytokines과 growth factor들이 주요한 역할을 하여 피부의 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다[5]. 따라서 본 연구에서 각질형성세포에 TNF-α를 처리하여 피부의 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-2와 MMP-9의 활성에 모링가 추출물이 미치는 영향을 zymography를 이용하여 실험하였다.

각질형성세포에 FBS를 첨가하지 않은 배지에서 모링가 추출물을 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리했을 때 MMP-2 및 MMP-9 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 부위별 대조군에 비해 TNF-α를 처리하였을 때 MMP-9의 활성이 증가되었으며, 부위별 모링가 추출물 모든군의 400 µg/ml 농도에서 MMP-9의 활성이 억제된 것으로 나타났다. 특히, 모링가 뿌리 추출물에서는 100, 200 µg/ml의 농도에서도 확연히 MMP-9의 활성을 억제함으로써 효과가 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한 MMP-2의 활성은 TNF-α에 의해 영향을 받지 않았으며 뿌리 추출물에 의해 감소하는 경향을 보였다. 그러나 뿌리 추출물을 제외한 다른 추출물에서는 MMP-2의 억제 효과가 없었다(Fig. 2). 위와 같은 결과로 피부에 염증을 유도한다고 알려진 TNF-α는 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-9을 증가시켜 피부노화에도 영향을 끼칠 수 있음을 확인하였다. 또한 4가지의 모링가 추출물 모두 TNF-α에 의해 증가된 MMP-9의 활성을 감소시켰으므로 모링가 추출물에 대한 피부노화 억제 효과의 가능성을 확인하였다. 특히 모링가 뿌리 추출물이 저농도에서 MMP-9을 감소시켰으며, MMP-2의 활성 또한 감소시켰으므로 피부의 콜라겐 분해를 저해하여 피부노화 억제에 효과적이라 판단된다.

모링가 추출물의 COX-2 단백질 발현저해

부위별 모링가 추출물이 염증인자로 알려진 COX-2 단백질

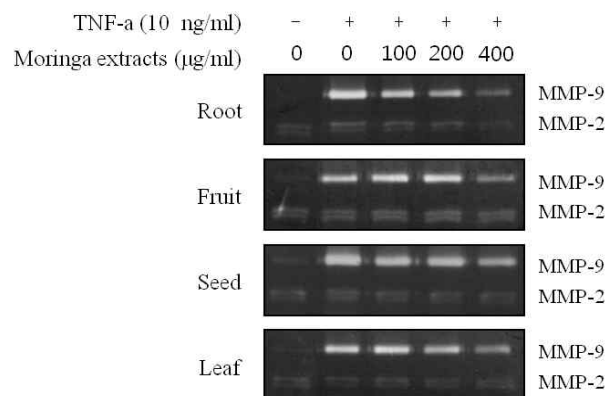


Fig. 2. Effect of extracts from different parts of moringa on TNF-α-induced MMP-9 activity in HaCaT keratinocyte. HaCaT cell were treated with the indicated concentrations of moringa extracts and TNF-α for 24 hr. The conditioned medium were prepared and used for gelatin zymography.

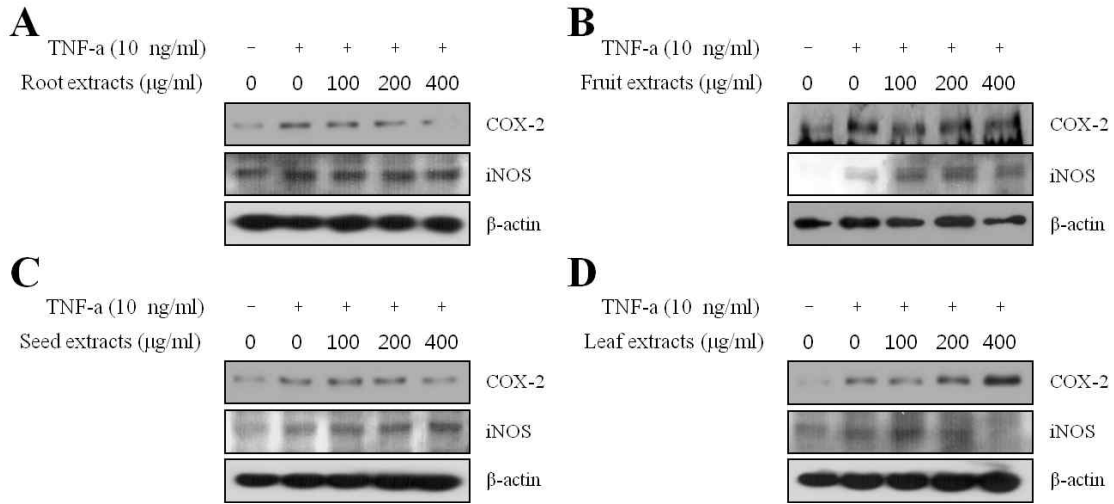


Fig. 3. Effect of extracts from different parts of moringa on TNF- α -induced expression of COX-2 and iNOS in HaCaT keratinocyte. Moringa extracts was added into cells for 1 hr before TNF- α stimulation and protein samples were extracted for 24 hr after TNF- α stimulation. The protein levels of COX-2 and iNOS were evaluated by Western blot analysis. β -actin was used as an internal control.

의 발현과도 관련이 있는지를 Western blot으로 조사하였다. 그 결과 COX-2의 단백질 발현량은 부위별 모링가 추출물 중 잎을 제외한 뿌리, 씨앗, 열매에서 전반적으로 유의성 있는 저해를 확인하였으며, 특히 모링가 뿌리 추출물은 낮은 농도인 100 μ g/ml 처리에도 감소하였으므로 COX-2의 저해효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). COX는 arachidonic acid (AA)로부터 prostaglandins (PGs)와 thromboxane의 합성에 중요한 효소이며 염증, 암 등 많은 질환과 관련되어 있다 [16].

또한 혈관의 삼투성을 증가시키고, 부종을 일으킨다 [7,12,18]. 그 중 COX-2는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS)를 포함한 염증성 자극 또는 유사분열 촉진에 의해 활성화되며, COX-2의 발현은 다양한 염증모델에서 염증반응을 촉진하는 PGs생성에 원인이 된다[21,33]. 따라서 모링가의 뿌리, 씨앗, 열매 추출물이 COX-2 단백질 발현을 감소시킴으로써 피부세포의 염증반응을 감소시킬 것을 알 수 있었다.

iNOS는 간 세포, 혈관 평활근 세포, 섬유아 세포 또는 마우스의 대식 세포와 같은 세포들에서 면역학적 자극이나 염증성 자극에 의하여 합성되고 이들 세포에서는 다량의 NO를 생성한다[28]. NO는 염증반응을 일으키는 촉진인자로서 NO의 생성은 다양한 염증성 질병의 발병 원인이 된다[24]. 따라서 모링가 추출물이 NO를 생성하는 iNOS 단백질의 발현을 조절하는지 확인하기 위해 Western blot으로 iNOS의 발현을 조사하였다. 부위별 대조군에 비해 TNF- α 를 처리하였을 때 iNOS의 발현량이 증가되었으나 부위별 모링가 추출물 모든 군의 100, 200, 400 μ g/ml 농도에서 iNOS 발현의 변화가 없는 것으로

나타났다. 한편 NO는 피부세포에서 콜라겐 생성에 중요한 영향을 끼칠 뿐 아니라 피부세포성장에도 주요한 역할을 한다고도 알려져 있다. 또한, iNOS 단백질의 역제는 콜라겐 합성을 감소시켜 피부세포의 상처치유를 억제하는 것으로 보고되었다 [29]. 따라서 모링가 추출물이 iNOS의 발현에 영향을 미치지 않는 것은 iNOS에 의한 피부염증과 콜라겐 합성 억제 경로에는 관련이 없는 것으로 생각된다.

모링가 추출물의 IL-6 형성 저해 효과

각질 형성 세포에서 부위별 모링가 추출물이, 염증을 일으키는 사이토카인 중 하나로 알려진 IL-6의 형성을 억제하는지 알아보기 위해 RT-PCR을 통해 IL-6의 mRNA 발현을 조사하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 증가된 IL-6의 mRNA 발현이 모링가 씨, 열매 추출물에서는 변화가 없었으나 뿌리, 잎 추출물에서는 농도 의존적으로 억제된 것을 관찰할 수 있었다. 특히 모링가 뿌리 추출물에서는 낮은 농도에서도 IL-6의 mRNA 발현이 나타난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). IL-6, IL-1 β , TNF- α 와 같은 cytokine은 iNOS, COX-2의 발현량을 증가시켜 염증반응에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[36]. 따라서 모링가 추출물이 상위단계에 있는 cytokine IL-6의 활성 억제를 통하여 하위의 염증 관련 인자(iNOS, COX-2)들을 억제할 수 있다. 그러나 위의 결과를 토대로 모링가 뿌리와 잎 추출물은 iNOS를 억제하지 못하였으므로 상하위 관계가 아닌 단독으로 IL-6를 억제시키는 것을 예상할 수 있었다.

최근 국외에서는 모링가에 대한 생리활성 연구가 활발히 진행되고 있다. Atawodi 등[4]은 모링가 잎과 뿌리, 줄기 추출

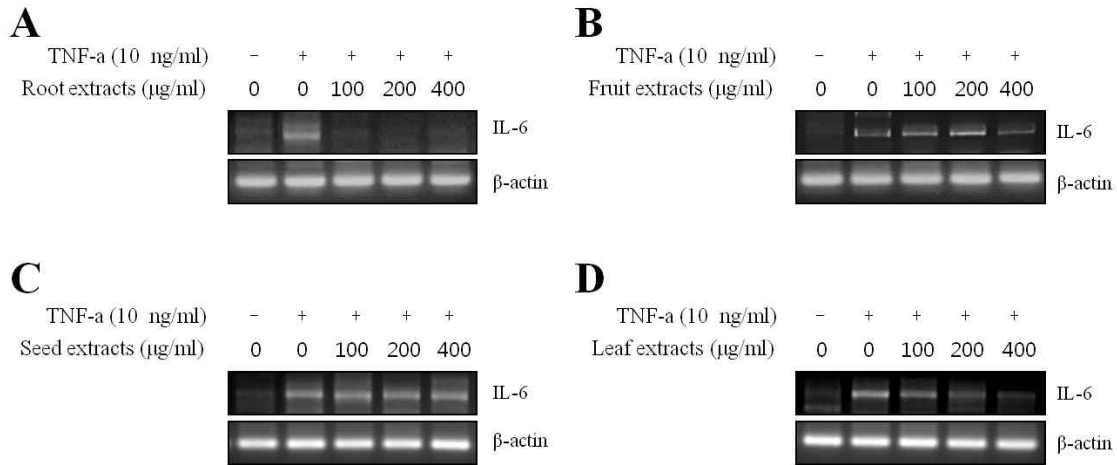


Fig. 4. Effect of extracts from different parts of moringa on TNF- α -induced IL-6 expression in HaCaT keratinocyte. HaCaT cells were treated with the indicated moringa extracts in the presence of TNF- α for 24 hr. The IL-6 mRNA levels were measured by RT-PCR. β -actin was used as an internal control.

물을 비교하여 항산화 활성에 대하여 보고하였다. 그 결과에 따르면 뿌리 추출물은 잎과 줄기 추출물에 비해 낮은 농도에서 oxygen free radical을 소거하여 항산화 활성이 가장 뛰어난 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는 본 연구의 피부세포 항염증 효과의 결과와 비슷한 것을 알 수 있다. 또한 모링가 뿌리 추출물은 항산화와 관련된 procyanidins의 함유량이 많은 것으로 알려져 있으며, 이러한 강한 항산화 효과는 콜라겐과 관련되어 피부노화를 예방하고 세포의 건강과 피부 탄력을 유지 시키는데 영향을 미친다고 보고되었다[25,27,32]. 따라서 Procyanidins에 대한 영향으로 모링가 뿌리 추출물이 피부노화와 염증억제에 효과적일 것이라 생각되며 이에 관해서는 더욱 연구가 필요하다고 사료된다.

또한 최근 피부의 노화 또는 염증에 관하여 모링가 잎에서 피부 상처치유에 효과적이라는 보고가 발표되었으나 이와 같은 생리활성에 대한 부위별 모링가 추출물의 효과를 비교 분석한 연구는 매우 미비한 실정이라 할 수 있다. 이러한 가운데 본 연구는 부위별 모링가 추출물의 비교를 통하여 모링가의 뿌리 추출물이 100 µg/ml에서 염증반응을 매개하는 MMP-9, COX-2, IL-6의 발현을 억제함을 도출하였다. 이러한 피부의 항노화와 항염증 활성을 통하여 모링가 뿌리 추출물의 천연 피부보호제로서의 이용 가능성을 보여주는 연구라 할 수 있다.

감사의 글

이 연구는 2010년도 대구가톨릭대학교 의과학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌습니다. 그리고 모링가는 ㈜유림물산 이태용 이사에게 제공받아 사용하였습니다.

References

1. Aktan, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* **75**, 639-653.
2. Anggakusuma, Yanti and Hwang, J. K. 2010. Effects of mace lignan isolated from *Myristica fragrans* Houtt. on UVB-induced matrix metalloproteinase-9 and cyclooxygenase-2 in HaCaT cells. *J. Dermatol. Sci.* **57**, 114-122.
3. Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M. and Gilani, A. H. 2007. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytother. Res.* **21**, 17-25.
4. Atawodi, S. E., Atawodi, J. C., Idakwo, G. A., Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Bartsch, H. and Owen, R. W. 2010. Evaluation of the polyphenol content and antioxidant properties of methanol extracts of the leaves, stem, and root barks of *Moringa oleifera* Lam. *J. Med. Food* **13**, 710-716.
5. Bachmeier, B. E. and Nerlich, A. G. 2002. Immunohistochemical pattern of cytokeratins and MMPs in human keratinocyte cell lines of different biological behaviour. *Int. J. Oncol.* **20**, 495-499.
6. Beissert, S., Cavazzana, I., Mascia, F., Meroni, P., Pastore, S., Tessari, G. and Girolomoni, G. 2006. Mechanisms of immune-mediated skin diseases: an overview. *Clin. Exp. Rheumatol.* **24**, S1-6.
7. Buckman, S. Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J. and Pentland, A. P. 1998. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* **19**, 723-729.
8. Diker-Cohen, T., Koren, R., Liberman, U. A. and Ravid, A. 2003. Vitamin D protects keratinocytes from apoptosis induced by osmotic shock, oxidative stress, and tumor necrosis factor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 350-353.
9. Eberhardt, W., Huwiler, A., Beck, K. F., Walpen, S. and

- Pfeilschifter, J. 2000. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Immunol.* **165**, 5788-5797.
10. Faizi, S., Siddiqui, B. S., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K. and Gilani, A. H. 1994. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *J. Nat. Prod.* **57**, 1256-1261.
 11. Faizi, S., Siddiqui, B. S., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K. and Gilani, A. H. 1995. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry* **38**, 957-963.
 12. Grewe, M., Trefzer, U., Ballhorn, A., Gyufko, K., Henninger, H. and Krutmann, J. 1993. Analysis of the mechanism of ultraviolet (UV) B radiation-induced prostaglandin E2 synthesis by human epidermoid carcinoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 528-531.
 13. Guevara, A. P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H. and Nishino, H. 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat. Res.* **440**, 181-188.
 14. Han, Y. P., Tuan, T. L., Hughes, M., Wu, H. and Garner, W. L. 2001. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J. Biol. Chem.* **276**, 22341-22350.
 15. Heck, D. E., Laskin, D. L., Gardner, C. R. and Laskin, J. D. 1992. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *J. Biol. Chem.* **267**, 21277-21280.
 16. Hur, S., Lee, Y. S., Yoo, H., Yang, J. H. and Kim, T. Y. 2010. Homoisoflavanone inhibits UVB-induced skin inflammation through reduced cyclooxygenase-2 expression and NF-kappaB nuclear localization. *J. Dermatol. Sci.* **59**, 163-169.
 17. Ishida, H., Ray, R. and Ray, P. 2008. Sulfur mustard down-regulates iNOS expression to inhibit wound healing in a human keratinocyte model. *J. Dermatol. Sci.* **49**, 207-216.
 18. Isoherranen, K., Punnonen, K., Jansen, C. and Uotila, P. 1999. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **140**, 1017-1022.
 19. Johansson, N., Westermarck, J., Leppa, S., Hakkinen, L., Koivisto, L., Lopez-Otin, C., Peltonen, J., Heino, J. and Kahari, V. M. 1997. Collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta. *Cell Growth Differ.* **8**, 243-250.
 20. Kahari, V. M. and Saarialho-Kere, U. 1997. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* **6**, 199-213.
 21. Kean, W. F. and Buchanan, W. W. 2005. The use of NSAIDs in rheumatic disorders 2005: a global perspective. *Inflammopharmacology* **13**, 343-370.
 22. Kobayashi, T., Hattori, S., Nagai, Y., Tajima, S. and Nishikawa, T. 1998. Differential regulation of MMP-2 and MMP-9 gelatinases in cultured human keratinocytes. *Dermatology* **197**, 1-5.
 23. Kwon, D. J., Bae, Y. S., Ju, S. M., Goh, A. R., Choi, S. Y. and Park, J. 2011. Casuarinin suppresses TNF-alpha-induced ICAM-1 expression via blockade of NF-kappaB activation in HaCaT cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
 24. Lawrence, T., Willoughby, D. A. and Gilroy, D. W. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 787-795.
 25. Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Suda, I. and Sato, T. 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7524-7529.
 26. Rathi, B. S., Bodhankar, S. L. and Baheti, A. M. 2006. Evaluation of aqueous leaves extract of *Moringa oleifera* Linn for wound healing in albino rats. *Indian J. Exp. Biol.* **44**, 898-901.
 27. Roig, R., Cascon, E., Arola, L., Blade, C. and Salvado, M. J. 2002. Procyanidins protect Fao cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **1572**, 25-30.
 28. Sakai, M., Shimizu, Y., Nagatsu, I. and Ueda, H. 1996. Immunohistochemical localization of NO synthases in normal human skin and psoriatic skin. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 625-627.
 29. Schaffer, M. R., Tantry, U., van Wesep, R. A. and Barbul, A. 1997. Nitric oxide metabolism in wounds. *J. Surg. Res.* **71**, 25-31.
 30. Sirsjo, A., Karlsson, M., Gidlof, A., Rollman, O. and Torma, H. 1996. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **134**, 643-648.
 31. Staples, G. and Herbst, D. R. 2005. A tropical garden flora : plants cultivated in the Hawaiian Islands and other tropical places. Honolulu, Hawai'i: Bishop Museum Press. p xxiv, 908 p.
 32. Ursini, F., Rapuzzi, I., Toniolo, R., Tubaro, F. and Bontempelli, G. 2001. Characterization of antioxidant effect of procyanidins. *Methods Enzymol.* **335**, 338-350.
 33. Vane, J. R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* **231**, 232-235.
 34. Williams, T. J. 1983. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. *Br. Med. Bull.* **39**, 239-242.
 35. Woessner, J. F. Jr. 2002. MMPs and TIMPs--an historical perspective. *Mol. Biotechnol.* **22**, 33-49.
 36. Yayeh, T., Oh, W. J., Park, S. C., Kim, T. H., Cho, J. Y., Park, H. J., Lee, I. K., Kim, S. K., Hong, S. B., Yun, B. S. and Rhee, M. H. 2011. Phellinus baumii ethyl acetate extract inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokine expression in RAW264.7 cells. *J. Nat. Med.* **66**, 49-54.

초록 : HaCaT 각질형성세포에서 TNF- α 에 의하여 유도되는 염증 발현에 대한 부위별 모링가 추출물의 억제 효과

이호진^{1,2} · 장영채^{1,2,*}

(¹대구가톨릭대학교 의용생체공학연구소, ²대구가톨릭대학교 의과대학 의학과)

모링가(*Moringa oleifera* Lam.)는 항알러지 약물로써 식용 가능한 식물이다. 본 연구에서 부위별 모링가의 피부 보호제로서의 가능성을 확인하기 위하여, TNF- α 로 염증을 유도한 각질형성세포에서 모링가의 씨, 뿌리, 잎과 열매 메탄올 추출물의 항염증 효과를 비교 실험하였다. 피부세포의 콜라겐 분해 관련인자인 MMP-2, MMP-9의 효소 활성을 측정된 결과 모든 부위별 모링가 추출물이 MMP-9의 효소 활성을 감소시켰다. 특히 모링가 뿌리 추출물은 낮은 농도에도 MMP-9을 효과적으로 감소시켰으며 MMP-2의 효소활성 억제에도 효과가 관찰되었다. 또한 피부 염증관련 인자로 알려진 iNOS와 COX-2의 단백질 발현을 측정된 결과, COX-2의 단백질 발현은 모링가 잎을 제외한 뿌리, 씨앗, 열매 추출물에 의해 억제되었다. 그 중 모링가 뿌리 추출물은 낮은 농도에서도 COX-2 단백질 발현을 억제시켰다. 그러나 iNOS는 부위별 모링가 추출물에 의한 단백질 발현의 변화가 없는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 피부 염증을 일으키는 cytokine으로 알려진 IL-6의 mRNA 발현을 확인한 결과 TNF- α 에 의해 증가된 IL-6 발현을 모링가 뿌리 추출물이 효과적으로 억제 시키는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 보아 부위별 모링가 추출물 중 뿌리 추출물에서 가장 피부노화 억제와 항 염증 효과가 높을 것으로 사료되며, 식물 유래의 피부 보호제 제품 개발에 있어 유용한 원료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.