피부각질형성세포에서 경옥고의 아토피 피부염 완화에 미치는 효과

조일주¹ · 최미옥^{2,*}

¹원광대학교 한의과대학 뇌졸중한의중점연구센터, 연구교수

²광주여자대학교 미용과학과, 교수

Protective Effects of *Kyungohkgo* on Atopic Dermatitis in HaCaT Cells

Il-Joo Jo¹ and Mee-Ok Choi^{2,*}

¹Research Professor, College of Korean Medicine, Central Stroke Center of Korean medicine, Wonkwang University

²Professor, Dept. of Beauty Science, Kwangju Women's University

Kyungohkgo (KOG) is an oriental herbal medicine that has been used for its various pharmacological effects, which include anti-oxidant, anti-inflammatory and immuno-regulation activities. But its effects and mechanisms of anti-atopic dermatitis (AD) have not been elucidated. HaCaT cells were pre-treated with KOG for 1 h and stimulated with tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ (10 ng/ml each). After 24 h, cells were harvested to measure the production of reactive oxygen species (ROS) and chemokines such as regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5), Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) and macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22). To investigate the regulatory mechanisms of KOG, we also assessed the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT1) signaling pathways in HaCaT cells. Treatment of KOG decreased the ROS production and mRNA levels of RANTES, TARC, MDC with a concentration dependent manner. In addition, KOG significantly inhibited TNF- α and IFN- γ induced phosphorylation of STAT1. This could indicate that the KOG shows anti-AD activity mainly through STAT1. Thus, we propose that KOG may be a promising anti-AD skin protector, which could suggest the clinical basis for cosmetics development.

Keywords: Atopic dermatitis, HaCaT cells, Kyungohkgo, Reactive oxygen species, Skin inflammation

I. 서 론

아토피 피부염은 천식 및 알레르기성 질환에 선행하여 피부에 만성적으로 재발하는 염증성 질환으로(Boguniewicz & Leung, 2010), 원인은 정확하게 밝혀지지 않았지만 환경적, 유전적 요인과 면역조절 불균형 및 피부장벽의 이상 등 다양한 원인에 의해서 발병할 것이라고 추정된다(Larsen & Hanifin, 2002; Searing & Leung, 2010). 또한, 아토피 피부염의 임상적 특징으로는 심한 가려움증과 함께 동반되는 홍반, 부종, 삼출 및 피부건조와 가피, 인설 등 1차적으로 나타나는 피부손상과 수면장애, 집중력 저하, 정서 불안 등 2차적으로 신체증상이 나타난다(Kader et al., 2021). 피부의 가장 표면층인 표피는 다양한 외부 자극으로부터 체내를 보호하는 장벽기능을 수행하며

표피세포의 형성과 분화, 탈각과정을 반복함으로써 항상성을 유지한다(Benedetto et al., 2012). 그 중 각질형성세포는 표피를 구성하는 대표적인 세포로서 피부장벽을 형성하고, 스트레스 환경에 노출되면 염증반응 및 면역반응에 관여한다. 하지만 지속적인 피부 손상으로 만성적으로 염증이 유도되면 피부건조를 유발시켜 아토피 피부염과 같은 피부질환을 일으키게 된다(Hudson, 2006; Natsuga, 2014). 아토피 피부염은 T림프구(T lymphocyte)와 Th1/Th2 세포에서 발현되는 Cytokines, 수지상 세포(dendritic cell)에서 발현되는 항원에 특이적인 IgE(Immunoglobulin E) 등 여러 종류의 세포와 인자들이 관여한다(Kim et al., 2012). 정상적인 상태에서는 Th1/Th2 세포가 상호간의 균형을 이루면서 면역반응을 유지하지만, 아토피 피부염에서는 T림프구의 Th2 세포 전환이 촉진되어 증가된 Th2 세포가 많은 양의 염증성 Cytokine을 분비시키고, 혈중 IgE의 상승을 가져옴으로써 염증반응이 더욱 증폭된다. 따라서 아토피 피부염의 병변에서는 Th2 세포에 의한 면역 반응이 우세하게 나타난다. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17)과

*Corresponding author: Mee-Ok Choi

Tel : +82-62-950-3792

E-mail : cmo0323@hanmail.net

접수일(2021년 8월 2일)/수정일(2021년 8월 30일)/채택일(2021년 10월 8일)

Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22)는 Th2 림프구의 염증부위로 이동을 유도하여 아토피 피부염과 같은 Th2 세포에 민감한 염증성 피부질환에 중요한 Chemokine으로 알려져 있다(Rozyk et al., 2005). 또한 TARC와 MDC는 C-C motif chemokine receptor 4에 속하며 피부각질세포를 포함한 다양한 세포에서 생성되고(Saeki & Tamaki, 2006), 아토피 피부염 환자의 혈청에서 TARC와 MDC가 유의하게 상승하였으며, 아토피 피부염 질환과 상관관계가 있는 것으로 보고되었다(Nakazato et al., 2008). 또한, 아토피 피부염에서 Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5)는 호산구와 T 림프구의 이동과 활성화에 관여하며, 내피 세포 표면에 림프구가 접착력 증가를 유도하여 염증을 유발한다(Luster, 2002). 따라서, 피부각질형성세포에서 RANTES, TARC 및 MDC 생성의 감소는 아토피 피부염 같은 염증성 피부질환에서 효과적인 치료 효과를 나타낼 수 있다. 기존 연구에 따르면 피부각질형성세포에서 Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) + Interferon-gamma (IFN- γ)에 의하여 유도되는 Th2 chemokine의 발현을 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)/P38, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway 및 Signal transducer and activator of transcription (STAT1) 활성화 억제를 통하여 하향조절된다고 보고되어 있다(Park et al., 2015). 또한, 다양한 한약 소재 혹은 천연물을 이용하여 아토피 피부염 조절 연구가 드물게 보고되고 있으나(Cho, 2012; Song & Kim., 2009; Yun, 2012), 아직도 관련 연구가 부족한 상황이다.

경옥고는 공진단, 우황청심원과 함께 3대 비약 중의 하나로 동의보감에 의하면 ‘정과 수를 채우고 진기를 고르게 하며, 원기를 보호하며 노인을 젊어지게 하고 모든 허손증을 보하며, 온갖 병을 낮게 한다고 기재되어 있을 정도로 약효가 뛰어나다(Yoon & Kim, 2005). 지금까지 보고된 경옥고의 생리활성에 대한 연구로는 면역활성 효과(Lee et al., 2002a), 폐암에 미치는 영향(Lee et al., 2002b), 심근세포 고사에 대한 경옥고의 방어 및 항 피로효과(Joo, 2004), 고혈당, 고혈압 및 염증, 위궤양 등의 생리활성 효과(Kim, 2011; Whang et al., 1994), 항치매 효과(Shin, 2011), 결핵균 내성도 감소(Jung et al., 2000) 및 항염증 활성화(Lee et al., 2013), 항산화 활성화(Lee et al., 2008) 등에 대한 보고가 있다. 이처럼 항염, 항산화, 면역조절 등 다양한 활성이 있는 경옥고는 각종 피부 질환에도 유효할 것으로 추측되나, 아직 관련 연구는 진행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 경옥고가 아토피 피부염 완화에 영향을 미치는지에 대하여 연구하였다.

이에 본 연구에서는 피부의 면역반응실험에 주로 사용하는 사람 피부각질형성세포인 HaCaT 세포를 이용하여 TNF- α 및 IFN- γ 로 유도된 아토피 피부염 염증 환경에서 경옥고를 처리하였을 때 RANTES, TARC, MDC의 활성화 억제 효과 및 그 기전에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료 준비

경옥고는 원광대학교 한방병원(익산, 대한민국)에서 구입하였다. 경옥고 진액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여 필터한 후 사용하였다. 동결 건조시킨 후 나온 분말 가루는 20.56 g으로 수율은 20.56%였다. 경옥고 준비과정은 Table 1에 나타내었다.

2) 시약

실험에 사용된 시약의 정보는 Table 2에 나타내었다.

2. 방법

1) 세포 배양

인체 유래 피부각질형성세포(keratinocyte)인 Human Adult low Calcium High Temperature (HaCaT) 세포주를 RPMI 1640 배지에 10% FBS와 1% Penicillin Streptomycin을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였으며, 2~3일 간격으로 계대 배양 하며 유지하였다.

2) 세포 독성 평가

HaCaT 세포의 세포 독성 평가를 위하여 MTT분석 방법을 사용하였다. RPMI 1640 배지에 HaCaT 세포를 1×10⁵ cells/ml로 희석한 다음 24 well plate에 500 μ l/well 분주하여 5% CO₂ 조건에서 37°C로 3시간 배양하였다. 그 후, well에 경옥고를 0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20, 50 및 100 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 배양액을 제거한 뒤, 각 well에 MTT 용액을 5 mg/ml씩 가한 뒤 5% CO₂ 조건에서 37°C로 30분간 배양하였다. 그 후, 배양액을 제거하고, DMSO 200 μ l를 넣고 formazan 결정을 용해시켜 96 well plate에 100 μ l/well씩 분주하여 Spectrometer (Molecular Devices, San jose, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율(%)을 계산하였다.

Table 1. Preparation of KOG

Day 0	Day 1	Day 2-5	Day 6
Purchase and Preparation	Freezing	Freeze drying	Freeze-dried powder

Table 2. List of materials

Reagent	Purchasing company
Fetal bovine serum (FBS) RPMI 1640 medium, Penicillin Streptomycin Tryple Express	Gibco, Waltham, MA, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 2-propanol	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Easy-BLUE	iNtRON Biotechnology, Daejeon, South Korea
ReverTra Ace qPCR RT Kit	Toyobo, Osaka, Japan
Power SYBR Green Master Mix MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 20X PBS buffer, 1.5M Tris Buffer (pH 8.8) 0.5M Tris Buffer (pH 6.8) 10% SDS Solution Tween 20 Xpert Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X) Protease Inhibitor Cocktail Solution (100X)	GenDEPOT, TX, USA
Power Blotter 1-Step Transfer Buffer (5X)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Western Blotting Filter Paper	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Amersham Hybond P0.45 PVDF blotting membrane	Amersham, Buckinghamshire, UK
Human TNF- α recombinant (hTNF- α) Human IFN- γ recombinant (hIFN- γ)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
phospho-STAT1 antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Total-STAT1 antibody	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

3) ROS 생성 측정

세포 내 ROS의 생성 정도를 측정하기 위하여 DCFDA 형광 염료를 이용하였다. HaCaT 세포를 6 cm dish에 25×10^5 cells/ml로 분주하고 3시간 배양한 다음, 경육고를 1, 5 및 10 mg/ml 농도로 1시간 동안 전 처리하였다. 그 후, TNF- α (10 ng/ml) 및 IFN- γ (10 ng/ml)로 세포를 24시간 동안 자극하였다. 세포를 수확하기 전에 Cold 1X PBS로 2회 세척해 준 후 새로운 1X PBS와 함께 10 μ M DCFDA를 처리하여 37°C에서 15분 동안 반응

시켰다. 반응 종료 후, 1X PBS로 2회 세척하여 Tryple express 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 다시 1X PBS로 3회 세척하여 Flow cytometry (FACS Calibur, San Jose, CA, USA)로 형광을 측정하고 Cell quest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 계산하였다.

4) Total RNA 추출 및 mRNA 발현 측정

HaCaT 세포를 6 well plate에 5×10^5 cells/ml로 분주하고 3시

Table 3. Sequences of real-time RT-PCR primers

Genes	Direction	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
RANTES/CCL5	Forward	GAG TAT TTC TAC ACC AGT GGC AAG	63°C
	Reverse	TCC CGA ACC CAT TTC TTC TCT	
GAPDH	Forward	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G	63°C
	Reverse	TCC TTG GAG GCC ATG TGG GCC AT	
TARC/CCL17	Forward	ACT GCA CTC CTG GTT GTC CT	60°C
	Reverse	AAG GTT AGC AAC ACC ACG CC	
MDC/CCL22	Forward	CAG CAC GAG GGA CCA ATG TG	60°C
	Reverse	CTT GGG GTC CGA ACA GAT GG	
18S	Forward	AAC CCG TTG AAC CCC ATT	60°C
	Reverse	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG	

간 배양한 다음, 경옥고를 1, 5 및 10 mg/ml 농도로 1시간 동안 전 처리하였다. 그 후, TNF- α (10 ng/ml) 및 IFN- γ (10 ng/ml)로 세포를 24시간 동안 자극하였으며, 각 well당 1 ml의 Easy-BLUE 용액을 넣어 세포를 용해시킨 후 Total RNA를 추출하였다(Jo et al., 2017). 1 μ g RNA를 ReverTra Ace qPCR RT Kit를 이용하여 cDNA를 합성한 후, SYBR Green Master Mix를 사용하여 Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 수행하였으며, Housekeeping 유전자를 동시에 측정하여 RNA 양을 보정하였다. 표적유전자는 특이적인 Primer를 제작하여 사용하였으며, 각 Primer의 염기서열은 Table 3에 나타내었다.

5) Western blot 분석

HaCaT 세포를 6 cm dish에 25×10^5 cells/ml로 분주하고 3시간 배양한 다음, 경옥고를 1, 5 및 10 mg/ml 농도로 1시간 동안 전 처리하고 TNF- α (10 ng/ml) 및 IFN- γ (10 ng/ml)로 세포를 15분 동안 자극하였다. 그리고, Cold PBS로 2회 세척하여 세포만 남긴 후, RIPA lysis buffe (1X RIPA buffer + Protease inhibitor, Phosphatase inhibitor)를 넣은 뒤 단백질을 2시간 동안 4°C에서 Lysis 시키고 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 Bradford법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질에 Sampling buffer를 넣은 뒤 Heating block에서 5분간 끓인 다음, 식힌 샘플을 8% SDS-PAGE에 전기영동한 후 Membrane에 옮겨 5% Skim milk로 상온에서 2시간 Blocking 하였다. pSTAT1 및 STAT1 분석을 하기 위하여 1차 항체와 2차 항체를 반응시켰다. 그리고 ECL detection 용액의 반응을 이용하여 Chemidoc (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 기기로 단백질 발현 정도를 확인하였다.

6) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 실시한 뒤 SPSS 22.0 프로그램을 사용하여 평균값과 표준편차(Mean $\pm$ Standard deviation (S.D.))를 계산하였고, one-way ANOVA 분석을 실시하여 $p < 0.05$ 에서 유의성이 있는 것으로 검증하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 경옥고의 HaCaT 세포에 대한 독성

사람 피부 각질형성세포에서 경옥고의 세포독성 범위를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 경옥고를 0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20, 50 및 100 mg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과, 경옥고 20, 50, 100 mg/ml에서 유의성 있는 세포 독성이 관찰되었고, 0.05, 0.1, 1, 2, 5 및 10 mg/ml 농도에서는 유의성 있는 세포 독성이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 따라서 이후 실험은 독성이 없는 상기 농

Fig. 1. Cytotoxic Effects of KOG in HaCaT cells. The cell viability was measured by MTT assay. HaCaT cells were incubated with or without Kyungohkgo, KOG as indicated doses (0.05, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20, 50 or 100 mg/ml) for 24 h. # $p < 0.01$ vs saline. The values are means $\pm$ S.D. of three independent experiments.

도 범위에서 수행하였다.

2. 경옥고의 항산화 활성에 미치는 영향

세포에 산화적 스트레스(Reactive oxygen species, ROS)가 가해지면 여러 신호전달기전 활성화를 통하여 Chemokine의 발현의 변화가 나타내게 된다. 따라서 ROS는 chemokine 발현 조절에 핵심적인 Second messenger라고 할 수 있다(Hong et al., 2017). 따라서, 경옥고가 피부각질형성세포에서 ROS 생성을 유의하게 억제할 수 있는지 DCFDA를 이용하여 측정하였다. 그 결과 TNF- α 및 IFN- γ 자극으로 인하여 세포내 ROS의 생성이 유의하게 증가하였으나, 경옥고를 전 처리 하였을 때 1, 5 및 10 mg/ml 농도 의존적으로 ROS 생성이 유의하게 감소하였다(Fig. 2). 따라서 경옥고는 피부각질형성세포에서 높은 항산화 활성이 있을 것으로 사료된다. 이러한 항산화 활성은 경옥고에 포함된 다양한 폴리페놀, 미네랄 등이 원인이 될 것으로 추측된다 (Lee et al., 2008).

3. 경옥고의 아토피 관련 Chemokine에 발현에 미치는 영향

아토피 피부염에서 RANTES는 호산구 및 T 림프구의 이동과 활성화에 관여하여 염증을 유도하며(Luster, 2002), 대표적인 Th2 케모카인 TARC 및 MDC는 CCR4를 경유하여 염증부위로 Th2 림프구의 이동과 침윤을 유도하여 아토피 피부염에 관여한다(Rozyk et al., 2005). 피부각질형성세포에서 경옥고에 의한 항염증 및 항알러지 효과를 확인하기 위하여 아토피 염증반응 중 생성되는 Chemokine의 일종인 RANTES, TARC 및 MDC를 mRNA 수준에서 실시간 정량적 역전사 중합 효소 연쇄반응을 통하여 측정하였다. 그 결과 TNF- α 및 IFN- γ 자극으로 인하여 RANTES, TARC 및 MDC 생성이 유의하게 증가하

Fig. 2. Effects of KOG on TNF- α and IFN- γ induced ROS production. HaCaT cells were pretreated with KOG (1, 5 or 10 mg/ml) for 1 h and incubation with TNF- α and IFN- γ (10 ng/ml) for 24 h. This was followed by stimulation with 10 μ M DCFDA. Then the cells were harvested for detection of ROS. The ROS production were measured by (A) fluorescence microscopy and (B) relative DCFDA intensity. * p < 0.05 vs saline. † p < 0.05 vs TNF- α + IFN- γ . The values are means $\pm$ S.D. of three independent experiments.

였으나, 경옥고 전 처리에 의하여 1, 5 및 10 mg/ml 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 3). 경옥고는 피부각질형성세포에서 아토피 피부염 관련 Chemokine을 효과적으로 감소시켰다. 이 결과는 경옥고가 아토피 관련 Chemokine을 억제함으로써, 관련 Lymphocyte 및 염증성 세포의 침윤을 억제하여 피부각질형성 세포를 보호할 수 있음을 보여준다. 또한 TARC, MDC 등 Th2 면역 반응 조절 Chemokine 조절을 통해 면역기능을 직접 조절할 수 있는 가능성을 보여주었다. 이는 기존에 경옥고가 면역 활성화 및 항염증 효과가 있다는 기존의 보고와 상통하는 것으로서(Lee et al., 2002a; Lee et al., 2013), 경옥고의 면역 조절 능력이 단순 면역 세포뿐만 아니라 피부각질형성 세포에도 영향을 줄 수 있음을 보여준다.

4. 경옥고가 STAT1 활성화에 미치는 영향

TNF- α 및 IFN- γ 자극은 STAT1 신호 전달 기전의 활성화를 통하여 피부각질형성세포에서 Chemokine 및 Cytokine의 생성을 유도한다(Ju et al., 2009) 또한, JAK/STAT 신호전달 경로는 TNF- α 및 IFN- γ 자극 HaCaT 세포에서 TARC와 MDC의 생성에 기여한다(Qi et al., 2011). 따라서 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극된 피부각질형성세포에 경옥고 전 처리가 STAT1 신호 전달 기전의 활성화에 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 TNF- α 및 IFN- γ 자극으로 인하여 STAT1 신호 전달 기전이 Phosphorylation 된 것을 확인 할 수 있었으며, 경옥고 1, 5 및 10 mg/ml 전 처리 시 STAT1 Phosphorylation이 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 이상의 실험결과는 TNF-

Fig. 3. Effects of KOG on mRNA expression of RANTES, TARC and MDC chemokine in HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with KOG (1, 5 or 10 mg/ml) for 1 h and incubation with TNF- α and IFN- γ (10 ng/ml) for 24 h. The mRNA levels of (A) RANTES, (B) MDC and (C) TARC were measured by real-time RT-PCR. * $p < 0.05$ vs saline. † $p < 0.05$ vs TNF- α + IFN- γ . The values are means $\pm$ S.D. of three independent experiments.

Fig. 4. Effects of KOG on TNF- α and IFN- γ induced STAT1 Phosphorylation in HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with KOG (1, 5 or 10 mg/ml) for 1 h and incubation with TNF- α and IFN- γ (10 ng/ml) for 15 min. Phosphorylated and total expression of STAT1 were detected by Western blot analysis using specific antibodies. The similar results were obtained from three additional experiments.

α 및 IFN- γ 에 의한 Chemokine 생성 억제에는 STAT1 신호 전달 기전의 활성화를 억제함으로써 매개되는 것으로 확인되었다. 많은 연구에서 TARC와 MDC가 아토피 피부염의 병인에 중요한 역할을 하고 있으며, 피부각질형성세포에서 TARC와 MDC의 생산 감소는 아토피 피부염 치료의 효과적인 표적이 될 수 있다고 보고하였다(Nakazato et al., 2008; Qi et al., 2009). 본 연구에서는, TNF- α 및 IFN- γ 로 자극된 피부각질형성세포에서 RANTES, TARC와 MDC의 생산에 미치는 경옥고의 영향을 확인하였다. 경옥고는 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극된 피부각질형성세포에서 STAT1 활성의 억제를 통하여 Th2 매개 Chemokine의 생산을 현저히 억제한다는 것을 보여주었으며, 이러한 결과는 경옥고가 아토피 피부염과 같은 염증성 피부 질환의 잠재적 치료제로 임상적으로 사용될 수 있을 것임을 나타낸다.

IV. 결 론

현재까지 다양한 아토피 피부염 및 피부손상 개선을 위하여 스테로이드제제 등의 사용이 흔하게 이루어져 왔으나, 최근 천연물 개발을 통하여 부작용 없이 피부를 개선하고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 경옥고를 사용하여 아토피

피 피부염 관련 Chemokine의 발현 억제 효과를 확인하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다. 사람 피부각질형성세포인 HaCaT 세포에 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 후 ROS 생성을 확인하였다. 그 결과 ROS의 발현이 경옥고 농도 의존적으로 유의하게 감소하였으며, TNF- α 및 IFN- γ 로 자극 한 대조군에 비하여 경옥고 10 mg/ml 농도에서 가장 유의한 감소를 보였다. 또한, 사람 피부각질형성세포인 HaCaT 세포에 TNF- α 및 IFN- γ 로 자극한 후 아토피 피부염 관련 Chemokine인 RANTES, TARC와 MDC의 발현양을 mRNA 수준에서 확인한결과, mRNA 수준에서 RANTES, TARC와 MDC의 발현이 경옥고 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. 이러한 경옥고의 ROS 및 아토피 피부염 관련 Chemokine 발현 억제 효과는 STAT1 신호 전달 기전의 활성 억제를 통하여 나타난 것을 확인하였다. 따라서 경옥고는 피부미용관련 제품 개발의 원료로서 화장품 소재 및 아토피 피부염 피부손상 개선 소재로서 활용이 가능할 것으로 예상된다. 또한, 이 연구를 더 발전시키기 위하여 추후 아토피 피부염 in vivo 모델에서 경옥고의 효과 연구를 추가적으로 진행할 필요가 있을 것으로 사료된다.

References

- Benedetto, A. D., Kubo, A., & Beck, L. A. (2012). Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *Journal of Investigative Dermatology*, 132(3 Pt 2), 949-963. doi: 10.1038/jid.2011.435
- Boguniewicz, M., & Leung, D. Y. (2010). Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(1), 4-13. doi: 10.1016/j.jaci.2009.11.027
- Cho, S. E. (2012). A Study on the Immunomodulatory Effects of Chamaecyparis Obtusa Leaves on NC/Nga Mice as Models for Atopic Dermatitis. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, 18(1), 78-89.

- Hong, S. J., Lee, W. J., Jo, E. H., & Ahn, S. H. (2017). The Effect of Lactobacillus Mixture Culture Fluid Extracts on Atopic Dermatitis Chemokine Expression of in HaCaT Cells. *Korean Journal of Acupuncture*, 34(2), 82-87.
- Hudson, T. J. (2006). Skin barrier function and allergic risk. *Nature Genetics*, 38(4), 399-400. doi: 10.1038/ng0406-399
- Jo, I. J., Kim, M. S., & Kim, K. Y. (2017). Anti-inflammatory Effect of Nardostachys jatamansi on TNF-alpha-induced Inflammatory Response in HaCaT Cells. *Journal of Investigative Cosmetology*, 13(4), 321-329.
- Joo, H. C. (2004). The effects of KYUNGOK-KO prescription for relieving fatigue in aerobics. PhD Dissertation. Chung-Ang University, Seoul. Korea.
- Ju, S. M., Song, H. Y., Lee, S. J., Seo, W. Y., Sin, D. H., Goh, A. R., Kang, Y. H., Kang, I. J., Won, M. H., Yi, J. S., Kwon, D. J., Bae, Y. S., Choi, S. Y., & Park, J. S. (2009). Suppression of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) production by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose via blockade of NF-kappaB and STAT1 activation in the HaCaT cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(1), 115-120. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.137
- Jung, H. J., Jung, S. K., Rhee, H. K., & Jeon, S. B. (2000). Experimental Studies of The Effects of Kyungok-go against Mycobacteria tuberculosis. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 21(4), 555-563.
- Kader, H. A., Azeem, M., Jwayed, S. A., Shehhi, A. A., Tabassum, A., Ayoub, M. A., Hetta, H. F., Waheed, Y., Iratni, R., Dhaheri, A. A., & Muhammad, K. (2021). Current Insights into Immunology and Novel Therapeutics of Atopic Dermatitis. *Cells*, 10(6), 1392. doi: 10.3390/cells10061392
- Kim, J. H. (2011). The anti-fatigue effect of modified kyungohkgo composition oriental medicines. PhD Dissertation. Wonkwang University, Iksan, Korea.
- Kim, M. A., Son, H. U., Nam, D. Y., Cha, Y. S., Choi, Y. H., & Lee, S. H. (2012). Inhibitory Effect of Angelica keiskei Extract in an Atopic Dermatitis Animal Model. *Korean Journal of Food Preservation*, 19(5), 792-798.
- Larsen, F. S., & Hanifin, J. M. (2002). Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunology and Allergy Clinics*, 22(1), 1-24.
- Lee, E. S., Seo, B. I., Lee, J. U., & Bae, J. S. (2002a). The Immunological Activities of Kyungohkgo and Prescription of Modified Kyungohkgo. *The Korea Journal of Herbology*, 17(2), 95-100.
- Lee, E. S., Seo, B. I., Lee, J. U., & Bae, J. S. (2002b). Effects of Kyungohkgo and prescription of Modified Kyungohkgo on lung Cancer. *Kyungohkgo. The Korea Journal of Herbology*, 17(2), 101-101.
- Lee, K. S., Kim, G. H., Kim, H. H., Seong, B. J., Kim, S. I., Han, S. H., Kang, E. J., & Yoo, Y. C. (2013). Qualities and Anti-inflammatory Activity of Kyungokgos Sold in Local Markets. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(3), 335-341.
- Lee, S. Y., Shin, Y. J., Park, J. H., Kim, S. M., & Park, C. S. (2008). An Analysis of the Gyungokgo's Ingredients and a Comparison Study on Anti-oxidation Effects According to the Kinds of Extract. *The Korea Journal of Herbology*, 23(2), 123-136.
- Luster, A. D. (2002). The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 14(1), 129-135. doi: 10.1016/s0952-7915(01)00308-9
- Nakazato, J., Kishida, M., Kuroiwa, R., Fujiwara, J., Shimoda, M., & Shinomiya, N. (2008). Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19(7), 605-613. doi: 10.1111/j.1399-3038.2007.00692.x
- Natsuga, K. (2014). Epidermal Barriers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(4), a018218. doi: 10.1101/cshperspect.a018218
- Park, J. H., Kim, M. S., Jeong, G. S., & Yoon, J. W. (2015). Xanthii fructus extract inhibits TNF- α /IFN- γ -induced Th2-chemokines production via blockade of NF- κ B, STAT1 and p38-MAPK activation in human epidermal keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 171, 85-93. doi: 10.1016/j.jep.2015.05.039
- Qi, X. F., Kim, D. H., Yoon, Y. S., Li, J. H., Song, S. B., Jin, D., Huang, X. Z., Teng, Y. C., & Lee, K. J. (2009). The adenylyl cyclase-cAMP system suppresses TARC/CCL17 and MDC/CCL22 production through p38 MAPK and NF-kappaB in HaCaT keratinocytes. *Molecular Immunology*, 46(10), 1925-1934. doi: 10.1016/j.molimm.2009.03.018
- Qi, X. F., Teng, Y. C., Yoon, Y. S., Kim, D. H., Cai, D. Q., & Lee, K. J. (2011). Reactive oxygen species are involved in the IFN- γ -stimulated production of Th2 chemokines in HaCaT keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 58-65. DOI: 10.1002/jcp.22303
- Rozyk, K. J., Targowski, T., Paluchowska, E., Owczarek, W., & Kucharczyk, A. (2005). Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. *Allergy*, 60(5), 685-688. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00774.x
- Saeki, H., & Tamaki, K. (2006). Thymus and activation regulated chemokine (TARC)/CCL17 and skin diseases. *Journal of Dermatological Science*, 43(2), 75-84. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2006.06.002
- Searing, D. A., & Leung, D. Y. (2010). Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 30(3), 397-409. doi: 10.1016/j.jac.2010.05.005
- Shin, B. Y. (2011). Anti-amnesic effects of a herbal medicinal prescription modified from Kyung-Ok-Ko on scopolamine or transient forebrain ischemia induced memory impairment. PhD Dissertation. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
- Song, D. H., & Kim, H. J. (2009). The Effect of Kushen Ethanol Extract Cream to NC/Nga mice Induced by Dermatophagoides farinae. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, 15(4), 1243-1252.
- Wang, W. K., Oh, I. S., Kim, Y. B., Shin, S. D., & Kim, I. H. (1994). The Physiological Activities of KYUNG OK-KO(III)-Effects on Inflammation, Gastric Ulcer, Analgesic and Homothermics. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 25(2), 153-159.
- Yoon, S. H., & Kim, H. J. (2005). *Heh Jun Tonguibogam. Tonguibogam press*. Korea: Kyungnam. pp. 29-30.
- Yun, M. Y. (2012). Preventive Effect of Hydrolyzed Preparations of Scutellanae Radix Extracts on Atopic Dermatitis. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, 18(5), 1104-1111.