

갈근과 두시 복합추출물의 아토피피부염 유발 백서에서의 피부장벽 손상 회복 효과

안상현¹ · 김기봉^{2,3,*}

¹세명대학교 한의과대학 해부학교실, ²부산대학교 한의학전문대학원, ³부산대학교한방병원 한방소아과

Abstract

Effect of Puerariae Radix and Douchi Complex Extracts on Skin Barrier Damage Recovery in Atopic Dermatitis-Induced Rats

Ahn Sang Hyun¹ · Kim Ki Bong^{2,3,*}

¹Department of anatomy, college of Korean Medicine, Semyung University

²School of Korean Medicine, Pusan National University

³Department of Korean Pediatrics, Korean Medicine Hospital, Pusan National University

Objective

This study aimed to evaluate the effect of a combined extract of Puerariae Radix (葛根) and fermented soybean (Douchi, 豆豉) on the recovery of skin barrier damage in atopic dermatitis (AD).

Methods

AD was induced in four-week-old NC/Nga mice, after which the combined extract of Puerariae Radix and Douchi was administered. To assess the skin barrier recovery through the generation of moisturizing factors, ceramide kinase and Caspase 14 were observed. To evaluate antimicrobial barrier recovery, Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) and cathelicidin were examined. Ccludin and Toll-like receptor 2 (TLR-2) were analyzed to assess tight junction recovery.

Results

Positive expression of ceramide kinase was higher in the Puerariae Radix and Douchi complex extract administration group after lipid barrier elimination (PDET) than in the lipid barrier eliminated group (LBE) and ceramide exposure group after lipid barrier elimination (CERT); caspase 14 expression showed less reduction in the PDET group. NHE expression was reduced to a lesser extent in the PDET group than that in the LBE and CERT groups, whereas cathelicidin expression was more increased in the PDET group. Claudin expression was also higher in the PDET group than in the LBE and CERT groups, and TLR-2 expression was significantly more increased in the PDET group.

Conclusion

The combined extract of Puerariae Radix and Douchi has the potential to restore skin barrier damage in atopic dermatitis.

Key words: Puerariae Radix, Douchi, Atopic dermatitis, Skin barrier, Tight junction

•Received: July 15, 2025 •Revised: July 18, 2025 •Accepted: July 31, 2025

*Corresponding Author: Kibong Kim

Department of Korean Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital,
Geumo-ro 20, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea
Tel: +82-55-360-5952 / Fax: +82-55-360-5952
E-mail: kkb2630@gmail.com

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. 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.

I. Introduction

피부는 외부 환경과 인체 내부를 구분짓는 1차 방어선 역할을 수행한다. 특히 항원, 병원균, 유해 화학 물질, 자외선 (UV) 등 다양한 외부 스트레스 요인으로 부터 인체를 보호하는 기능이 핵심이다^{1,2)}. 이러한 보호 기능의 상당 부분은 피부의 가장 바깥층인 표피 (epidermis) 에 의해 수행되며, 표피의 구조적, 분자적 특성이 이러한 기능을 가능하게 한다. 표피는 각질세포를 중심으로 구성되어 있으며, 각질세포가 최종적으로 각질층으로 변할 때, 세포 내 단백질이 세포막과 결합하여 단단한 외막 (단백질 겹질)을 형성한다³⁾. 이러한 단백질 외막은 로리크린 (loricrin), 인볼루크린 (involucrin), 트리코하이알린 (trichohyalin) 등의 단백질의 가교결합을 통해 구성된다^{4,5)}. 각질세포의 세포막 바깥 쪽에는 지질 외막이 있으며, 세포 간 지질 (intercellular lipid) 이 층상 구조를 이루어 수분손실을 방지하고 한 원 및 병원균 차단, 면역 반응조절에 관여한다⁶⁾. 이러한 피부 장벽의 구조와 기능이 손상될 경우, 아토피 피부염이나 건선 (psoriasis)과 같은 다양한 피부질환이 발생할 수 있다.

아토피피부염 (Atopic Dermatitis, AD) 은 유전적 요인, 면역학적 이상, 피부 장벽 기능의 손상, 환경적 자극 등이 복합적으로 상호작용하여 나타나는 만성 재발성 염증성 피부질환으로, 가려움증 (pruritus), 건조한 피부 (xerosis), 홍반성 병변 (erythematous lesions), 태선화 (lichenification) 등의 증상을 유발하며, 삶의 질을 크게 저하시킬 수 있다⁷⁾. 아토피피부염은 흔히 알레르기 행진 (allergic march)이라 불리는 면역질환 진행 과정의 시작점으로 작용한다. 초기의 피부 장벽 손상과 T-helper type 2 (Th2) 면역 반응 과활성으로 인해 항원의 경피 침투 (percutaneous sensitization)가 용이해지고, 이로 인해 점차 알레르기 비염, 기관지 천식, 식품 알레르기 등 다른 아토피 질환으로 이어질 수 있다⁸⁾.

한의학에서는 아토피피부염을 단순한 피부 질환이 아닌, 체내의 기혈 (氣血), 음양 (陰陽), 장부 (臟腑) 기능의 불균형에 기인한 전신성 질환으로 접근한다. 특히 소아에서 흔히 나타나는 아토피성 피부 증상은 태열 (胎熱)의 미배출이 주된 병리적 기전으로 간주된다⁹⁾. 이러한 태열은 피부의 표면으로 표출되어 홍반, 발진, 가려움, 야간 악화 등의 아토피피부염 증상을 유발하게 된다¹⁰⁾. 이를 한의학에서는 영위불화 (營衛不和),

폐위허약 (肺胃虛弱), 습열내온 (濕熱內蘊) 등의 병리적 원인으로 보고, 청열해독 (清熱解毒), 조화장부 (調和臟腑) 하는 약제와 치료법을 통해 보다 근본적인 치료를 지향한다¹¹⁾.

복합추출물은 갈근 (葛根, Puerariae Radix)과 두시 (豆豉, Douchi, 발효된 *Glycine max* Merr.)로 구성되어 있다. 갈근은 생진지갈 (生津止渴), 발한해기 (發汗解肌), 해표투진 (解表透疹)의 효능이 있으며, interleukin 3 (IL-3), interleukin 4 (IL-4), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 같은 사이토카인의 전사인자 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), activator protein 1 (AP-1) 등) 활성화를 억제하여 염증 경로를 차단한다¹²⁾. 두시는 청열해독 (清熱解毒), 건비화습 (健脾化濕) 효능이 있으며, 체내에 축적된 열독 (熱毒)을 제거하고 체내에 쌓인 습 (濕)과 부종, 진물 등의 배출을 도와 염증 반응을 진정시키는 데 효과가 있다¹³⁾.

본 연구는 갈근과 두시의 복합추출물이 아토피피부염으로 유발된 피부장벽 손상에서 피부보습인자 생성을 통한 장벽 회복을 확인하기 위해 Ceramide kinase, Caspase 14를 관찰하였다. 항균장벽 회복을 확인하기 위해 Na^+/H^+ exchanger (NHE), cathelicidin을 관찰하였고, 밀착연접 회복을 확인하기 위해 claudin, toll-like receptor 2 (TLR-2)을 분석하였다. 이를 통해 본 복합추출물이 아토피피부염의 염증을 완화할 수 있는 가능성을 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. Materials and Methods

1. Materials

1) 실험동물

자바이오 (JA-Bio, Seoul, Korea)에서 분양 받은 태령 4주 수컷 NC/Nga계 생쥐를 사용하였다. 결과 평가할 때 발생할 수 있는 주관적 편향을 최소화하기 위해 2주 동안 적응시킨 후 체중 16 ± 1 g로 선별하여 실험에 사용하였다. 실험군은 대조군 (Control, Ctrl), 지방장벽 제거군 (lipid barrier elimination group, LBE), 지방장벽 제거 후 Ceramide 도포군 (Ceramide exposure group after lipid barrier elimination, CERT) 그리고 지방장벽제거 후 갈근두시탕추출물 투여군 (Puerariae Radix and Douchi complex extract administration group after lipid barrier elimination, PDET)으로 나누었고, 각각 10마리씩 배정

하였다. 실험기간 동안 행동행태를 관찰하여 공격적 과잉행동 및 회피행동 개체를 선정에서 제외하였다.

모든 군의 생쥐들은 23 - 25 °C, 55 ± 10% 습도, 12 h 명암 주기에서 사육되었고, SAFE-40 + RMM (SAFE, France) 및 filtered tap water의 식이를 자유롭게 제한없이 제공하였다. 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (IACUC No. smecae 20-11-01) 후 실시되었고, 기타 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 National Institutes of Health (NIH) 가이드라인에 따라 시행되었다.

2) 실험약물

갈근과 두시 복합추출물 58.5 g (갈근 (*Puerariae Radix*) 26 g, 두시 (*Glycine max* (L.) Merr.) 32.5 g)을 증류수 1000 ml에 넣고 3시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator (Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 50 ml로 감압·농축한 후 동결 건조하여 추출물 8.59 g (수득률 14.7%) 획득했다. PDE 0.143 mg/kg을 생리식염수 0.2 ml씩에 녹인 후 지방장벽제거 후 5일 동안 PDET에 경구투여하였다. 한편, 대조약물로 사용된 ceramide (Sigma-Aldrich)는 지방장벽제거 부위 100 µl씩 5일동안 CERT에 도포하였다.

2. Methods

1) 지방장벽 제거

생쥐의 피부 등쪽 부위를 전기면도기와 제모크림 (Body natur, Nueil-les-Aubiers, France)을 이용하여 제모하고, Tape (3M, St. Paul, MN, USA)를 이용하여 각질층 탈락막 (desquamation) 제거하였다. 각질층의 지방장벽을 제거하기위해 10% sodium dodecyl sulfate (SDS: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 500 µl를 면봉으로 20회 처리하였다.

2) 조직화학

피부는 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin, NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 등쪽 피부를 10% NBF에 실온 환경에서 24 시간 동안 고정된 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 µm 두께로 연속절편을 만들었다. 약물 복용에 따른 아토피유발 피부의 일반적인 변화를 조사하기 위해 Masson's trichrome 염색을 통한 조직학적 구조를 관찰하였다.

3) 면역조직화학

피부보습인자 (natural moisturizing factor, NMF) 생성에 관여하는 Ceramide kinase K와 Caspase 14, 피부의 산성도를 유지하는 관여하는 sodium hydrogen antiporter 1 (NHE1), 항균펩타이드인 Cathelicidine, 밀착연접 (tight junction) 단백질인 Claudin 및 밀착연접에 영향을 미치는 TLR-2 등의 면역조직학적 변화를 조사하기 위해 항 Ceramide kinase K, Caspase 14, NHE1, Cathelicidine, Claudin, 그리고 TLR-2 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

우선 피부절편을 proteinase K (20 µg / µL; Dako, Santa Clara, CA, USA)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 1% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich)이 포함된 10% normal goat serum (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)에서 1시간 동안 blocking 반응을 시켰다. 1차 항체인 mouse anti-Ceramide kinase (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse anti-Caspase 14 (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse anti-NHE (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-Cathelicidine (1 : 100, Abcam, Waltham, MA, USA), mouse anti-Claudin (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.) 및 mouse anti-TLR 2 (1 : 100, Abcam, Waltham, MA, USA)에 4 °C humidity chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (1 : 50, Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 실온에서 24시간 link 하였고, avidin biotin complex kit (Vector Lab)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

4) 영상분석

면역조직화학의 결과는 image Pro 10 (Media cybernetics, Rockville, MD, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means ± standard error) 되었다. 각 군의 피부표본 10개를 임의로 선정한 후 x 100 배율에서 촬영한 다음 positive pixels (intensity 80 ~ 100) / 20,000,000 pixels로 영상분석하였다.

5) 통계

통계는 SPSS software (SPSS 25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이루어졌으며, one-way ANOVA 시행을 통

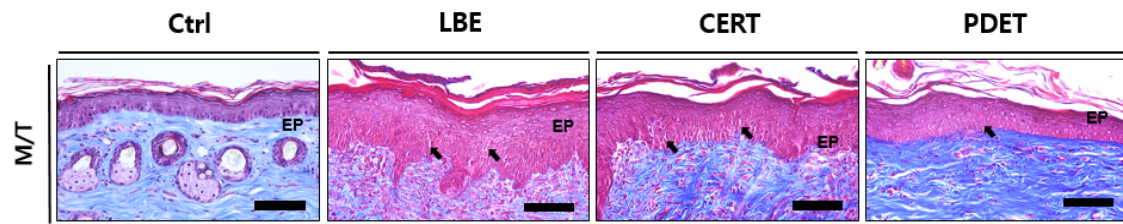


Figure 1. The repair effects of epidermal destruction by Puerariae Radix and Douchi complex extract (PDE) treatment

The PDE extract treatment relieved symptom as enlargement of intercellular space (arrow) in PDET compared with LBE and CERT. Abbreviations. Ctrl, normal; LBE, lipid barrier eliminated group; CERT, Ceramide exposure group after lipid barrier elimination; PDET, PDE extract administration group after lipid barrier elimination; M/T, Masson's trichrome; EP, epithelium; Arrow, Intracellular space; Bar size, 100 μ m.

해 유의성 ($p < 0.05$)을 검증하고, 사후 검증은 Tukey HSD를 실시하였다.

사이공간의 확장, 그리고 기저층내 붕괴와 이로 인한 바닥면 주변으로 림프구 침윤 증가의 구조적 변화가 관찰되었다. 이에 비해 PDET에서는 LBE와 CERT에 비해 피부염 붕괴가 회복되는 변화를 보였다 (Figure 1).

III. Results

1. 피부상피 손상 완화

붕괴된 피부상피의 조직화학적 관찰에서 LBE과 CERT에서는 가시층의 소실, 과립층과 가시층의 세포

2. 피부보습인자 생성 회복

Ceramide kinase 양성반응은 Ctrl ($9.995 \pm 299 / 20,000,000$ pixel)에 비해 LBE ($21,049 \pm 360 /$

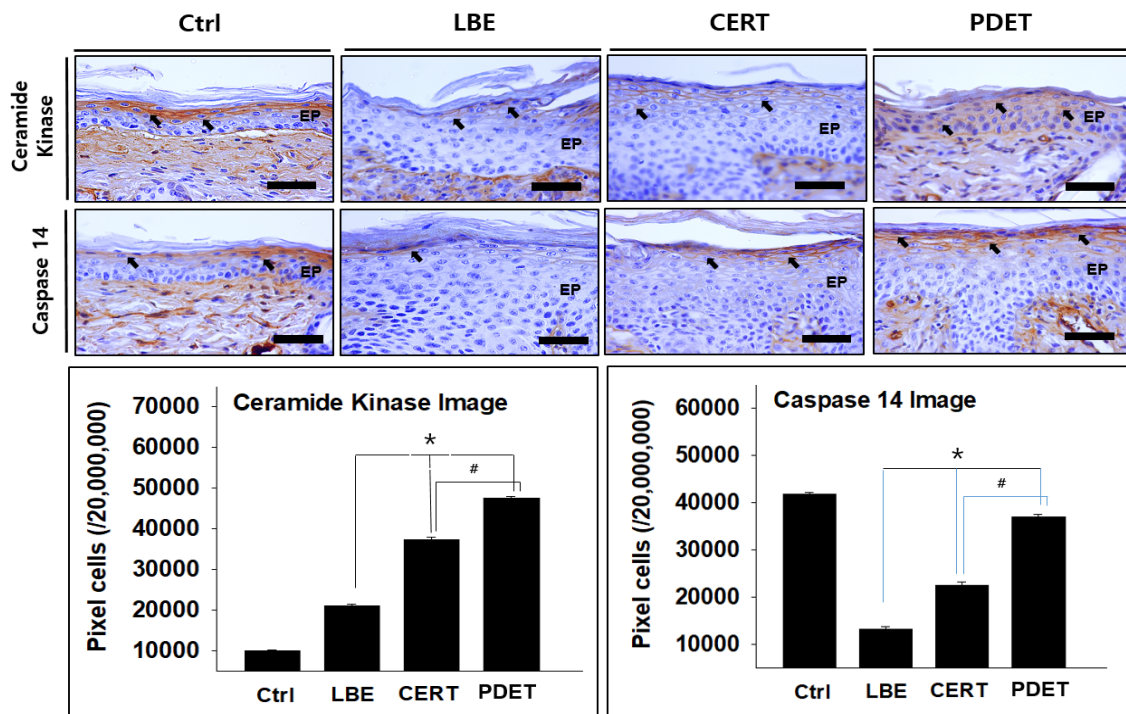


Figure 2. The regeneration of normal moisturizing factor by Puerariae Radix and Douchi complex extract (PDE) treatment (Ceramide kinase and caspase 14 immunohistochemistry; Bar size, 50 μ m).

The activation of Ceramide kinase and caspase 14 (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in PDET as compared with LBE and CERT, the data of Ceramide kinase and caspase 14 image analysis showed the same results. (*, $p < 0.05$ compared with LBE; #, $p < 0.05$ compared with CERT) Abbreviations same as Figure 1.

20,000,000 pixel), CERT ($37,217 \pm 775 / 20,000,000$ pixel), PDET ($47,594 \pm 382 / 20,000,000$ pixel)에서 모두 증가하였다. LBE는 Ctrl에 비해 111% 증가하였고, CERT는 272%, PDET는 376% 증가하였다. PDET의 ceramide kinase 양성반응은 LBE에 비해 126%, CERT에 비해 28% 유의성있게 더 증가하였다 (Figure 2).

과립층에서 관찰되는 Caspase 14 양성반응은 Ctrl ($47,734 \pm 459 / 20,000,000$ pixel)에 비해 LBE ($13,127 \pm 602 / 20,000,000$ pixel), CERT ($22,511 \pm 680 / 20,000,000$ pixel), PDET ($36,947 \pm 596 / 20,000,000$ pixel)는 모두 감소되었다. LBE는 Ctrl에 비해 69% 감소하였고, CERT는 46%, PDET는 11% 감소하였다. PDET의 caspase 14 양성반응은 LBE에 비해 181%, CERT에 비해 64% 유의성있게 덜 감소하였다 (Figure 2).

3. 항균장벽 회복

피부내 산성도 유지에 관여하는 NHE 양성반응은 각질층과 과립층에서 관찰되었다. NHE 양성반응은

Ctrl ($42,909 \pm 610 / 20,000,000$ pixel)에 비해 LBE ($19,342 \pm 928 / 20,000,000$ pixel), CERT ($31,695 \pm 524 / 20,000,000$ pixel), PDET ($38,181 \pm 643 / 20,000,000$ pixel) 모두 감소되었다. LBE는 Ctrl에 비해 55% 감소하였고, CERT는 26%, PDET는 11% 감소하였다. PDET의 NHE 양성반응은 LBE에 비해 97%, CERT에 비해 20% 유의성있게 덜 감소하였다 (Figure 3).

피부 항균작용에 관여하는 cathelicidine 양성반응은 각질층과 과립층에서 관찰되었다. Cathelicidine 양성반응은 Ctrl ($12,801 \pm 378 / 20,000,000$ pixel)에 비해 LBE ($5,288 \pm 224 / 20,000,000$ pixel)과 CERT ($8,596 \pm 334 / 20,000,000$ pixel)는 감소한 반면에 PDET ($17,657 \pm 389 / 20,000,000$ pixel)는 증가하였다. Ctrl에 비해 LBE는 59%, CERT는 33% 감소하였고, PDET는 Ctrl에 비해 38% 증가하였다. PDET의 cathelicidine 양성반응은 LBE에 비해 234%, CERT에 비해 105% 유의성있게 더 증가하였다 (Figure 3).

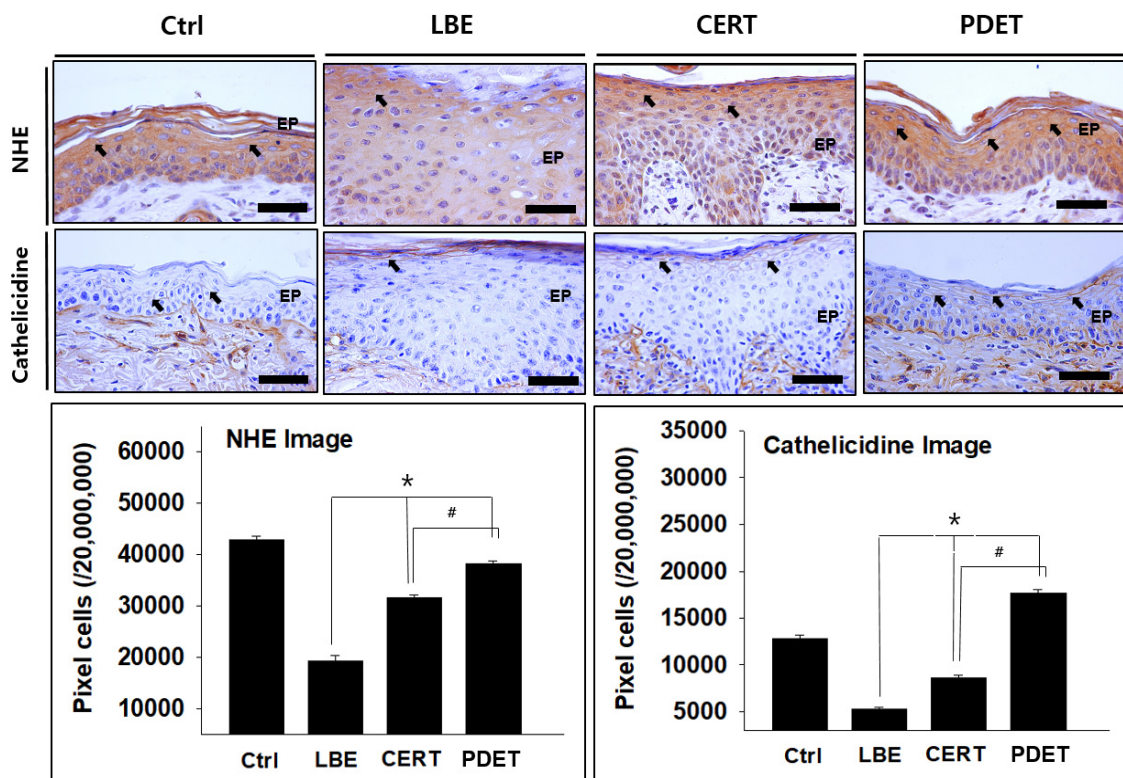


Figure 3. The regeneration of anti-microbial barrier by Puerariae Radix and Douchi complex extract (PDE) treatment (normal hydrogen electrode (NHE) and Cathelicidine immunohistochemistry; Bar size, 50 μ m).

The activation of NHE & Cathelicidine (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in PDET as compared with LBE and CERT, the data of NHE and Cathelicidine image analysis showed the same results. (*, $p < 0.05$ compared with LBE; #, $p < 0.05$ compared with CERT) Abbreviations same as Figure 1.

4. 밀착연접 회복

밀착연접단백질인 claudin 양성반응은 각질층과 과립층에서 관찰되었다. Claudin 양성반응은 Ctrl ($34,923 \pm 507 / 20,000,000$ pixel)에 비해 LBE ($22,355 \pm 444 / 20,000,000$ pixel)과 CERT ($30,652 \pm 509 / 20,000,000$ pixel)는 감소하였고, PDET ($45,005 \pm 545 / 20,000,000$ pixel)는 증가하였다. Ctrl에 비해 LBE는 36%, CERT는 12% 감소하였고, PDET는 29% 증가하였다. PDET의 Claudin 양성반응은 LBE에 비해 101%, CERT에 비해 47% 유의성있게 더 증가하였다 (Figure 4).

밀착연접 단백질 영향인자인 TLR-2 양성반응 역시 과립층에서 관찰되었다. TLR-2 양성반응은 Ctrl ($39,232 \pm 392 / 20,000,000$ pixel)에 비해 LBE ($21,042 \pm 512 / 20,000,000$ pixel), CERT ($30,057 \pm 359 / 20,000,000$ pixel)는 감소하였고, PDET ($44,423 \pm 465 / 20,000,000$ pixel)는 증가하였다. Ctrl에 비해 LBE는 46%, CERT는 23% 감소하였고, PDET는 13% 증가하였다. PDET의 TLR-2 양성반응은 LBE에 비해 111%, CERT에 비해

48% 유의성있게 더 증가하였다 (Figure 4).

IV. Discussion

피부 표피는 각질세포, 단백질 외막, 지질막, 그리고 세포외 기질로 정교하게 구성되어 있으며, 이들 구성 요소가 유기적으로 작용하여 외부 유해 인자로부터 인체를 효과적으로 보호한다. 이러한 피부 장벽의 구조와 기능이 손상될 경우, 아토피 피부염이나 건선 (psoriasis)과 같은 다양한 피부질환이 발생할 수 있다^{3,4)}.

아토피피부염은 단순한 피부 트러블을 넘어 전신 면역계 이상과 미래의 알레르기 질환으로의 이행을 예고하는 질환으로 볼 수 있다. 특히 소아기 발병 환자에서 조기 진단과 적극적인 개입은 증상의 경감뿐 아니라 알레르기 질환의 예방 및 삶의 질 향상에도 매우 중요한 역할을 한다. 아토피피부염은 각질층의 세라마

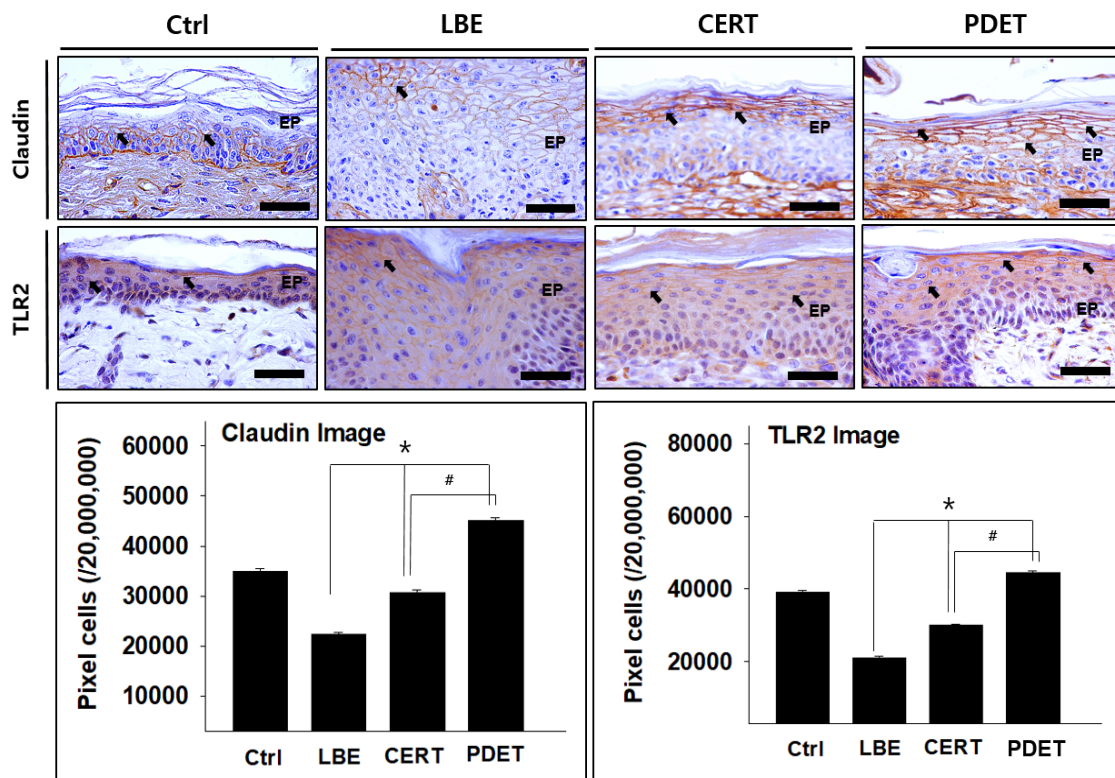


Figure 4. The regeneration of tight junction by Puerariae Radix and Douchi complex extract (PDE) treatment (Claudin and TLR-2 immunohistochemistry; Bar size, 50 μ m).

The activation of Claudin and toll-like receptor 2 (TLR-2) (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in PDET as compared with LBE and CERT, the data of Claudin and TLR-2 image analysis showed the same results. (*, $p < 0.05$ compared with LBE; #, $p < 0.05$ compared with CERT) Abbreviations same as Figure 1.

이드 (ceramide) 감소, 항균 펩타이드 감소, 밀착연접 (tight junction) 이상 등으로 인하여 피부장벽의 기능이 상 (skin barrier dysfunction)이 발생한다.

Ceramide kinase는 세라마이드를 phosphorylating 하여 세라마이드-1-인산 (ceramide-1-phosphate, C1P)를 생성하는 효소이다. 이 반응은 세포 신호 전달, 염증 반응, 세포 생존과 성장 등 다양한 생리학적 과정에 관여한다. 세라마이드는 일반적으로 세포 자멸사 (apoptosis)를 유도하는 신호를 전달하는 지질이고, C1P는 반대로 세포 생존, 증식, 염증 유도에 관여하는 신호지질이다^{14,15)}. 따라서 ceramide kinase 양성반응의 증가는 C1P 생성의 증가를 의미하며, 이는 세포 생존 촉진, 염증 반응 유도, 암세포 생존 연장과도 관련될 수 있다.

본 연구에서 Ceramide kinase 양성반응이 Ctrl에 비해 LBE, CERT, PDET에서 모두 증가하였다. 이는 각 물질이 ceramide kinase 활성을 자극하거나 C1P 생성을 증가시킬 가능성을 보여준다. 아울러 PDET의 ceramide kinase 양성반응이 LBE에 비해 126%, CERT에 비해 28% 유의성있게 더 증가한 것은 복합추출물이 가장 강력한 ceramide kinase 활성 유도제임을 보여주는 결과이다. 또한 CERT에서 유도될 수 있는 ceramide kinase 반응을 PDET에서 더 효과적으로 유도되었음을 의미하며, 생리적 또는 치료적 효과 측면에서 복합추출물이 더 강력할 수 있음을 의미한다. 이는 복합추출물이 ceramide 관련 경로를 타겟으로 하는 치료제나 기능성 소재로의 가능성을 보여준다.

Caspase-14는 비정형 caspase로, 다른 caspase들처럼 apoptosis와 직접적인 관련이 있는 것은 아니며, 표피 (epidermis)의 각화 (keratinization) 과정, 특히 과립층 (granular layer)과 각질층 (stratum corneum)의 형성과 성숙에 특이적으로 관여한다. 주로 filaggrin 같은 표피 단백질 분해에 관여하여 천연 보습 인자 (natural moisturizing factor, NMF)를 생성하며, 피부 장벽의 성숙도와 보습 능력에 중요한 역할을 한다^{16,17)}. 따라서 caspase-14의 양성반응이 강하다는 것은 피부에서 각질화 형성 및 장벽 성숙이 잘 일어남을 의미한다.

본 연구에서 LBE, CERT, PDET 모두에서 Caspase-14 양성반응이 감소하였다. 이는 세 개의 군 모두 피부 장벽의 성숙 (각질화) 수준이 감소했음을 의미한다. 특히 LBE는 Ctrl에 비해 69% 감소하였고, CERT는 46%, PDET는 11% 감소하였다. PDET의 caspase 14 양성반응은 LBE에 비해 181%, CERT에 비해 64% 유의성있게 덜 감소하였다. LBE에서 가장 크게 감소하여 피부

장벽 형성 기능이 가장 약화되었을 가능성이 높은 반면, PDET는 감소 폭이 가장 작아 상대적으로 건전한 각질화 과정이 이루어졌다고 볼 수 있다. 따라서 PDET는 11%만 감소하여 장벽 성숙에 미치는 영향이 가장 작고, 상대적으로 피부 보호 효과가 더 우수할 가능성이 있다.

Na^+/H^+ exchanger (NHE)는 나트륨 (Na^+)과 수소 이온 (H^+)을 교환하는 막 단백질로서, 피부에서는 주로 각질층 (stratum corneum)과 과립층 (granular layer)에 존재한다. NHE는 세포 내의 H^+ 를 외부로 방출하여 피부를 약산성 (pH ~5.5) 상태로 유지시키고, 장벽 형성과 효소 활성화에 필수적인 pH 조절을 통하여 각질 분해 효소 활성화, 지질 대사 조절, 병원균 억제 등을 수행한다¹⁸⁾. 따라서 NHE 양성반응이 강하다는 것은 피부의 산성도 유지 기능과 장벽 항상성이 우수하다는 것을 의미한다.

본 연구에서 모든 처리군 (LBE, CERT, PDET)에서 NHE 양성반응이 감소하였다. 이는 Na^+/H^+ 교환 기능이 억제되었으며, 피부 산성도 유지 능력이 저하되었음을 의미한다. LBE는 Ctrl에 비해 55% 감소하였고, CERT는 26%, PDET는 11% 감소하였다. PDET의 NHE 양성반응은 LBE에 비해 97%, CERT에 비해 20% 유의성있게 덜 감소하였다. LBE는 55% 감소로, 피부 내 산성도 유지 능력이 가장 크게 떨어졌고, 이는 장벽 항상성 악화, 병원균 방어력 저하, 효소 활성화 불균형 등을 유발할 수 있다. 반면에, PDET는 가장 적은 감소 (11%)를 보였으며, 이는 피부 pH 항상성에 거의 영향을 주지 않았으며, 장벽 기능이 잘 유지되었을 가능성을 보여준다. 결과적으로, PDET는 피부 항상성 및 보호 기능 유지 측면에서 가장 우수한 처리군으로 해석될 수 있다.

Cathelicidin은 선천 면역계에 속하는 항균 펩타이드 (Antimicrobial Peptide, AMP)로, 주로 각질형성세포 (keratinocyte), 호중구 (neutrophil) 등에서 생성된다. 특히 피부의 각질층과 과립층에서 주로 발현되어 항균작용, 면역 조절, 피부 감염 예방 및 상처 치유, 피부장벽 회복 등의 기능을 담당한다^{19,20)}. 따라서 Cathelicidin 양성반응이 증가했다는 것은 피부의 면역 방어력과 항상성 유지 능력이 향상되었음을 의미한다.

본 연구에서 Cathelicidine 양성반응이 Ctrl에 비해 LBE와 CERT는 감소한 반면에 PDET는 증가하였다. Ctrl에 비해 LBE는 59%, CERT는 33% 감소하였고, PDET는 Ctrl에 비해 38% 증가하였다. PDET의 cathelicidine

양성반응은 LBE에 비해 234%, CERT에 비해 105% 유의성있게 더 증가하였다. 이러한 결과는 LBE와 CERT에서는 cathelicidin 발현을 억제되었으며, 피부의 항균 방어력 및 면역 활성이 저하되었음을 의미한다. 반면, PDET에서는 cathelicidin 발현을 38% 증가시켰다. 이는 항균 및 면역 방어 능력을 증진시켰으며, 피부 감염에 대한 자연 방어 기전이 강화되었음을 의미한다. PDET는 cathelicidin뿐 아니라 앞서 본 Caspase-14, NHE, ceramide kinase 등 여러 피부 방어 지표에서도 가장 우수한 결과를 보여주므로, 복합추출물이 피부 장벽 기능 및 면역 기능을 동시에 향상시킬 수 있는 유력한 후보 물질로 충분한 가능성을 보여준다.

Claudin은 밀착연접 (tight junction)의 핵심 단백질로, 상피세포와 상피세포 사이를 밀접하게 연결하여 물리적 장벽을 형성하는 데 중요한 역할을 한다. Claudin은 피부에서는 표피의 투과성을 조절하고, 외부 항원, 독소, 병원균으로부터 내부 조직을 보호하는 데 필수적인 단백질로서, 피부 장벽 강화, 수분 손실 억제, 면역 보호, 세포 극성 유지 및 조직 구조 안정화 등의 역할을 담당한다²¹⁾. 따라서 claudin 발현이 증가한다는 것은 피부 장벽이 견고하게 유지되며, 보호기능이 강화되어 있음을 의미한다.

본 연구에서 claudin 양성반응이 Ctrl에 비해 LBE와 CERT는 감소하였고, PDET는 증가하였다. Ctrl에 비해 LBE는 36%, CERT는 12% 감소하였고, PDET는 29% 증가하였다. PDET의 claudin 양성반응은 LBE에 비해 101%, CERT에 비해 47% 유의성있게 더 증가하였다. 이러한 결과는 LBE와 CERT에서는 claudin 발현을 감소시켜 피부 장벽의 견고성 및 밀착 결합 능력을 약화되었음을 의미한다. PDET에서는 유일하게 claudin 발현이 29% 증가되었는데, 이는 밀착연접 기능이 강화되고, 피부의 투과성과 물리적 방어력이 향상되었음을 의미한다. 따라서 PDET는 피부장벽 기능이 강화되고, 자극이나 감염에 대한 저항성이 높아졌을 가능성이 있다고 보여진다.

Toll-like receptor 2 (TLR-2)는 선천 면역계의 패턴인식 수용체 (Pattern Recognition Receptor, PRR) 중 하나로, 피부를 포함한 상피세포와 면역세포 (대식세포, 호중구 등)에 발현된다. TLR-2은 세균의 리포테이코산, 펩티도글리칸 등과 같은 외인성 Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)를 인식하여 피부 내 유익균과 병원균 구분에 중요한 역할을 한다. 또한 TLR-2가 자극되면 NF- κ B 경로가 활성화되어 IL-1 β , TNF- α 같

은 사이토카인을 분비하여 피부 염증을 조절하고 면역 균형을 유지시킨다. TLR-2는 표피 장벽 회복 촉진, 상피세포 증식과 분화에 관여하여 피부 장벽의 항상성 유지에도 관여한다^{22,23)}. 따라서 TLR-2 양성반응이 증가했다는 것은 피부가 병원체 감지 및 방어 기능을 활성화하고 있음을 의미하며, 피부 면역 항상성이 잘 유지되고 있음을 의미한다.

본 연구에서 TLR-2 양성반응이 Ctrl에 비해 LBE, CERT는 감소하였고, PDET는 증가하였다. Ctrl에 비해 LBE는 46%, CERT는 23% 감소하였고, PDET는 13% 증가하였다. PDET의 TLR-2 양성반응은 LBE에 비해 111%, CERT에 비해 48% 유의성있게 더 증가하였다. LBE와 CERT에서는 TLR-2 양성반응이 억제되어 피부의 병원체 인식 및 면역 활성 기능이 약화되었으나, PDET에서는 TLR-2 발현이 13% 증가되어 오히려 피부 면역계의 병원체 인식 및 면역 방어 능력을 강화되었을 것으로 해석된다.

본 연구의 결과들을 통해 갈근과 두시 복합추출물은 아토피피부염으로 인한 피부 장벽 손상을 회복시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 이는 아토피피부염 치료제로서의 가능성을 충분히 보여준다. 그러나 본 연구는 쥐를 이용한 동물 실험이기에 임상현장에 적용하기에는 제한적이며, 인간의 아토피피부염 유발에 영향을 주는 유전적 요인 역시 고려되지 않았다. 본 연구 결과를 토대로 향후 치료기전에 대한 추가적인 연구와 임상연구가 필요하다고 생각된다.

V. Conclusion

본 연구는 갈근과 두시의 복합추출물이 아토피피부염으로 유발된 피부장벽 손상에서 피부보습인자 생성을 통한 장벽 회복을 확인하기 위해 Ceramide kinase, Caspase 14를, 항균장벽 회복을 확인하기 위해 NHE, cathelicidine를, 밀착연접 회복을 확인하기 위해 claudin, TLR-2을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PDET에서는 LBE와 CERT에 비해 피부염 붓기가 회복되었다.
2. Ceramide kinase 양성반응은 PDET가 LBE에 비해 126%, CERT에 비해 28% 유의성있게 더 증가하였다.

3. Caspase 14 양성반응은 PDET가 LBE에 비해 181%, CERT에 비해 64% 유의성있게 덜 감소하였다.
4. NHE 양성반응은 PDET가 LBE에 비해 97%, CERT에 비해 20% 유의성있게 덜 감소하였다.
5. Cathelicidine 양성반응은 PDET가 LBE에 비해 234%, CERT에 비해 105% 유의성있게 더 증가하였다.
6. Claudin 양성반응은 PDET가 LBE에 비해 101%, CERT에 비해 47% 유의성있게 더 증가하였다.
7. TLR-2 양성반응은 PDET가 LBE에 비해 111%, CERT에 비해 48% 유의성있게 더 증가하였다.

VI. Acknowledgement

이 연구는 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)에 의하여 연구되었음.

VII. References

1. Kwon MS, Choi TB, Kim GY. The effect on the skin barrier function of ceramide. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2005;3(1):131-7.
2. Kim YJ, Ahn JY, Seo SJ, Hong CK. The effect of retinoic acid on expression of human beta defensin-2 and LL-37 in keratinocyte. *J Korean Invest Dermatol*. 2007;14:29-35.
3. Yoon YM, Yoon JY, Lim KM, Hahn HJ, Kim YR, Ahn KJ, An SK. Effects of the complex containing *Centella asiatica*-and folic acid-fermented extracts, acetyl glutamine, and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on the inhibition of senescence and elanogenesis, promotion of collagen expression, cellular regeneration, and keratinocyte differentiation, and anti-inflammation. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2013;11(4):675-84.
4. Steven AC, Steinert PM. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci*. 1994;107(2):693-700.
5. Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodi-peptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*. 1995;270(30):17702-11.
6. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res*. 1991;24:1-26.
7. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet* (London, England). 2016;387(10023):1109-22.
8. Kim JH. Current understanding of atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Respir Dis*. 2004;14(1):12-23.
9. Im GM, Kim HJ, Jeong WY, Jeong HW. Oriental medical approach on the allergic disease. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2002;16(5):831-9.
10. Cha HY, Ahn SH, Cheon JH, Park SY, Kim KB. Hataedock treatment has preventive therapeutic effects for atopic dermatitis through skin barrier protection in *Dermatophagoides farinae*-induced NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol*. 2017;206:327-36.
11. Muluye RA, Bian Y, Alemu PN. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of heat-clearing Chinese herbs: a current review. *J Tradit Complement Med*. 2014;4(2):93-8.
12. Kim HB, Kang KH, Hwang WD, Lyu SA, Lee SY. The effects of puerariae radix on allergic inflammation. *J Pediatr Korean Med*. 2009;23(3):217-31.
13. Zhang T, Pan W, Takebe M, Schofield B, Sampson H, Li XM. Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of T-helper type 1 and T-helper type 2 responses. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(11):1808-18.
14. Choi MJ, Maibach HI. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am J Clin Dermatol*. 2005;6(4):215-23.
15. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A. Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol*. 1991;96(4):523-6.
16. Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(7):4097-101.
17. Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, Scott IR.

- Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci.* 2000;22(1):21-52.
18. Metz-Boutigue MH, Shooshtarizadeh P, Prevost G, Haikel Y, Chich JF. Antimicrobial peptides present in mammalian skin and gut are multifunctional defence molecules. *Curr Pharm Des.* 2010;16(9):1024-39.
 19. Braff MH, Di Nardo A, Gallo RL. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. *J Invest Dermatol.* 2005;124(2):394-400.
 20. Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst MA, Travers JB, Leung DY. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(6):1195-202.
 21. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beatty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):773-86.
 22. Kuo IH, Yoshida T, De Benedetto A, Beck LA. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):266-78.
 23. Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int.* 2013;62(2):151-61.