

감초시탕 추출물을 이용한 proactive therapy가 아토피피부염 완화에 미치는 영향

안상현¹ · 박범찬^{2,3} · 김기봉^{2,4,*}

¹세명대학교 한의과대학 해부학교실, ²부산대학교 한의학전문대학원 한방소아과학교실,
³박시한의원, ⁴부산대학교한방병원 한방소아과

Abstract

The Effect of Proactive Therapy Using Gamchosi-tang on Alleviating Atopic Dermatitis

Ahn Sang Hyun¹ · Park Beom Chan^{2,3} · Kim Ki Bong^{2,4,*}

¹Dept. of anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University

²School of Korean Medicine, Pusan National University

³Parksi Korean Medicine Clinic

⁴Dept. of Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital

Objectives

This study analyzed the therapeutic effects and underlying mechanisms of Gamchosi-tang in atopic dermatitis (AD) through integrated network pharmacology and in vivo experiments.

Methods

Active compounds and target proteins were predicted, and core genes were identified. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were performed to identify the major pathways. AD-induced mice were treated with Gamchosi-tang or ceramide, and filaggrin expression, transepidermal water loss (TEWL), skin pH, and inflammatory marker expression were evaluated.

Results

The core genes were associated with the phosphoinositide 3-kinases (PI3K)-protein kinase B (Akt) and advanced glycation end-product (AGE)-receptor for AGE (RAGE) pathways. Gamchosi-tang increased filaggrin expression, normalized TEWL and pH, and suppressed inflammation.

Conclusion

Gamchosi-tang exerts skin barrier - restorative and anti-inflammatory effects through activation of the PI3K-Akt pathway and inhibition of the AGE-RAGE pathway.

Key words: atopic dermatitis; skin barrier, network pharmacology, *Glycyrrhiza uralensis*, fermented *Glycine max* Merrill

•Received: October 19, 2025 •Revised: October 22, 2025 •Accepted: October 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: kkb@pusan.ac.kr

© 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

아토피피부염 (Atopic dermatitis)은 만성 재발성의 염증성 피부질환이다. 심한 가려움증과 눈에 보이는 피부증상이 아토피피부염의 핵심 증상으로 아토피피부염의 증상과 환자의 삶의 질 간의 상관관계를 살펴 본 연구¹⁾에서 아토피피부염의 증상들이 삶의 모든 영역에 크게 영향을 주었으며, 특히 가려움과 통증은 큰 영향을 미치는 것으로 보고되었다. 이런 아토피피부염의 병인으로 유전적 소인, 면역 불균형, 환경 요인 등이 복합적으로 작용한다고 생각되며, 특히 피부 장벽의 손상, 특히 지질 장벽의 손상은 아토피피부염 발병의 중요 기반이 된다²⁾.

피부 장벽은 표피의 각질층 내 지질층 (lipid lamella)과 필라그린과 같은 단백질로 구성되며, 내부를 보호하고 외부를 차단하는 역할을 한다. 피부 장벽의 손상은 이런 기능의 결함을 발생시켜 피부 장벽-염증 순환 고리를 통해 건선과 아토피피부염 스펙트럼의 진행을 촉진한다³⁾. 또한 피부 장벽의 손상은 아토피피부염의 발병 원인이 될 뿐만 아니라 다른 악화요인으로도 작용한다. 그 중 하나인 필라그린의 결핍은 각질세포의 세포 이상을 유발하고, 외인성 분자의 표피 침투를 촉진하는 표피 장벽 손상을 초래한다⁴⁾.

이전의 연구⁵⁻⁸⁾에서 다양한 본초들이 필라그린 회복에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다. 감초 (甘草, *Glycyrrhiza uralensis*)는 조화제약 (調和諸藥)의 본초로서, 다양한 한약에 포함된다. 기존 연구^{9,10)}에서 항염증, 피부 조직 재생 및 장벽 보호 가능성 등이 보고되고 있다. 또한 두시 (豆豉, fermented *Glycine max* Merrill)는 하태독법으로 interleukin 4 (IL-4) 활성을 조절하여 아토피 유사 피부염의 개선 가능성을 확인하였다¹¹⁾. 또한 갈근과 함께 사용된 경우 아토피피부염 유도 NC/Nga 생쥐 모델에서 ceramide kinase, caspase-14, tight junction 등을 조절하여 지질 장벽 복구 및 상피 구조 조절 효과가 있음을 확인하였다¹²⁾. 이러한 연구들을 통해 감초와 두시가 서로 다른 생리적 기전을 가지며, 감초시탕의 형태로 함께 사용되면 다양한 신호 경로나 병리축에 작용될 수 있을 것이라 기대하였다.

본 연구는 감초와 두시의 다성분 작용을 통합적으로 해석하기 위해 네트워크 약리학을 활용해 아토피피부염 개선에 작용될 수 있는 핵심 유전자 및 핵심 경로를 확인하고, 감초시탕을 복용시킨 아토피피부염 유도

NC/Nga 생쥐 모델에서 지질 장벽 회복 효과 및 항염증 효과를 확인하고자 하였다.

II. Materials & Methods

1. 네트워크 약리학

1) 활성 화합물 수집 및 유효 성분 선별

감초와 두시의 활성 화합물을 수집하기 위해 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database (TCMSP)를 활용하였다. TCMSP에서 감초와 두시의 간체자를 활용하여 활성 화합물을 수집하였다. 이 중 TCMSP 권고에 따라 경구 이용률 (Oral Bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 약물유사성 (Drug-Likeness, DL) ≥ 0.18 의 기준을 만족하는 성분을 유효성분으로 선별하였다¹³⁾. 이후 PubChem을 통해 각 유효 성분의 분자 구조 및 Simplified Molecular Input Line Entry System (SMILES)을 확인하였으며, Pubchem ID를 확인할 수 없는 성분은 제외하였다.

2) 유효 성분에 대한 표적 단백질 예측

감초와 두시의 유효 성분에 대한 잠재적 표적 단백질은 SwissTargetPrediction (<https://www.swisstargetprediction.ch/>)을 이용하여 확인하였다. 각 성분의 SMILES 정보를 입력하여 얻은 표적 단백질 중 생체 활성률 (Probability) = 0인 항목은 분석에서 제외하였다.

3) 표적 단백질 수집 및 공통 유전자 확인

아토피피부염 관련 표적 단백질은 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)에서 'Atopic dermatitis'를 검색하여 수집하였다. 이후 앞서 수집한 감초와 두시의 표적 단백질과 아토피피부염의 표적 단백질을 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)을 활용하여 아토피피부염, 감초, 두시 간의 공통 표적 단백질을 시각화하였다.

4) 단백질-단백질 상호작용 네트워크 구축 및 핵심 유전자 도출

앞서 확인한 공통 표적 단백질에 대해 STRING database version 12.0 (<https://string-db.org/>)을 이용하여 단백질-단백질 상호작용 (Protein-Protein Interaction, PPI)

네트워크를 구축하였다. Organism은 'Homo sapiens', Interaction score는 'Highest confidence > 0.700'으로 설정하였으며, 해당 조건에 따라 구축된 네트워크는 Cytoscape version 3.10.4을 통해 시각화하였다. CytoNCA plugin version 2.1.6을 이용해 Degree Centrality, Betweenness Centrality, Closeness Centrality, Eigenvector Centrality의 네 가지 중심성 지표를 산출하였으며, 모든 지표에서 상위 10% 이내의 값을 나타낸 유전자를 핵심 유전자로 설정하였다.

5) Functional enrichment 분석

핵심 유전자의 생물학적 기능과 경로를 분석하기 위해 Enrichr database (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)를 활용하였다. The Gene Ontology (GO) enrichment 분석과 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)의 2가지 database를 사용하였으며, 이후 p-value를 기준으로 나열한 후 주된 작용을 할 것으로 추정되는 pathway를 설정하였다.

6) Herb-Compound-Target-Pathway

(H-C-T-P) 네트워크 구성

수집된 데이터를 Cytoscape version 3.10.4를 활용하여 3번의 단계를 거쳐 분석한 후 감초와 두시의 아토피 피부염 관련 H-C-T-P 네트워크를 구성하였다.

2. 실험동물

자바이오 (JA-Bio, Seoul, Korea)에서 분양 받은 태령 4주 수컷 NC/Nga계 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 16 ± 1 g로 선별하여 실험에 사용하였다. 대조군 (Control, Ctrl), 아토피피부염 유발군 (Atopic dermatitis elimination group, ADEG), 아토피 피부염 유발 후 ceramide 처리군 (ceramide treatment after atopic dermatitis elicitation, CTG), 아토피피부염 유발 후 감초시탕 추출물 투여군 (Glycyrrhiza uralensis and fermented Glycine max Merrill extract treatment group after atopic dermatitis elicitation, 2GTG)으로 나누었고, 각각 10마리씩 배정하였다. 결과를 평가할 때 발생할 수 있는 주관적 편향을 최소화하기 위해 2주 적응기간을 거친 후 행동행태를 관찰하여 공격적 과잉행동 및 회피행동 개체를 선정에서 제외하였다. 모든 군의 생쥐들은 23 - 25 °C, $55 \pm 10\%$ 의 습도, 12 h 명암 주기에서 사육되었고, SAFE-40+RMM (SAFE, France) 및 fil-

tered tap water의 식이를 자유롭게 제한없이 제공하였다. 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (IACUC No. smecae 24-10-03) 후 실시되었으며, 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 National Institutes of Health (NIH) 가이드라인에 따라 시행되었다.

3. 실험약물

본 실험에서 사용한 감초시탕 (甘草豉湯) 150 g (감초 75 g, 두시 75 g)을 증류수 1000 mL에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 100 mL으로 감압, 농축한 후 동결 건조하여 추출물 36.5 g (수득률 24.3%)을 획득하였다.

4. 아토피피부염 유발과 치료약물 투여

생쥐 등쪽 부위 피부를 면도한 다음 계면활성제 (surfactant)인 5% sodium dodecyl sulfate (SDS; Sigma, USA) 1 mL을 면봉으로 20회 문질러서 각질층의 lipid lamella를 제거한 후 *D. pteronyssinus* crude extract striper (100 mg, Biostir, Japan)을 3주 동안 주 3회씩 도포하여 유발하였다. 그런 다음 감초시탕 추출물 61 mg/kg량을 생리식염수에 녹인 후 0.2 mL씩 2GTG에 아토피피부염 유발 후 3주 동안 경구투여하였다. 한편 대조약물로 사용된 ceramide (Sigma-Aldrich, USA)는 지방장벽제거 부위 100 μ L씩 5일 동안 CTG에 도포하였다.

5. Transepidermal Water Loss (TEWL) 및 pH 측정

TEWL는 Vapometer (Delfin Technologies Ltd, Kuopio, Finland)를 이용하여 측정하였다. 피부의 pH 변화는 SKIN-O-MET (COSMOMED, Ruhr, Germany)으로 측정하였다.

6. 조직처리 및 면역조직화학

피부는 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin, NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 등쪽 피부를 10% Neutral Buffered formalin에 실온 환경에서 24시간 동안 고정한 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다.

지방장벽 손실, 상피 염증, T helper 2 (Th2) 분화의 면역조직학적 변화를 조사하기 위해 항 filaggrin, Kallikrein Related Peptidase (KLK) 7, Protease activated receptor

(PAR)-2, Thymic stromal lymphopoietin (TSLP), 그리고 interleukin (IL)-4 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 피부절편을 proteinase K (20 μ g/ μ L; 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-filaggrin (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-KLK7 (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse anti-PAR-2 (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse anti-TSLP (1 : 100, Abcam, Waltham, MA, USA), mouse anti-IL-4 (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 4 $^{\circ}$ C humidified 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.

7. 영상분석

면역조직화학의 결과는 image Pro 10 (Media cybernetics,

Rockville, MD, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means $\pm$ standard error) 되었다. 각 군의 피부표본 10개를 임의로 선정한 후 $\times$ 400 배율에서 촬영한 다음 positive pixels (intensity 80~100) / 20,000,000 pixels로 영상분석하였다.

8. 통계

통계는 SPSS software (SPSS 25, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이루어졌으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 ($p < 0.05$)을 검증하고, 사후 검증은 Tukey HSD를 실시하였다.

III. Results

1. 네트워크 약리학

1) 활성 화합물 수집 및 유효 성분 선별

TCMSP database를 통해 감초 및 두시의 활성 화합물을 선별한 결과 감초에서 61개, 두시에서 1개의 활성 화합물을 선별하였다 (Table 1, 2).

Table 1. Active Compounds and Molecular Structures of Glycyrrhiza uralensis

Active Compound	OB (%)	DL	Pubchem ID	SMILES
1 DFV	32.76	0.18	114829	<chem>Cl[C@H](OC2=C(C1=O)C=CC(=C2)O)C3=CC=C(C=C3)O</chem>
2 Mairin	55.38	0.78	64971	<chem>CC(=C)[C@@H]1CC[C@]2([C@H]1[C@H]3CC[C@H]4[C@]5(CC[C@H](C4)C([C@H]5CC[C@]4([C@@]3(CC2)O)C(C)O)OC(=O)O</chem>
3 Glycyrol	90.78	0.67	5320083	<chem>CC(=CCC1=C(C2=C(C1O)OC(=O)C3=C2OC4=C3C=CC(=C4)O)OC)C</chem>
4 Jaranol	50.83	0.29	5318869	<chem>COC1=CC(=C2C(=C1)OC(=C(C2=O)OC)C3=CC=C(C=C3)O)O</chem>
5 Medicarpin	49.22	0.34	336327	<chem>COC1=CC2=C(C=C1)[C@@H]3COC4=C([C@@H]3O2)C=C(C=C4)O</chem>
6 sitosterol	36.91	0.75	12303645	<chem>CC[C@H](CC[C@H](C)[C@H]1CC[C@H]2[C@@]1(CC[C@H]3[C@H]2CC=C4[C@@]3(CC[C@H](C4)O)C(C)C)C</chem>
7 Lupiwighteone	51.64	0.37	5317480	<chem>CC(=CCC1=C2C(=C(C1O)O)C(=O)C(=CO2)C3=CC=C(C=C3)O)C</chem>
8 7-Methoxy-2-methyl isoflavone	42.56	0.2	354368	<chem>CC1=C(C(=O)C2=C(O1)C=C(C2)OC)C3=CC=CC=C3</chem>
9 formononetin	69.67	0.21	5280378	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C2=COC3=C(C2=O)C=CC(=C3)O</chem>
10 Calycosin	47.75	0.24	5280448	<chem>COC1=C(C=C(C1)C2=COC3=C(C2=O)C=CC(=C3)O)O</chem>
(2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano[2,3-f]chromen-4-one	31.79	0.72	197678	<chem>CC(=CCC1=C(C=CC(=C1)[C@@H]2CC(=O)C3=C(O2)C4=C(C=C3)OC(C=C4)C)O)C</chem>

	Active Compound	OB (%)	DL	Pubchem ID	SMILES
12	Glyasperin C	45.56	0.4	480859	<chem>CC(=CCC1=C(C2=C(C1O)OC[C@H](C2)C3=C(C=C(C=C3)O)O)OC)C</chem>
13	Isotrifoliol	31.94	0.42	5318679	<chem>COC1=CC(=CC2=C1C3=C(C4=C(O3)C=C(C=C4)O)C(=O)O2)O</chem>
14	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	39.62	0.35	10881804	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC(=C2)/C=C/C(=O)C3=C(C=C(C=C3)O)O)C</chem>
15	kanzonols W	50.48	0.52	15380912	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC3=C2OC(=O)C(=C3)C4=C(C=C(C=C4)O)O)C</chem>
16	Semilicoisoflavone B	48.78	0.55	5481948	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C(=CC(=C2)C3=COC4=CC(=CC(=C4C3=O)O)O)O)C</chem>
17	Glepidotin A	44.72	0.35	5281619	<chem>CC(=CCC1=C2C(=C(C=C1O)O)C(=O)C(=C(O2)C3=CC=CC=C3)O)C</chem>
18	Glepidotin B	64.46	0.34	442411	<chem>CC(=CCC1=C2C(=C(C=C1O)O)C(=O)[C@@H]([C@H](O2)C3=CC=CC=C3)O)C</chem>
19	Phaseolinisoflavan	32.01	0.45	162412	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC(=C2O)[C@H]3CC4=C(C=C(C=C4)O)OC3)C</chem>
20	Glypallichalcone	61.6	0.19	5317768	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C(=O)/C=C/C2=C(C=C(C=C2)O)OC</chem>
21	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	58.44	0.38	10542808	<chem>CC1(C=CC2=C(C=CC(=C2O1)C3=CC4=C(O3)C=C(C=C4)O)O)C</chem>
22	Licochalcone B	76.76	0.19	5318999	<chem>COC1=C(C=CC(=C1O)O)/C=C/C(=O)C2=CC=C(C=C2)O</chem>
23	licochalcone G	49.25	0.32	49856081	<chem>CC(C)(C=C)C1=C(C=C(C=C1)/C=C/C(=O)C2=C(C=C(C=C2)O)O)OC)O</chem>
24	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin	59.62	0.43	10090416	<chem>CC(C)(C=C)C1=C2C(=C(C=C1O)OC)C=C(C(=O)O2)C3=C(C=C(C=C3)O)O</chem>
25	Licoricone	63.58	0.47	5319013	<chem>CC(=CCC1=C(C=C(C=C1O)C2=COC3=C(C2=O)C=CC(=C3)O)O)OC)C</chem>
26	Gancaonin A	51.08	0.4	5317478	<chem>CC(=CCC1=C(C2=C(C=C1O)OC=C(C2=O)C3=CC=C(C=C3)O)O)C</chem>
27	Gancaonin B	48.79	0.45	5317479	<chem>CC(=CCC1=C(C2=C(C=C1O)OC=C(C2=O)C3=CC(=C(C=C3)O)O)O)C</chem>
28	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	66.37	0.41	14604077	<chem>CC(=CCC1=C2C(=C(C=C1O)O)C(=O)C(=CO2)C3=CC(=C(C=C3)O)O)C</chem>
29	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	30.49	0.41	14604078	<chem>CC(=CCC1=C2C(=C(C=C1O)O)C(=O)C(=CO2)C3=CC=C(C=C3)OC)C</chem>
30	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	44.15	0.41	14604081	<chem>CC(=CCC1=C(C2=C(C=C1O)OC(=CC2=O)C3=CC(=C(C=C3)O)O)O)C</chem>
31	Glycyrin	52.61	0.47	480787	<chem>CC(=CCC1=C(C=C2C(=C1O)OC=C(C(=O)O2)C3=C(C=C(C=C3)O)O)OC)C</chem>
32	Licocoumarone	33.21	0.36	503731	<chem>CC(=CCC1=C(C2=C(C=C1O)OC(=C2)C3=C(C=C(C=C3)O)O)OC)C</chem>
33	Licoisoflavone B	38.93	0.55	5481234	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC(=C2O)C3=COC4=CC(=CC(=C4C3=O)O)O)C</chem>
34	(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	46.27	0.31	11267805	<chem>CC(=CCC1=C(C(=CC(=C1)/C=C/C(=O)C2=C(C=C(C=C2)O)O)O)O)C</chem>
35	Glabridin	53.25	0.47	124052	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC3=C2OC[C@H](C3)C4=C(C=C(C=C4)O)O)C</chem>
36	Glabranin	52.9	0.31	124049	<chem>CC(=CCC1=C2C(=C(C=C1O)O)C(=O)[C@H]([C@H](O2)C3=CC=CC=C3)C</chem>
37	Glabrene	46.27	0.44	480774	<chem>CC1(C=CC2=C(C=C=CC(=C2O1)C3=CC4=C(C=C(C=C4)O)OC3)O)C</chem>

	Active Compound	OB (%)	DL	Pubchem ID	SMILES
38	Glabrone	52.51	0.5	5317652	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC(=C2O)C3=COC4=C(C3=O)C=CC(=C4)O)C</chem>
39	1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	48.14	0.43	11558452	<chem>COC1=CC2=C(C=C1)C3=C(O2)C4=C(C=C(C4OC3=O)O)O</chem>
40	Eurycarpin A	43.28	0.37	5317300	<chem>CC(=CCC1=C(C=CC(=C1O)C2=COC3=C(C2=O)C=CC(=C3)O)O)C</chem>
41	Sigmoidin-B	34.88	0.41	73205	<chem>CC(=CCC1=C(C(=CC(=C1)[C@@H]2CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)C</chem>
42	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	71.12	0.18	928837	<chem>C1[C@@H](OC2=C(C1=O)C=CC(=C2)O)C3=CC=C(C=C3)O</chem>
43	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one	36.57	0.32	193679	<chem>CC(=CCC1=C(C=CC2=C1O[C@@H](CC2=O)C3=CC=C(C=C3)O)O)C</chem>
44	Isolicoflavonol	45.17	0.42	5318585	<chem>CC(=CCC1=C(C=CC(=C1)C2=C(C=O)C3=C(C=C(C3O2)O)O)O)C</chem>
45	HMO	38.37	0.21	3764	<chem>COC1=CC2=C(C=C1)C(=O)C(=CO2)C3=CC=C(C=C3)O</chem>
46	1-Methoxyphaseollidin	69.98	0.64	480873	<chem>CC(=CCC1=C(C=CC2=C1O[C@@H]3[C@H]2COC4=C3C(=CC(=C4)O)OC)O)C</chem>
47	3'-Hydroxy-4'-O-Methylglabridin	43.71	0.57	15228662	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC3=C2OC[C@H](C3)C4=C(C=C(C=C4)OC)O)C</chem>
48	licochalcone a	40.79	0.29	5318998	<chem>CC(C)(C=C)C1=C(C=C(C(=C1)/C=C/C(=O)C2=CC=C(C=C2)O)OC)O</chem>
49	3'-Methoxyglabridin	46.16	0.57	15228663	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC3=C2OC[C@H](C3)C4=C(C=C(C=C4)O)OC)O)C</chem>
50	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyranol[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	36.21	0.52	9927807	<chem>CC1(C=CC2=C(O1)C=CC3=C2OC[C@H](C3)C4=C(C=C(C=C4)OC)O)C</chem>
51	Inflacoumarin A	39.71	0.33	5318437	<chem>CC(=CCC1=CC2=C(C=C1O)OC(=O)C=C2C3=CC=C(C=C3)O)C</chem>
52	icos-5-enoic acid	30.7	0.2	5312521	<chem>CCCCCCCCCCCCC/C=C/CCCC(=O)O</chem>
53	7-Acetoxy-2-methylisoflavone	38.92	0.26	268208	<chem>CC1=C(C(=O)C2=C(O1)C=C(C2)OC(=O)OC3=CC=CC=C3)C</chem>
54	gadelaidic acid	30.7	0.2	5460988	<chem>CCCCCCCCC/C=C/CCCCCCC(=O)O</chem>
55	Vestitol	74.66	0.21	177149	<chem>COC1=CC=C(C=C1)[C@@H]2CC3=C(C=C(C=C3)O)OC2)O</chem>
56	Gancaonin G	60.44	0.39	480780	<chem>CC(=CCC1=C(C=C2C(=C1O)C(=O)C(=CO2)C3=CC=C(C=C3)O)OC)C</chem>
57	Gancaonin H	50.1	0.78	5481949	<chem>CC(=CCC1=C(C2=C(C=C1O)OC(=O)C3=CC4=C(C(=C3)O)OC(C4)O)O)C</chem>
58	Licoagrocarpin	58.81	0.58	15840593	<chem>CC(=CCC1=C(C=CC2=C1OC[C@H]3[C@H]2OC4=C3C=CC(=C4)OC)O)C</chem>
59	Licoagroisoflavone	57.28	0.49	636883	<chem>CC(=C)[C@H]1CC2=C(O1)C=C3C(=C2O)C(=O)C(=CO3)C4=CC=C(C=C4)O</chem>
60	Odoratin	49.95	0.3	13965473	<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C2=COC3=CC(=C(C=C3C2=O)OC)O)O</chem>
61	Phaseol	78.77	0.58	44257530	<chem>CC(=CCC1=C(C=CC2=C1OC(=O)C3=C2OC4=C3C=CC(=C4)O)O)C</chem>

OB: Oral Bioavailability, DL: Drug-Likeness, ID: Identifier, SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry System

Table 2. Active Compounds and Molecular Structures of Fermented Glycine max Merrill

	Active Compound	OB (%)	DL	Pubchem ID	SMILES
1	Glycitein	50.48	0.24	5317750	<chem>COC1=C(C=C2C(=C1)C(=O)C(=CO2)C3=CC=C(C=C3)O)O</chem>

OB: Oral Bioavailability, DL: Drug-Likeness, ID: Identifier, SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry System

Table 3. Core Genes in the Intersection between *Glycyrrhiza uralensis*, Fermented *Glycine max* Merrill and Atopic Dermatitis

	Genes	Degree	Eigenvector	Betweenness	Closeness
1	AKT1	25	0.204681128	2187.781914	0.012819834
2	BCL2	15	0.090883225	1126.109366	0.01278259
3	CASP3	16	0.098624319	1546.882784	0.01278259
4	EGFR	19	0.191339225	1027.996395	0.012800846
5	ESR1	22	0.191287339	3207.344612	0.01282391
6	HSP90AA1	23	0.167793766	1687.364224	0.012803555
7	HSP90AB1	19	0.14658381	832.1691668	0.012796108
8	JAK1	14	0.122326218	159.3442068	0.012740195
9	JAK2	17	0.162161127	333.7861519	0.012759675
10	JAK3	14	0.116350748	539.9682398	0.012742878
11	LYN	15	0.138960078	277.72878	0.01276304
12	MAPK1	23	0.212438822	1176.714951	0.012813724
13	MAPK3	23	0.207061902	1507.173691	0.012817797
14	MAPK8	15	0.103129126	1993.527001	0.01279205
15	PIK3CA	27	0.246709824	1332.545391	0.012800169
16	PIK3CD	25	0.226400092	776.2522161	0.012784616
17	PRKACA	20	0.127356216	2261.285837	0.01278259
18	PRKCA	14	0.123290636	851.355361	0.012769101
19	PTK2	17	0.163279489	1006.056971	0.012771796
20	PTPN11	20	0.200072736	470.9343426	0.012776517
21	PTPN6	16	0.167911902	330.3530899	0.012771122
22	RAF1	18	0.190951392	318.2697263	0.012786643
23	RELA	13	0.08420717	630.7037006	0.012796785
24	SRC	33	0.290817827	4991.453098	0.012827988
25	TNF	15	0.083982974	3273.369732	0.012798138

2) 유효 성분에 대한 표적 단백질 예측

선별된 활성 화합물의 SMILES를 SwissTargetPrediction에 입력하여 표적 단백질을 검색하였고 그 중 Probability = 0인 항목을 제외하여 총 705개의 표적 단백질을 선별하였다.

3) 표적 단백질 수집 및 공통 유전자 확인

GeneCards에서 'Atopic Dermatitis'를 검색한 결과 총 2,574개의 유전자가 도출되었다. Venny 2.1.0을 통해 감초와 두시의 표적 단백질 705개, 아토피피부염 관련 유전자 2,574개의 유전자의 교집합을 확인한 결과 244개의 공통 유전자를 확인하였다 (Figure 1).

4) 단백질-단백질 상호작용 네트워크 구축 및 핵심 유전자 도출

공통 유전자 중 STRING database에서 Homo sapiens 종 내에서 유효한 단백질로 인식되지 못한 1개의 유전자 (OPRK1)를 제외하고 243개를 활용하여 PPI 네트워크를 구축하였으며, Cytoscape version 3.10.4를 이용해 시각화하였다. 이중 Degree, Betweenness, Closeness, Eigenvector의 중심성 지표를 토대로 상위 10% 이내의 값을 나타낸 25개 유전자를 핵심 유전자로 설정하였다 (Figure 2).

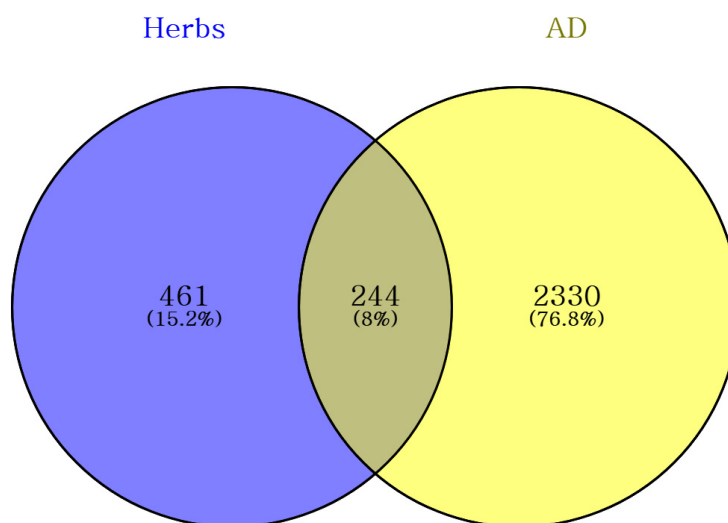


Figure 1. The Venn diagram representing common target genes between *Glycyrrhiza uralensis*, fermented *Glycine max* Merrill (Herbs, Blue) and atopic dermatitis (AD, Yellow)

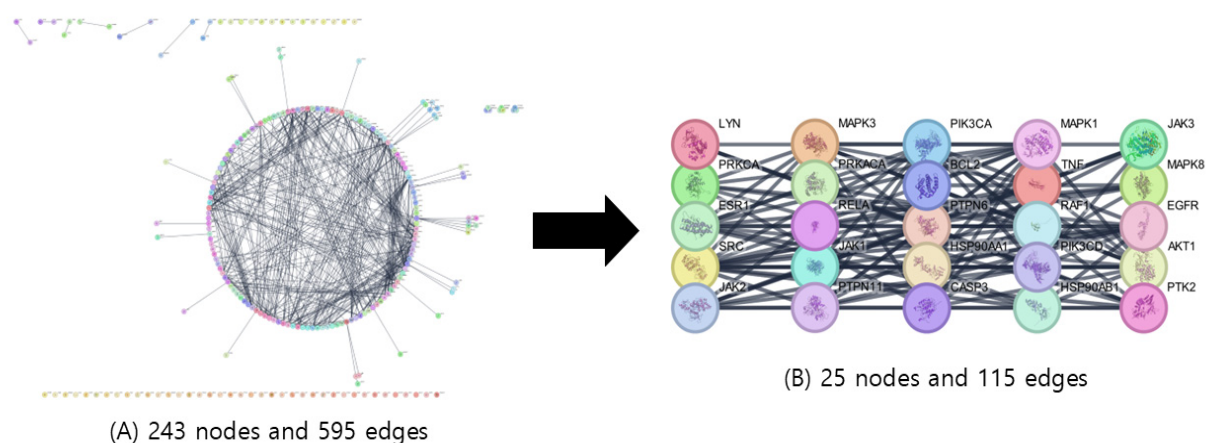


Figure 2. Visualization of protein–protein interaction (PPI) networks

(A) PPI network of common target genes between *Glycyrrhiza uralensis*, fermented *Glycine max* Merrill and atopic dermatitis, (B) PPI network of core target genes identified based on topological parameters.

5) Functional enrichment 분석

핵심 유전자 25개를 Enrichr에 입력한 후 GO enrichment 분석과 KEGG pathway database를 확인하였다. GO enrichment 분석 결과 생물학적 과정 (Biological Process, BP), 세포 구성요소 (Cellular Component, CC)와 분자 기능 (Molecular Function, MF) 중 p -value를 기준으로 상위 10개의 GO를 확인하였다 (Figure 3-5). 아토피 피부염과 연관된 생물학적 과정은 'Cytokine-mediated signaling pathway', 'Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway', 'Regulation of Phosphoinositide 3-kin-

ases (PI3K)-Protein kinase B (Akt) Signal Transduction' 이 있었다. 세포 구성요소는 'Plasma membrane raft', 'Membrane raft', 'Caveola', 'Cytoplasmic side of plasma membrane'이 있었다. 분자 기능은 'Non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity', 'Protein tyrosine kinase activity', 'Kinase binding', 'Protein kinase binding'이 있었다.

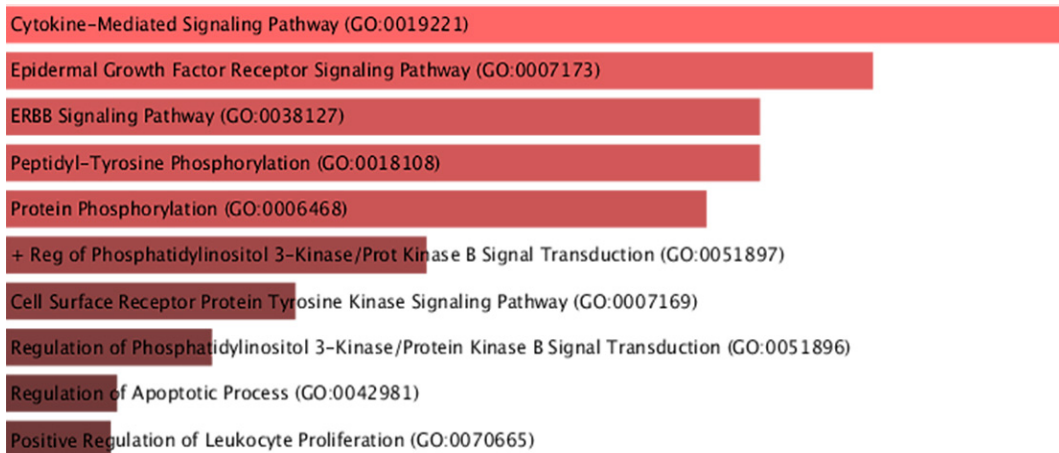


Figure 3. Gene Ontology (GO) biological process analysis of core genes in the intersection between *Glycyrrhiza uralensis*, fermented *Glycine max* Merrill and atopic dermatitis using Enrichr

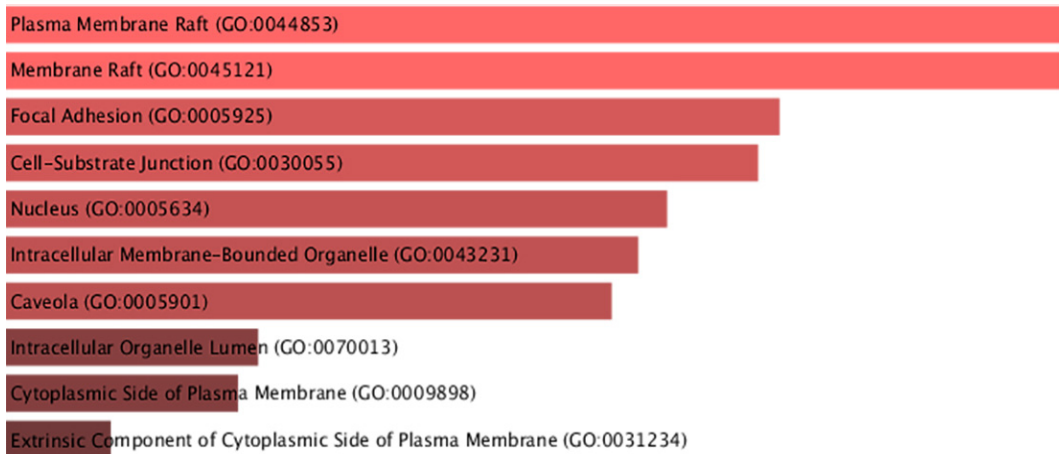


Figure 4. Gene Ontology (GO) cellular component analysis of core genes in the intersection between *Glycyrrhiza uralensis*, fermented *Glycine max* Merrill and atopic dermatitis using Enrichr.

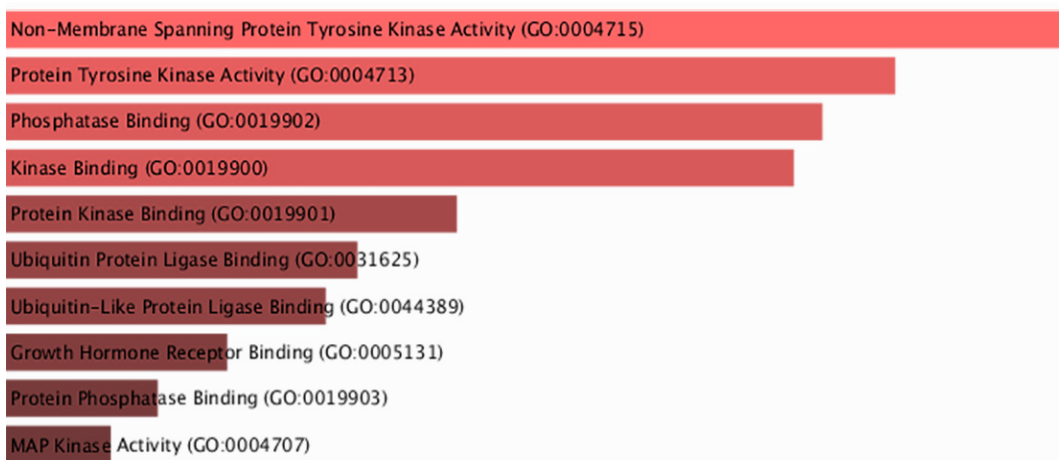


Figure 5. Gene Ontology (GO) molecule function analysis of core genes in the intersection between *Glycyrrhiza uralensis*, fermented *Glycine max* Merrill and atopic dermatitis using Enrichr.

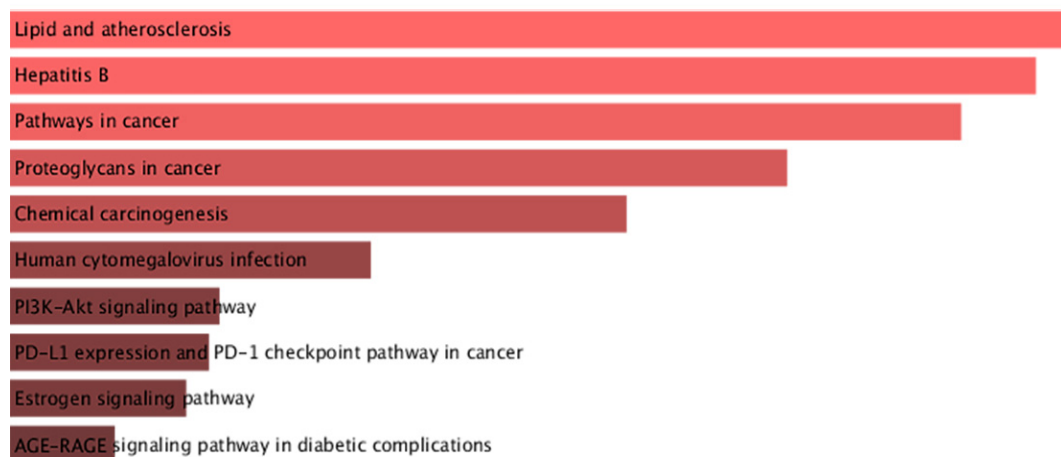


Figure 6. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis of core genes in the intersection between *Glycyrrhiza uralensis*, fermented *Glycine max* Merrill and atopic dermatitis using Enrichr.

KEGG pathway database 분석 결과 p -value 기준으로 상위 10개의 pathway를 선별하였다 (Figure 6). 10개의 pathway 중 아토피피부염 기전과 연관된 pathway는 ‘PI3K-Akt signaling pathway’, ‘Advanced Glycation End-product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) signaling pathway in diabetic complications’가 있었다.

6) H-C-T-P 네트워크를 통한 감초, 두시의 아토피 피부염 치료 기전 분석

Cytoscape를 활용하여 Herb-Compound-Target-Pathway 네트워크를 시각화한 결과, 감초 및 두시의 활성 화합물 중 1-Methoxyphaseollidin이 총 9개의 핵심 유전자와 연관되어 가장 높은 연결성을 보였다 (Figure 7). 이외 Glepidotin B, 3'-Methoxyglabridin, Isolicoflavonol, Phaseo-

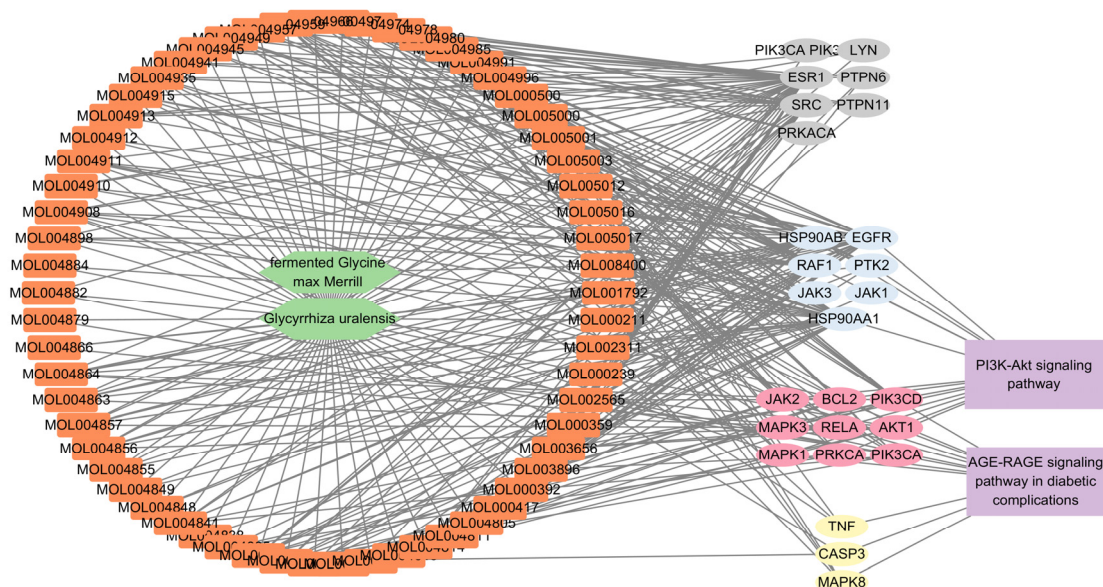


Figure 7. Herb-Compound-Target-Pathway network of the intersection between *Glycyrrhiza uralensis*, fermented *Glycine max* Merrill and atopic dermatitis

The green hexagon represents the herb, and orange rectangles represent its bioactive compounds. Purple rectangles indicate key pathways associated with atopic dermatitis. Elliptical nodes represent core target genes, color-coded by pathway. Association: Pink (associated with both major pathways), Blue (associated only with the phosphoinositide 3-kinases (PI3K)-protein kinase B (Akt) signaling pathway), Yellow (associated only with the advanced glycation end-product (AGE)-receptor for AGE (RAGE) signaling pathway in diabetic complications), and Gray (not associated with either pathway).

linisoflavan, Medicarpin가 각각 8개의 핵심 유전자와 연관되어 높은 연결성을 보였다.

아토피피부염과 관련된 주요 경로인 PI3K-Akt signaling pathway 및 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications와 핵심 유전자 사이의 연결을 확인한 결과, Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)1, AKT serine/threonine kinase 1 (AKT1), MAPK3, Phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta (PIK3CD), Protein kinase C alpha (PRKCA), RELA proto-oncogene, NF- κ B subunit (RELA), Janus kinase (JAK)2, B-cell lymphoma (BCL)2의 9개 유전자가 두 경로와 모두 연관되어 있었다. Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (RAF)1, Epidermal growth factor receptor (EGFR), Heat shock protein 90 beta family class B member 1 (HSP90AB), Heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AA1), Protein tyrosine kinase (PTK)2, JAK3, JAK1는 PI3K-Akt signaling pathway와, Tumor necrosis factor (TNF), Caspase (CASP)3, MAPK3는 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications와 단일 연결되었다.

2. 지질 장벽 회복

필라그린 양성 반응은 아토피피부염 유발 후 Ctrl에 비해 ADEG와 CTG는 감소하였으며, 2GTG는 증가하였다. ADEG ($12,470 \pm 695 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl ($79,313 \pm 1,540 / 20,000,000$ pixel)에 비해 60% 감소하였다. CTG ($21,103 \pm 854 / 20,000,000$ pixel)는 32% 감소하였고, 2GTG ($42,182 \pm 708 / 20,000,000$ pixel)는 35% 증가하였다. 2GTG은 ADEG에 비해 238%, CTG에 비해 100%의 유의성 있는 증가를 보였다 (Figure 8).

피부수분분포의 지표인 TEWL는 Ctrl (30 ± 2 g/m²h)에 비해 ADEG와 CTG, 2GTG 모두 피부손상 후 증가하였다. ADEG (234 ± 6 g/m²h)는 680%, CTG (160 ± 5 g/m²h)는 433%, 2GTG (104 ± 4 g/m²h)는 247% 증가하였다. 2GTG의 TEWL이 가장 낮았으며, ADEG에 비해 56%, CTG에 비해 35%로 유의성 있게 덜 증가하였다 (Figure 8).

피부내 산성도 (pH)는 피부 손상 후 증가하였다. Ctrl (5.4 ± 0.1)에 비해 ADEG (8.3 ± 0.1)는 54%, CTG (7.3 ± 0.1)는 35%, 2GTG (6.4 ± 0.1)는 19% 증가하였다. 특히, 2GTG의 pH가 가장 낮았으며, ADEG에 비해 23%, CTG에 비해 12% 유의성 있게 덜 증가하였다 (Figure 8).

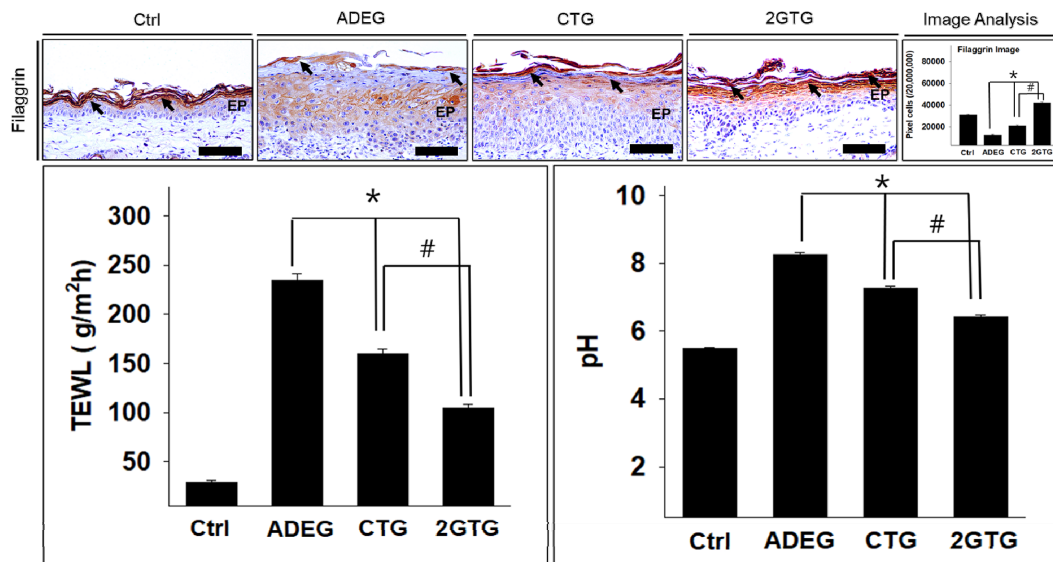


Figure 8. The regeneration of lipid barrier as filaggrin by Gamchosi-tang.

The distribution of filaggrin (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in 2GTG as compared with ADEG and CTG, the data of filaggrin image analysis showed the same results (Filaggrin immunohistochemistry). The TEWL and pH is decreased in 2GTG, but increased in ADEG and CTG.

Abbreviations. Ctrl, normal; ADEG, atopic dermatitis elicitate group; CTG, ceramide treatment after atopic dermatitis elicitation; 2GTG, extract treatment group after atopic dermatitis elicitation; TEWL, Transepidermal water loss; EP, epidermis; Bar size, 50 μ m; *, $p < 0.05$ compared with ADEG; #, $p < 0.05$ compared with CTG.

3. 상피내 염증조절을 통한 피부내 Th2 분화 조절

지질 장벽 손상에 따른 상피내 염증반응이 감소시 탕에 의해 완화되어 Th2 분화가 조절된 것으로 면역조직화학을 통해 확인되었다. 아토피피부염 유발 후 각질층, 과립층, 가시층의 세포사이공간에서 관찰되는 KLK7 양성 반응은 모든 군에서 증가하였다. ADEG ($61,280 \pm 888 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl ($28,921 \pm 530 / 20,000,000$ pixel)에 비해 119% 증가하였다. CTG ($45,217 \pm 936 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 61% 증가하였고, 2GTG ($34,252 \pm 1,114 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 22% 증가하였다. 2GTG의 KLK7 양성 반응은 ADEG에 비해 44%, CTG에 비해 24% 유의성 있게 덜 증가하였다 (Figure 9).

아토피피부염 유발 후 피부상피의 각질층, 과립층 그리고 가시층의 세포사이공간에서 관찰되는 PAR2 양성반응은 Ctrl ($6,089 \pm 329 / 20,000,000$ pixel)에 비해 모든 군에서 증가하였다. ADEG ($78,758 \pm 1,234 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 1,193% 증가하였고, CTG ($33,188 \pm 837 / 20,000,000$ pixel)는 445% 증가하였다. 2GTG ($22,231 \pm 841 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 265% 증가하였다. 2GTG의 PAR2 양성 반응은 ADEG에 비해 72%, CTG에 비해 33% 유의성 있게 덜

증가하였다 (Figure 9).

Th2 분화에 관여하는 TSLP 양성 반응은 아토피피부염 유발 후 피부 상피 모든 층에서 관찰되었다. Ctrl ($7,978 \pm 298 / 20,000,000$ pixel)에 비해 모든 군에서 증가하였다. ADEG ($36,588 \pm 801 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 359% 증가하였고, CTG ($27,684 \pm 686 / 20,000,000$ pixel)는 247% 증가하였다. 2GTG ($18,231 \pm 572 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 128% 증가하였다. 2GTG의 TSLP 양성 반응은 ADEG에 비해 50%, CTG에 비해 34% 유의하게 덜 증가하였다 (Figure 9).

IL-4 양성 반응은 상피과립층과 진피유두에서 관찰되었으며, Ctrl ($5,568 \pm 185 / 20,000,000$ pixel)에 비해 모든 군에서 증가하였다. ADEG ($33,447 \pm 730 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 501% 증가하였으며, CTG ($25,284 \pm 756 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 354% 증가하였다. 2GTG ($18,066 \pm 498 / 20,000,000$ pixel)는 Ctrl에 비해 244% 증가하였다. 2GTG의 IL-4 양성 반응은 ADEG에 비해 50%, CTG에 비해 29% 유의하게 덜 증가하였다 (Figure 9).

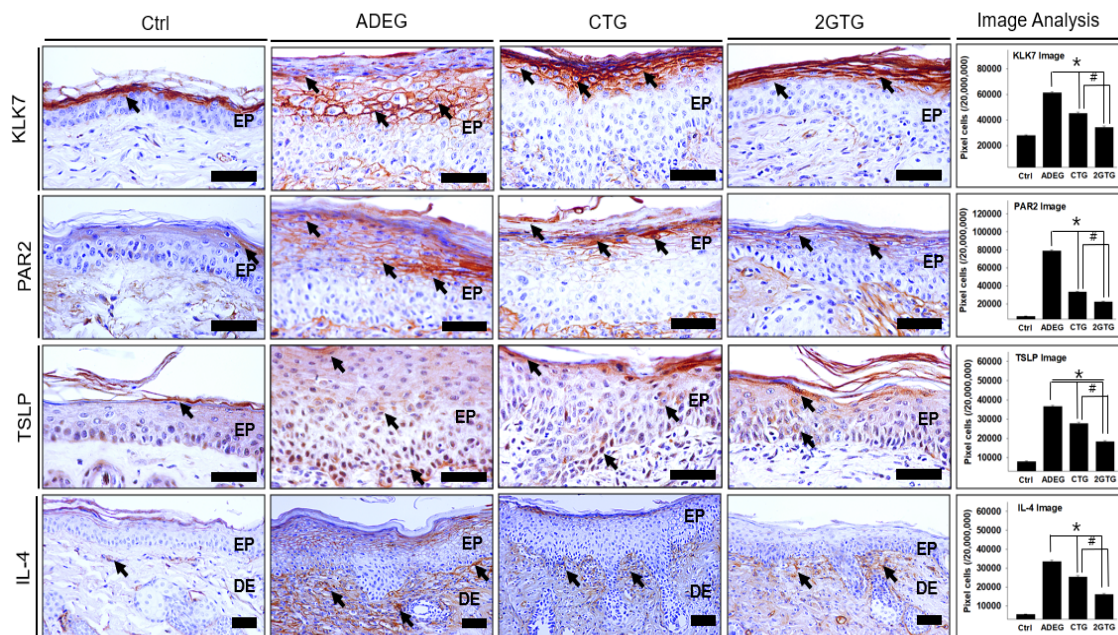


Figure 9. The regulation of Th2 differentiation by application of Gamchosi-tang.

The positive reaction of Kallikrein Related Peptidase (KLK)7, Protease activated receptor (PAR)-2, Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) & interleukin (IL)-4 (arrow indicates light brown particle) was significantly decreased in 2GTG as compared with ADEG and CTG (Immunohistochemistry; Bar size, 50 μ m). The data of image analysis for positive reaction showed the same results. Abbreviations same as Fig. 8

IV. Discussion

본 연구는 두 가지 방식으로 감초시탕의 아토피피부염 개선 작용을 확인하였다. 첫 번째는 동물실험을 통해 감초시탕의 지질 장벽 회복과 그로 인한 염증 발현 억제를 확인하였다. 두 번째로는 네트워크 약리학을 활용하여 감초와 두시의 다중 성분-다중 Target 간의 상호작용을 예측하여 아토피피부염에 작용하는 기전을 보다 체계적으로 확인하였다.

Ceramide는 각질층에 존재하는 피부 구성물질로 국소 치료 시 아토피피부염 병변 (홍반, 각질, 태선화, 가려움)을 개선하고 TEWL을 유의하게 감소시켰다는 보고¹⁴⁾가 있다. 국소 치료제의 경우 경구 투여보다 피부 조직 내 더 높은 농도를 유지할 수 있고, 전신 부작용이 적어 피부 질환에 다용되는 치료법이다¹⁵⁾. 본 연구에서 대조군 증제로 사용한 ceramide 국소 치료는 손상된 지질장벽을 채워주는 직관적인 치료로서, ceramide-Mgnesium를 포함한 외용제가 Hydrocortisone과 유사한 정도의 SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD) 점수 감소 및 TEWL 감소, 피부 수분도 증가, 천연 보습인자 증가를 보였다¹⁶⁾. 본 연구에서 감초시탕은 ceramide 국소 도포 대조군과 대비하여 필라그린을 효과적으로 증가시켰으며, TEWL을 감소시켜 손상된 피부 장벽의 회복을 간접적으로 확인하였다. 또한 KLK7→PAR2→TSLP→IL-4로 이어지는 일련의 염증 유도 과정을 효과적으로 개선하였다.

이러한 동물 실험의 결과로 감초시탕의 복용이 기존에 연구를 통해 확인한 항염증 작용 뿐만 아니라 구조적인 장벽 복구 과정까지 개입했음을 알 수 있다. 필라그린은 피부의 산성화와 수분 유지 기능에 중요한 역할을 하며, 항미생물 작용도 하는 각질층의 중요 요소이다¹⁷⁾. 필라그린의 결핍은 피부 장벽 기능을 저하시킬 뿐 아니라 각질층의 pH 상승, 피부 건조를 야기¹⁸⁾하여 아토피피부염 발병 기전의 중요 요소로 연구되고 있다¹⁹⁾. 따라서 필라그린의 회복은 지질 장벽 회복을 통해 후속과정을 억제하는 Proactive therapy가 될 수 있다. 본 연구는 감초시탕의 필라그린 회복과 염증과정 억제를 통해 아토피피부염에 대한 Proactive therapy 효과를 확인할 수 있었으며, 이는 한의학의 '치미병 (治未病)' 개념에 부합한다.

네트워크 약리학은 다양한 성분을 포함하는 천연물에 적합한 연구 방식²⁰⁾으로, 감초와 두시 역시 복합 성

분이 다양한 Target과 pathway에 작용할 가능성이 있다. KEGG 분석에서 PI3K-Akt signaling pathway와 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications가 감초시탕의 아토피피부염 관련 경로로 확인되었다. 이는 감초와 두시의 활성 화합물이 두 경로의 축을 조절하면서 아토피피부염의 발병 기전에 개입할 가능성을 시사한다. 실제 네트워크 약리학 분석 결과 1-Methoxyphaseollidin이 가장 많은 핵심 유전자와 연결성을 보였으며, MAPK1, AKT1, MAPK3, PIK3CA, PIK3CD, PRKCA, RELA, JAK2, BCL2의 9개 핵심 유전자가 두 pathway 모두와 연관되었다. 1-Methoxyphaseollidin은 감초 계열의 flavonoid로 메톡실화되어 있다. 메톡실기는 하이드록시기에 비해 세포독성이 적고 항산화 활성을 잠재적으로 저하시킬 수 있다²¹⁾. 또한 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) 신호 전달 경로를 뚜렷하게 억제하여 flavonoid의 항염증 효과를 향상시킨다는 특성이 있다²²⁾. 이외 다양한 flavonoid 유도체가 PI3K-Akt, MAPK, NF-κB 등 신호 전달 경로를 조절하는 효과가 관찰된 바 있다^{23,24)}. 1-Methoxyphaseollidin은 AKT1, MAPK1/3, RELA 등의 핵심 유전자와 상호작용하여 PI3K/Akt 경로 활성화 및 안정화 기능을 촉진시키고, AGE/RAGE 축을 억제하여 NF-κB 매개 염증 반응을 조절하는 복합 작용을 수행했을 가능성이 있다.

PI3K-Akt signaling pathway는 표피의 장벽 기능 유지에 필요하며, 각질세포 생존과 스트레스 반응 조절, 분화 조절에 역할을 하며, PI3K-Akt 신호는 epidermal homeostasis 및 barrier integrity 유지에 관여한다²⁵⁾. 또한 피부 손상 모델에서 PI3K의 인산화가 Akt를 통해 mTOR을 활성화시키고, 이를 통해 각질세포의 증식 및 분화를 촉진하여 상피 재생을 유도했다는 실험 결과²⁶⁾가 있어 손상된 피부 재생 과정에서 PI3K/Akt 축이 핵심 매개 경로로 작용했음을 추측할 수 있다.

또 다른 pathway로는 AGE-RAGE signaling pathway가 있었다. AGE의 축적은 피부 노화 및 염증과 관련되어 있으며, Ultraviolet (UV)나 산화 스트레스 등에 의해 유도된 glyoxal 및 기타 전당화 물질이 피부 조직 염증 및 ECM 파괴에 기여할 수 있다는 보고²⁷⁾가 있다. RAGE pathway는 NF-κB, MAPK 신호 전달을 자극하여 염증성 사이토카인 발현을 유도할 수 있어²⁸⁾ AGE-RAGE 축 활성화는 조직 스트레스 및 만성 염증 상태를 조성할 수 있다. 감초시탕은 AGE-RAGE 축을 억제하여 염증 지표를 개선하였음을 추측할 수 있다. 또한 조직 스트

레스 억제 및 구조적 손상 억제 효과로 PI3K-Akt pathway 조절로 재생된 장벽을 유지하는데 도움을 주었을 것으로 추측된다.

본 연구에서는 감초시탕이 PI3K-Akt signaling pathway를 조절하여 각질세포 생존, 분화, 이동, 지질 대사 및 재형성 과정을 유리하게 조정할 수 있으며, 그 결과 동물 실험의 결과에서 필라그린 발현 증가, 지질 장벽 복구 촉진, TEWL 감소가 관찰되었다. 또한 감초시탕은 AGE-RAGE signaling pathway를 조절하여 KLK7, PAR2, TSLP, IL-4와 같은 염증 지표 개선이라는 복합 작용을 하였을 가능성이 높다.

기준에 부합하는 두시의 활성화합물은 'Glycitein' 1가지로 핵심 유전자 EGFR, ESR1, HSP90AA1과 연결되어 있다. 이 중 EGFR과 HSP90AA1이 핵심 경로인 PI3K-Akt signaling pathway에 관여하는 유전자로 두시가 이 경로에 중점적으로 작용함을 알 수 있다. 다만 이 3가지 핵심 유전자 모두가 감초의 다른 활성화합물과도 연결된 유전자이다. 두시는 발효 과정에서 생성되는 isoflavone 대사체가 감초의 flavonoid와 구조적으로 유사하지만 발효로 인해 생체이용률, 대사 안정성, 흡수율이 증가하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 이는 동일한 유전자를 조절하더라도 약리 작용의 강도와 지속시간에서 차이를 만들며, 감초 활성화합물의 효과를 보조하는 조절자 역할을 할 가능성을 시사한다. in vivo에서 관찰된 감초시탕의 효과는 감초와 두시가 함께 구성된 처방의 결과로 단일 본초 또는 단일 화합물 분석만으로는 설명할 수 없는 복합적 상호작용의 산물이다. 즉, 두시는 독자적인 효과를 확인할 수는 없었지만 감초와 핵심 유전자를 중복으로 조절하여 PI3K-Akt 및 AGE-RAGE 경로의 안정적 조절을 강화하는 보조 요소로 해석할 수 있다.

하지만 본 연구에서는 PI3K/Akt 축의 인산화 상태 (p-Akt), total Akt, RAGE 발현량, AGE 축적 정도, Reactive Oxygen Species (ROS) 수준 등 경로 직접 지표를 측정하지 못하였기에 경로 연결을 단정지어 해석하기에는 어려움이 있다. 향후 연구에서는 이러한 경로 연결의 가설에 대하여 피부 조직 내 Phosphorylated Akt (p-Akt), RAGE-AGE 단백질 발현, ROS/Malondialdehyde (MDA) 지표 등의 정량적 분석과 경로 억제제 또는 유전자 조작 (Akt inhibitor, RAGE knockdown) 실험을 통해 인과성을 확인하는 과정이 필요하다. 또한 경구 투여 방식이므로 감초와 두시 성분이 실제 피부 조직에 전달되는 약물 동태학 및 분포 특성을 밝히는 연구가 필요하다.

VI. Conclusion

본 연구는 감초시탕 추출물의 네트워크 약리학 분석, 필라그린 발현 회복, TEWL, 피부 pH, KLK7, PAR2, TSLP, IL-4의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 네트워크 약리학 분석을 통해 아토피피부염에 대해 MAPK1, AKT1, MAPK3, PIK3CA, PIK3CD, PRKCA, RELA, JAK2, BCL2 등이 PI3K/Akt 경로 및 AGE/RAGE 경로 양쪽과 연관되며, 1-Methoxy phaseollidin 같은 활성 화합물이 여러 핵심 유전자와 높은 연결성을 보였다.
2. 2GTG의 필라그린 양성 반응은 ADEG에 비해 238%, CTG에 비해 100% 유의하게 증가하였다.
3. 2GTG의 TEWL는 ADEG에 비해 56%, CTG에 비해 35%로 유의하게 덜 증가하였다.
4. 2GTG의 pH는 ADEG에 비해 23%, CTG에 비해 12%로 유의하게 덜 증가하였다.
5. 2GTG의 KLK7 양성 반응은 ADEG에 비해 44%, CTG에 비해 24%로 유의하게 덜 증가하였다.
6. 2GTG의 PAR-2 양성 반응은 ADEG에 비해 72%, CTG에 비해 33% 유의하게 덜 증가하였다.
7. 2GTG의 TSLP 양성 반응은 ADEG에 비해 50%, CTG에 비해 34% 유의하게 덜 증가하였다.
8. 2GTG의 IL-4 양성 반응은 ADEG에 비해 50%, CTG에 비해 29% 유의하게 덜 증가하였다.

V. Acknowledgements

이 연구는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

VI. References

1. Armario-Hita JC, Carrascosa JM, Flórez Á, Herranz P, Pereyra-Rodríguez JJ, Serra-Baldrich E, Silvestre JF,

- Comellas M, Isidoro O, Ortiz de Frutos FJ. Pruritus and pain constitute the main negative impact of atopic dermatitis® from the patient's perspective: a systematic review. *Dermatitis*. 2024 May-Jun;35(3):216-234. doi: 10.1089/derm.2023.0163. Epub 2023 Sep 25. PMID: 37751176.
2. Bhattacharya N, Sato WJ, Kelly A, Ganguli-Indra G, Indra AK. Epidermal lipids: key mediators of atopic dermatitis pathogenesis. *Trends Mol Med*. 2019 Jun; 25(6):551-562. doi: 10.1016/j.molmed.2019.04.001. Epub 2019 May 1. PMID: 31054869; PMCID: PMC6698381.
3. Dong S, Li D, Shi D. Skin barrier-inflammatory pathway is a driver of the psoriasis-atopic dermatitis transition. *Front Med*. 2024;11:1335551. doi: 10.3389/fmed.2024.1335551.
4. Moosbrugger-Martinez V, Leprince C, Méchin MC, Simon M, Blunder S, Gruber R, Dubrac S. Revisiting the roles of filaggrin in atopic dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2022 May 10;23(10):5318. doi: 10.3390/ijms23105318. PMID: 35628125; PMCID: PMC9140947.
5. Son SH, Ahn SH, Park SY, Kim KB. Hwangnyeonhaedok-tang extracts ameliorates atopic dermatitis via epidermal lipid barrier regeneration in NC/Nga Mouse. *J Pediatr Korean Med*. August, 2018;32(3):90-9. doi: 10.7778/jpkm.2018.32.3.090
6. Ahn SH, Shin S, Do Y, Jo Y, Ryu D, Ha KT, Kim KB. Topical application of galgeunhwanggeumhwan-gryeon-tang recovers skin-lipid barrier and ameliorates inflammation via filaggrin-thymic stromal lymphopoietin-interleukin 4 pathway. *Medicina*. 2021;57(12):1387. doi:10.3390/medicina57121387
7. Park BC, Ahn SH, Yang IJ, Kim KB. Effect of coptis chinensis, glycyrrhiza uralensis, and fermented glycine max extract as proactive therapy for atopic dermatitis. *Appl Sci*. 2021;11(18):8380.
8. Park SH, Jang S, Kim HK. Gardenia jasminoides extract ameliorates DfE-induced atopic dermatitis in mice through restoration of barrier function and T-helper 2-mediated immune response. *Biomed Pharmacother*. 2022;145:112344.
9. Leite CDS, Bonafé GA, Pires OC, Santos TWD, Pereira GP, Pereira JA, Rocha T, Martinez CAR, Ortega MM, Ribeiro ML. Dipotassium glycyrrhizinate improves skin wound healing by modulating inflammatory process. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 14;24(4):3839. doi: 10.3390/ijms24043839. PMID: 36835248; PMCID: PMC9965141.
10. Fatoki TH, Ajiboye BO, Aremu AO. In silico evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and dermatocosmetic activities of phytoconstituents in licorice (*glycyrrhiza glabra* L.). *Cosmetics*. 2023; 10(3):69. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10030069>
11. Ahn SH, Kim JK, Cheon JH, Kim KB. The effect of douchi hataedok treatment for dermatophagoides farinae-induced atopic dermatitis-like skin lesions by controlling IL-4 activity. *J Pediatr Korean Med*. 2017; 31(1):43-51. doi: 10.7778/jpkm.2017.31.1.043
12. Ahn SH, Kim KB. Effect of puerariae radix and douchi complex extracts on skin barrier damage recovery in atopic dermatitis-induced rats. *J Pediatr Korean Med*. 2025;39(3):31-40. doi: 10.7778/jpkm.2025.39.3.31
13. Yang L, Wang H, Zhu Z, Yang Y, Xiong Y, Cui X, Liu Y. Network Pharmacology-Driven Sustainability: AI and Multi-Omics Synergy for Drug Discovery in Traditional Chinese Medicine. *Pharmaceuticals*. 2025; 18(7):1074. <https://doi.org/10.3390/ph18071074>
14. Ishida K, Takahashi A, Bito K, Draelos Z, Imokawa G. Treatment with synthetic pseudoceramide improves atopic skin, switching the ceramide profile to a healthy skin phenotype. *J Invest Dermatol*. 2020;140(9):1762-70.e8.
15. McClain RW, Yentzer BA, Feldman SR. Comparison of skin concentrations following topical versus oral corticosteroid treatment: reconsidering the treatment of common inflammatory dermatoses. *J Drugs Dermatol*. 2009 Dec;8(12):1076-9. PMID: 20027934.
16. Koppes SA, Charles F, Lammers L, Frings-Dresen M, Kezic S, Rustemeyer T. Efficacy of a cream containing ceramides and magnesium in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis: a randomized, double-blind, emollient- and hydrocortisone-controlled trial. *Acta Derm Venereol*. 2016 Nov 2;96(7):948-53. doi: 10.2340/00015555-2395. PMID: 26939522.
17. Čepelak I, Dodig S, Pavić I. Filaggrin and atopic march. *Biochem Med (Zagreb)*. 2019 Jun 15;29(2):020501. doi: 10.11613/BM.2019.020501. PMID: 31223255; PMCID: PMC6559618.

18. Hart PH, Norval M. The multiple roles of urocanic acid in health and disease. *J Invest Dermatol*. 2020 Sep 9:S0022-202X(20)31957-6. doi: 10.1016/j.jid.2020.07.017. Epub ahead of print. PMID: 32919759.
19. Drislane C, Irvine AD. The role of filaggrin in atopic dermatitis and allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2020 Jan;124(1):36-43. doi: 10.1016/j.anai.2019.10.008. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31622670.
20. Noor F, Tahir Ul Qamar M, Ashfaq UA, Albutti A, Alwashmi ASS, Aljasir MA. Network pharmacology approach for medicinal plants: review and assessment. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 May 4;15(5):572. doi: 10.3390/ph15050572. PMID: 35631398; PMCID: PMC9143318.
21. An J, Zhang Z, Jin A, Tan M, Jiang S, Li Y. Organic functional groups and their substitution sites in natural flavonoids: a review on their contributions to antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic capabilities. *Food Sci Nutr*. 2025;13(5):e70191.
22. Chen L, Teng H, Xie Z, Cao H, Cheang WS, Skalicka-Woniak K, Georgiev MI, Xiao J. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: an update on structure-activity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(4):513-27.
23. Tseng CH, Lin CF, Aljuffali IA, Huang J-R, Yang SH, Fang JY. The effectiveness of synthetic methoxylated isoflavones in delivering to the skin and alleviating psoriasisiform lesions via topical absorption. *Int J Pharm*. 2022;617:121629.
24. Wójciak M, Drozdowski P, Skalska-Kamińska A, Zagórska-Dziok M, Ziemiańska A, Nizioł-Lukaszewska Z, Latalska M. Protective, anti-inflammatory, and anti-aging effects of soy isoflavones on skin cells: an overview of in vitro and in vivo studies. *Molecules*. 2024;29:5790.
25. Teng Y, Fan Y, Ma J, Lu W, Liu N, Chen Y, Pan W, Tao X. The PI3K/Akt pathway: emerging roles in skin homeostasis and a group of non-malignant skin disorders. *Cells*. 2021 May 17;10(5):1219. doi: 10.3390/cells10051219. PMID: 34067630; PMCID: PMC8156939.
26. Tsai CL, Changchien CY, Chen Y, Chang HH, Tsai WC, Wang YW, Chou KC, Chiang MH, Tsai YL, Tsai HC, Wang CY, Shen MS, Cheng LT, Lin HY, Yang TB, Chian CF. Accelerated wound healing and keratinocyte proliferation through PI3K/Akt/pS6 and VEGFR2 signaling by topical use of pleural fluid. *Cells*. 2022 Feb 26;11(5):817. doi: 10.3390/cells11050817. PMID: 35269438; PMCID: PMC8909204.
27. Sultana R, Parveen A, Kang M-C, Hong S-M, Kim SY. Glyoxal-derived advanced glycation end products (GO-AGEs) with UVB critically induce skin inflammaging: in vitro and in silico approaches. *Sci Rep*. 2024; 14(1):1843.
28. Guarneri F, Custurone P, Papaiani V, Gangemi S. Involvement of RAGE and oxidative stress in inflammatory and infectious skin diseases. *Antioxidants*. 2021;10(1):82. <https://doi.org/10.3390/antiox10010082>
29. do Prado FG, Pagnoncelli MGB, de Melo Pereira GV, Karp SG, Soccol CR. Fermented Soy Products and Their Potential Health Benefits: A Review. *Microorganisms*. 2022 Aug 9;10(8):1606. doi: 10.3390/microorganisms10081606. PMID: 36014024; PMCID: PMC9416513.