

아토피 피부염 유발 생쥐에서 감초시탕 추출물의 피부 장벽 단백질 발현 변화

안상현¹ · 김기봉^{2,3,*}

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

Abstract

Gamchosi-tang extract Alters Skin Barrier Protein Expression in Mice with Atopic Dermatitis

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 investigate changes in the expression of skin barrier proteins in atopic dermatitis (AD) following treatment with *Gamchosi-tang* extract.

Methods

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

Results

Claudin and TLR-2 expressions showed significantly less reduction in the *Gamchosi-tang* extract treatment group after atopic dermatitis elicitation (GGTG) than in the atopic dermatitis elimination group (ADEG) and ceramide treatment group after atopic dermatitis elicitation (CTG). NHE and cathelicidin expressions were significantly increased in the GGTG group compared to the ADEG and CTG groups. Additionally, ceramide kinase and caspase 14 expressions showed significantly less reduction in the GGTG group than in the ADEG and CTG groups.

Conclusion

The extract of *Gamchosi-tang* has the potential to restore skin barrier damage in atopic dermatitis.

Key words: *Gamchosi-tang*, Atopic dermatitis, Skin barrier, Tight junction

•Received: July 19, 2026 •Revised: July 24, 2026 •Accepted: July 29, 2026

*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

피부는 외부 환경과 신체 내부를 분리하는 최전선의 생체 방어벽이다. 특히 항원이나 병원균, 유해 화학 물질 및 자외선 (UV) 등 다변화된 외부 스트레스 요인으로부터 생명을 보호하는 것이 핵심적인 역할이다^{1,2)}. 이러한 방어 메커니즘의 대부분은 피부 최외각 세포층인 표피 (epidermis) 구조와 분자생물학적 특성에 기반하여 발휘된다. 표피는 주로 각질세포로 이루어져 있으며, 이 각질세포가 최종 분화 단계를 거쳐 각질층을 형성할 때 세포 내부 단백질이 교차 결합하면서 견고한 단백질 외막을 구축하게 된다³⁾. 이 장벽 구조는 로리크린 (loricrin), 인볼루크린 (involucrin), 트리코하이알린 (trichohyalin) 등의 구성을 바탕으로 한 효소적 가교결합에 의해 완성된다^{4,5)}. 나아가 각질세포 외벽에는 세포 간 지질 (intercellular lipid)이 정교한 층상 구조를 형성하고 있어, 체내 수분 증발을 억제하는 동시에 외부 항원과 병원체의 유입을 차단하고 면역 항상성을 조절한다⁶⁾. 만약 이와 같은 피부 장벽의 구조적 균형이 무너지면 아토피 피부염이나 건선 (psoriasis)을 비롯한 다양한 난치성 피부 질환이 유발될 수 있다.

만성 재발성 염증성 피부 손상인 아토피피부염 (Atopic Dermatitis, AD) 은 유전적 소인과 면역학적 불균형, 표피 장벽 기능 저하 및 환경적 자극원 등이 복합적으로 얹혀 발병한다. 주요 증상으로는 극심한 가려움증 (pruritus), 피부 건조증 (xerosis), 홍반성 병변 (erythematous lesions) 및 피부가 두꺼워지는 태선화 (lichenification) 등이 있으며, 이는 환자의 삶의 질을 심각하게 저하시킨다⁷⁾. 또한 아토피피부염은 전신 알레르기 질환으로 이행되는 ‘알레르기 행진 (allergic march)’의 시발점이 된다. 초기 장벽 결손과 과도한 Th2 면역 반응은 항원의 경피 흡수 (percutaneous sensitization)를 촉진하며, 이는 순차적으로 알레르기 비염, 기관지 천식, 식품 알레르기 등의 추가적인 알레르기성 병증을 연쇄적으로 야기하는 원인이 된다⁸⁾.

한의학적 관점에서 아토피피부염은 국소적인 피부 문제에 국한되지 않고, 체내 기혈 (氣血), 음양 (陰陽), 장부 (臟腑)의 기능적 부조화에서 비롯된 전신 질환으로 간주된다. 특히 소아 환자에게서 빈발하는 아토피성 병변은 출생 전후 체내에 정체된 태열 (胎熱)이 원활하게 배출되지 못한 병리적 결과로 해석된다⁹⁾. 이 울체된 열감이 피부 표면으로 발현되면서 홍반, 발진, 소

양증 및 야간 악화 등 전형적인 아토피 증상을 보이게 된다¹⁰⁾. 이에 한의학에서는 이를 영위불화 (營衛不和), 폐위허약 (肺胃虛弱), 습열내온 (濕熱內蘊) 등의 병기 (病機)로 진단하고, 청열해독 (清熱解毒)과 조화장부 (調和臟腑) 강화를 목표로 하는 한약 처방을 통해 근본적으로 조절하고자 한다¹¹⁾.

본 연구에서 사용된 감초시탕 추출물은 감초 (甘草, *Glycyrrhiza uralensis*)와 두시 (豆豉, Douchi, 발효된 *Glycine max* Merr.)의 조합으로 구성되어 있다. 감초는 한의학에서 보비익기 (補脾益氣), 청열해독 (清熱解毒), 완급지통 (緩急止痛) 및 조화제약 (調和諸藥)의 효능이 있어 다양한 처방의 약성을 조화롭게 조절하는 약재이다. 최근 연구에 따르면, 감초의 주요 활성 성분들은 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 전염증성 사이토카인의 생성을 유의미하게 억제할 뿐만 아니라¹²⁾, 이들의 상위 신호 전달체인 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로 및 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)의 전사 활성화를 차단함으로써 세포 내 염증 연쇄 반응을 효과적으로 제어하는 것으로 보고되고 있다¹³⁾. 또한 두시는 청열해독 (清熱解毒), 건비화습 (健脾化濕)의 효능이 있어, 체내 병리적인 열독을 치료하고 체내의 축적된 습 (濕)의 배출을 유도하여 국소부위 염증 반응을 진정시키는 작용을 한다¹⁴⁾.

이에 본 연구는 감초시탕 추출물이 아토피피부염 조건에서 상피 세포 간의 밀착연접 결합력을 확인하고자 claudin과 toll-like receptor 2 (TLR-2)의 변동을 측정하였다. 더불어 항균 장벽의 수복 여부를 평가하기 위해 Na⁺/H⁺ exchanger (NHE)와 cathelicidine을 추적하였으며, 파괴된 피부 장벽을 회복시키는지 확인하고자, 생체 내 보습 인자 생성 메커니즘을 반영하는 Ceramide kinase 및 Caspase 14의 발현을 분석하였다. 이를 통해 감초시탕이 아토피피부염의 염증성 병태를 완화하고 피부 환경을 개선할 수 있는 치료 약물로서의 가능성을 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

II. Materials and Methods

1. Materials

1) 실험동물

자바이오 (JA-Bio, Seoul, Korea)에서 분양 받은 대령 4주 수컷 NC/Nga계 생쥐를 무균사육장치내에서 2주 일 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 group after atopic dermatitis elicitation, CTG), 아토피 피부염 유발 후 감초시탕 추출물 투여군 (Gamchosi-tang extract treatment group after atopic dermatitis elicitation, GGTG)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 ± 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 24-10-13) 후 실시되었고, 기타 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 National Institutes of Health (NIH) 가이드라인에 따라 시행되었다.

2) 실험약물

감초시탕 150 g (감초 75 g, 두시 75 g, 옴니허브, 한국)을 증류수 1000 ml에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator (Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 50 ml으로 감압, 농축한 후 동결 건조하여 추출물 36.5 g (수득률 24.3%) 획득하였다. GGTG에 AD 유발 후 감초시탕 추출물 61 mg/kg량을 생리식염수에 녹인 후 0.2 ml씩 3주 동안 경구투여하였다. 대조약물로 사용된 ceramide (Sigma-Aldrich)는 CTG의 지방장벽제거 부위에 100 μ l씩 5일동안 도포하였다.

2. Methods

1) 아토피피부염 유발

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 3주동안 주 3회씩 도포하여 유발하였다.

2) 조직화학

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

3) 면역조직화학

밀착연접 (tight junction) 단백질인 Claudin 및 밀착연접에 영향을 미치는 TLR-2, 피부의 산성도를 유지하는 관여하는 sodium hydrogen antiporter 1 (NHE1), 항균펩타이드인 Cathelicidine, 피부보습인자 (natural moisturizing factor, NMF) 생성에 관여하는 Ceramide kinase K와 Caspase 14 등의 면역조직학적 변화를 조사하기 위해 항 Claudin, TLR-2, NHE1, Cathelicidine, Ceramide kinase K 및 Caspase 14 등의 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-Claudin (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse anti-TLR 2 (1 : 100, Abcam, Waltham, MA, USA), mouse anti-NHE (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-Cathelicidine (1 : 100, Abcam, Waltham, MA, USA), mouse anti-Ceramide kinase (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.) 및 mouse anti-Caspase 14 (1 : 100, Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1 : 50, Santa Cruz Biotechnology Inc.)에 실온에서 24시간 link하였고, avidin biotin complex kit (Vector Lab)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine 과 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 $\pm$ standard error) 되었다. 각 군의 피부표본 10개를 임의로 선정한 후 $\times 100$ 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 통해 유의성 ($p < 0.05$)을 검증하고, 사후 검증은 Tukey HSD를 실시하였다.

III. Results

1. 피부상피 손상 완화

붕괴된 피부상피의 조직화학적 관찰에서 ADEG과 CTG에서는 가시층의 소실, 과립층과 가시층의 세포사이공간의 확장, 기저층내 붕괴와 이로 인한 바닥면 주변으로 림프구 침윤 증가 등의 구조적 변화가 관찰되었다. 이에 비해 GGTG에서는 ADEG와 CTG에 비해 피부 붕괴가 회복되는 양상을 보였다 (Fig. 1).

2. 밀착연접 회복

밀착연접단백질인 claudin 양성반응은 각질층과 과립층에서 관찰되었다. 피부내 claudin 양성반응이 Ctrl (47,360 $\pm$ 373 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG (13,529 $\pm$ 480 / 20,000,000 pixel), CTG (21,442 $\pm$ 472 / 20,000,000 pixel), GGTG (41,774 $\pm$ 764 / 20,000,000 pixel)는 감소

하였다. Ctrl에 비해 ADEG는 71%, CTG는 55%, GGTG는 12% 감소하였다. GGTG의 claudin 양성반응은 ADEG에 비해 209%, CTG에 비해 95% 유의성있게 덜 감소하였다 (Fig. 2).

밀착연접단백질 영향인자인 TLR-2 양성반응 역시 과립층에서 관찰되었다. TLR-2 양성반응은 Ctrl (50,880 $\pm$ 409 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG (15,616 $\pm$ 528 / 20,000,000 pixel), CTG (22,759 $\pm$ 653 / 20,000,000 pixel), GGTG (38,172 $\pm$ 402 / 20,000,000 pixel)에서 모두 감소하였다. Ctrl에 비해 ADEG는 69%, CTG는 55%, GGTG는 25% 감소하였다. GGTG의 TLR-2 양성반응은 ADEG에 비해 144%, CTG에 비해 68% 유의성있게 덜 감소하였다 (Fig. 2).

3. 항균장벽 회복

피부내 산성도 유지에 관여하는 NHE 양성반응은 각질층과 과립층에서 관찰되었다. NHE 양성반응이 Ctrl (42,407 $\pm$ 782 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG (14,067 $\pm$ 965 / 20,000,000 pixel), CTG (31,953 $\pm$ 771 / 20,000,000 pixel)는 감소하였고 GGTG (49,536 $\pm$ 628 / 20,000,000 pixel)는 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 67%, CTG는 25% 감소하였고, GGTG는 17% 증가하였다. GGTG의 NHE 양성반응은 ADEG에 비해 252%, CTG에 비해 55% 유의성있게 증가하였다 (Fig. 3).

피부 항균작용에 관여하는 cathelicidine 양성반응은 각질층과 과립층에서 관찰되었다. Cathelicidine의 양성반응은 Ctrl (19,680 $\pm$ 450 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG (8,263 $\pm$ 306 / 20,000,000 pixel)와 CTG (12,770 $\pm$ 660 / 20,000,000 pixel)는 감소하였고, GGTG (22,277 $\pm$ 607 / 20,000,000 pixel)는 증가하였다. Ctrl에 비해 ADEG는 58%, CTG는 35% 감소하였고, GGTG는 Ctrl에

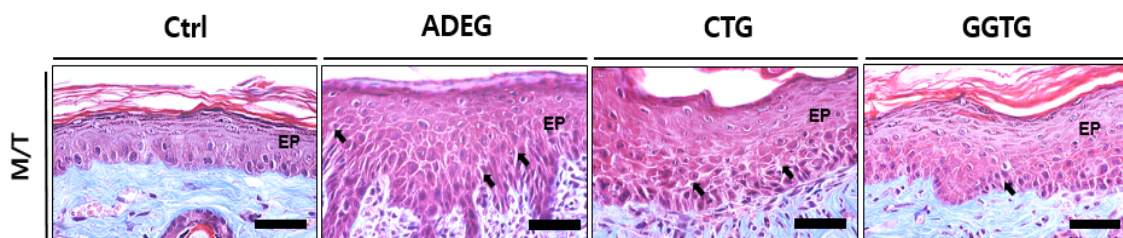


Figure 1. The repair effects of epidermal destruction by *Gamchosi-tang* extract(GGE) treatment.

The GGE treatment relieved symptom as enlargement of intercellular space (arrow) in GGTG compared with ADEG and CTG. Abbreviations. Ctrl, normal; ADEG, atopic dermatitis elicited group; CTG, Ceramide exposure group after atopic elicitation; GGTG, GGE administration group after atopic dermatitis elicitation; M/T, Masson's trichrome; EP, epidermis; Arow, Intracellular space; Bar size, 100 μ m.

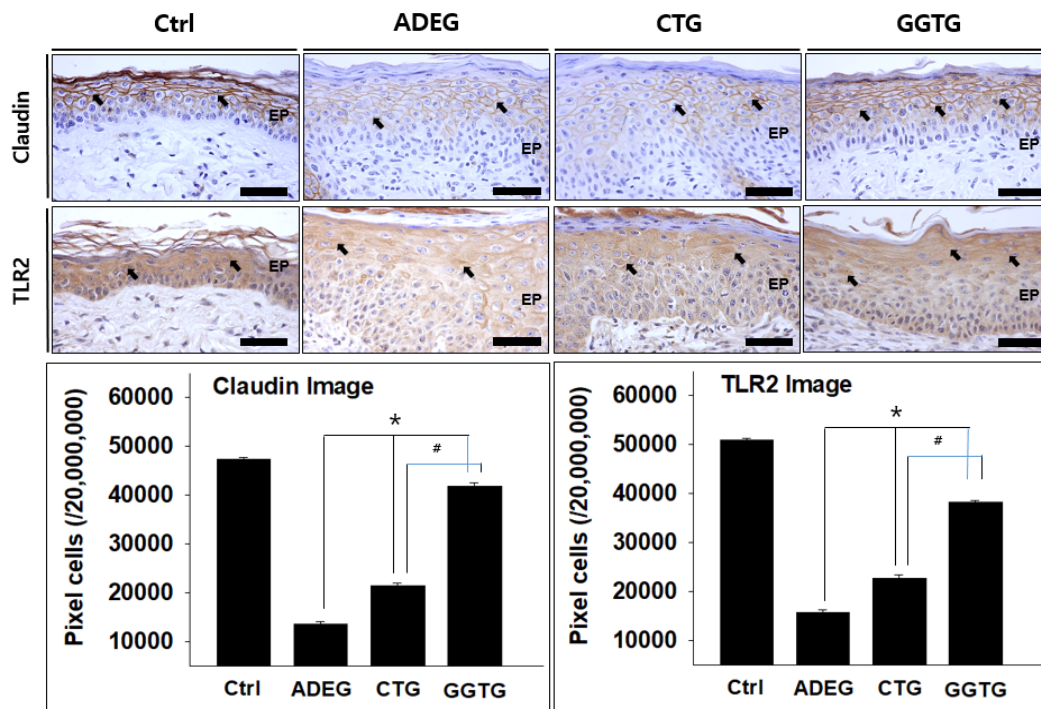


Figure 2. The regeneration of tight junction by GGE treatment (Claudin and TLR-2 immunohistochemistry; Bar size, 50 μ m).

The activation of Claudin and TLR-2 (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in GGTG as compared with ADEG and CTG, the data of Claudin and TLR-2 image analysis showed the same results. (*, $p < 0.05$ compared with ADEG; #, $p < 0.05$ compared with CTG) Abbreviations same as Fig. 1.

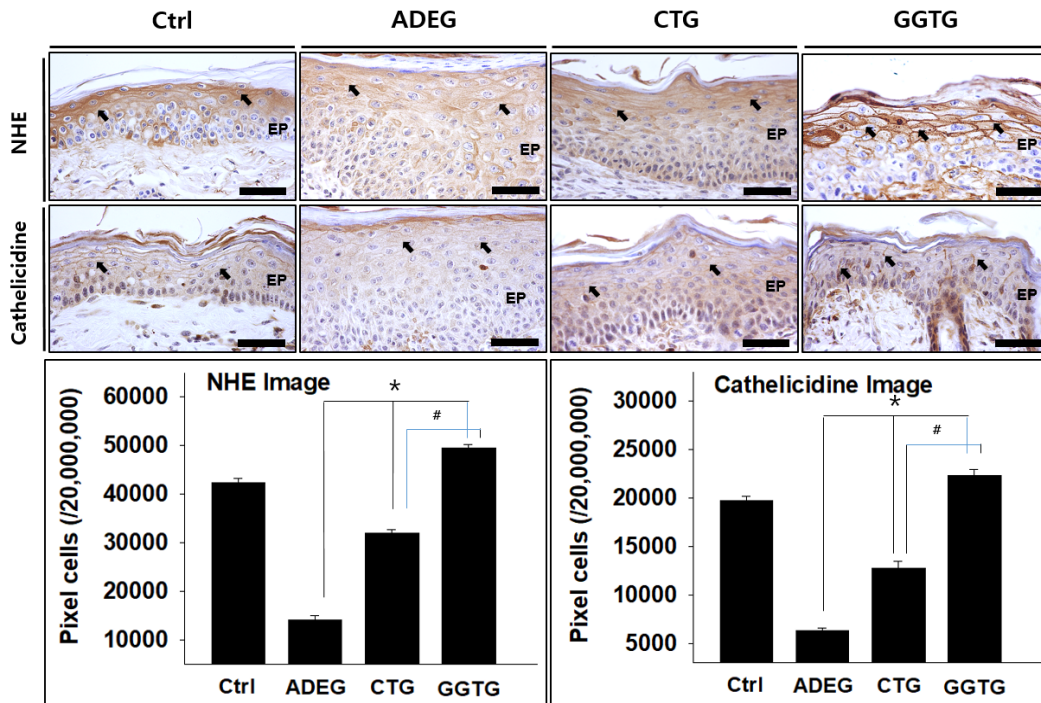


Figure 3. The regeneration of anti-microbial barrier by GGE treatment (NHE and Cathelicidin immunohistochemistry; Bar size, 50 μ m).

The activation of NHE & Cathelicidin (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in GGTG as compared with ADEG and CTG, the data of NHE and Cathelicidin image analysis showed the same results. (*, $p < 0.05$ compared with ADEG; #, $p < 0.05$ compared with CTG) Abbreviations same as Fig. 1.

비해 13% 증가하였다. GGTG의 cathelicidin 양성반응은 ADEG에 비해 170%, CTG에 비해 74% 유의성있게 증가하였다 (Fig. 3).

4. 피부보습인자 생성 회복

각질층과 과립층에서 관찰되는 ceramide kinase 양성반응을 통해 피부내 지방장벽 활성도를 평가할 수 있다. Ceramide kinase 양성반응은 Ctrl ($52,692 \pm 693 / 20,000,000$ pixel)에 비해 ADEG ($10,592 \pm 685 / 20,000,000$ pixel), CTG ($20,360 \pm 741 / 20,000,000$ pixel), GGTG ($36,301 \pm 591 / 20,000,000$ pixel)에서 모두 감소하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 80%, CTG는 61%, GGTG는 31% 감소하였다. GGTG의 ceramide kinase 양성반응은 ADEG에 비해 243%, CTG에 비해 78% 유의성있게 덜 감소하였다 (Fig. 4).

과립층에서 관찰되는 Caspase 14 양성반응은 Ctrl ($51,018 \pm 637 / 20,000,000$ pixel)에 비해 ADEG ($9,162 \pm 331 / 20,000,000$ pixel), CTG ($20,991 \pm 740 / 20,000,000$ pixel), GGTG ($32,447 \pm 613 / 20,000,000$ pixel)

pixel)에서 모두 감소하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 82% 감소하였고, CTG는 59%, GGTG는 36% 감소하였다. GGTG의 caspase 14 양성반응은 ADEG에 비해 254%, CTG에 비해 55% 유의성있게 덜 감소하였다 (Fig. 4).

IV. Discussion

아토피피부염은 국소적인 피부 염증 증상에 머무르지 않고, 전신적 면역 불균형과 알레르기 병증으로 발현할 가능성을 가진 질환이다. 특히 영유아 및 소아기에 아토피피부염이 발생한 환자의 경우, 초기의 정확한 감별과 선제적인 치료적 개입은 당장의 증상 완화는 물론 구조적인 알레르기 진행 억제 및 전반적인 삶의 질 개선을 위해 필수적이다. 아토피피부염의 주요 병태생리로는 각질층 내 세라마이드 (ceramide) 성분의 결핍, 자체적인 항균 펩타이드 발현 저하, 그리고 상피세포 간 밀착연접 (tight junction)의 구조적 결함 등이 지목되며, 이들이 결합하여 최종적으로 피부장벽의 기

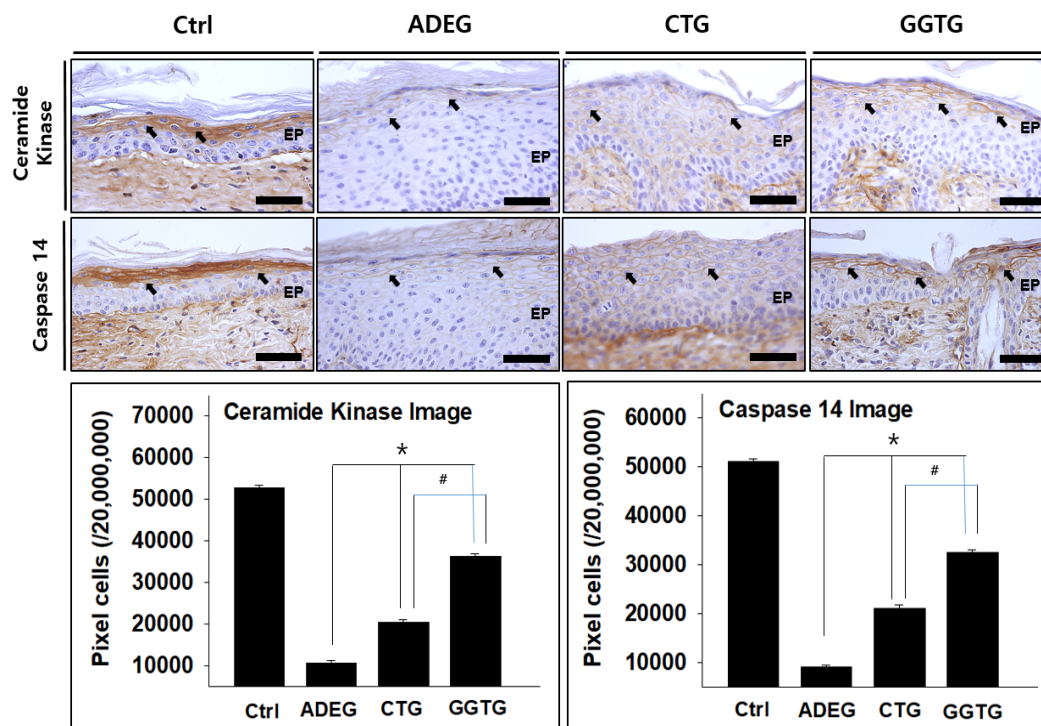


Figure 4. Effects of GGE treatment on the expression of ceramide kinase and caspase-14 in skin tissue (Ceramide kinase and caspase 14 immunohistochemistry; Bar size, 50 μ m).

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

능이상 (skin barrier dysfunction)을 야기하게 된다.

Claudin은 세포 간 밀착연접 (tight junction)을 구축하는 가장 핵심적인 구조 단백질로, 상피세포 간의 간극을 치밀하게 결합함으로써 생체 내 물리적 방어벽을 형성하는 데 중추적인 기여를 한다. 특히 표피 조직에서 claudin은 피부 고유의 물질 투과성을 정교하게 제어하는 역할을 하며, 외래 항원을 비롯한 환경 독소 및 병원체의 체내 유입을 차단하는 필수 불가결한 인자이다. 나이가 이는 표피 장벽의 구조적 보강, 경피 수분 손실의 억제, 국소 면역 방어력 구축은 물론, 세포 극성 (polarity) 유지와 조직 전반의 구조적 안정화 등 다면적인 생리 활성을 주도한다¹⁵⁾. 그러므로 조직 내 claudin의 발현 유도 및 증가는 표피 세포 간 결합력이 견고하게 유지되고 있으며, 이로 인해 피부 전체의 보호 메커니즘이 효과적으로 공고해졌음을 시사한다.

본 연구에서 claudin 양성반응이 Ctrl에 비해 ADEG, CTG, GGTG 모두 감소하였다. Ctrl에 비해 ADEG는 71%, CTG는 55%, GGTG는 12% 감소하였다. GGTG의 Claudin 양성반응은 ADEG에 비해 209%, CTG에 비해 95% 유의성있게 덜 감소하였다. 이러한 결과는 ADEG에서 claudin 발현을 감소시켜 피부 장벽의 견고성 및 밀착 결합 능력이 약화되었음을 의미한다. CTG와 GGTG는 ADEG에 비해 claudin 발현이 감소하였으며, 이는 밀착연접 기능 저하를 억제하고, 피부의 투과성과 물리적 방어력이 개선되었음을 의미한다. 또한 GGTG가 CTG에 비해 claudin 발현이 증가하여 개선효과가 더 뛰어난 것으로 확인되었다. 따라서 GGTG는 피부장벽 기능이 강화되고, 자극이나 감염에 대한 저항성을 높여줄 가능성이 있다고 보여진다.

Toll-like receptor 2 (TLR-2)는 초기 선천 면역 반응을 주도하는 패턴인식 수용체 (Pattern Recognition Receptor)의 일종으로, 표피를 구성하는 상피세포를 비롯해 대식세포 및 호중구 등의 국소 면역세포군 전반에 걸쳐 발현된다. TLR-2는 미생물의 리포테이코산이나 펩티도글리칸 같은 외인성 Pathogen-Associated Molecular Patterns를 선택적으로 인지함으로써, 피부 미세환경 내 유익균과 유해 병원체를 감별하는 데 중추적인 기여를 한다. 아울러 외부 자극에 의해 TLR-2 신호 전달계가 활성화되면 세포 내 NF- κ B 경로의 연쇄 반응을 유도하여 IL-1 β , TNF- α 등 전염증성 사이토카인의 분비를 조절하고, 이를 통해 국소 염증 진행을 제어하며 면역학적 균형을 조율한다. 나이가 TLR-2는 표피 장벽의 수복 촉진은 물론 상피세포의 이상 증식

과 분화 공정에도 깊이 관여하여 피부 장벽 전반의 항상성 유지에 동참한다^{16,17)}. 따라서 조직 내에서 TLR-2의 양성 반응 증가는 표피가 외부 병원체를 능동적으로 감지하여 생체 방어 시스템을 본격적으로 가동하고 있음을 시사하며, 피부 내부의 면역 항상성 조절 메커니즘이 안정적으로 유지되고 있음을 의미한다.

본 연구에서 TLR-2 양성반응은 Ctrl에 비해 ADEG, CTG, GGTG 모두 감소하였다. Ctrl에 비해 ADEG는 69%, CTG는 55%, GGTG는 25% 감소하였다. GGTG의 TLR-2 양성반응은 ADEG에 비해 144%, CTG에 비해 68% 유의성있게 덜 감소하였다. 이러한 결과는 ADEG와 CTG, GGTG에서는 TLR-2 양성반응이 억제되어 피부의 병원체 인식 및 면역 활성 기능이 약화되었으나, GGTG에서는 TLR-2 발현이 훨씬 적게 감소하여 피부 면역계의 병원체 인식 및 면역 방어 능력 감소를 억제시키는 것으로 해석된다.

Na⁺/H⁺ exchanger (NHE)는 나트륨 이온 (Na⁺)과 수소 이온 (H⁺)의 상호 교환을 매개하는 세포막 수송 단백질로, 표피 조직 내에서는 주로 각질층 (stratum corneum)과 과립층 (granular layer)을 중심으로 국소 발현된다. NHE는 세포 내부의 H⁺를 세포 외 공간으로 능동 배출함으로써 표피 표면을 고유의 약산성 환경으로 구축하는 핵심적인 역할을 담당한다. 이러한 pH 조절 작용은 생체 장벽의 형성 및 지질 합성 효소 활성화에 필수적인 조건이며, 궁극적으로는 각질 분해 효소의 활성 유도, 지질 대사 항상성 유지, 그리고 외부 병원체 증식 억제 등 다각적인 방어 기전을 조절한다⁸⁾. 그러므로 조직 내 NHE의 양성 반응 강도가 높게 나타나는 것은 피부 고유의 미세환경 산성도 유지 능력이 견고하며, 표피 장벽의 항상성 조절 메커니즘이 원활하게 작동하고 있음을 보여준다.

본 연구에서 NHE 양성반응이 Ctrl에 비해 ADEG, CTG는 감소하였고 GGTG는 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 67%, CTG는 25% 감소하였고, GGTG는 17% 증가하였다. GGTG의 NHE 양성반응은 ADEG에 비해 252%, CTG에 비해 55% 유의성있게 증가하였다. ADEG는 67% 감소되어 피부 내 산성도 유지 능력이 크게 저하되었는데, 이는 장벽 항상성 악화, 병원균 방어력 저하, 효소 활성 불균형 등을 유발할 수 있다. 반면, GGTG는 17% 증가를 보였으며, 이는 GGTG가 피부의 산성도 유지 능력이 있고, 표피 장벽의 항상성 조절 기능이 있음을 의미한다.

Cathelicidin은 선천적 면역 시스템을 구성하는 대표

적인 항균 펩타이드 (Antimicrobial Peptide, AMP)의 일종으로, 주로 각질형성세포 (keratinocyte) 및 호중구 (neutrophil) 등의 면역 세포군에 의해 합성된다. 이 물질은 특히 표피의 각질층과 과립층을 중심으로 국소 발현되어 병원체에 대한 직접적인 항균 작용을 수행할 뿐만 아니라, 면역 반응의 미세 조절, 국소 감염 저지, 창상 치유 촉진 및 표피 방어벽 수복 등 다각적인 항상성 유지 기능을 담당한다^{19,20}). 따라서 조직 내 Cathelicidin의 양성 반응 강도가 증가하는 것은 외부 유해 인자에 대항하는 피부 자체의 생체 면역 방어 기전이 강화되었으며, 표피 환경의 항상성 조절 능력이 유의미하게 증진되었음을 방증하는 것이다.

본 연구에서 Cathelicidine 양성반응이 Ctrl에 비해 ADEG과 CTG는 감소하였고, GGTG는 증가하였다. Ctrl에 비해 ADEG는 58%, CTG는 35%, 감소하였고, GGTG는 Ctrl에 비해 13% 증가하였다. GGTG의 cathelicidine 양성반응은 ADEG에 비해 170%, CTG에 비해 74% 유의성있게 더 증가하였다 이러한 결과는 ADEG과 CTG에서는 cathelicidin 발현을 억제되었으며, 피부의 항균 방어력 및 면역 활성이 저하되었음을 의미한다. 반면, GGTG에서는 cathelicidin 발현을 증가시켰다. 이는 항균 및 면역 방어 능력을 증진시켰으며, 피부 감염에 대한 자연 방어 기전이 강화되었음을 의미하며, 피부 장벽 기능 및 면역 기능을 동시에 향상시킬 수 있는 유력한 후보물질로 충분한 가능성을 보여준다.

Ceramide kinase는 세라마이드의 인산화 (phosphorylation) 과정을 매개하여 세라마이드-1-인산 (ceramide-1-phosphate, C1P)의 합성을 유도하는 효소이다. 이 대사 기전은 세포 내 신호 전달계를 비롯해 염증 매개 반응, 세포의 생존 능력 및 증식성 조절 등 광범위한 생리적 항상성 유지에 깊이 관여한다. 일반적으로 세라마이드가 세포 자멸사 (apoptosis) 경로를 자극하는 신호 분자로 작용하는 반면, 이를 바탕으로 생성된 C1P는 이와 대조적으로 세포의 사멸을 억제하고 증식을 유도하며 염증 환경을 조성하는 신호 지질의 특성을 지닌다^{21,22}). 결과적으로 ceramide kinase의 활성 및 양성 반응의 발현 증가는 세포 내 C1P 생성이 활발해졌음을 시사하며, 이는 세포 생존 신호의 강화, 염증 반응의 촉진, 그리고 나아가 악성 세포의 비정상적인 생존 기간 연장 과 밀접하게 연계될 수 있다.

본 연구에서 ceramide kinase 양성반응은 Ctrl보다 모든 실험군에서 낮았다. ADEG는 Ctrl에 비해 80%, CTG는 61%, GGTG는 31% 감소하였다. GGTG에서는

ADEG와 CTG보다 유의하게 높게 나타났다. 이는 감초시탕 추출물이 피부손상에 의해 감소한 ceramide kinase 발현을 부분적으로 회복시켰음을 보여준다.

Caspase-14는 일반적인 apoptosis 경로와 직접적인 인과관계를 갖지 않는 독특한 형태의 비정형 caspase이다. 이 효소는 표피 (epidermis)의 세포 각화 (keratinization) 기전에 선택적으로 작용하며, 특히 과립층 (granular layer)에서 각질층 (stratum corneum)으로 이행되는 분화 및 구조적 성숙 단계를 조절하는 데 특이성을 지닌다. 구체적으로는 filaggrin을 비롯한 주요 표피 단백질의 제한적 분해를 유도함으로써 천연 보습 인자 (natural moisturizing factor, NMF)의 합성을 촉진하고, 이를 통해 피부 장벽의 구조적 완성도와 표피 내 수분 보유 능력을 유지하는 핵심적인 임무를 수행한다²³). 결론적으로 조직 내 caspase-14의 양성 반응 강도가 증가하는 것은 표피 세포의 정상적인 각질화 과정이 활발히 진행되고 있으며, 피부의 방어 장벽이 안정적으로 성숙하고 있음을 보여주는 것이다.

본 연구에서 ADEG, CTG, GGTG에서 모두 Caspase-14 양성반응이 감소하였다. 이는 세 개의 군 모두 피부 장벽의 성숙 (각질화) 수준이 감소했음을 의미한다. ADEG는 Ctrl에 비해 82% 감소하였고, CTG는 59%, GGTG는 36% 감소하였다. GGTG의 caspase 14 양성반응은 ADEG에 비해 254%, CTG에 비해 55% 유의성있게 덜 감소하였다. ADEG에서 가장 크게 감소하여 피부 장벽 형성 기능이 가장 약화되었을 가능성이 높은 반면, GGTG는 감소 폭이 가장 작아 상대적으로 건전한 각질화 과정이 이루어졌다고 볼 수 있다. 따라서 GGTG는 장벽 성숙에 미치는 영향이 가장 작고, 상대적으로 피부 보호 효과가 더 우수할 가능성이 있다.

이러한 연구 결과들을 종합해 볼 때, 감초시탕 추출물은 아토피피부염 유발로 인해 붕괴된 표피층의 물리적, 면역학적 방어벽을 효과적으로 회복하고 장벽 항상성을 재정립하는 유의미한 치료 효과를 입증하였다. 특히 감초시탕 추출물이 표피의 생체 보습, 항균 방어, 세포 간 밀착연접 매커니즘을 다각도로 활성화한다는 본 연구의 결과는, 향후 감초시탕이 안전성과 유효성을 갖춘 천연물 기반의 아토피피부염 치료 물질로서 임상적 활용 가능성이 매우 높음을 시사한다.

그럼에도 불구하고, 본 연구는 몇 가지 방법론적 한계점을 가진다. 본 연구는 인위적으로 병태를 유도한 생쥐 모델을 대상으로 진행된 전임상 단계의 동물 실험이기에, 설치류와 인간 피부 조직 간의 해부생리학

적 차이에서 기인하는 간극을 완벽히 극복하기 어렵다는 점에서 실제 임상 현장에 즉각적으로 반영하기에는 제한이 있다. 더욱이 실제 인간에게 발병하는 아토피 피부염의 경우, 다인자성 유전적 소인과 다변화된 면역학적 이상 징후가 복합적으로 얹혀 발현되지만, 본 연구에서는 이러한 유전적 배경의 다양성과 복잡성을 온전히 담아내지 못했다는 아쉬움이 존재한다.

결론적으로 본 연구의 기초 성과를 보다 가치 있게 발전시키기 위해서는 향후 유효 성분의 구체적인 세포 내 신호 전달 경로 및 분자생물학적 표적 기전을 규명하는 고도화된 후속 연구가 선행되어야 한다. 나아가 궁극적으로는 실제 인간 환자를 대상으로 안전성과 임상적 효용성을 검증하는 무작위 대조 임상시험이 반드시 수행되어야 할 것으로 사료된다.

V. Conclusion

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

1. GGTG에서는 ADEG와 CTG에 비해 피부염 붕괴가 회복되었다.
2. Claudin 양성반응은 GGTG가 ADEG에 비해 209%, CTG에 비해 95% 유의성있게 덜 감소하였다.
3. TLR-2 양성반응은 GGTG가 ADEG에 비해 144%, CTG에 비해 68% 유의성있게 덜 감소하였다.
4. NHE 양성반응은 GGTG가 ADEG에 비해 252%, CTG에 비해 55% 유의성있게 증가하였다.
5. Cathelicidine 양성반응은 GGTG가 ADEG에 비해 170%, CTG에 비해 74% 유의성있게 증가하였다.
6. Ceramide kinase 양성반응은 GGTG가 ADEG에 비해 243%, CTG에 비해 78% 유의성있게 덜 감소하였다.
7. Caspase 14 양성반응은 GGTG가 ADEG에 비해 254%, CTG에 비해 55% 유의성있게 덜 감소하였다.

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 isopeptide 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. Wang CY, Kao TC, Lo WH, Inbaraj BS, Chen BH. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory bio-activities of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2011;59(14): 7715-26.
13. Yang R, Yuan BC, Ma YS, Zhou S, Liu Y. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. *Pharmaceutical Biology.* 2017;55(1):5-18.
14. 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.
15. 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, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):773-86.
16. 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.
17. Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int.* 2013;62(2):151-61.
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. Choi MJ, Maibach HI. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am J Clin Dermatol.* 2005;6(4):215-23.
22. 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.
23. Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, Scott IR. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci.* 2000;22(1):21-52.