

龍芽草 유기용매 분획물의 항산화 및 피부 장벽 개선 효과

한제근^{1#}, 김민주^{2#}, 박해진³, 이경하⁴, 노성수^{5*}

1 : (주)원일바이오, 2 : 대구한의대학교 간질환한약융복합활용연구센터
3 : 대구한의대학교 바이오융복합시험센터, 4 : 부산대학교 분자생물학과
5 : 대구한의대학교 한의학과 본초약리학교실

Anti-oxidant Activity and Skin Barrier Function Measured in Different Solvent Fractions Obtained from Agrimoniae Herba

Jegeun Han^{1#}, Min Ju Kim^{2#}, Hae-Jin Park³, Kyung-Ha Lee⁴, Seong-Soo Roh^{5*}

1 : WONIL BIO, 2 : Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Daegu Haany University
3 : DHU Bio Convergence Testing Center, 4 : Department of Molecular biology, Pusan National University
5 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Agrimoniae Herba is a herbal medicine widely distributed in Asia and contains flavonoids including catechin, quercitrin, rutin, hyperoside, and quercetin. This study aimed to investigate the anti-oxidant activity and skin barrier function of different solvent fractions (Hexane; methylene chloride, MC; ethyl acetate, EA; n-butanol, Bu; Water) obtained from Agrimoniae Herba.

Methods : Anti-oxidant activity of different solvent fractions obtained from Agrimoniae Herba was investigated through total polyphenol contents, total flavonoid contents, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity measurements. Then, filament aggregating protein (Filaggrin), Type I collagen, ceramide synthase (CERS) 3, and CERS4 were analyzed to evaluate the skin barrier strengthening effect of different solvent fractions obtained from Agrimoniae Herba on UVB-stimulated HaCaT cells.

Results : As a result of measuring total polyphenol contents, total flavonoid contents, DPPH free radical scavenging activity, and ABTS radical scavenging activity, antioxidant activity was found to be excellent in the order of EA > Bu > MC > Hexane > Water. As a result of measuring mRNA gene expression of Type I collagen, Filaggrin, CERS3, and CERS4 after UVB-stimulated was applied to HaCaT cells treated with different solvent fractions obtained from Agrimoniae Herba, it was found to increase significantly in the Bu-treated group.

Conclusion : Our findings show that the Bu sample obtained from Agrimoniae Herba has excellent anti-oxidant ability, which increases Type I collagen, Filaggrin, and ceramide synthetase in UVB-stimulated HaCaT cells to control the skin barrier improvement effect.

Key words : Agrimoniae Herba, Anti-oxidant, Skin barrier function, HaCaT cells.

* Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First Author : Jegeun Han, WONIL BIO, 41 Bioballey 2-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27159, Republic of Korea.

· Tel : +82-43-648-8878 · Fax : +82-43-651-8878 · E-mail : hani2859@naver.com

Min Ju Kim, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : mj8976@naver.com

· Received : 17 April 2023 · Revised : 04 May 2023 · Accepted : 25 May 2023

I. 서론

노화가 진행되면 사람의 피부는 신진대사 조절에 영향을 미치는 호르몬 분비 억제, 면역 및 피부 세포 활성 저하 등으로 생기게 되는 내인성 노화와 외부의 자극으로부터 피부 외관의 아름다움을 상실하게 된다¹⁾. 특히 최근에는 자외선, 각종 오염물질 등의 증가로 인해 직접적 및 간접적으로 주변 환경 등에 영향을 미치게 되어 인체에 해를 끼치게 되는데 그중 체외 보호기관인 피부에도 영향을 미치게 되어 건조증, 아토피 등의 피부 장벽 손상을 유발한다²⁾. 인간의 피부 각질층은 외력에 의해 생기는 기계적 손상과 병원균 및 방사선의 체내 침투로부터 보호하는 1차 방어선 역할을 하며, 최소한의 경표피수분 손실량을 유지해 체내 항상성 조절하는 기능을 한다³⁾. 자외선에 의해 피부가 손상되면 표면의 수분량이 줄어들게 되는데 이는 피부 각질층의 유연성 상실로 이어지게 되며 건성 피부를 일으키게 된다⁴⁾. 따라서 건강한 피부 상태를 위해 피부 수분량을 유지하는 것이 중요한 요소라고 할 수 있다. 이에 최근에는 피부 장벽 기능 조절에 효과적인 천연소재 개발에 관심이 높아지고 있는 추세이다⁵⁾.

龍芽草 (*Agrimoniae Herba*)는 장미과 (*Rosaceae*)에 속하는 다년생 본초인 짚신나물 (*Agrimonia pilosa* Ledeb.)의 순채를 건조한 것으로 性味는 平苦澁하며 收斂止血, 解毒殺蟲, 截癰止痛의 효능을 지니고 있어 예로부터 咯血, 崩漏下血, 吐血, 血痢脫力勞傷 등과 같은 出血症과 瘧疾, 陰痒帶下, 癰腫瘡毒 등의 증상에 사용된다⁶⁾. 龍芽草에는 catechin, quercitrin, rutin, hyperoside, quercetin과 같은 flavonoid 성분이 함유되어 있는데 이 성분들은 항산화 및 항염증 효과가 있다고 알려져 있다⁷⁻¹⁰⁾. 또한 최근 龍芽草의 간 보호 효과, 항산화 효소 활성 증진 효과, 항알레르기 효과, 혈관이완 효과, 항염 효과, 폐암 종양 크기 감소 효과 등과 같은 다양한 실험 연구가 보고되었다¹¹⁻¹⁷⁾.

본 연구에서는 龍芽草 유기용매 분획물의 항산화 및 피부 장벽 조절에 대한 효과를 비교하기 위해 *in vitro* 실험을 진행하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 龍芽草는 (주)태극인 (Yeongcheon-si, Korea), (주)동의한재 (Seoul, Korea), 참한약초 (Gimhae-si, Korea), 두손약초 (Yeongcheon-si, Korea), 한뜻약초 (Hwaseong-si, Korea), 참두리 (Seoul, Korea), 지리산약초골 (Sancheong-gun, Korea), 약초홍삼사랑 (Seoul, Korea) 에서 구매하여 동량으로 혼합하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 sodium carbonate, ethanol, gallic acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), hexane, quercetin, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, n-butanol (Bu), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium hydroxide, 7 mM 2,2'-azino-bis(3-

ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS), ethyl acetate (EA), methylene chloride (MC) 및 1,1-diphenyl-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)은 Sigma aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그리고 L-ascorbic acid, Trizol-reagent, Maxima cDNA Synthesis kit, SYBR Primix Ex Taq 및 aluminium chloride는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에서 사용한 HaCaT 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포 배양에 사용된 penicillin, fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS) 및 dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA)에서 구매하여 사용하였다. Filaggrin, Type I collagen, ceramide synthase (CERS) 3, CERS4 gene은 Bio-Rad Laboratories, Inc. (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 시료 추출 및 분획물 제조

Ethanol 1,000 mL에 龍芽草 100 g을 넣고 상온에서 24 시간 교반 추출을 이용하여 2회 반복 추출하였다. 추출된 추출액은 정성여과지를 사용해 여과하였다. 그 후 남아있는 잔류물에 추출 및 여과과정을 한 번 더 시행해 주었다. 여과한 추출액을 회전감압 농축기를 사용해 농축한 후 동결건조기를 사용하여 완전히 건조하여 분말상태의 龍芽草 에탄올 추출물을 획득하였다 (수율 6.87%). 위의 방법을 반복하여 분획에 사용될 龍芽草 ethanol 추출물 53.87 g을 획득하였다. 획득된 龍芽草 ethanol 추출물을 증류수로 녹인 후 Hexane, MC, EA, Bu을 이용하여 순차적으로 분획하였다. 각 분획물들은 회전감압 농축기를 사용해 농축하여 각 분획물의 분말을 획득하였다 (Hexane, 11.36 g; MC, 4.42 g; EA, 4.29 g; BuOH, 7.26 g).

3. Total polyphenol 및 flavonoid 함량

Folin Ciocalteu's의 방법을 시료의 total polyphenol 함량을 분석하였다¹⁸⁾. 먼저 e-tube에 100 μ L의 龍芽草 유기용매 분획물과 10% Folin-ciocalteu's phenol reagent 500 μ L, 7.5% sodium carbonate 400 μ L를 넣고 잘 혼합한 뒤 30분간 빛을 차광하여 반응시킨 후, UV 분광광도계 (Infinite M200, Tecan, Männedorf, ZH, Switzerland)로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 standard로 사용하였으며, 龍芽草 유기용매 분획물 내 total polyphenol 함량을 mg gallic acid equivalents (GAE)/g으로 나타내었다.

龍芽草 유기용매 분획물 내 total flavonoid 함량을 Aluminium chloride를 사용한 비색법으로 측정하였다¹⁹⁾. 먼저 e-tube에 100 μ L의 龍芽草 유기용매 분획물과 10% aluminium chloride solution 20 μ L, 1M potassium acetate solution 20 μ L, 증류수 560 μ L를 넣고 잘 혼합한 뒤 30분간 빛을 차광한 상태로 반응시킨 후, 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 standard로 사용하였으며, 龍芽草 유기용매 분획물 내 total flavonoid 함량을 mg quercetin equivalents (QE)/g으로 나타내었다.

4. DPPH free radical scavenging activity

Blois 방법을 사용하여 龍芽草 유기용매 분획물의 DPPH free radical scavenging activity을 구하였다²⁰⁾. 농도별로 희석된 龍芽草 유기용매 분획물 100 μ L와 60 μ M DPPH 용액 100 μ L를 96-well plate에 넣고 30분간 빛을 차광하여 반응시킨 후, UV 분광광도계를 사용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 양성대조시약으로 사용하였다. 그 후, 龍芽草 유기용매 분획물을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 억제하는데 필요한 龍芽草 유기용매 분획물의 농도를 half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀)으로 나타내었다.

5. ABTS radical scavenging activity

龍芽草 유기용매 분획물의 항산화능을 확인하기 위해 ABTS radical scavenging activity을 분석하였다²¹⁾. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합한 후 빛을 차광하여 약 15시간 동안 반응시켜 ABTS⁺를 만든 다음, ethanol에 희석하여 415 nm에서 흡광도 0.70±0.02의 값이 측정되는 ABTS 용액을 만들어주었다. 그 후 ABTS 용액 95 μ L와 농도별로 희석된 龍芽草 유기용매 분획물 5 μ L를 96-well plate에 넣고 잘 혼합하여 15분 반응시킨 후 UV 분광광도계로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-ascorbic acid를 양성대조시약으로 사용하였다. 그 후, 龍芽草 유기용매 분획물을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 억제하는데 필요한 龍芽草 유기용매 분획물의 농도를 IC₅₀으로 나타내었다.

6. 세포배양

10% heat-inactivated FBS과 1% penicillin 및 streptomycin을 포함한 DMEM에서 HaCaT 세포를 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고 세포의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA solution을 처리하여 세포를 부유시킨 다음 계대배양하였다.

7. 세포 생존율

HaCaT 세포를 well당 1×10⁶ cells로 96-well culture plate에 180 μ L 분주하고 24시간 동안 배양한 다음, 농도별 (1, 5, 10, 50, 100 및 500 μ g/mL)로 희석한 龍芽草 유기용매 분획물을 처리하여 24시간 배양하였다. 대조군은 龍芽草

유기용매 분획물과 동일한 양의 증류수를 처리한 후 동일한 조건으로 배양하였다. 그 후, 무혈청 배지로 교체하고 5 mg/mL의 MTT 용액을 20 μ L 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후, 배양액을 제거하고 well 당 DMSO:Ethanol (1:1) 150 μ L를 첨가하여 실온에서 30분 반응시킨 뒤 UV 분광광도계로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 龍芽草 유기용매 분획물 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율 (%)로 나타내었다.

8. Type I procollagen 및 filaggrin 함량

세포를 24-well plate (5×10⁴ cells/well)에 분주하고 24시간 후에 배지를 제거한 뒤 PBS로 2회 세척한 후 무혈청배지를 추가하였다. 24시간 배양한 후에 농도별로 희석한 龍芽草 유기용매 분획물을 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 그 다음 배양액에 UVB 312 nm (20 mJ/cm²)의 자극을 가하였고, collagen의 함량은 Type I procollagen ELISA kit (Takara Bio Inc., Otsu Shiga, Japan)를 사용하여 측정하였다.

세포를 24-well plate (1×10⁴ cells/well)에 분주하고 24시간 배양해주었다. 그 후, 배지를 제거한 뒤 PBS로 2회 세척한 후 무혈청배지를 추가하였다. 24시간 배양한 후에 농도별로 희석한 龍芽草 유기용매 분획물을 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양액에 UVB 312nm (20 mJ/cm²)를 자극한 후 Filaggrin ELISA Kit (LSBio Inc., WA, USA)를 사용하여 함량을 측정하였다.

9. Quantitative Realtime PCR

Trizol-reagent를 사용하여 total RNA의 분리하였다. M-MLV RT5 × buffer 8 μ L, 10 mM dNTPs 3 μ L, 10,000 U RNase inhibitor 0.45 μ L, 50,000 UM-MLV reverse transcriptase 0.3 μ L 및 50 pmol/ μ L oligo dT 1.5 μ L를 분리한 total RNA 3 μ g와 혼합하여 40 μ L의 부피로 역전사 반응을 하였다. 역전사로 만들어진 complementary DNA (cDNA)에 5×green Go Taq flexi buffer 4 μ L, 10 mM dNTPs 0.4 μ L, 500 U Taq polymerase 0.1 μ L 및 25 mM MgCl₂ 1.2 μ L를 혼합하였다. 그 다음, Filaggrin, Type I collagen, CERS3, CERS4 및 β -actin 유전자들에 대한 20 pmol/ μ L의 sense primer와 20 pmol/ μ L의 antisense primer를 넣은 뒤 PCR을 실시하였으며, 각 primer의 염기 서열은 Table1에 나타내었다.

Table 1. Primer sequences used for PCR analysis

| Primer | Sequences |
|---------------------|--|
| Filaggrin | sense (5' → 3') TGAGGCATACCCAGAGGACT |
| | antisense (3' → 5') CACTTCCGTGCTGAGAGTGT |
| Type I collagen | sense (5' → 3') CTGGTCCCAAGGGTAACAG |
| | antisense (3' → 5') GCCAGGAGAACCACGTTC |
| Ceramide synthase 3 | sense (5' → 3') TGTACACGATGTGGCTGACA |
| | antisense (3' → 5') GCGTCCATCCAGCATAAGA |
| Ceramide synthase 4 | sense (5' → 3') CACCCCCAGGACTTGTTG |
| | antisense (3' → 5') GGGCAGGCCAATGAATCT |
| β -actin | sense (5' → 3') TCATGTTTGAGACCTTCAA |
| | antisense (3' → 5') GTCCTTGCGGATGTCCAGC |

10. 통계분석

실험에 사용된 값들은 mean \pm SEM으로 표시하였으며, t-test로 검증을 실시하여 유의수준 $p < 0.05$ 일 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

III. 결 과

1. Total polyphenol 및 flavonoid 함량

실험에 사용된 龍芽草 유기용매 분획물의 total polyphenol 및 flavonoid 함량을 측정하였다. Total polyphenol 함량 (mg GAE/g) 측정결과, Hexane 58.46 ± 2.16 , MC 99.68 ± 0.68 , EA 354.95 ± 0.38 , Bu 282.90 ± 0.98 , Water 42.21 ± 0.30 으로 측정되었으며 (Table 2), total flavonoid 함량 (mg QE/g) 측정결과, Hexane 15.86 ± 0.25 , MC 66.20 ± 0.23 , EA 49.88 ± 0.29 , Bu 50.41 ± 0.05 , Water 8.45 ± 0.27 으로 나타났다 (Table 3).

Table 2. Total polyphenol content

| Sample | Total polyphenol (mg GAE/g) |
|---------------------|-----------------------------|
| Hexane | 58.46 ± 2.16 |
| MC | 99.68 ± 0.68 |
| Agrimoniae Herba EA | 354.95 ± 0.38 |
| Bu | 282.90 ± 0.98 |
| Water | 42.21 ± 0.30 |

Table 3. Total flavonoid content

| Sample | Total flavonoid (mg QE/g) |
|---------------------|---------------------------|
| Hexane | 15.86 ± 0.25 |
| MC | 66.20 ± 0.23 |
| Agrimoniae Herba EA | 49.88 ± 0.29 |
| Bu | 50.41 ± 0.05 |
| Water | 8.45 ± 0.27 |

2. DPPH and ABTS radical scavenging activity

실험에 사용된 龍芽草 유기용매 분획물의 DPPH 및 ABTS radical scavenging activity를 측정하였다. DPPH free radical scavenging activity IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) 측정결과, Hexane 14.57 ± 0.51 , MC 23.24 ± 0.30 , EA 2.81 ± 0.09 , BuOH 4.74 ± 0.09 , Water 27.04 ± 0.45 로 측정되었으며 (Table 4), ABTS radical scavenging activity IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) 측정결과, Hexane 46.59 ± 0.17 , MC 32.86 ± 0.53 , EA 9.69 ± 0.13 , BuOH 14.20 ± 0.16 , Water 115.67 ± 0.78 으로 나타났다 (Table 5).

Table 4. DPPH free radical scavenging activity

| Sample | DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|-------------------------------------|
| L-ascorbic acid | 1.06 ± 0.01 |
| Hexane | 14.57 ± 0.51 |
| MC | 23.24 ± 0.30 |
| Agrimoniae Herba EA | 2.81 ± 0.09 |
| Bu | 4.74 ± 0.09 |
| Water | 27.04 ± 0.45 |

Half-maximal inhibitory concentration; IC_{50} . All values are represented using 3 independent experiments expressed mean \pm SEM.

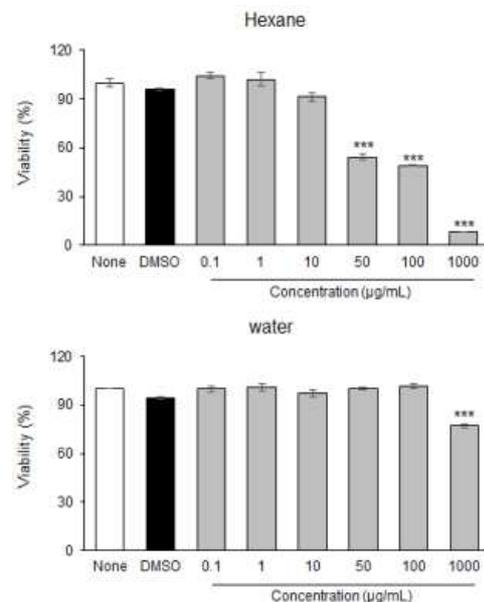
Table 5. ABTS radical scavenging activity

| Sample | ABTS IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|-------------------------------------|
| L-ascorbic acid | 3.23 ± 0.03 |
| Hexane | 46.59 ± 0.17 |
| MC | 32.86 ± 0.53 |
| Agrimoniae Herba EA | 9.69 ± 0.13 |
| Bu | 14.20 ± 0.16 |
| Water | 115.67 ± 0.78 |

Half-maximal inhibitory concentration; IC_{50} . All values are represented using 3 independent experiments expressed mean \pm SEM.

3. 세포 생존율

인간유래 각질세포인 HaCaT 세포에서 龍芽草 유기용매 분획물의 세포 생존율 측정결과, Hexane의 경우 $10 \mu\text{g/mL}$, MC의 경우 $50 \sim 100 \mu\text{g/mL}$, EA의 경우 $100 \mu\text{g/mL}$, Bu의 경우 $100 \mu\text{g/mL}$, Water의 경우 $100 \mu\text{g/mL}$ 에서 세포독성을 보이지 않는 최대 처리 농도로 나타났기에 피부장벽 개선 가능성 평가에 안전한 농도를 결정하였다 (Figure 1).



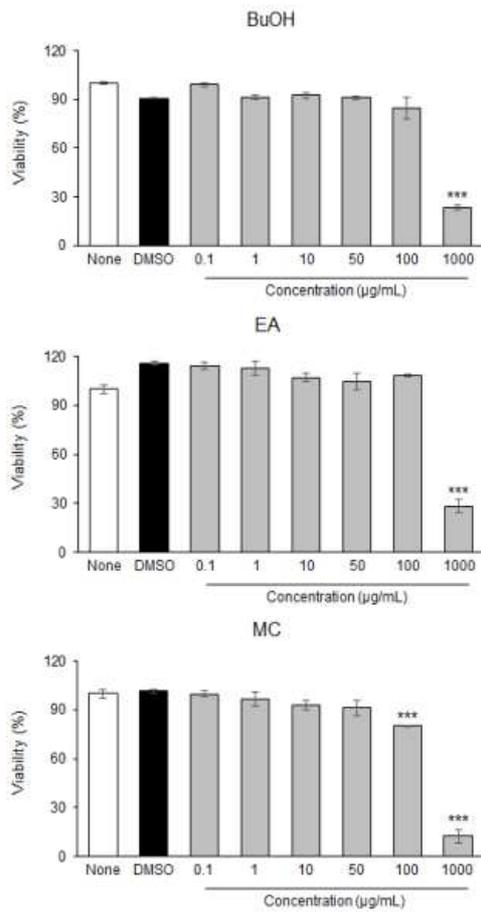


Figure 1. Cells viability effects of solvent fractions obtained from a Agrimoniae Herba extract in HaCaT cells. All data are expressed mean±SEM (n=3). Significance: *** $p < 0.001$ vs. DMSO group by t-test.

4. Type I procollagen 및 Filaggrin 함량

세포배양액에서 龍芽草 유기용매 분획물이 Type I procollagen과 Filaggrin 생성량에 미치는 영향을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다 (Figure 2). 그 결과, 자외선으로 자극 받은 UVB군과 비교하여 龍芽草 유기용매 분획물 처리군들에서 생성량이 증가하는 경향이 나타났으며, 특히 Bu층 처리군에서 UVB군의 생성량 보다 Type I procollagen 28.59%, Filaggrin 20.87% 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$).

5. 피부장벽 조절 인자의 발현

1) Type I collagen 및 Filaggrin

자외선과 龍芽草 유기용매 분획물을 각각 처리한 후, Type I collagen 및 Filaggrin mRNA 유전자 발현을 분석하였다 (Figure 3). Type I collagen의 결과, 자외선으로 자극 받은 UVB군과 비교하여 Water층과 MC층을 제외한 龍芽草 유기용매 분획물 처리군들에서 생성량이 증가하는 경향이 나타났으며, 특히 Bu층 처리군에서 UVB군의 발현량 보다 29.41% 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). Filaggrin의

결과, Hexane층과 MC층을 제외한 모든 군에서 UVB군 보다 발현량이 증가하였으며, Bu층의 경우 UVB군과 비교하여 27.69% 유의하게 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$).

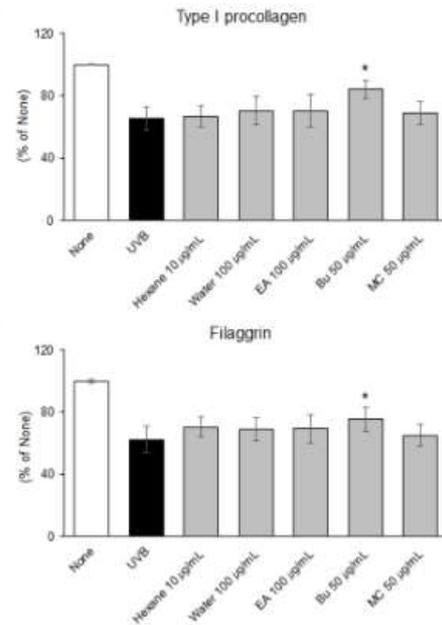


Figure 2. Effects of solvent fractions obtained from a Agrimoniae Herba extract on the Type I procollagen and Filaggrin levels in HaCaT cells. All data are expressed mean±SEM (n=3). Significance: * $p < 0.05$ vs. UVB group by t-test.

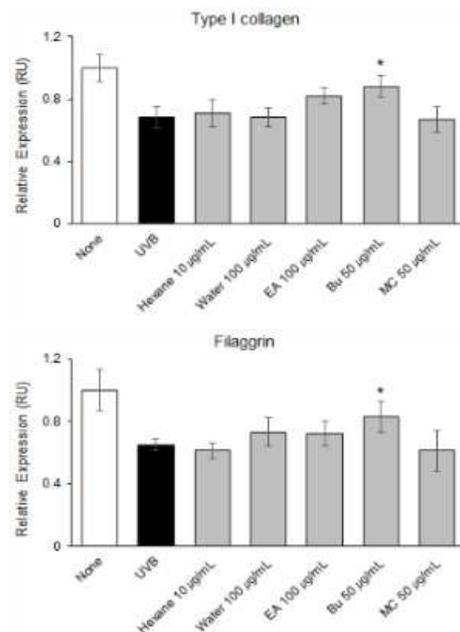


Figure 3. Effect of solvent fractions obtained from a Agrimoniae Herba extract on mRNA expression of Type I collagen and filaggrin in HaCaT cells. All data are expressed mean±SEM (n=3). Significance: * $p < 0.05$ vs. UVB group by t-test.

2) Ceramide 합성관련 효소

자외선과 龍芽草 유기용매 분획물을 각각 처리한 후, Ceramide 합성 관련 효소인 CERS3와 CERS4 mRNA 유전자 발현을 분석하였다 (Figure 4). CERS3의 결과, 모든 龍芽草 유기용매 분획물 처리군들에서 자외선으로 자극 받은 UVB군 보다 발현량이 증가하였으며, 그 중 Bu층과 MC층이 UVB군 보다 각각 19.05% ($p < 0.05$), 20.63% ($p < 0.01$) 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. CERS4의 발현량 또한 모든 龍芽草 유기용매 분획물 처리군들에서 UVB군 보다 발현량이 증가하는 경향이 나타났으며, 특히 Bu층과 MC층이 UVB군 보다 각각 15.07% ($p < 0.01$), 8.22% ($p < 0.05$) 유의하게 증가하였다.

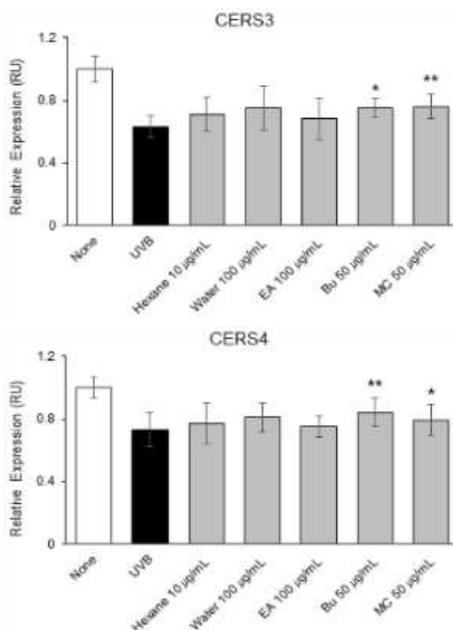


Figure 4. Effect of solvent fractions obtained from a Agrimoniae Herba extract on mRNA expression of CERS3 and CERS4 in HaCaT cells. All data are expressed mean \pm SEM (n=3). Significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. UVB group by t-test.

V. 고 찰

피부는 인체의 가장 외부에 위치하며 체내 수분의 손실과 항원, 미생물 등의 외부 유해인자의 내부 침입을 방어하는데 필수적인 장벽의 역할을 한다²²⁾. 피부장벽은 cholesterol, ceramides 및 유리지방산으로 구성된 피부 지질로 둘러싸인 각질세포로 구성된 각질층에 의해 기능이 작용된다^{23,24)}. 그렇기에 외부 또는 내부 자극으로 인하여 피부 각질층의 손상이 과하게 일어나게 되면 피부 건조증, 지질 형성 변이, 알레르기 등을 유발될 수 있다²⁵⁾.

이에 본 연구에서는 龍芽草 유기용매 분획물의 항산화능과 자외선 조사로 자극된 피부각질세포인 HaCaT 세포에 미치는 피부장벽 개선 효과에 대하여 알아보았다.

산화 스트레스는 다양한 산화환원 민감 경로를 통해 여러 피부 질환의 발달에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다²⁶⁾. 이에

龍芽草 유기용매 분획물의 항산화능을 비교하기 위해 total polyphenol 및 flavonoid 함량, DPPH 및 ABTS radical scavenging activity를 측정하였다. Total polyphenol 결과, EA > Bu > MC > Hexane > Water 순으로 함량이 높게 측정되었으며, total flavonoid 결과, MC > Bu > EA > Hexane > Water 순으로 나타났다. DPPH free radical scavenging activity 측정결과, EA > Bu > Hexane > MC > Water 순으로 나타났으며, ABTS radical scavenging activity 측정결과, EA > Bu > MC > Hexane > Water 순으로 측정되었다. 이상의 결과들을 종합하였을 때 EA > Bu > MC > Hexane > Water 순으로 龍芽草 유기용매 분획물의 항산화능 우수한 것을 확인할 수 있었다.

인간유래 각질세포인 HaCaT 세포에서 龍芽草 유기용매 분획물 처리 후 생존율을 측정한 결과, Hexane 10 µg/mL, MC 50~100 µg/mL, EA 100 µg/mL, Bu 100 µg/mL, Water 100 µg/mL 처리 농도에서 세포독성 나타나지 않았기에 이후 피부장벽 개선 기능성 평가에 안전한 농도로 설정하였다.

그 후 HaCaT 세포에 자외선 조사로 자극을 주어 龍芽草 유기용매 분획물의 피부장벽 개선 효과를 알아보았다. 피부의 주름 및 탄력에 관여하는 collagen은 외부 또는 내부 자극, 노화 등에 의해 합성량이 줄어들게 된다²⁷⁾. 이에 龍芽草 유기용매 분획물을 각각 처리한 HaCaT 세포에 자외선 조사 후, 배양액 내 Type I procollagen 생성량과 Type I collagen mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 자외선을 조사로 인하여 감소한 collagen 생성량을 Bu층 처리군에서 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다.

피부장벽은 섬유질 구조 단백질 (Collagen 및 Keratin)과 Filament 관련 단백질 (Filaggrin, Involucrin 및 Loricrin)의 조합으로 구성되는데 이들은 각질 분화과정에서 중요한 역할을 한다²⁸⁾. 이 중 Filaggrin은 피부 수분 유지에 필요한 천연 보습 인자에 영향을 주기에 피부장벽 기능을 유지하는 가장 중요한 요소이다⁴⁾. 이에 배양액 내 생성량과 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 자외선을 조사한 UVB군과 비교하여 Bu층 처리군에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.

Ceramide는 각질층 지질의 구성요소 중 하나로 강력한 수소 결합력을 지니고 있어 피부 수분 유지에 중요한 역할을 한다²⁹⁻³¹⁾. 이에 ceramide 합성에 관여하는 CERS3와 CERS4 mRNA 유전자 발현을 분석한 결과, 자외선 조사로 감소한 ceramide를 Bu층과 MC층 처리로 유의한 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과들을 종합해보면, 龍芽草 유기용매 분획물들은 모두 우수한 항산화능을 지니고 있으나 그 중 EA층과 Bu층이 가장 우수했으며, Bu층의 경우 자외선 조사로 자극을 받은 HaCaT 세포에서 Type I collagen, Filaggrin, ceramide 합성효소를 유의적으로 증가시켜 피부장벽 개선 효과를 지니고 있는 것으로 사료된다. 그러나 항산화능이 제일 높은 것으로 나타난 EA층은 피부장벽 및 항산화 유전자 관련 실험을 통해 추가적인 분석을 해볼 필요성이 있는 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서는 龍芽草 유기용매 분획물의 항산화능과 자외선 조사로 자극된 피부각질세포인 HaCaT 세포에 미치는 피부장벽 개선 효과에 대하여 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 龍芽草 유기용매 분획물의 항산화능을 측정하기 위해 total polyphenol 및 flavonoid 함량, DPPH 및 ABTS radical scavenging activity를 측정한 결과, EA > Bu > MC > Hexane > Water 순으로 龍芽草 유기용매 분획물의 항산화능 우수한 것으로 나타났다.
2. HaCaT 세포의 생존율은 여러 농도의 Hexane 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MC 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Bu 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Water 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 농도에서 세포 독성을 지니고 있지 않는 것으로 나타났다.
3. 龍芽草 유기용매 분획물을 각각 처리한 HaCaT 세포에 자외선 조사로 자극을 준 후 Type I collagen을 측정된 결과, Bu층 처리군에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.
4. 또한 Filaggrin을 측정한 결과, Bu층 처리군에서 유의하게 증가하였다.
5. Ceramide 합성 효소인 CERS3와 CERS4 mRNA 유전자 발현 결과, Bu층과 MC층 처리군에서 유의하게 발현이 증가하는 것으로 나타났다.

결과적으로 龍芽草 유기용매 분획물 중 Bu층은 우수한 항산화능을 지니므로써 자외선 조사로 자극된 HaCaT 세포에서 Type I collagen, Filaggrin, ceramide 합성효소를 증가시켜 피부장벽 개선 효과를 조절하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2023년도 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었습니다 (No. 2018R1A5A2025272).

References

1. Choi JH, Hwang SJ, Jeong SN, Lee YK, Jin MH, Park SG, Lee CK. Anti-aging Effect on Skin with 9 Repetitive Steaming and Fermenting Process Herbal Composition Extract. *J. Herbology* 2009;24(4):101-6.
2. Kim HS. Effect of *Nepeta cataria* extract on the skin barrier function. *Korean J. Food Preserv.* 2020;27(2):242-6. doi:org/10.11002/kjfp.2020.27.2.242.
3. Chaquour B, Seit  S, Coutant K, Fourtanier A, Borel JP, Bellon G. Chronic UVB- and all-trans retinoic-acid-induced qualitative and quantitative changes in hairless mouse skin. *J Photochem Photobiol B.* 1995;28(2):125-35. doi:10.1016/1011-1344(94)07080-8.
4. Jeon HY, Kim JK, Kim WG, Lee SJ. Beneficial Effect of Curcumin on Epidermal Permeability Barrier Function in Hairless Rat. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 2008;40(6):686-90.
5. Park CS. Skin barrier and beauty foods. *Food Sci.* 2008;40:19-26. doi:org/10.23093/FSI.2007.40.4.19.
6. Choi YS, Kim YS. Neuroprotective Effects of *Agrimoniae Herba* against Intrastriatal Hemorrhage in Rats. *Kor. J. Herbology* 2010;25(4):31-7.
7. Xu X, Qi X, Wang W, Chen G. Separation and determination of flavonoids in *Agrimonia pilosa* Ledeb. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Sep Sci.* 2005;28(7):647-52. doi:10.1002/jssc.200400095.
8. Pan Y, Liu HX, Zhuang YL, Ding LQ, Chen LX, Qiu F. [Studies on isolation and identification of flavonoids in herbs of *Agrimonia pilosa*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2008;33(24):2925-8.
9. Kumar A, Sehgal N, Kumar P, Padi SS, Naidu PS. Protective effect of quercetin against ICV colchicine-induced cognitive dysfunctions and oxidative damage in rats. *Phytother Res.* 2008;22(12):1563-9. doi: 10.1002/ptr.2454.
10. Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J, Shytle RD. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation.* 2008;5:41. doi:10.1186/1742-2094-5-41.
11. Yoon JY, Lee SY, Jun HJ, Lee JY. Anti-aging Effects of Solvent Fraction from *Agrimonia pilosa* L. Extracts [Internet]. Vol. 55, *Journal of Applied Biological Chemistry.* *J Appl Biol Chem* 2012;55(1):35-9. doi:org/10.3839/jabc.2011.056.
12. Kim HJ, Lim HW, Kim BH, Choi SW, Yoon CS. Studies on the Anti-acne Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 2006;32(1):53-8.
13. Kang SC, Lee CM, Koo HJ, Ahn DH, Choi H, Lee JH, Bak JP, Lee MH, Choung ES, Kawk JH. Hepatoprotective effects of aqueous extract from aerial part of *Agrimonia*. *Kor J Pharmacogn.* 2006;37(1):28-32.
14. Hua CL, Lee JK, Cho KH, Kang DG, Kwon TO,

- Kwon JW, Kim JS, Sohn EJ, Lee HS. Mechanism for the vascular relaxation induced by butanol extract of *Agrimonia pilosa*. *Kor J Pharmacogn*. 2006;37(2):67–73.
15. Choi SJ, Baik JW, Park JH, Jun CY, Choi YK, Ko SG. Mechanism of apoptosis & tumor growth inhibition of *Agrimonia pilosa* Ledebour (APL) in vitro and in vivo. *Korean J Orient Int Med*. 2009;30(2):399–409.
16. Kim JJ, Jiang J, Shim DW, Kwon SC, Kim TJ, Ye SK, Kim MK, Shin YK, Koppula S, Kang TB, Choi DK, Lee KH. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb extract on murine cell lines and OVA-induced airway inflammation. *J Ethnopharmacol*. 2012;140(2):213–21. doi:10.1016/j.jep.2011.12.035.
17. Saeed N, Khan MR, Shabbir M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:221. doi:10.1186/1472-6882-12-221.
18. Malla MY, Sharma M, Saxena RC, Mir MI, Mir AH, Bhat SH. Phytochemical screening and spectroscopic determination of total phenolic and flavonoid contents of *Eclipta Alba* Linn. *J. Nat. Prod. Plant Resour*. 2013;3(2):86–91.
19. Blosis MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;26:1199–200. doi:org/10.1038/1811199a0.
20. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9–10): 1231–7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
21. Ha CW, Sohn EH, Kim SH, Jang S, Park MR, Kim YK, Bae IY. Fermented *Angelicae tenuissimae* with *Aspergillus oryzae* Improves Skin Barrier Properties, Moisturizing, and Anti-Inflammatory Responses. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20):12072. doi:10.3390/ijms232012072.
22. Park NJ, Jo BG, Bong SK, Park SA, Lee S, Kim YK, Yang MH, Kim SN. *Lobelia chinensis* Extract and Its Active Compound, Diosmetin, Improve Atopic Dermatitis by Reinforcing Skin Barrier Function through SPINK5/LEKTI Regulation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8687. doi: 10.3390/ijms23158687.
23. Koo JS. A Study on the Skin Improvement Effect of *Castanea crenata* Inner Shell with Microneedle Therapy System. *Kor. J. Herbol*. 2022;37(2):23–31.
24. Jing C, Guo J, Li Z, Xu X, Wang J, Zhai L, Liu J, Sun G, Wang F, Xu Y, Li Z, Zhao D, Jiang R, Sun L. Screening and Research on Skin Barrier Damage Protective Efficacy of Different Mannosylerythritol Lipids. *Molecules*. 2022;27(14):4648. doi:10.3390/molecules27144648.
25. Baek J, Lee MG. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Rep*. 2016;21(4): 164–9. doi:10.1179/1351000215Y.0000000015.
26. Yoon YM, Yoon JY, Lim KM, Hahn HJ, Kim YR, Ahn KJ, An SK. Effects of the Complex Containing *Centella asiatica* – and Folic Acid–Ferment Extracts, Acetyl Glutamine, and Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate on the Inhibition of Senescence and Melanogenesis, Promotion of Collagen Expression, Cellular Regeneration, and Keratinocyte Differentiation, and Anti-inflammation. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*. 2013;11(4): 675–84.
27. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 9):1285–94. doi:10.1242/jcs.033969.
28. Coderch L, López O, de la Maza A, Parra JL. Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(2):107–29. doi:10.2165/00128071-200304020-00004.
29. Schürer NY, Plewig G, Elias PM. Stratum corneum lipid function. *Dermatologica*. 1991;183(2):77–94. doi: 10.1159/000247644.
30. Jungersted JM, Hellgren LI, Jemec GB, Agner T. Lipids and skin barrier function—a clinical perspective. *Contact Dermatitis*. 2008;58(5): 255–62. doi: 10.1111/j.1600-0536.2008.01320.x.