

피부각질형성세포에서 동의보감 충부약재 14 종이 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

박 건 혁 · 문 병 철 · 임 혜 선[†]

한국한의학연구원 한약자원연구센터
(2020년 6월 11일 접수, 2020년 6월 22일 수정, 2020년 6월 29일 채택)

Effects of 14 *Chung-bu* Medicinal Materials Described in the *Dongui Bogam* on Inflammatory Cytokines Production in HaCaT Keratinocytes

Gunhyuk Park, Byeong Cheol Moon, and Hye-Sun Lim[†]

Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine,
111, Geonjae-ro, Naju-si, Jeollanam-do 58245, Republic of Korea
(Received June 11, 2020; Revised June 22, 2020; Accepted June 29, 2020)

요약: 본 연구에서는 피부각질형성세포에서 동의보감에 기록된 14 종의 충부약재에 대한 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 확인하기 위하여 멀티플렉스 사이토카인 분석으로 17 종에 대한 사이토카인을 스크리닝 하였다. 충부약재 14 종 중, 제조 및 전갈 추출물은 IL-5 생성을 억제하였고, 제조, 상표초 및 수질 추출물은 IL-6 생성을, 제조, 상표초, 지룡, 수질 및 문합 추출물은 IL-8 생성에 억제 효과를 보였다. 합개, 잠사, 선퇴 및 문합 추출물은 IL-13 생성을 억제하였으며, 귀판, 잠사 및 지룡 추출물은 MIP-1 β 생성에 유의적인 효과를 확인하였다. 이러한 충부약재는 피부염증 억제를 위한 항염증제 활용 가능성에 의미를 둘 수 있지만, 그 가치를 증명하기 위해서는 피부개선을 위한 기전연구를 포함하여 인체피부모사판 모델에서 추가 실험을 통한 검증이 선행 되어야 한다.

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effects of 14 *Chung-bu* medicinal materials described in the *Dongui Bogam* on inflammatory cytokine production in HaCaT human keratinocyte cells. In order to confirm this possibility, we screened inhibition activity of 17 cytokines using Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex assay in HaCaT cell lines. Of the 14 *Chung-bu* medicinal materials, *Holotrichia* (Ho) and *Scorpio* (Sc) exerted inhibitory effects on interleukin (IL)-5 production; Ho, *Mantidis Ootheca* (MO), and *Hirudo* (Hi) exerted inhibitory effects on IL-6 production; Ho, MO, *Lumbricus* (Lu), Hi, and *Meretricis Concha* (MC) showed significant inhibitory effects on IL-8 production; *Gecko* (Ge), *Bombycis Faeces* (BF), *Cicadidae Periostracum* (CP), and MC showed significant inhibitory effects on IL-13 production; and *Testudinis Chinemis Plastrum et Carapax* (TCPC), BF, and Lu exerted significant inhibitory effects on MIP-1 β production. Results indicated that the *Chung-bu* medicinal materials might be a good candidate as potential anti-inflammatory agents for inhibition of skin inflammation. However, further investigations on these materials, including mechanistic studies, should be carried out to validated the effects in human skin equivalent models of dermatitis.

Keywords: *Dongui Bogam*, *Chung-bu* medicinal materials, HaCaT keratinocyte, inflammatory cytokine

[†] 주 저자 (e-mail: qp1015@kiom.re.kr)
call: 061-338-7124

1. 서론

피부는 표피, 진피, 피하지방으로 구성되며, 표피 세포의 80% 이상을 차지하는 각질형성세포(keratinocyte)는 피부 각질을 형성할 뿐만 아니라 피부의 재생피화와 상처치유 활성화에 중요한 역할을 한다. 또한, 외부 환경적 요인에 따라 사이토카인 및 염증성 인자를 생산하여 염증반응 조절을 통하여 피부의 항상성을 유지한다[1]. 피부각질형성세포가 화학물질이나 자외선 등의 환경적 스트레스에 지속적으로 노출되면 interleukin (IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등과 같은 염증성 사이토카인을 분비하여 피부각질형성세포의 증식 속도를 감소시키고, 진피층의 기질 형성을 방해함으로써 손상된 피부의 회복 속도 저하, 피부노화 또는 아토피성 피부염, 건선 등과 같은 염증성 피부질환을 유발함으로써 면역 시스템 기능 저하가 초래된다고 보고된 바 있다[2,3]. 현재까지 임상에서 활용되는 피부질환의 치료제는 피부의 수분 유지 및 면역계 염증 반응 조절을 목적으로 하여 스테로이드제를 주로 처방해왔지만, 장기간 또는 과다 사용 시 내성과 같은 부작용을 초래하는 것으로 보고되어 이를 보완하는 연구가 활발해지고 있다[4]. 특히, 상대적으로 부작용이 적은 천연물질을 활용한 치료제 개발에 대한 연구가 집중되고 있으며, 최근 화장품 소재 산업 현황에서도 천연화장품 원료 개발 연구에 대한 중요성이 강조되고 있다.

최근 식용곤충으로 알려진 장수풍뎅이, 흰점박이꽃무지, 갈색거저리 및 쌍별귀뚜라미는 광노화 개선 효과를 증명하며 화장품 원료로서의 가치를 입증한 바가 있으며[5], 왕지네의 생리활성성분인 스크라펜드라신 I 을 활용하여 아토피피부염 환자를 위한 화장품 효능이 보고되어진 바 있다[6]. 또한, 꿀벌의 봉독 및 프로폴리스 등이 화장품 원료로 사용되고 있으며, 달팽이의 점액성 물질인 뮤신이 피부 건조증상을 개선하는 기능성 원료로 사용되고 있다[7]. 이처럼 화장품 산업에서도 곤충을 활용하여 제품 개발에 응용되고 있다.

한의학의 대표적 의서 동의보감(東醫寶鑑) 탕액편에는 충부(蟲部)로 분류되어 그 효능 및 사용법에 대하여 기록된 바가 있다[8]. 따라서 본 연구에서는 동의보감에 수재되어 있는 충부 95 종 중 유통 가능 범위로 한정하여, 임상에서 주로 사용되고 있는 별갑(鱗甲), 귀판(龜板), 합개(蛤蚧), 백강잠(白僵蠶), 제조(蟻蟻), 잠사(蠶砂), 상표초(桑螵蛸), 선퇴(蟬退), 갈(蝸), 오공(蜈蚣), 지룡(地龍), 수질(水蛭),

석결명(石決明), 문합(文蛤)에 대한 14 종을 선별하여 피부항염증을 증명하고자, TNF- α /interferon (IFN)- γ 로 유도된 피부각질형성세포를 활용한 17 종의 사이토카인에 미치는 영향을 탐색하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 추출물 제조

본 연구에 사용된 동의보감 충부약재 14 종은 한국한의약연구원(Korea)의 최고야 박사가 형태감별을 수행한 후 사용하였다. 각 시료는 한국한의약연구원 한약자원연구센터 한약표준표본관에 표본번호(3-18-0026 ~ 3-18-0052)를 부여하여 약재표본으로 보관하였다. 해당 약재의 표본사진은 Table 1 에 표기하였다. 충부약재 14 종에 대한 추출 방법은 다음과 같다. 각각의 약재에 10 배에 해당하는 양의 증류수와 함께 100 °C 에서 3 h 동안 환류 추출법(경서메디텍 COSMOS-660, Korea)을 이용하여 추출하였다. 추출액은 거름망 및 솜 필터 후 동결건조기(일신대형동결건조기 PVTFD100R, Korea)를 사용하여 추출물 분말을 얻었다.













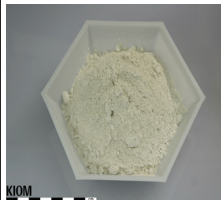

2.2. 세포 배양

피부각질형성세포주인 HaCaT (human keratinocyte cell line)은 Cell Line Service (CLS, Germany)에서 구매하였으며, 세포 배양을 위해 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin 을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA)을 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였고, 2 - 3 일 간격으로 계대 배양하였다.

2.3. 멀티플렉스 사이토카인 분석

TNF- α /IFN- γ 로 활성화된 HaCaT 세포에서 사이토카인 생성에 대한 충부약재의 효과를 알아보기 위해 Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex assay kit (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 배양액 내에 존재하는 사이토카인의 분비량을 다음과 같이 측정하였다. HaCaT (1×10^6 cells/well) 세포를 6 well plate 에 10% FBS 가 포함된 배지에 18 h 배양한 후, serum-free DMEM 배지로 교체하였다. 각각의 충부약재 14 종의 물 추출물을 농도에 따라 1 h 동안 전처리 후, TNF- α /IFN- γ (10 ng/mL)을 각 well 에 처리하여 23 h 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 상층액을 채취하여 멀티플렉스 어세이에 사용한다. 세포 배양 상층액을 분주하기 전에 96 well plate 를 wash buffer

Table 1. The 14 *Chung-bu* Medicinal Materials Described in the *Dongui Bogam*

	<i>Pelodiscis Carapax</i>	<i>Testudinis Chinemis Plastrum et Carapax</i>	<i>Gecko</i>	<i>Batryticatus Bombyx</i>	<i>Holotrichia</i>
Herbal medicine					
Yield (%)	3.80	2.34	17.46	21.78	27.36
	<i>Bombycis Faeces</i>	<i>Mantidis Ootheca</i>	<i>Cicadidae Periostracum</i>	<i>Scorpio</i>	<i>Scolopendra</i>
Herbal medicine					
Yield (%)	6.78	1.50	6.30	9.10	20.67
	<i>Lumbricus</i>	<i>Hirudo</i>	<i>Nardotidis seu Sulculii Concha</i>	<i>Meretricis Concha</i>	
Herbal medicine					
Yield (%)	17.21	21.96	0.24	0.05	

URL: <https://oasis.kiom.re.kr/herbplib/rsrc/resrceList.do>

로 세척 후, 특정 항체가 결합되어 있는 beads 를 분주 후 다시 한번 wash buffer 로 세척한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 준비된 세포 배양 상층액과 표준물질 (standard antibody) 을 각 well 에 50 μ L 씩 분주한다. 분주가 끝나면 실온에서 30 min 간 850 rpm 의 속도로 shaking 한다. 30 min 후, wash buffer 를 이용하여 plate 를 3 회 세척한다. 세척이 끝나면 세척액을 모두 제거한 후 미리 혼합된 Detection Antibody 를 각 well 에 25 μ L 씩 분주하고 실온에서 30 min 간 850 rpm 의 속도로 shaking 한다. 30 min 간의 shaking incubation 이 끝나면 wash buffer 를 이용하여 plate 를 3 회 세척한다. 세척 후 미리 잘 섞인 Streptavidin-PE 를 각 well 에 50 μ L 씩 분주하고 실온에서 10 min 간 850 rpm 의 속도로 shaking 한다. 10 min 후, wash buffer 를 이용하여 plate 를 3 회 세척한다. 세척이 끝

나면 세척액을 모두 제거한 후 각 well 에 assay buffer 를 125 μ L 씩 분주하고 실온에서 30 s 동안 850rpm 의 속도로 shaking 한 후 Bioplex-200 (Bio-Rad Laboratories, USA) 을 이용하여 각 사이토카인들의 생성량을 측정하여 대조군과 시료군의 차이를 비교한다.

2.4. IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 및 MIP-1 β 생성량 측정

세포 배양액 내의 사이토카인 생성량을 측정하기 위해 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit 를 이용하여 실험을 수행하였다. HaCaT (1×10^6 cells/well) 세포를 6 well plate 에 10% FBS 가 포함된 배지에 18 h 배양한 후, serum-free DMEM 배지로 교체하였다. 각각의 충부약재 14 종의 물 추출물을 각각의 농도별로 1 h 동안 전처리 후, TNF- α /IFN- γ (10 ng/mL) 을 각 well 에 처리하여 23 h 동

Table 2. Inhibitory Activity of Water Extracts of the 14 *Chung-bu* Medicinal Materials on Inflammatory Cytokines in TNF- α /IFN- γ -induced HaCaT keratinocytes

Herbal medicine	Korean Name	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%)							
			IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
<i>Pelodiscis Carapax</i>	별갑	1000	-63.04 \pm 4.98	1.610 \pm 2.15	-14.71 \pm 0.37	-6.21 \pm 0.00	-99.17 \pm 2.07	19.77 \pm 9.04	-3.27 \pm 0.21	18.32 \pm 3.47
<i>Testudinis Chinemis Plastrum et Carapax</i>	귀관	125	-49.42 \pm 1.45	6.830 \pm 1.48	-7.490 \pm 4.06	9.480 \pm 8.05	-22.88 \pm 0.76	-18.64 \pm 33.9	-2.87 \pm 0.66	56.93 \pm 23.3
<i>Gecko</i>	합개	1000	-52.32 \pm 2.26	10.79 \pm 6.17	-16.20 \pm 0.27	-1.060 \pm 17.76	-4.530 \pm 2.36	-22.60 \pm 8.47	-2.16 \pm 1.02	23.76 \pm 12.9
<i>Batryticatus Bombyx</i>	백강잠	125	-13.90 \pm 4.75	-1.78 \pm 5.65	-15.29 \pm 5.45	14.31 \pm 4.33	32.76 \pm 0.50	-10.73 \pm 3.39	12.84 \pm 2.67	-4.95 \pm 5.94
<i>Holotrichia</i>	제조	250	-2.670 \pm 5.10	14.86 \pm 7.41	-19.30 \pm 1.98	22.37 \pm 3.54*	61.29 \pm 3.79***	24.86 \pm 23.2	20.00 \pm 1.96**	7.430 \pm 11.39
<i>Bombycis Faeces</i>	잠사	125	-13.50 \pm 7.36	14.27 \pm 3.41	-6.260 \pm 5.72	20.94 \pm 9.85	22.59 \pm 5.35	33.33 \pm 4.52	-4.22 \pm 1.12	16.83 \pm 15.84
<i>Mantidis Ootheca</i>	상표초	62.5	-19.81 \pm 3.13	6.440 \pm 9.98	-13.48 \pm 1.07	13.30 \pm 2.58	41.97 \pm 0.20***	8.470 \pm 0.00	26.10 \pm 1.51***	22.77 \pm 3.960
<i>Cicadidae Periostracum</i>	선퇴	62.5	-27.58 \pm 4.06	11.35 \pm 6.99	-16.04 \pm 6.63	6.400 \pm 3.77	14.64 \pm 2.31	-10.17 \pm 5.08	-0.35 \pm 1.03	-26.73 \pm 35.64
<i>Scorpio</i>	전갈	250	-26.19 \pm 0.81	14.57 \pm 2.60	-6.040 \pm 0.48	24.07 \pm 2.30**	4.520 \pm 3.37	12.99 \pm 0.00	-2.31 \pm 0.56	35.64 \pm 12.87
<i>Scolopendra</i>	오공	250	-49.25 \pm 6.26	2.900 \pm 3.11	-19.25 \pm 3.21	7.590 \pm 13.3	10.12 \pm 3.06	-28.81 \pm 5.65	9.02 \pm 0.70	11.39 \pm 14.36
<i>Lumbricus</i>	지렁	250	-27.98 \pm 2.38	3.350 \pm 1.97	-4.760 \pm 4.01	19.33 \pm 6.76	27.62 \pm 2.39	6.780 \pm 11.9	23.63 \pm 0.50**	10.89 \pm 7.92
<i>Hirudo</i>	수질	125	-31.29 \pm 1.74	4.270 \pm 1.24	-10.80 \pm 4.81	18.87 \pm 4.65	41.46 \pm 1.98***	-20.90 \pm 18.1	25.61 \pm 0.10***	-24.26 \pm 24.26
<i>Nardotidis seu Sulculii Concha</i>	석결명	125	-57.42 \pm 0.17	7.180 \pm 3.08	-15.19 \pm 0.43	3.360 \pm 0.00	-16.94 \pm 1.67	-6.210 \pm 5.65	-1.31 \pm 1.38	13.37 \pm 3.470
<i>Meretricis Concha</i>	문합	31.3	-32.79 \pm 3.48	6.250 \pm 5.22	-14.44 \pm 3.64	17.63 \pm 2.49	26.76 \pm 1.93	-27.68 \pm 13.5	25.95 \pm 2.00***	3.960 \pm 13.86

안 배양하였다. ELISA kit (R&D system, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 세포 상등액 내에 존재하는 IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 및 MIP-1 β 의 분비량을 측정하였다.

2.5. 통계처리

본 실험의 결과는 3 회 반복 실험하여 측정된 값을 평균값 \pm 표준편차로 나타내었다. 실험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 Graph Pad software version 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA 검정을 적용하였으며, Dunnet's multiple comparison test 를 실시하여 *p*-value 가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정

하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총부약재 14 종 물 추출물에 대한 17 종 염증성

사이토카인 발현 변화 검색

피부각질형성세포는 외부 환경적인 자극에 의해 다양한 사이토카인 및 케모카인을 생산하며, 이들은 피부의 염증 및 면역 반응을 일으킨다고 보고된 바 있다[9]. 특히, TNF- α 및 IFN- γ 에 의한 자극은 각질형성세포로부터 염증성 사이토카인의 비정상적인 분비로 피부 염증을 유발하며, 이

Table 2. Continued

Herbal medicine	Korean Name	Concentration (μg/mL)	Inhibition (%)								
			IL-12 (p70)	IL-13	IL-17A	G-CSF	GM-CSF	IFN-γ	MCP-1	MIP-1β	TNF-α
<i>Pelodiscis Carapax</i>	별갑	1000	5.640 ± 21.4	51.63 ± 5.28*	12.11 ± 18.51	-61.47 ± 8.50	-58.66 ± 2.74	-1.17 ± 0.85	1.20 ± 1.11	-35.11 ± 0.28	1.24 ± 0.14
<i>Testudinis Chinemis Plastrum et Carapax</i>	귀판	125	17.35 ± 2.55	52.85 ± 7.32*	0.07 ± 8.63	-1062.9 ± 37.11	-366.01 ± 31.58	6.63 ± 1.22	2.67 ± 1.22	31.47 ± 2.23***	1.54 ± 0.47
<i>Gecko</i>	합개	1000	-3.57 ± 0.00	58.54 ± 3.25**	6.69 ± 0.29	-159.49 ± 11.33	-330.81 ± 32.35	-3.47 ± 0.87	4.26 ± 1.57	6.090 ± 4.73	-0.71 ± 0.05
<i>Batryticatus Bombyx</i>	백강잠	125	15.31 ± 0.51	52.94 ± 1.22*	2.80 ± 7.19	-45.61 ± 0.57	-184.21 ± 11.18	-1.31 ± 2.45	0.00 ± 0.23	14.16 ± 0.84	0.64 ± 0.17
<i>Holotrichia</i>	제조	250	5.100 ± 3.57	38.21 ± 4.07	-3.52 ± 6.47	-11.90 ± 4.82	-16.340 ± 15.46	-8.91 ± 3.26	-7.77 ± 1.62	26.45 ± 9.36	-5.70 ± 0.14
<i>Bombycis Faeces</i>	잠사	125	13.78 ± 1.02	66.26 ± 1.22**	7.940 ± 2.34	-124.93 ± 13.03	-429.39 ± 27.85	-4.30 ± 2.50	-3.81 ± 0.76	36.65 ± 8.10**	-5.16 ± 0.74
<i>Mantidis Ootheca</i>	상포초	62.5	12.24 ± 11.7	51.38 ± 2.85*	0.650 ± 1.58	-6.800 ± 1.98	-151.75 ± 6.360	-6.22 ± 1.11	-0.18 ± 0.41	9.440 ± 2.16	-0.72 ± 0.31
<i>Cicadidae Periostracum</i>	선퇴	62.5	-5.61 ± 4.08	58.35 ± 2.44**	8.520 ± 0.04	-53.82 ± 3.12	-204.93 ± 10.64	-5.39 ± 0.53	-1.73 ± 0.74	4.220 ± 1.89	-1.83 ± 0.12
<i>Scorpio</i>	전갈	250	8.670 ± 8.16	56.10 ± 2.44*	12.01 ± 2.88	-97.79 ± 2.83	-171.82 ± 2.520	-3.22 ± 1.13	2.77 ± 0.40	12.36 ± 0.60	-0.56 ± 0.94
<i>Scolopendra</i>	오공	250	3.060 ± 8.67	43.09 ± 2.44	-1.44 ± 1.08	-27.48 ± 3.97	-269.52 ± 13.16	-12.8 ± 0.71	-2.39 ± 0.52	-0.850 ± 2.05	-3.07 ± 0.34
<i>Lumbricus</i>	지렁	250	13.78 ± 7.14	43.50 ± 0.41	6.250 ± 1.01	-9.350 ± 9.63	-203.62 ± 14.36	9.84 ± 4.89	-0.91 ± 2.12	48.51 ± 0.55**	-5.71 ± 0.22
<i>Hirudo</i>	수질	125	-12.76 ± 1.02	41.87 ± 2.03	-0.22 ± 1.87	-3.120 ± 2.27	-143.86 ± 8.550	-6.80 ± 3.47	2.92 ± 1.92	8.610 ± 0.52	-0.78 ± 2.53
<i>Nardotidis seu Sulculii Concha</i>	석결명	125	-1.020 ± 1.53	50.00 ± 11.8*	-2.48 ± 2.91	-110.2 ± 0.85	-220.29 ± 6.250	-8.19 ± 0.52	-1.14 ± 0.03	3.760 ± 3.00	-3.85 ± 0.10
<i>Meretricis Concha</i>	문합	31.3	-8.160 ± 11.73	57.88 ± 6.91**	-3.13 ± 4.57	-15.01 ± 0.57	-141.89 ± 10.96	-7.70 ± 0.74	-3.28 ± 1.27	11.90 ± 0.19	-5.46 ± 0.02

Data are represented as mean ± SEM of three independent experiments.

p* < 0.05, *p* < 0.01, and ****p* < 0.001 indicated significant differences from the TNF-α/IFN-γ-treated cells.

Pelodiscis Carapax (PC); *Testudinis Chinemis Plastrum et Carapax* (TCPC); *Gecko* (Ge); *Batryticatus Bombyx* (BB); *Holotrichia* (Ho); *Bombycis Faeces* (BF); *Mantidis Ootheca* (MO); *Cicadidae Periostracum* (CP); *Scorpio* (Sc); *Scolopendra* (Sco); *Lumbricus* (Lu); *Hirudo* (Hi); *Nardotidis seu Sulculii Concha* (NSC); *Meretricis Concha* (MC)

것이 지속될 경우 노화 및 아토피성 피부염, 건선 등과 같은 피부질환을 발생 시키는 것으로 알려져 있다[10,11]. 따라서, 본 연구에서는 HaCaT 세포에 TNF-α/IFN-γ를 자극하여 분비되는 염증성 사이토카인의 생성에 대한 충부약재 14 종의 효과를 멀티플렉스 사이토카인 분석을 통해 확인하였다. 이전에 본 저자들은 충부약재 14 종에 대한 피부각질형성세포에 대한 세포 안전성 평가를 실시하였고,

세포 독성이 없는 범위를 설정하였다[12]. 본 연구에서는 세포 독성이 없는 범위에서 수행되었다. 멀티플렉스 사이토카인에는 IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17A, Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IFN-γ, Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Macrophage inflammatory protein-1β (MIP-1β),

TNF- α 의 총 17 종에 대한 사이토카인을 효소면역측정으로 한번에 분석하는 에세이법이며, TNF- α /IFN- γ 로 HaCaT 세포를 자극하였을 때, 아무것도 처리하지 않은 세포군에 비해 17 종의 사이토카인은 유의성 있게 증가하였고, 이에 증부약제 14 종의 처리에 의해 각각 억제된 비율을 확인하였다(Table 2). 그 결과, 증가된 IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12(p70), IL-17A, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1, MIP-1 β 및 TNF- α 의 경우 증부약제 처리에 의한 영향은 없었으며, IL-5 생성의 경우 제조(Ho) 및 전갈(Sc) 처리한 결과에서 유의적인 억제 효과를 확인하였다(각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$). 또한, 제조(Ho, $p < 0.001$), 상표초(MO, $p < 0.001$) 및 수질(Hi, $p < 0.001$) 처리는 IL-6 생성을 유의적으로 억제하였으며, 이 중에서 제조, 상표초 및 수질은 40% 이상의 억제효과를 나타냈다. IL-8 생성은 제조(Ho, $p < 0.01$), 상표초(MO, $p < 0.001$), 지룽(Lu, $p < 0.01$), 수질(Hi, $p < 0.001$) 및 문합(MC, $p < 0.001$) 처리에 의해 유의적으로 감소하였다. 제조는 IL-5, IL-6, IL-8에 모두 유의적인 감소 효과를 보였으며, 제조의 주요 성분은 주로 불포화 지방산 계열인 oleic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, linoleic acid와 아미노산 계열인 glutamic acid, tyrosine, serine, glycine, alanine, valine로 알려져 있다[13]. 불포화지방산 계열인 oleic acid는 알레르겐에 대한 IgE 결합을 감소시킨다고 보고되었으며[14], linoleic acid는 함염증 및 기도 염증 효과가 보고되었다[15,16]. IL-13 생성에서는 오공(Sco), 지룽(Lu), 수질(Hi)을 제외하고 나머지 소재에서 유의성을 보였으며, 특히 합개(Ge), 잠사(BF), 선퇴(CP) 및 문합(MC) 처리에 의해 57% 이상의 억제효과를 나타냈다($p < 0.01$). 또한, 귀관(TCPC, $p < 0.001$), 잠사(BF, $p < 0.01$) 및 지룽(Lu, $p < 0.01$) 처리는 MIP-1 β 생성을 유의적으로 억제하였다. IL-13 및 MIP-1 β 에 억제 효과를 보인 잠사의 대표 성분은 알칼로이드 계열의 1-Deoxynojirimycin으로 비스테로이드성 항염증제와의 상승효과를 통해 샌드호프병(sandhoff disease)의 마우스모델에서 항당뇨 효과를 발휘한다고 보고되었다[17]. 이상의 결과, 면역단백질(cytokines) 분비와 관련하여 증부약제 14 종의 영향을 알아보았고, 그 결과 17 종의 사이토카인 중에서 IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 및 MIP-1 β 생성에서 변화가 있음을 확인 할 수 있었다. 사이토카인 생성량을 더 분명하게 재확인하기 위해 5 종의 사이토카인에 유의성 있는 변화를 보인 증부약제를 각각 선별하여 농도에 따른 영향을 확인하였다.

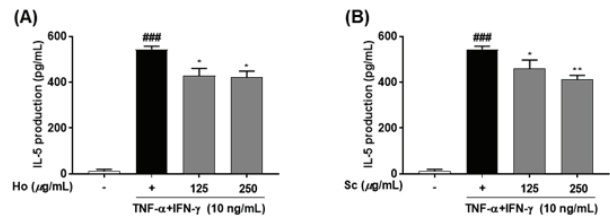


Figure 1. Effect of water extracts of *Chung-bu* medicinal materials on IL-5 production in TNF- α /IFN- γ -induced HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes were pretreated with the indicated concentrations of Sc (A) and Ho (B) for 1 h, and then stimulated with TNF- α /IFN- γ for 23 h. Data are represented as mean \pm SEM of three independent experiments. ### $p < 0.001$ compared with non-treated cells; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with TNF- α /IFN- γ -treated cells.

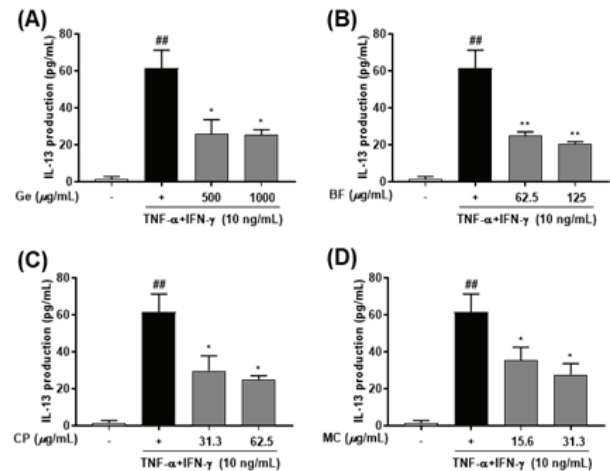


Figure 2. Effect of water extracts of *Chung-bu* medicinal materials on IL-13 production in TNF- α /IFN- γ -induced HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes were pretreated with the indicated concentrations of Ge (A), BF (B), CP (C), and MC (D) for 1 h, and then stimulated with TNF- α /IFN- γ for 23 h. Data are represented as mean \pm SEM of three independent experiments. ## $p < 0.01$ compared with non-treated cells; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with TNF- α /IFN- γ -treated cells.

3.2. IL-5 및 IL-13 생성에 대한 영향

손상된 피부장벽을 통하여 외부 항원이 침투하게 되면 수지상 세포가 항원을 인식하여 Th2 세포를 활성화시킨다. 활성화된 Th2 세포에서 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인이 분비되고, IL-4 및 IL-13에 의해 B 세포가 활성화되어 면역글로블린 E(immunoglobulin E, IgE)가 분비된다. 또한,

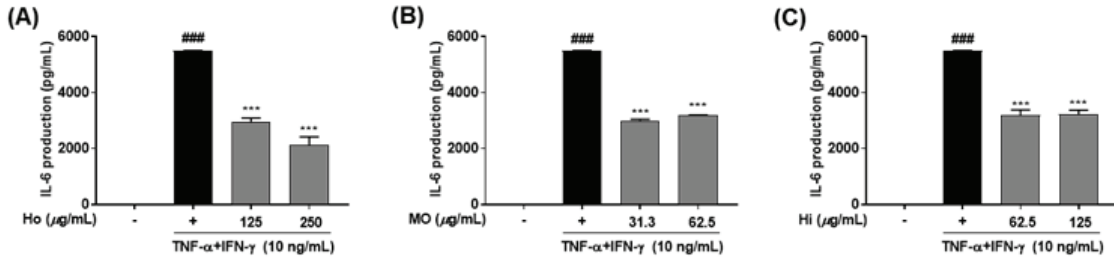


Figure 3. Effect of water extracts of *Chung-bu* medicinal materials on IL-6 production in TNF- α /IFN- γ -induced HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes were pretreated with the indicated concentrations of Ho (A), MO (B), and Hi (C) for 1 h, and then stimulated with TNF- α /IFN- γ for 23 h. Data are represented as mean \pm SEM of three independent experiments. $^{###}p < 0.001$ compared with non-treated cells; $^{***}p < 0.001$ compared with TNF- α /IFN- γ -treated cells.

IL-5 에 의해 호산구가 모여들며, 분비된 IgE 가 비만세포 와 결합한 후 히스타민, 프로스타글란딘 D2, 류코트리엔 C4/D4/E4 등의 다양한 염증매개물질을 분비시켜 아토피피부염의 임상증상을 만든다[18]. 제조(Ho) 및 갈(Sc) 물 추출물은 HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 자극으로 증가된 IL-5 의 생성을 유의성 있게 감소시켰으며 (Figure 1), 함께 (Ge), 잠사(BF), 설퇴(CP) 및 문합(MC) 물 추출물은 증가된 IL-13 의 생성량을 TNF- α /IFN- γ 처리군과 비교하여 농도 의존적으로 유의하게 억제시켰다(Figure 2). 피부염증 질환 인 아토피피부염과 관련성이 큰 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킴으로써 피부 염증 억제 효능을 가질 것으로 의미한다.

3.3. IL-6 생성에 대한 영향

피부각질형성세포에서 IL-6 는 iNOS 및 COX-2 의 발현량을 증가시켜 염증반응에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[19]. HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 자극에 의해 IL-6 의 생성량이 증가하였다. 그러나 제조(Ho), 상표초(MO) 및 수질(Hi) 물 추출물을 농도별로 처리한 경우 IL-6 의 생성량이 유의적으로 감소하였다(Figure 3). 제조, 상표초, 수질 추출물이 상위단계에 있는 사이토카인 IL-6 의 활성 억제를 통하여 하위의 염증 관련 인자(iNOS, COX-2) 들을 억제할 수 있을 것으로 예상할 수 있으며, 이는 IL-6 의 발현을 억제시킴으로써 염증 초기작용 기전을 억제하여 피부 자극 완화 효과를 줄 수 있을 것으로 기대되어 진다.

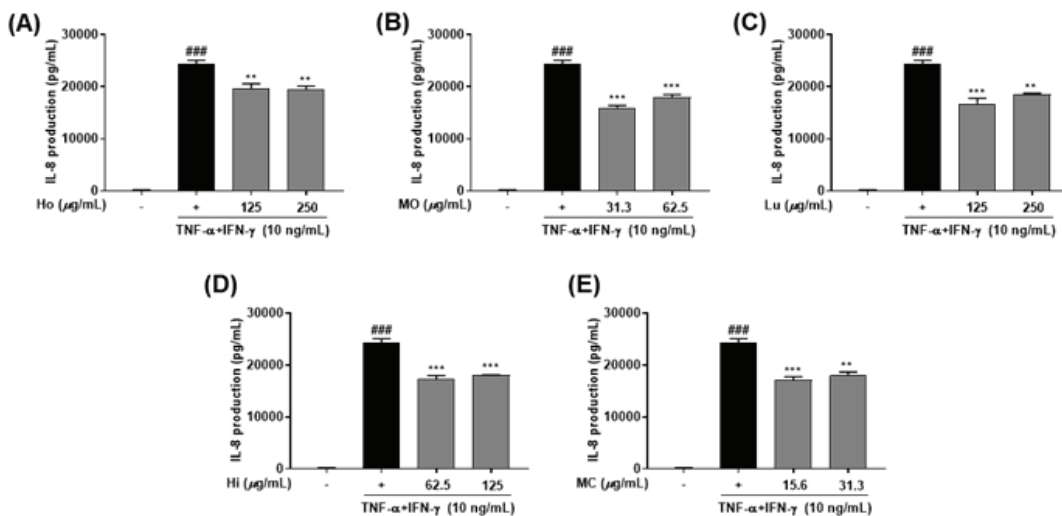


Figure 4. Effect of water extracts of *Chung-bu* medicinal materials on IL-8 production in TNF- α /IFN- γ -induced HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes were pretreated with the indicated concentrations of Ho (A), MO (B), Lu (C), Hi (D), and MC (E) for 1 h, and then stimulated with TNF- α /IFN- γ for 23 h. Data are represented as mean \pm SEM of three independent experiments. $^{###}p < 0.001$ compared with non-treated cells; $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$ compared with TNF- α /IFN- γ -treated cells.

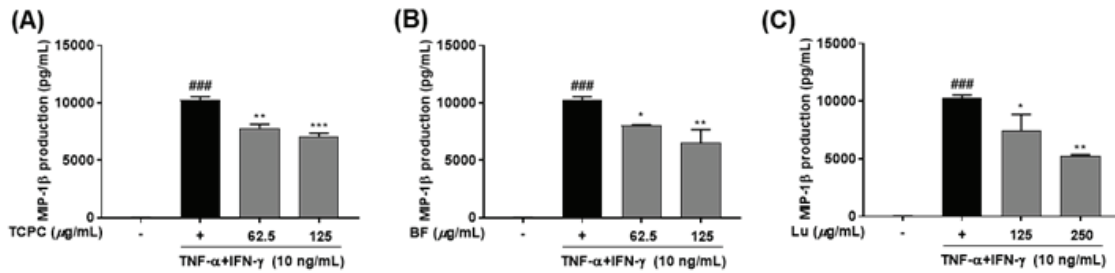


Figure 5. Effect of water extracts of *Chung-bu* medicinal materials on MIP-1 β production in TNF- α /IFN- γ -induced HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes were pretreated with the indicated concentrations of TCPC (A), BF (B), and Lu (C) for 1 h, and then stimulated with TNF- α /IFN- γ for 23 h. Data are represented as mean \pm SEM of three independent experiments. $###p < 0.001$ compared with non-treated cells; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ compared with TNF- α /IFN- γ -treated cells.

3.4. IL-8 생성에 대한 영향

IL-8은 호중구나 T세포의 화학주성에 관여하거나 호중구의 활성화 또는 히스타민의 분비를 조절하는 등 여러 가지 역할을 하는 사이토카인으로 각질형성세포를 포함한 여러 세포에서 만들어지며, 평상시에는 분비가 이루어지지 않다가 TNF- α 등의 자극에 의해 유도되어 염증세포들이 자극부위로 모여들게 하여 염증반응을 촉진하는 기능을 한다[20]. HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 자극에 의해 IL-8의 생성량이 증가하였고, 제조(Ho), 상표초(MO), 지룡(Lu), 수질(Hi) 및 문합(MC) 물 추출물을 처리하였을 때 TNF- α /IFN- γ 자극된 세포와 비교하여 IL-8의 생성량을 농도 의존적이지는 않지만 유의적으로 감소시켰다(Figure 4). 피부손상에 기여하는 IL-8 생성량을 억제함으로써 제조, 상표초, 지룡, 수질, 문합 추출물은 염증성 피부질환을 완화시킬 수 있을 것으로 생각된다.

3.5. MIP-1 β 생성에 대한 영향

화장품관련 분야에서 국제적으로 3R (replacement, reduction, refinement) 원칙을 토대로 동물시험을 이용하여 안전성 혹은 유효성이 검증된 화장품 또는 화장품원료의 시판을 전면 금지한다는 정책 결정에 의거, 화장품 개발에 있어서 무엇보다도 중요한 피부알레르기 관련 안전성 평가를 위해 *in vitro* 시험법 개발에 역점을 기울이고 있으며, 시험법 중 MIP-1 β 생성 수준 평가를 통하여 피부 감작능을 판별하는 지표가 될 수 있다고 보고하고 있다[21]. HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 자극에 의해 MIP-1 β 의 생성량이 증가되었고, 귀관(TCPC), 잠사(BF) 및 지룡(Lu)은 증가된 MIP-1 β 생성을 농도 의존적으로 유의적인 억제를 보여주었다(Figure 5). MIP-1 β 생성량을 감소시킴으로써 피부 면

역계의 과민 반응이 원인인 알레르기에 의한 민감성이 완화된데 도움이 될 수 있을 것으로 여겨진다.

4. 결 론

본 연구에서는 동의보감 총부약재 14종을 열수 추출하여 물 추출물을 제조하였고, 이를 각각 피부각질형성세포에 대한 염증성 사이토카인 활성화에 미치는 영향을 수행하였다. 피부각질형성세포에 TNF- α /IFN- γ 로 자극하여 염증반응을 유도한 후 총부약재들의 항염증 활성을 평가한 결과, 17종의 사이토카인 중에서 IL-5, IL-6, IL-8, IL-13 및 MIP-1 β 생성에 대한 억제 변화를 보여주었다. 총부약재 14종 중, 제조(Ho) 추출물은 잠적정풍뎡이 유충으로 IL-5, IL-6 및 IL-13 생성에 대해 억제효과를 보였고, 갈(Sc)은 전갈 추출물로 IL-5 생성을 억제하였다. 수질(Hi)인 참거머리 추출물과 상표초(MO) 추출물인 넓적배사마귀 알집은 IL-6 및 IL-8 생성에 억제 효과를 보였다. 지룡(Lu)은 지렁이 추출물로 IL-8 및 MIP-1 β 생성을 억제하였으며, 문합(MC)은 개조개 추출물로 IL-8 및 IL-13 생성을, 잠사(BF)는 누에나방 분변 추출물로 IL-13 및 MIP-1 β 생성을 억제함을 확인하였다. 합개(Ge)인 도마뱀붙이 추출물과 선퇴(CP)인 말뚝미 허물 추출물은 IL-13 생성에 억제효과를 보였으며, 귀관(TCPC)은 남생이 배딱지 추출물로 MIP-1 β 의 생성을 억제하였다. 이들은 각각의 사이토카인 생성 억제를 통하여 피부염증반응에 유의미함을 보여주었다.

본 연구는 동의보감 탕액편에 기록된 14종 총부약재들의 피부염증에 대한 영향력을 평가하였다. 전 세계적으로 고농축 식물성 원료를 사용하는 비건 화장품에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있는 것은 사실이나, 아직 일부에

서는 달팽이의 점액을 이용한 화장품과 같은 동물성 원료 소재 화장품 산업 시장이 유지되고 있다는 것 또한 간과할 수는 없는 현실로 생각된다. 따라서 본 연구진은 동물성 원료를 포함한 미활용자원을 사용함에 있어, 소재의 기원·성분 등과 같은 정보, 안전성 및 효능에 대한 객관성을 갖는 것 또한 화장품 개발자를 포함한 소비자들에게 매우 중요한 것이라 생각되어 활용가치 제고뿐 아니라 학문적 의미 등 천연화장품 원료 개발 연구에 대한 산업적 기초 자료를 제공하는데 의의를 가질 수 있다고 사료되어진다.

Acknowledgement

본 연구의 충부약제 형태감별을 수행해주신 최고야 박사님께 감사드리며, 본 연구는 한국한의학연구원 「지속가능한 한약표준자원 활용기술 개발」사업 지원을 받아 수행되었습니다(KSN2012320).

Reference

1. W. R. Lee, K. H. Kim, H. J. An, J. Y. Kim, S. M. Han, K. G. Lee, and K. K. Park, The effects of bee venom on tumor necrosis factor (TNF)- α induced inflammatory human HaCaT keratinocytes, *Kor. J. Pharmacogn.*, **45**(3), 256 (2014).
2. J. H. Chung, Photoaging in Asians, *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **19**(3), 109 (2003).
3. C. S. Lee, S. A. Lee, Y. J. Kim, S. J. Seo, and M. W. Lee, 3,4,5-Tricaffeoylquinic acid inhibits tumor necrosis factor- α -stimulated production of inflammatory mediators in keratinocytes via suppression of Akt- and NF- κ B-pathways, *Int. Immunopharmacol.*, **11**(11), 1715 (2011).
4. D. C. Kevin, Atopic dermatitis: recent trends in pathogenesis and therapy, *J. Invest. Dermatol.*, **102**(1), 128 (1994).
5. A. R. Im, K. Y. Ji, I. Park, J. Y. Lee, K. M. Kim, M. Na, and S. Chae, Anti-photoaging effects of four insect extracts by downregulating matrix metalloproteinase expression via mitogen-activated protein kinase-dependent signaling, *Nutrients*, **11**(5), 1159 (2019).
6. D. H. Kim, J. S. Hwang, I. H. Lee, S. T. Nam, J. Hong, P. Zhang, L. F. Lu, J. Lee, H. Seok, C. Pothoulakis, J. T. Lamont, and H. Kim, The insect peptide CopA3 increases colonic epithelial cell proliferation and mucosal barrier function to prevent inflammatory responses in the gut, *J. Biol. Chem.*, **291**(7), 3209 (2016).
7. M. J. Oh, S. M. Park, and H. T. Kim, The effects of snail secretion filtrate on the damaged skin barrier's recovery of the atopic dermatitis, *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*, **23**(3), 138 (2010).
8. J. Heo, Donguibogam, eds. S. H. Yoon and H. J. Kim, 2082, Publishing company of Donguibogam, Korea (2006).
9. T. Shimauchi, K. Sugita, D. Nishio, H. Isoda, S. Abe, Y. Yamada, R. Hino, M. Ogata, K. Kabashima, and Y. Tokura, Alterations of serum Th1 and Th2 chemokines by combination therapy of interferon- α and narrowband UVB in patients with mycosis fungoides, *J. Dermatol. Sci.*, **50**(3) 217 (2008).
10. H. S. Lim, H. Ha, M. Y. Lee, S. E. Jin, S. J. Jeong, W. Y. Jeon, N. R. Shin, D. E. Sok, and H. K. Shin, *Saussurea lappa* alleviates inflammatory chemokine production in HaCaT cells and house dust mite-induced atopic-like dermatitis in Nc/Nga mice, *Food Chem. Toxicol.*, **63**, 212 (2014).
11. J. H. Yang, Y. H. Hwang, M. J. Gu, W. K. Cho, and J. Y. Ma, Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- α /IFN- γ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells, *Phytomedicine.*, **22**(14), 1262 (2015).
12. G. Park, B. C. Moon, and H. S. Lim, Evaluation of cytotoxicity on 14 Chung-bu Medicinal Materials Described in the Dong Ui Bo Gam, *Journal of Oriental Medicine Industry*, **11**(1), 1 (2019).
13. K. Pei, W. Cao, Q. Q. Guo, Y. H. Xie, Z. M. He, and S. W. Wang, Analysis of liposoluble constituents in *Holotrichia diomphalia* by GC-MS and investigation their anti-inflammatory and analgesic activities, *Zhong. Yao. Cai.*, **35**(3), 357 (2012).

14. S. Y. Chung, C. P. Mattison, S. Reed, R. L. Wasserman, and W. A. Desormeaux, Treatment with oleic acid reduces IgE binding to peanut and cashew allergens, *Food Chem.*, **180**, 295 (2015).
15. A. M. Turpeinen, N. Ylönen, E. vonWillebrand, S. Basu, and A. Aro, Immunological and metabolic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy, *Br. J. Nutr.*, **100**(1), 112 (2008).
16. A. Jaudszus, M. Krokowski, P. Möckel, Y. Darcan, A. Avagyan, P. Matricardi, G. Jahreis, and E. Hamelmann, Cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid inhibits allergic sensitization and airway inflammation via a PPARgamma-related mechanism in mice, *J. Nutr.*, **138**(7), 1336 (2008).
17. P. Geng, Y. Yang, Z. Gao, Y. Yu, Q. Shi, and G. Bai, Combined effect of total alkaloids from *Feculae Bombycis* and natural flavonoids on diabetes, *J. Pharm. Pharmacol.*, **59**(8), 1145 (2007).
18. E. Mamessier and A. Magnan, Cytokines in atopic diseases: revisiting the Th2 dogma, *Eur. J. Dermatol.*, **16**(2), 103 (2006).
19. T. Yayeh, W. J. Oh, S. C. Park, T. H. Kim, J. Y. Cho, H. J. Park, I. K. Lee, S. K. Kim, S. B. Hong, B. S. Yun, and M. H. Rhee, Phellinus baumii ethyl acetate extract inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokine expression in RAW264.7 cells, *J. Nat. Med.*, **66**(1), 49 (2011).
20. K. A. Roebuck, Regulation of Interleukin-8 gene expression, *J. Interferon Cytokine Res.*, **19**(5), 429 (1999).
21. T. Ashikaga, Y. Yoshida, M. Hirota, K. Yoneyama, H. Itagaki, H. Sakaguchi, M. Miyazawa, Y. Ito, H. Suzuki, and H. Toyoda, Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicol. In Vitro*, **20**(5), 767 (2006).