

Emodin의 항염 및 피부장벽개선 활성 연구

김세기^{1,*} · 최재근² · 장영아^{3†}

¹대구가톨릭대학교 제약공학과, 조교수

²아이피아코스메틱, 대표

³경성대학교 화장품학과, 조교수

(2021년 11월 29일 접수: 2021년 12월 11일 수정: 2021년 12월 13일 채택)

Emodin Studies on Anti-inflammatory and Skin Barrier Improvement Activities

Se-Gie Kim¹ · Jae Gurn Choi² · Young-Ah Jang^{3†}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Catholic University,
Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38430, Republic of Korea

²IPIA Cosmetic Co., Ltd. 163, UN-ro, Busan, Republic of Korea

³Convergence Research Center for Smart Healthcare of KS R&DB Foundation,
Kyungsung University, Busan 48434, Republic of Korea

(Received November 29, 2021; Revised December 11, 2021; Accepted December 13, 2021)

요 약 : 호장근, 적하수오, 대황, 알로에 등과 같은 생약재의 주요 약리 활성 성분인 emodin은 항산화, 항균, 항염, 항암, 간보호 등에 효능이 있는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 emodin의 피부 질환 및 기능성 소재로서의 활용 가능성을 알아보기 위해 염증 개선과 피부장벽기능 개선 관련 활성을 확인하였다. human keratinocyte인 HaCaT 세포에 대하여 항염효과를 관찰하기 위해 cytokine억제능은 ELISA kit로, 단백질 발현은 western blot으로 확인하였다. TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL)로 활성화된 HaCaT 세포에서 emodin을 농도별(5, 10, 20, 40) μ M로 처리한 결과 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성량은 emodin의 농도가 증가함에 따라 감소됨을 확인하였다. 염증관련 단백질인 iNOS, COX-2 발현량에 대한 실험결과에서도 emodin 20 μ M 농도에서 control 대비 iNOS는 48%, COX-2는 29%가 저해됨을 확인하였다. 피부장벽기능 개선의 지표로써 filaggrin, involucrin, loricrin의 mRNA 발현 정도와 filaggrin, involucrin, loricrin의 생성량을 확인한 결과 에모딘 농도에 의존적으로 증가하는 우수한 결과가 얻어졌다. 특히 20 μ M 농도에서 대조군 대비 2배의 생성량 증가를 보인 filaggrin은 천연 보습인자인 NMF의 형성에 관계되는 단백질로 각질층의 보습에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 결론적으로 emodin의 피부 질환 및 기능성 소재로서의 활용 가능성 중 염증 개선 및 피부장벽기능 개선 소재로 활용될 수 있음을 확인하였으며 향후 추가적인 연구가 수행되면 그 활용 범위가 더 넓어질 수 있을 것으로 사료된다.

†Corresponding author
(E-mail: yaviol@ks.ac.kr)

주제어 : 에모딘, 항염, 피부장벽, 필라그린, 피부 질환 및 기능성 소재

Abstract : It has been reported that emodin, a major pharmacologically active ingredient of herbal medicines such as *Polygonum cuspidatum*, *Polygonum multiflorum*, *Rheum palmatum*, and *Aloe vera*, is effective in antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, anticancer, and liver protection. In this study, to investigate the potential of emodin to be used as a skin disease and functional material, the activity related to the improvement of inflammation and skin barrier function was confirmed. To observe the anti-inflammatory effect on HaCaT cells, which are human keratinocytes, cytokine inhibition was confirmed by ELISA kit and protein expression by western blot. In HaCaT cells activated with TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL), emodin was treated with each concentration (5, 10, 20, 40) μ M. As a result, It was confirmed that the production amount of TNF- α , IL-1 β and IL-6 decreased as the concentration of emodin increased. In the experimental results on the expression levels of inflammation-related proteins iNOS and COX-2, it was confirmed that 48% of iNOS and 29% of COX-2 were inhibited compared to control at a concentration of 20 μ M of emodin. As an indicator of skin barrier function improvement, the mRNA expression level of filaggrin, involucrin, and loricrin and the production amount of filaggrin, involucrin, and loricrin were confirmed, and excellent results were obtained with an emodin concentration-dependent increase. In particular, filaggrin, which was produced twice as much as the control at a concentration of 20 μ M, is a protein involved in the formation of NMF, a natural moisturizing factor, and is known to play an important role in moisturizing the stratum corneum. In conclusion, it was confirmed that emodin can be used as a material for improving inflammation and improving skin barrier function, which is part of the potential for use as a skin disease and functional material. It is believed that if additional research is performed in the future, the scope of its application can be further expanded.

Keywords : Emodin, anti-inflammatory, skin barrier, filaggrin, functional material

1. 서론

피부의 피부장벽기능의 약화나 점차적인 소실로 인해 발생하는 피부 증상에는 피부 갈라짐, 이상 각질 탈락, 피부 소양증, 피부 노화, 아토피성 피부 등이 있으며 건조한 환경에서는 그 증상이 더욱 악화될 수 있다[1, 2]. 이러한 증상들은 치명적인 질환과는 직접적으로 관련성은 적지만 삶의 질을 크게 떨어뜨릴 수 있는 요인이 되므로 이와 관련한 더 많은 연구가 필요하다. 피부는 표피, 진피, 피하지방층으로 크게 나눌 수 있으며 이 중 표피의 각질층이 피부 장벽기능에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[3, 4]. 각질층은 표피의 가장 깊은 층인 기저층세포가 분열하여 유극층, 과립층 등으로 이행, 분화 하여 최종적으로 각질층을 형성한다.[5] 각질층의 피부장벽기능은 벽돌과 모르타르 모델(bricks and mortar

model)로서 설명되며[6] 벽돌 역할을 하는 각질세포와 모르타르 역할을 하는 세포 간 지질(intercellular lipids) 등에 의해 수행된다[7]. 세포 간 지질은 세라마이드 50%, 콜레스테롤 25%, 지방산 15% 등으로 구성된 다층의 지질 이중막(multi-lamellar lipid layer)이며 이들의 성분 구성비 유지가 장벽기능 향상성에 중요한 요소인 것으로 보고되었다. 피부장벽에 또 하나의 중요한 요소인 각질세포는 NMF (natural moisturizing factor)를 포함하는 케라틴 단백질 다발을 corneocyte-envelope (CE)가 표면을 감싸고 있는 형태를 취한다[8]. 여기서 filaggrin은 각질세포의 단백질인 케라틴과 keratin-filaggrin 복합체를 형성하고 loricrin과 involucrin, envoplakin 등의 단백질이 측쇄 결합하여 불용성의 CE를 형성한다[9]. 이러한 형태의 각질세포에서 표면을 덮은 CE는 세포간 지질과 강한 접합을 이루어 피부장

벽 기능을 수행하게 된다[10]. filaggrin은 각질생성세포의 분화과정에서 시트룰린화됨(citrullinated)으로써 최종적으로 천연보습인자(NMF)로 바뀌게 된다[11, 12]. 따라서 filaggrin, loricrin, involucrin 등은 정상적인 표피 항상성 유지를 확인하는 주요한 단백질이며 이들의 발현 조절에 영향을 미치는 소재는 표피의 피부장벽기능개선에 도움이 될 수 있는 것으로 보고되고 있다[13]. Emodin(1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone)은 호장(*Polygonum cuspidatum*), 적하수오(*Polygonum multiflorum*), 대항(*Rheum palmatum*), 알로에 베라(*Aloe vera*) 등 효과 있는 생약재로 널리 사용되는 식물에 함유된 천연 anthraquinone 유도체이다[14, 15, 16, 17]. 이 식물들은 동아시아 여러 국가에서 전통 의약품으로 사용하여 왔으며[18] 특히 마디풀과에 속한 다년생 초본인 호장은 약리 작용으로 항산화작용, 항균작용, 항바이러스작용 등이 밝혀져 있다[19]. 최근에는 항산화, nitricoxide 생성억제 및 COX-2 활성억제, 간염바이러스에 대한 항바이러스 효능 및 *Streptococcus mutans* 등에 대한 항균 효과, 관절염 억제효과 등이 보고되었다[20, 21, 22, 23]. 이러한 결과들은 Emodin이 우수한 약리작용을 가질 수 있음을 암시하며 다양한 연구에서 항암, 간보호, 항염, 항산화 및 항균활성 등이 있는 것으로 밝혀지고 있다[24, 25, 26]. 그러나 아직까지 emodin의 피부 질환 및 기능성 소재로서의 효능에 대한 연구는 수행되지 않아 자료가 거의 없는 상황이다. 본 연구에서는 전통적으로 효능이 있는 것으로 알려진 생약 소재를 기반으로 우수한 피부 약리 활성 물질을 발굴해 내기 위한 노력의 일환으로 Emodin의 염증 개선과 피부장벽 개선 효능에 대한 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 연구에서 사용한 emodin($C_{15}H_{10}O_5$)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며 molecular weight는 270.24 g/mol이다.

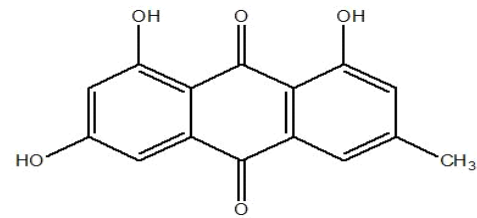


Fig. 1. Structure of emodin.

2.2. 세포 배양

본 연구에 사용된 human keratinocyte인 HaCaT 세포는 대구한의대학교 피부면역학 연구실에서 제공 받아 실험하였다. 실험을 위한 시약인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 0.4% trypan blue stain과 실험에 사용된 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HaCaT 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Introgen Therapeutics, USA)과 1% penicillin/streptomycin (HycloneTM, GE Healthcare Life Sciences, USA) 100 unit/mL가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GibcoTM, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (FormaTM, Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

2.3. MTT assay

HaCaT cell을 96-well plate에 2×10^4 cells/well 이 되게 0.18 mL 분주하고, emodin을 농도별로 조제한 후 0.02 mL 첨가하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.02 mL 첨가하여 4시간 배양한 후 상층액을 제거하고, 형성된 formazan에 각 well당 0.1 mL의 DMSO 용액을 가하여 실온에서 15분간 반응시킨 뒤 ELISA reader (PowerWave XS, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.4. TNF- α , IL-1 β and IL-6 측정

HaCaT cell을 6 well plate에 1×10^5 cells/mL로 24시간 배양 후 TNF- α /IFN- γ 와 농도별로 제조한 emodin을 처리한 후 18시간 뒤 세포 배양액을 취하여 TNF- α , IL-1 β and IL-6를 측정하였다. 상층액을 수거하여 측정 전까지 -70°C 에서 보관하였고 TNF- α , IL-1 β and IL-6의 함량은 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였으며, 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

2.5. iNOS and COX-2 protein expressions 측정

HaCaT cell을 6 well plate에 1×10^5 cells/mL의 농도로 접종 및 배양하여 세포 밀도가 80% 되었을 때 무혈청 배지로 교환하고 24시간 배양한 후 emodin을 농도별로 처리하였다. 각 샘플 처리 후 TNF- α /IFN- γ 를 Normal 군을 빼 모든 well에 넣어서 자극시키고 24시간 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후에 scraper로 세포를 수확하였다. 수확된 각 세포에 lysis buffer를 well 당 $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 1시간 동안 냉장하여 세포를 용해시키고 그 후 원심분리 하여($12,000 \text{ rpm}$, 4°C , 10 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, $10 \mu\text{L}$ 의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 transfer하였다. transfer가 끝나면 5% skim milk에 1~2시간 동안 방치하여 background를 제거시켰다. $1 \times \text{TBST}$ 로 3회 washing 후 1차 antibody (1:1000)를 24시간 불인 후 $1 \times \text{TBST}$ 로 3회 washing 후 2차 antibody (1:1000)를 2시간 반응한 후 ECL kit (Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Image Quant LAS-4000 (GE life sciences, Taiwan)으로 band density를 확인하였다.

2.6. Western blot

Emodin의 피부보습과 피부장벽 강화 효과를 검증하기 위해 HaCaT 세포에 시료를 농도별로 처리하고 37°C , 5% CO_2 incubator에서 24시간

배양하였다. 그 후, 상층액을 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척 후 cell scraper로 수확하였다. 수확된 각 세포에 lysis buffer를 well 당 $100 \mu\text{L}$ 를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리 하여 ($12,000 \text{ rpm}$, 4°C , 10 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, $20 \mu\text{L}$ 의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 250 V 에서 4시간 이상 transfer하였다. Transfer가 끝나면 5% skim milk에 24시간 동안 방치하여 background를 제거시켰다. $1 \times \text{TBST}$ 로 3회 washing 후 1차 antibody (1:1000)를 24시간 불인 후 $1 \times \text{TBST}$ 로 5회 washing 후 2차 antibody (1:1000)를 4시간 반응한 후 ECL kit (Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. band density는 Image Quant LAS-4000 (GE life sciences, Taiwan)으로 확인하였다.

2.7. Real-time PCR

HaCaT cell을 24 well plate에 4×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 뒤 emodin을 농도별로 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)로 2회 세척 후, TRI-Solution을 이용하여 세포벽을 깨고 chloroform을 넣어 수층액층과 유기용매층으로 분리하여 phenol성분을 제거한 뒤, Isopropanol로 RNA를 침전시켜 75% 에탄올로 세척하였다. 이후 에탄올을 제거하고 RNA pellet만 남겨 air-dry 하여 RNase free D.W를 넣고 pellet을 녹여 최종적으로 total RNA를 추출하였다.

추출한 RNA를 nano drop (microdigital, Seongnam, Korea)을 이용하여 정량하고 RT master mix를 이용해 역전사 반응하여 cDNA를 합성한 후 filaggrin, involucrin, loricin의 mRNA 발현 확인을 위해 TB Green® Premix Ex Taq II를 이용하여 증폭하였다. PCR조건은 94°C 에서 30초 (denaturation), 55°C 에서 30초 (annealing), 72°C 에서 30초 (extension)를 40회 반복하였다.

2.8. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software package (Version 22.0; IBM, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)를 이용하여 유의성을 확인한 후, t-test를 이용한 다중비교를 실시하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 독성 측정 결과

Emodin이 세포 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대표적인 cell viability assay인 MTT assay를 진행하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. MTT시약은 살아있는 세포의 막을 통과하여 불용성 결정체를 형성하고 이를 유기용매로 녹여주는 방식으로 흡광도가 높을수록 cell viability가 높음을 의미한다[27]. HaCaT cell에 emodin을 농도별로 (5, 10, 20, 40) μM 처리하여 세포의 생존율을 확인한 결과 각각 (97, 93, 90, 75)%로 나타났으며 90% 이상 생존율을 나타내는 20 μM 이하를 유효농도로 잡고 이후 실험을 진행하였다.

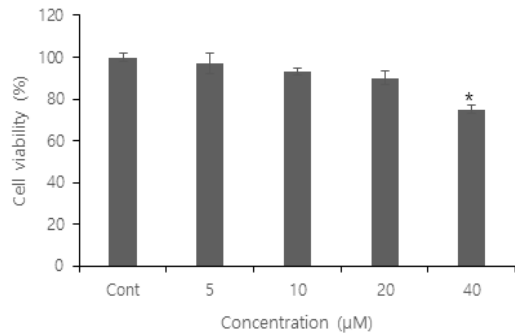


Fig. 2. Cell viability of emodin, cell viability is decreased significantly depend on concentration. Data are expressed as means \pm SEM.

3.2. 염증성 cytokine 생성량 측정 결과

항염증 활성을 알아보기 위한 기본적인 실험으로 염증 관련 단백질인 iNOS, COX-2와 이들 효소가 유발하는 NO, PGE₂의 생성 억제, 그리고 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 Cytokine 생성을 억제하는 물질은 유용한 항염증제로 활용될 수 있다. 염증반응을 자극하는 cytokine의 발현을 확인하기 위해 TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL)로 활성화된 HaCaT 세포에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성량을 측정하였다. 그 결과 emodin은 (5, 10, 20) μM 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 TNF- α , IL-1 β , 및 IL-6의 생성량을 저해하였으며 그 결과는 그림 Fig. 3과

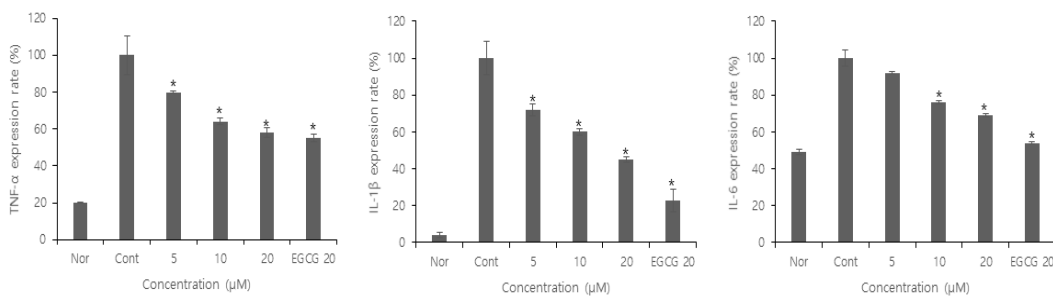


Fig. 3. The effect of emodin on TNF- α , IL-1 β and IL-6 Production Expressions in TNF- α /IFN- γ induced HaCaT Cells. HaCaT cells(2×10^5 cells/mL) were preincubated for 24 h, and the cells were stimulated TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL) in the presence of emodin (5, 10, 20 μM) for 24 hr. Nor: TNF- α /IFN- γ not induced group, Con: TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL) induced group. EGCG: Epigallocatechin gallate. Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data.

같다.

3.3. iNOS and COX-2 protein expressions 측정 결과

염증 관련 단백질인 iNOS, COX-2에 대한 emodin의 저해능을 확인하기 위해 TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL)로 활성화된 HaCaT 세포에 emodin을 (5, 10, 20) μ M 농도로 처리한 후 Western blot을 통해 단백질의 발현량을 각각 확인하였다. 그 결과 TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL)로 유도된 control군과 대비하여 emodin을 처리한 시험군의 iNOS, COX-2 발현량은 emodin의 농도가 증가함에 따라 감소됨을 확인하였으며 20 μ M 농도에서 대조군 대비 iNOS는 48%, COX-2는 29%가 저해됨을 확인하였다. 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다.

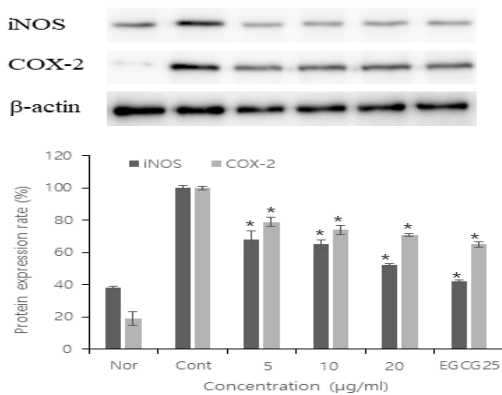


Fig. 4. The Effect of emodin on iNOS and COX-2 expressions protein in TNF- α /IFN- γ induced HaCaT Cells. HaCaT cells(2×10^5 cells/mL) were preincubated for 24 h, and the cells were stimulated TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL) in the presence of emodin (5, 10, 20 μ M) for 24 hr. Nor: TNF- α /IFN- γ not induced group, Con: TNF- α /IFN- γ (10ng/mL+10ng/mL) induced group. EGCG: Epigallocatechin gallate. Results are expressed as means \pm S.D. of triplicate data.

3.4. Western blot 측정 결과

피부 turn-over 과정에서 각질형성세포는 1열

의 원통형 세포가 기저층에서 분열하여 상층으로 올라가면서 성숙해지고 결과적으로 각질세포로 분화되는데 이때 분화와 관련되어 발현이 증가하는 유전자로 transglutaminase 1 및 3, involucrin, cornifin, loricrin, filaggrin 그리고 small proline-rich protein (SPR)등이 있다[28]. 각질형성세포의 분화가 진행되면 세포막의 안쪽에 involucrin, cornifin, loricrin, SPR 등의 구조 단백질을 transglutaminase가 결합시키어 물에 녹지 않는 단단한 구조물인 각질세포막 (cornified cell envelope)을 형성하게 된다[29]. 이러한 각질형성세포 분화가 비정상적으로 일어나게 되면 피부장벽 기능에 결함이 생기게 되고 건조한 피부를 야기하고 결과적으로 피부건조의 정도에 따라 노화 피부 및 아토피성 피부 질환까지로 이어질 수 있다.

본 연구에서는 피부장벽에 영향을 미치는 filaggrin (FG), involucrin (IV), loricrin (LC)의 발현량을 western blot assay로 확인한 결과, 샘플과 자극을 주지 않은 normal군 대비 TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL)로 자극을 준 control군에서 FG, IV, LC의 발현량이 줄어들었으며 emodin을 농도별로 처리한 결과 FG은 20 μ M 농도에서 155%의 발현량을 나타내어 자극을 준 대조군의 78% 대비 2배의 높은 증가량을 보였다. LC도 (5, 10, 20) μ M 농도에서 각각 (88, 83, 97)%의 결과를 나타내었으며 농도 의존적으로 증가하는 양상을 나타내어 피부장벽 강화 능이 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 특히 대조군 대비 2배의 증가량을 보인 filaggrin은 천연 보습인자인 NMF의 형성에 관계되는 단백질로 각질층의 보습에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[30].

3.5. Real-time PCR 측정 결과

Emodin의 보습활성을 알아보기 위해 대표적인 피부장벽 구성인자인 filaggrin (FG), involucrin (IV), loricrin (LC)의 mRNA 발현 정도를 확인하고 Fig. 6에 나타내었다. emodin (5, 10, 20) μ M 농도로 안정화된 세포에 4시간 동안 처리한 후 Real-time PCR을 통해 유전자의 발현을 확인하였다. 그 결과 control 대비 emodin 20 μ M 농도에서 TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL)를 처리한 control 군 대비 LC> IV> FG 순으로 mRNA 발현량이 상승하였다. 이러한 결과는 FG> LC> IV 순으로 나타난 단백질 발현량

과는 일치하지 않은 결과를 나타내었으며 mRNA 발현에서 가장 낮은 수치를 나타낸 FG의 경우 단백질 합성에서는 가장 높은 값을 나타내어 mRNA에 대한 민감성이 가장 높은 것으로 판단된다.

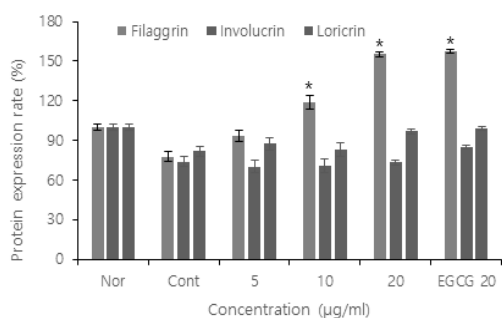


Fig. 5. Effects of emodin on TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL) -induced filaggrin , involucrin, loricrin protein expression. Nor: TNF- α /IFN- γ not induced group, Cont: TNF- α /IFN- γ induced group. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, compared with control.

4. 결론

전통적으로 효능이 있는 것으로 알려진 생약 소재를 기반으로 우수한 피부 약리 작용 물질을 발굴해 내기 위해 본 연구를 수행하였으며 호장근, 적하수오, 대황, 알로에 등과 같은 생약재의 주요 약리 활성 물질로 알려진 emodin으로 부터 염증 개선과 피부장벽기능 개선 활성을 확인하였다. 이미 emodin은 항산화, 항균, 항염, 항암, 간보호 등에 효능이 있는 것으로 보고되었으며, 따라서 피부 질환 및 미용 관련 효능도 있을 것으로 기대되었다. human keratinocyte인 HaCaT cell에 대하여 항염효과를 관찰하기 위해 TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL)로 활성화된 HaCaT 세포에서 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성량을 측정된 결과 emodin을 (5, 10, 20) μ M 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 TNF- α , IL-1 β , 및 IL-6의 생성량이 저해되었으며 20 μ M 농도에서는 대조군 대비 각각 42%, 55%, 31%가 저해되었다. iNOS, COX-2 발현량에 대한 실험결과에서도 emodin의 농도가 증가함에 따라 발현량이 감소됨을 확인하였으며 emodin 20 μ M 농도에서 대조군 대비 iNOS는 48%, COX-2는 29%가 저해됨을 확인하였다. 피부장벽기능 개선의 지표로써 filaggrin, involucrin, loricrin의 mRNA 발현 정도를 확인한 결과 emodin 20 μ M 농도에서 대조군 대비 각각 2.1배, 4.2배, 4.2배의 발현 증가가 관찰되었다. 또한 filaggrin, involucrin, loricrin의 생성량을 western blot assay로 확인한 결과 emodin 20 μ M 농도

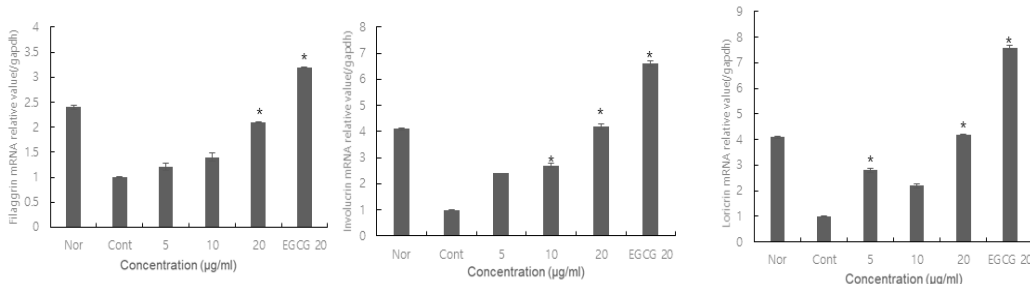


Fig 6. Effects of Emodin on TNF- α (10 ng/mL)/IFN- γ (10 ng/mL) -induced Filaggrin , Involucrin, Loricrin mRNA expression. Nor: TNF- α /IFN- γ not induced group, Cont: TNF- α /IFN- γ induced group. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, compared with control.

에서 대조군 대비 각각 1.99배, 0.99배, 1.18배의 생성량 증가가 확인되었다. 이상의 연구 결과로부터 emodin은 우수한 염증 개선과 피부장벽기능 개선 효과가 있음이 확인되었으며 특히 대조군 대비 2배의 생성량 증가를 보인 filaggrin은 천연 보습인자인 NMF의 형성에 관계되는 단백질로 각질층의 보습에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 결론적으로 emodin의 피부 질환 및 미용 소재로서의 활용 가능성 중 염증 개선 및 피부장벽기능 개선 물질로서의 활용성을 확인하였으며 향후 추가적인 신호전달경로나 생리활성 메카니즘 등의 연구가 수행되면 그 활용성이 더 넓어질 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. B. E. Kim, D. Y. M. Leung, "Significance of Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis", *Allergy Asthma Immunol Res.*, Vol.10, No.3, pp. 207-215, (2018).
2. H. M. Wang, C. H. Park, "A Study on Extracts and Compounds Effective in Improving Skin Barriers", *The Korean Society of Cosmetics and Cosmetology*, Vol.10, No.1, pp. 107-121, (2020).
3. K. L. Kim, J. S. Kim, "The Effect of Sebum and Moisture Condition of Skin on the Facial Pigmentation", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.7, No.1, pp. 101-113, (2009)
4. E. H. Choi, "Aging of the Skin Barrier", *Clinics in Dermatology*, Vol.37, No.4, pp. 336-345, (2019)
5. C. S. Park, "Skin barrier and beauty foods", *Food Science and Industry*, Vol.40, No.4, pp. 19-26, (2007)
6. H. H. Jang, S. N. Lee, "Epidermal skin barrier", *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.14, No.3, pp. 339-347, (2016)
7. G. Yang, J. K. Seok, H. C. Kang, Y. Y. Cho, H. S. Lee, J. Y. Lee, "Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.21, No.8, pp. 2867, (2020)
8. C. S. Park, "Epidermal homeostasis and dry skin management", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.34, No.1, pp. 1-8, (2008)
9. K. D. Kim, H. J. Kim, N. I. Kim, "Immunohistochemical Study of Expression of Involucrin, Loricrin, Filaggrin and Bcl-2 in Psoriasis", *Korean Journal of Dermatology*, Vol.40, No.5, pp. 506-512, (2002)
10. H. M. Kim, J. N. Lee, J. M. Kim, S. K. Kim, S. M. Park, "The Effect of Jeju Wild Ginseng Extracts on Skin Barrier via Serine-Palmitoyltransferase", *Journal of Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.42, No.2, pp. 119-126, (2016)
11. Z. Szekanecz, L. Soós, Z. Szabó, A. Fekete, A. Kapitány, A. Végvári, S. Sipka, G. Szücs, S. Szántó, G. Lakos, "Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: as good as it gets?", *Clinical reviews in allergy & immunology*, Vol.34, No.1, pp. 26-31, (2008)
12. M. A. McAleer, I. Jakasa, N. Raj, C. P. F. O'Donnell, M. E. Lane, A. V. Rawlings, R. Voegeli, W. H. I. McLean, S. Kezic, A. D. Irvine, "Early-life regional and temporal variation in filaggrin-derived natural moisturizing factor, filaggrin-processing enzyme activity, corneocyte phenotypes and plasmin activity: implications for atopic dermatitis", *British Journal of Dermatology*, Vol.179, No.2, pp. 431-441, (2018)
13. W. J. Lee, K. H. Park, H. W. Cha, M. Y. Sohn, K. D. Park, S. J. Lee, D. W. Kim, "The expression of involucrin, loricrin, and filaggrin in cultured sebocytes", *Annals of dermatology*, Vol.26, No.1, pp. 134-137, (2014)
14. E. B. Lee, M. M. Kim, "Effect of Ethanolic Extracts Mixed with Grains and Fallopia multiflora on Melanogenesis", *Journal of Life Science*, Vol.29, No.4, pp. 461-469, (2019)

15. Y. S. Jang, V. M. Chu, K. J. Lee, E. Y. Seo, D. H. Kim, J. S. Kang, "Effects of the decoction water on the extraction of the bioactive compounds from rhubarb", *Analytical Science & Technology*, Vol.24, No.1, pp. 38-44, (2011)
16. R. Mandrioli, L. Mercolini, A. Ferranti, S. Fanali, M. A. Raggi, "Determination of aloe emodin in Aloe vera extracts and commercial formulations by HPLC with tandem UV absorption and fluorescence detection", *Food Chemistry*, Vol.126, No.1, pp. 387-393, (2011)
17. H. J. Chi, J. R. Choi, S. C. Yu, "Pharmacognostical Studies on 'Ho-Jang' (III) -Phytochemical Study of the Rhizome of Polygonum ellipticum Migo", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.13, No.4, pp. 145-152, (1982)
18. T. X. N. Huy, A. W. B. Reyes, H. T. Hop, L. T. Arayan, V. H. Son, W. Min, H. J. Lee, S. Kim, "Emodin successfully inhibited invasion of Brucella abortus via modulating adherence, microtubule dynamics and ERK signaling pathway in RAW 264.7 cells", *Journal of microbiology and biotechnology*, Vol.28, No.10, pp. 1723-1729, (2018)
19. H. A. Jung, S. S. Roh, M. S. Oh, "The effects of Polygonum cuspidatum on the skin functions", *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*, Vol.19, No.1, pp. 73-89, (2009)
20. C. Y. Hsu, Y. P. Chan, J. Chang, "Antioxidant activity of extract from Polygonum cuspidatum", *Biological research*, Vol.40, No.1, pp. 13-21, (2007)
21. K. W. Kim, K. T. Ha, C. S. Park, U. H. Jin, H. W. Chang, I. S. Lee, C. H. Kim, "Polygonum cuspidatum, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages", *Vascular pharmacology*, Vol.47, No.2-3, pp. 99-107, (2007)
22. J. S. Chang, H. W. Liu, K. C. Wang, M. C. Chen, L. C. Chiang, Y. C. Hua, C. C. Lin, "Ethanol extract of Polygonum cuspidatum inhibits hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line", *Antiviral research*, Vol.66, No.1, pp. 29-34, (2005)
23. J. H. Chung, Y. M. Kim, J. P. Bak, I. S. Ryu, K. H. Leem, C. J. Kim, E. H. Kim, "The effect of pharmacopuncture with polygonum cuspidatum Sieb et Zucc. solution on collagen-induced arthritis in wistar rats", *Korean Journal of Acupuncture*, Vol.28, No.1, pp. 79-89, (2011)
24. N. H. Lee, S. M. Lee, D. H. Song, J. Y. Yang, H. S. Lee, "Antimicrobial effect of emodin isolated from Cassia tora Linn. seeds against food-borne bacteria", *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol.56, No.3, pp. 187-189, (2013)
25. Y. B. Lee, E. J. Cho, D. H. Lee, Y. Cho, S. J. Yu, J. H. Lee, Y. J. Kim, H. S. Lee, C. Y. Kim, J. H. Yoon, "Emodin attenuates bile acid-induced and palmitate-induced hepatocyte apoptosis by suppressing JNK activation", *Hepatology*, Vol.58, pp. 469A-469A, (2013)
26. X. Dong, J. Fu, X. B. Yin, S. Cao, X. C. Li, L. F. Lin, H. J. Ni, "Emodin: a review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics", *Phytotherapy Research*, Vol.30, No.8, pp. 1207-1218, (2016)
27. A. Bahuguna, I. Khan, V. K. Bajpai, S. C. Kang, "MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug", *Bangladesh Journal of Pharmacology*, Vol.12, No.2, pp. 8 (2017)
28. P. M. Steinert, "A model for the hierarchical structure of the human epidermal cornified cell envelope", *Cell death and differentiation*, Vol.2, No.1, pp. 33-40, (1995)
29. S. Choi, J. Shin, B. Lee, Y. Cho, "Dietary effect of green tea extract on hydration improvement and metabolism of free amino acid generation in epidermis of UV-irradiated hairless mice". *Journal of*

- Nutrition and Health*, Vol.49, No.5, pp. 269-276, (2016)
30. H. Y. Yu, I. J. Yang, V. R. Lincha, I. S. Park, D. U. Lee, H. M. Shin, "The Effects of the Fruits of *Foeniculum vulgare* on Skin Barrier Function and Hyaluronic Acid Production in HaCaT Keratinocytes", *Journal of Life Science*, Vol.25, No.8, pp. 880-888, (2015)