

돌외 캘러스 추출물의 항염, 항알러지 및 *S. aureus*에 의한 각질세포 손상 완화 효능

이혜숙·이혜민·김한영[†]

애경산업 중앙연구소

(2020년 12월 3일 접수, 2021년 3월 22일 수정, 2021년 5월 21일 채택)

Effects of *Gynostemma pentaphyllum* Callus Extract on Anti-inflammation, Anti-allergy, and Alleviation of Keratinocyte Damage Caused by *S. aureus*

Hye Suk Lee, Hye Min Lee, and Han Young Kim[†]

Aekyung Industrial Corporation R&D center, 120, Sinseongnam-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34108, Korea

(Received December 3, 2020; Revised March 22, 2021; Accepted May 21, 2021)

요약: 본 연구는 울릉도 돌외(*Gynostemma pentaphyllum*) 잎으로부터 캘러스 유도 및 추출한 후, 피부장벽 기능과 관련된 항염증, 항알러지, 각질세포외막 형성, *S. aureus*에 의한 각질형성세포 손상 완화 효능을 확인하고자 수행되었다. 돌외 캘러스 추출물의 피부에 대한 항염증 효능을 확인하기 위해, PAR-2 agonist로 활성화된 primary epidermal keratinocyte (HEKa)에서 염증성 사이토카인들의 발현을 확인한 결과, 돌외 캘러스 추출물은 IL-8, IL-25, TSLP 발현을 저해하는 효능이 있는 것을 확인하였다. RBL-2H3 세포를 이용한 β -hexosaminidase assay 시험을 통해 항알러지 효능을 확인한 결과, β -hexosaminidase 방출을 억제하는 효과를 보였다. 또한, 돌외 캘러스 추출물은 HaCaT 세포에서 각질세포외막(cornified envelope) 형성 효과가 있음을 확인하였고, HaCaT 세포와 *S. aureus* 공배양 실험을 통해 *S. aureus*에 의한 각질형성세포 생존율 감소를 완화하는 효능이 있음을 확인하였다. 본 연구 결과를 종합해보면, 울릉도 돌외 캘러스 추출물은 항염, 항알러지, *S. aureus*에 의한 각질세포 손상 완화 효능에 유효한 소재의 가능성을 확인하였고, 피부장벽 개선을 위한 화장품 소재로서 활용 가치가 있을 것으로 판단된다.

Abstract: This study was conducted to identify the efficacy related to skin barrier functions such as anti-inflammatory, anti-allergic, cornified envelope formation and the alleviation effect of keratinocyte damage caused by *S. aureus* using the callus extract, which was induced and extracted from the leaves of *Gynostemma pentaphyllum* in Ulleungdo Island. In order to confirm the anti-inflammatory effect of the *G. pentaphyllum* callus extract on the skin, the expression of inflammatory cytokines was investigated in primary epidermal keratinocytes (HEKa) activated with PAR-2 agonist, and the *G. pentaphyllum* callus extract showed IL-8, IL-25, and TSLP production inhibitory effect. β -Hexosaminidase assay using RBL-2H3 cells was performed to confirm the anti-allergic efficacy, and *G. pentaphyllum* callus extract showed the effect of inhibiting the release of β -hexosaminidase. In addition, *G. pentaphyllum* callus extract showed the cornified envelope formation effect in HaCaT cells, and through the co-culture experiment with HaCaT cells and *S. aureus*, it showed alleviation effect of keratinocyte damage caused by *S. aureus*. Therefore, *G. pentaphyllum* callus extract is considered to be a useful cosmetic material for improving skin barrier with anti-inflammatory, anti-allergic and alleviation effect of keratinocyte damage caused by *S. aureus*.

Keywords: *Gynostemma pentaphyllum* callus, anti-inflammation, anti-allergy, keratinocyte damage by *S. aureus*, skin barrier

[†] 주 저자 (e-mail: hans73@aekyung.kr)
call: 042-879-0294

1. 서론

돌외(*Gynostemma pentaphyllum*, *G. Pentaphyllum*)는 박목 박과의 쌍떡잎식물로, 여러해살이 덩굴식물이다. 한국에서는 주로 제주도 및 울릉도의 산이나 들의 숲 속에서 자란다. 예로부터 강장, 강정, 이뇨, 소염 및 건위 효과가 있는 약용식물로 알려져 있다. 돌외의 유효성분은 다양한 지페노사이드(gypenoside)를 포함하는 담마란(dammarane type)계 사포닌으로 알려져 있으며 항염, 항산화 작용 및 혈관내피 세포 보호 작용, 심혈관 기능 개선 작용 및 콜레스테롤 저하 작용 등을 가지는 것으로 보고되고 있다[1-3].

캘러스(callus)는 식물체에 상처가 났을 때 생기는 조직이다. 화장품에서는 자연 지향적이고 환경 친화적인 추세에 따라 식물성 원료를 이용한 니즈가 증가하고 있는데, 식물자원의 산업화를 위한 무분별한 채취 및 자연환경 훼손 등의 문제를 해결하기 위한 방법 중 하나로 식물의 캘러스를 활용한 화장품 원료의 개발이 최근 활발히 이루어지고 있다. 식물의 캘러스를 이용한 화장품 원료는 생육지의 기후나 환경, 수확 시기 등에 영향을 받지 않고 일정한 품질의 원료 개발할 수 있는 장점이 있고, 보호 식물종처럼 활용에 제한이 있는 식물들의 활용 가능성을 높일 수 있는 기술이다.

피부는 인체 최외곽에 존재하는 기관으로서 체내 수분을 보호하고, 감염원 등 외부 인자의 침입으로부터 보호하는 필수적인 장벽 기능을 수행하고 있다. 피부장벽(skin barrier)이 손상되면 외부로부터 침투한 각종 알레르겐에 의해 쉽게 노출이 되는데, 손상된 피부장벽을 가지는 피부는 피부 pH가 증가하여 serine protease 활성이 증가하고, 각질형성 세포의 protease activated receptor-2 (PAR-2)가 활성화되어 IL-25, IL-33, thymic stromal lymphopoietin (TSLP)를 세포 밖으로 분비한다. 이러한 인자들은 Th2 면역세포를 활성화시켜 아토피 피부염 등 염증반응을 악화시킨다[4-7].

이와 같이, 피부장벽이 손상되면 염증, 가려움증이 동반되어 피부의 물리적 손상을 초래하고, 피부장벽 손상을 더욱 악화시키게 된다. 아토피 피부염 등에서 면역학적 이상으로 인해 IgE가 증가하고, IgE에 감작된 비만세포(mast cell)가 알레르겐과 반응을 하면, 탈과립화로 β -hexosaminidase, 히스타민(histamine), 염증 매개인자 등이 방출된다[8,9]. 이러한 인자들은 염증 및 가려움증을 유발할 수 있다.

또한 아토피 피부염의 악화 시 포도상구균인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)가 증가한다[10]. *S. aureus*는 α -toxin을 분

비하여 각질형성세포의 괴사(necrosis)를 유도하여 피부 장벽을 손상시킨다[11,12].

본 연구에서는 울릉도 돌외의 잎으로부터 캘러스를 유도하여 추출한 후, 돌외 캘러스 추출물의 항염증, 항알러지, *S. aureus*에 의한 각질세포 손상 완화 효능을 확인하였으며, 이를 화장품의 개발 및 응용에 활용하고자 한다.

2. 재료 및 실험

2.1. 실험재료

배지로 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 Gibco BRL (USA)를 사용하였다. Dermal cell basal medium, keratinocyte growth kit는 ATCC (USA)사의 제품을 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), SLIGKV-NH₂, dinitrophenyl-immunoglobulin E (DNP-IgE), DNP-bovine serum albumin (DNP-BSA)은 Sigma-Aldrich (USA)사의 제품을 구입하여 사용하였다.

2.2. 돌외 캘러스 추출물의 제조

실험에 사용한 돌외(*G. Pentaphyllum*)는 경북 울릉군 울릉읍(Korea)에서 입수한 돌외의 잎을 사용하였으며, 돌외 캘러스는 주식회사 바이오에프디엔씨(Korea)에서 돌외 잎으로부터 캘러스로 유도한 것을 사용하였다. 건조한 돌외 캘러스 분말 40 g에 정제수 1 L를 첨가한 후, 120 °C에서 열수 추출하였다. 추출 후, 필터로 여과하여 고형분을 제거한 것을 실험에 사용하였다.

2.3. 세포 배양

Primary epidermal keratinocyte (Normal, Human, Adult (HEKa))은 American Type Cell Culture (ATCC, USA)로부터 분양 받아 dermal cell basal medium (ATCC, USA)에 keratinocyte growth kit (ATCC, USA)를 추가한 배지를 사용하여 배양하였다. Rat basophilic leukemia cell line인 RBL-2H3 cell은 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 분양 받아 10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin (final concentration 100 U/mL)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. Human immortalized keratinocyte cell line인 HaCaT cell은 네오팜(Korea)으로부터 분양 받아 10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin (final concentration 100 U/mL)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 각각의 세포는 37 °C, 5% CO₂ 배양기

에서 배양하였으며, 세포가 plate 바닥에 80% 부착될 때마다 계대배양 하였다.

2.4. 세포 생존율 측정

돌의 켈러스 추출물의 항염, 항알러지, *S. aureus*에 의한 각질세포 손상 완화 효능 실험에 앞서, HEKa, RBL-2H3, HaCaT 세포 각각에 대한 돌의 켈러스 추출물의 세포 독성과 처리 농도 범위를 확인하기 위하여 MTT assay를 통한 세포생존율을 측정하였다. HEKa 세포를 24 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 24 h 동안 배양한 뒤, 돌의 켈러스 추출물을 농도 별로 처리하여 다시 24, 48 h 동안 배양하였다. 이후, MTT 시약을 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 4 h 반응시켰다. 반응이 끝난 후 MTT 용액을 제거하고, 여기에 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 formazan을 용해시키고, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

RBL-2H3 세포는 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 24 h 동안 배양한 뒤, 돌의 켈러스 추출물을 농도 별로 처리하여 다시 24 h 배양한 후, MTT assay를 통해 세포 생존율(%)을 계산하였다.

HaCaT 세포는 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 24 h 동안 배양한 뒤, 돌의 켈러스 추출물을 농도 별로 처리하여 다시 48 h 동안 배양한 후, MTT assay를 통해 세포 생존율(%)을 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{시료 처리군} / \text{대조군}) \times 100$$

2.5. IL-8, IL-25, TSLP 생성량 측정

각질형성세포에서 PAR-2 활성화에 따른 염증 반응을 돌의 켈러스 추출물이 억제하는 효능을 가지는지 확인하기 위해 primary cell인 HEKa 세포를 이용하여 염증성 인자 IL-8, IL-25, TSLP 생성량을 측정하였다. HEKa 세포를 6 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 배양하였다. 24 h 배양 후, PAR-2 agonist로서 SLIGKV-NH₂ 10 μM 와 돌의 켈러스 추출물을 농도 별로 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 IL-8 ELISA kit (R&D Systems, USA), IL-25 ELISA kit (Abcam, USA), TSLP ELISA kit (MyBiosource, USA)를 이용하여 프로토콜에 따라 각각 수행한 후, microplate reader (Multiskan, ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2.6. β -Hexosaminidase Assay

돌의 켈러스 추출물의 항알러지 효능을 확인하기 위해 RBL-2H3 세포주를 이용하여 β -hexosaminidase 방출량을 측정하였다. RBL-2H3 세포는 점막형 비만세포의 특징을 나타내고 세포막표면에 IgE 수용체를 발현하고 있어, IgE에 감작된 후 항원에 반응하여 β -hexosaminidase를 분비하는 특성을 가지고 있다[13]. β -hexosaminidase assay는 Jung 등[14]의 방법을 이용하였다. 24-well plate에 RBL-2H3 세포를 1×10^5 cells/well로 분주하고, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 DNP-IgE를 함유한 DMEM 배지 조건에서 12 h 배양하였다. 그 후, 세포를 siraganian buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM glucose, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2 회 세척한 다음, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 동일 buffer로 10 min 전 배양하였다. 돌의 켈러스 추출물을 세포독성이 없는 농도 이하에서 처리하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 30 min 반응시켰다. DNP-BSA를 최종 농도 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 가하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 2 h 반응시키고, ice bath에서 10 min 배양한 후 반응을 종결시켰다. 상층액 50 μL 를 96 well black plate에 옮기고, Beta hexosaminidase activity assay kit (CELL BIOLABS, USA)를 이용하여 프로토콜에 따라 수행한 후, microplate fluorometer (Victor X2, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 excitation wavelength 365 nm, emission wavelength 450 nm에서 β -hexosaminidase 양을 측정하였다.

2.7. 각질세포외막(Cornified Envelope, CE) 형성 촉진 활성

돌의 켈러스 추출물의 각질분화 유도 효능을 확인하기 위해 HaCaT 세포를 이용하여 각질세포외막의 양을 측정하였다. 사람 각질형성세포(HaCaT)를 6 well plate에 약 5×10^5 cells/well로 처리한 다음, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 0.05 mM Ca²⁺이 함유된 DMEM 배지에서 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건으로 24 h 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 새로운 배지에 돌의 켈러스 추출물을 희석한 뒤 세포에 처리하여 3 일간 반응시켰다. 돌의 켈러스 추출물의 처리 농도는 동일 기간 처리 시 세포독성에 영향을 미치지 않는 농도 이하에서 처리하였다. 스크래퍼를 이용하여 세포를 회수한 뒤, 2% sodium dodecyl sulphate (SDS), 20 mM dithiothreitol (DTT)를 포함하는 0.1 M Tris 버퍼 용액에 분산시켜 끓는 물에 1 h 동안 반응시켰다. 이후 반응물을 식혀 microplate reader를 이용하여 310 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 각질세포외막의 양을 측정하였다[15,16].

2.8. 각질형성세포(HaCaT)와 *S. aureus*의 공배양

아토피 피부염 등의 병변 부위에서 많이 발견되는 균인 *S. aureus*가 각질형성세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위해 HaCaT 세포와 *S. aureus*의 공배양 실험을 하였다. HaCaT 세포를 24 well plate에 약 5×10^4 cells/well로 처리한 다음 항생제를 포함하지 않는 DMEM, 10% FBS 배지에 37°C , 5% CO_2 조건으로 2 일간 배양하였다. 기존의 배지를 제거하고 돌의 캘러스 추출물을 포함하는 배지를 넣고 그 위로 $0.4 \mu\text{m}$ cell culture insert (Falcon, USA)를 올려 그 내부에 약 1×10^3 CFU/mL 농도로 KCTC (Korean collection for type culture, Korea)에서 분양 받은 균주인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, KCTC 3881)를 접종하였다. 그 후 37°C , 5% CO_2 조건으로 2 일간 반응시킨 뒤, MTT assay를 통하여 세포 생존율을 측정하였다.

2.9. 통계처리

본 연구의 실험에서 얻은 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 각 실험 결과에 대한 통계분석은 student's *t*-test를 이용하였다. *p*값이 대조군과 비교하여 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 생존율

돌의 캘러스 추출물의 세포독성 정도를 확인하기 위해 HEKa, RBL-2H3 및 HaCaT 세포에 돌의 캘러스 추출물을 농도별, 시간별로 각각 처리하였다. MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과, Figure 1A과 같이 HEKa 세포에서는 24 h, 48 h 처리 시 모두 $400 \mu\text{g/mL}$ 이하에서, Figure 1B와 같이 RBL-2H3 세포에서는 24 h 처리 시 $50 \mu\text{g/mL}$ 이하에서 세포 독성을 나타내지 않았다. HaCaT 세포에서는 48 h 처리 시 $400 \mu\text{g/mL}$ 이하에서 세포 독성을 나타내지 않았다(Figure 1C). 이후의 실험들은, 세포 독성을 나타내지 않는 농도 이하에서 수행하였다.

3.2. 돌의 캘러스 추출물의 IL-8, IL-25, TSLP 생성억제 효과

각질형성세포에서 PAR-2 활성화에 따른 돌의 캘러스 추출물의 항염 효과를 확인하기 위해 IL-8, IL-25 및 TSLP 생성 억제 활성을 측정하였다. HEKa 세포에 PAR-2 agonist인 SLIGKV-NH₂를 처리하여 PAR-2를 activation 시킨 뒤,

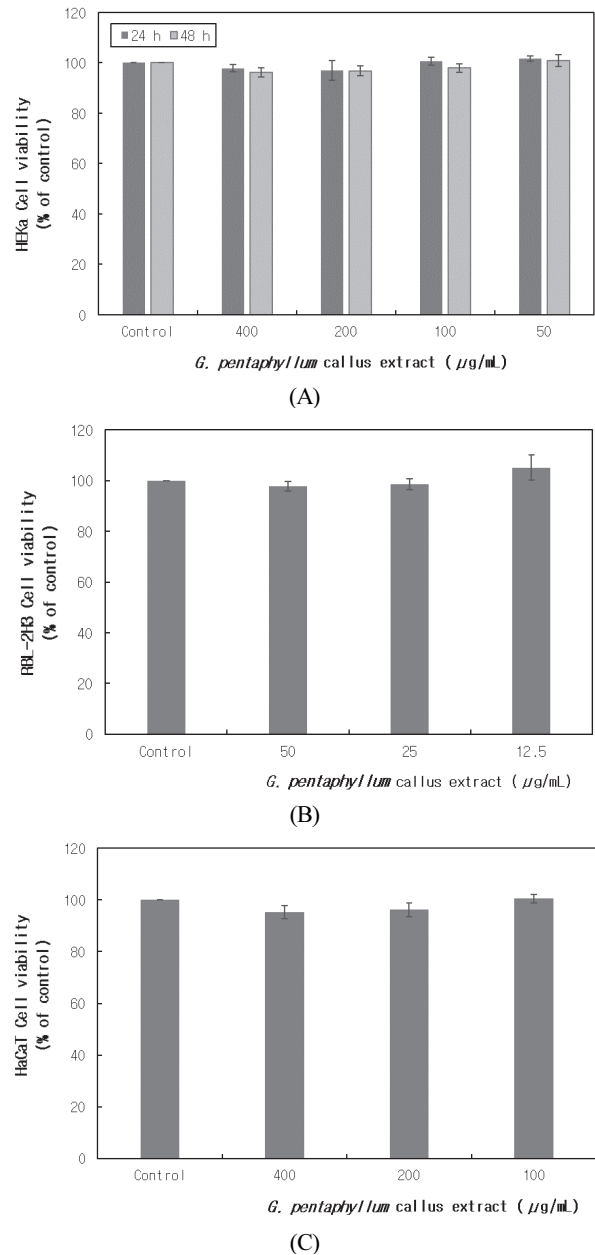


Figure 1. Effect of *G. pentaphyllum* callus extract on cell viability. (A) HEKa cells were treated with *G. pentaphyllum* callus extract for 24 h and 48 h. (B) RBL-2H3 cells were treated for 24 h. (C) HaCaT cells were treated for 48 h. Cell viabilities were tested by MTT assay. The results are expressed as mean \pm SD (N = 3).

돌의 캘러스 추출물을 처리하여 IL-8, IL-25 및 TSLP 생성 억제에 미치는 영향을 ELISA를 통해 확인하였다. 그 결과, IL-8 생성량은 돌의 캘러스 추출물을 $400 \mu\text{g/mL}$ 처리 시

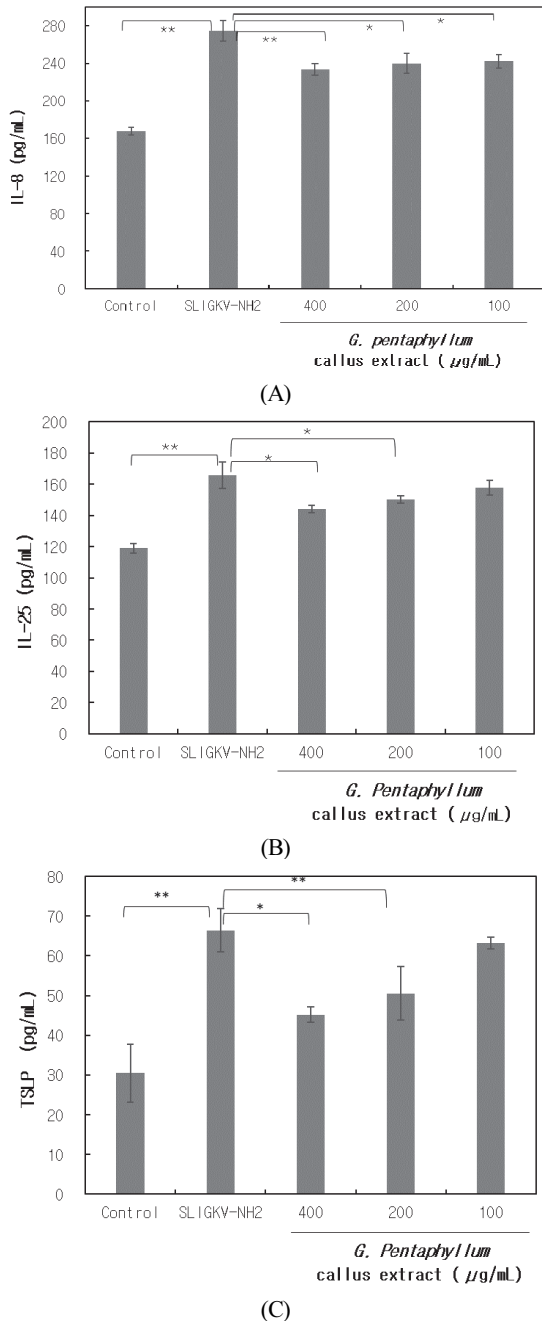


Figure 2. Effects of *G. pentaphyllum* callus extract on production of (A) IL-8, (B) IL-25, and (C) TSLP in SLIGKV-NH₂ (PAR-2 agonist)-induced HEKa. The results are expressed as mean ± SD (N = 3). * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01 versus SLIGKV-NH₂ treated group.

39%, 200 µg/mL 처리 시 33% 감소하였다(Figure 2A). IL-25 생성량은 돌의 캘러스 추출물을 400 µg/mL 처리 시 46%, 200 µg/mL 처리 시 33% 감소하였다(Figure 2B). TSLP 생

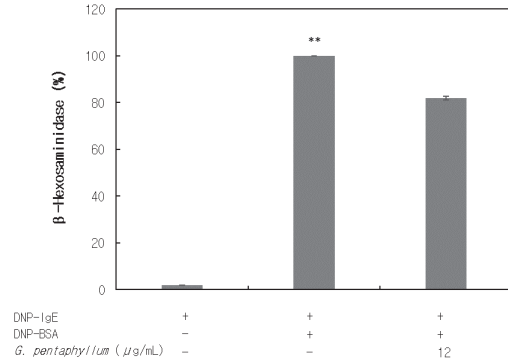


Figure 3. Effect of *G. pentaphyllum* callus extract on β-hexosaminidase secretion in RBL-2H3 cells. The results are expressed as mean ± SD (N = 3). ** *p* < 0.01 versus DNP-IgE and DNP-BSA treated group.

성량은 돌의 캘러스 추출물을 400 µg/mL 처리 시 59%, 200 µg/mL 처리 시 44% 감소하였다(Figure 2C).

따라서, 돌의 캘러스 추출물은 PAR-2 agonist에 의해 활성화된 각질형성세포에서 IL-8, IL-25 및 TSLP의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 효과가 있음을 확인하였고, 이를 통해 Th2 면역세포의 활성화를 억제하여 allergic inflammation 반응을 억제하는 효과가 있을 것으로 판단된다.

3.3. β-Hexosaminidase 방출 억제

돌의 캘러스 추출물의 항알러지 효과는 탈과립 지표인 β-hexosaminidase 분비량을 측정함으로써 확인하였다.

돌의 캘러스 추출물이 알러지반응이 나타날 때 분비되는 물질인 β-hexosaminidase 방출을 억제하는지 확인하기 위하여, RBL-2H3 cells을 이용해 β-hexosaminidase 방출 억제능을 평가하였다. RBL-2H3 cells을 DNP-IgE로 감작시킨 후, DNP-BSA (allergen)를 처리하여 β-hexosaminidase 방출을 유도하였다. 동시에 돌의 캘러스 추출물을 세포독성이 없는 농도 이하에서 처리하여 β-hexosaminidase 방출 억제 효과를 확인한 결과, Figure 3과 같이 돌의 캘러스 추출물은 12 µg/mL 농도에서 β-hexosaminidase 방출을 17% 억제함을 확인하였다. 따라서, 돌의 캘러스 추출물은 면역학적 이상으로 인한 아토피 피부염 등에서 알레르겐에 대한 항알러지 효능을 가질 것으로 판단된다.

3.4. 각질세포외막 형성 촉진 활성 확인

돌의 캘러스 추출물의 각질세포외막 형성 촉진 효능을 확인하기 위해 6 well plate에 배양된 HaCaT에 400, 200, 100 µg/mL의 농도로 3일간 처리하였다. 그 결과 Figure 4

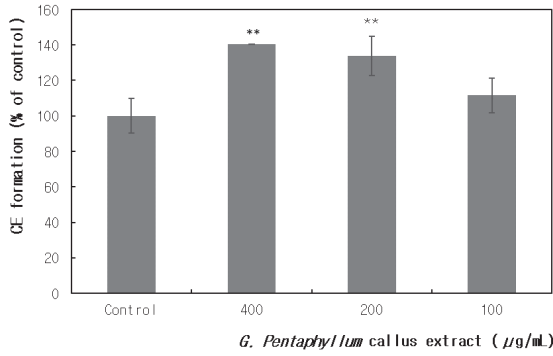


Figure 4. The effect of *G. pentaphyllum* callus extract on cornified envelope formation in HaCaT cells. The results are expressed as mean ± SD (N = 3). ***p* < 0.01 versus control.

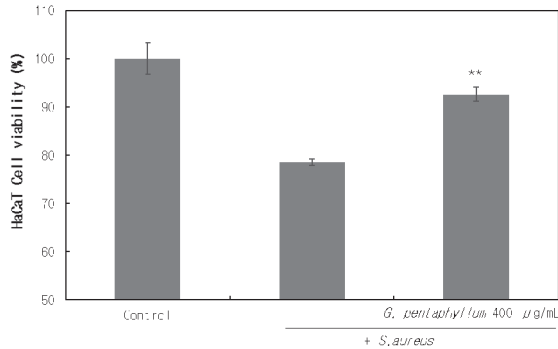


Figure 5. The keratinocyte protection effect of *G. pentaphyllum* callus extract against *S. aureus*. The results are expressed as mean ± SD (N = 3). ***p* < 0.01 versus *S. aureus* treated control.

와 같이 돌의 캘러스 추출물 400 µg/mL 처리 시 대조군 대비 각질세포외막 형성이 40%, 200 µg/mL 처리 시 34% 촉진된 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 돌의 캘러스 추출물이 각질세포외막형성 촉진 및 각질형성세포의 분화에 효능을 가질 것으로 판단된다.

3.5. *S. aureus*에 의한 각질세포 손상 완화 효능

돌의 캘러스 추출물이 *S. aureus*로부터 유발되는 각질형성세포의 사멸을 방지할 수 있는지 확인하기 위해 항생제를 포함하지 않는 배지에 돌의 캘러스 추출물을 400 µg/mL 농도로 희석하여 24 well plate에 배양된 HaCaT 세포에 처리하고 *S. aureus*와 공배양하였다. 실험결과 Figure 5에서 보는 것과 같이 돌의 캘러스 추출물을 처리한 실험군에서 *S. aureus*에 의한 각질형성세포의 사멸이 약 60% 이상 감소하였다. 따라서, 돌의 캘러스 추출물은 *S. aureus*에 의한

각질형성세포 손상을 완화하는 효능을 가지는 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 울릉도 돌의 잎으로부터 유도된 돌의 캘러스 추출물의 항염, 항알러지, 각질세포외막 형성 촉진, *S. aureus*에 의한 각질세포 손상 완화에 미치는 영향에 관하여 연구하였다.

아토피 피부염 등을 유발하고 악화시키는 알레르겐에 의해 피부장벽 손상되면, 피부각질형성세포의 PAR-2가 활성화되고, 피부장벽 기능의 회복이 지연되는데, 돌의 캘러스 추출물은 PAR-2 agonist에 의해 활성화된 각질형성세포에서 IL-8, IL-25, TSLP의 생성을 효과적으로 억제함으로써 항염 효능을 가지는 것을 확인하였다.

또한, 돌의 캘러스 추출물은 DNP-IgE로 감작된 RBL-2H3 세포에서 알러지 반응과 관련된 탈과립화 인자인 β-hexosaminidase 방출을 억제함으로써 항알러지 효능을 가지는 것을 확인하였다.

각질세포외막은 피부장벽 보호를 위한 각질형성세포의 분화를 판단할 수 있는 기준으로 사용되고 있는데, 돌의 캘러스 추출물은 각질세포외막 형성을 촉진시키는 효능을 보였다.

또한, 각질형성세포와 *S. aureus* 공배양 실험을 통해 *S. aureus*가 각질형성세포의 세포생존율을 감소시키는 것을 확인하였고, 돌의 캘러스 추출물은 *S. aureus*에 의한 각질형성세포의 사멸을 방지하는 것을 확인하였다.

이상의 결과는 돌의 캘러스 추출물이 피부장벽이 손상된 피부에서 항염증, 항알러지 효과를 통해 염증 및 가려움증을 개선하는 효과를 가지고 있으며, *S. aureus*에 의한 각질세포 손상 완화 효능을 갖는다는 것을 알 수 있으며, 피부장벽 개선을 위한 화장품 소재로서 활용될 수 있음을 시사한다. 추후 피부 흡수율 및 제형 연구, 피부장벽 개선 인체적용시험 등을 통해 돌의 캘러스 추출물의 화장품 소재로서의 적용 연구를 진행할 예정이다.

감사의 말

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술 연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것입니다(과제고유번호: HP20C0029).

References

1. B. Wang, M. Li, H. Gao, X. Sun, B. Gao, Y. Zhang, and L. Yu, Chemical composition of tetraploid *Gynostemma pentaphyllum* gypenosides and their suppression on inflammatory response by NF- κ B/MAPKs/AP-1 signaling pathways, *Food Sci. Nutr.*, **8**(2), 1197 (2020).
2. F. Aktan, S. Henness, B. D. Roufogalis, and A. J. Ammit, Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF- κ B-mediated iNOS protein expression, *Nitric Oxide*, **8**(4), 235 (2003).
3. D. Samec, L. V.-Zulj, S. Martinez, J. Grúz, A. Piljac, and J. P.-Zegarac, Phenolic acids significantly contribute to antioxidant potency of *Gynostemma pentaphyllum* aqueous and methanol extracts, *Ind. Crops Prod.*, **84**, 104 (2016).
4. E. H. Choi and N. Y. Yoon, Pathogenesis of atopic dermatitis, *J. Korean Medical Assoc.*, **57**(3), 218 (2014).
5. D. Redhu, K. Franke, V. Kumari, W. Francuzik, M. Babina, and M. Worm, Thymic stromal lymphopoietin production induced by skin irritation results from concomitant activation of protease-activated receptor 2 and interleukin 1 pathways, *Br. J. Dermatol.*, **182**(1), 119 (2020).
6. S. R. Wilson, L. T. Lydia, L. M. Batia, K. Beattie, G. E. Katibah, S. P. McClain, M. Pellegrino, D. M. Estandian, and D. M. Bautista, The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch, *Cell*, **155**(2), 285 (2013).
7. J. M. Leyva-Castillo, P. Hener, H. Jiang, and M. Li, TSLP produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic march in mice, *J. Invest. Dermatol.*, **133**(1), 154 (2013).
8. J. H. Ju, C. H. Lim, J. H. Kim, J. P. Lee, K. H. Son, S. K. Hong, T. R. Kwon, M. Chang, D. S. Kim, H. S. Yoon, and K. L. Park, Establishment of screening and test methods of atopic dermatitis using *in vitro* systems, *J. Altern. Anim. Exp.*, **4**(1), 31 (2010).
9. R. H. Guo, J. U. Park, S. J. Jo, J. H. Ahn, J. H. Park, J. Y. Yang, S. S. Lee, M. J. Park, and Y. R. Kim, Anti-allergic inflammatory effects of the essential oil from fruits of *Zanthoxylum coreanum* Nakai, *Front. Pharmacol.*, **12**(9), 1441 (2018).
10. H. H. Kong, J. Oh, C. Deming, S. Conlan, E. A. Grice, M. A. Beatson, E. Nomicos, E. C. Polley, H. D. Komarow, P. R. Murray, M. L. Turner, and J. A. Segre, Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis, *Genome Res.*, **22**(5), 850 (2012).
11. T. Nakatsuji, T. H. Chen, A. M. Two, K. A. Chun, S. Narala, R. S. Geha, T. R. Hata, and R. L. Gallo, *Staphylococcus aureus* exploits epidermal barrier defects in atopic dermatitis to trigger cytokine expression, *J. Invest. Dermatol.*, **136**(11), 2192 (2016).
12. J. B. Travers, D. A. Norris, and D. Y. Leung, The keratinocyte as a target for Staphylococcal bacterial toxins, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **6**(3), 225 (2001).
13. S. B. Park, Ph. D. Dissertation, Dong-eui Univ., Busan, Korea (2011).
14. Y. J. Jung, Y. S. Jeon, H. J. Kim, K. S. Kang, Y. K. Kim, and S. N. Kim, Anti-allergic and anti-inflammatory effect of *Leonurus sibiricus* seed ethyl acetate fractions, *Yakhak Hoeji*, **58**(5), 294 (2014).
15. T. Hasegawa, H. Shimada, T. Uchiyama, O. Ueda, M. Nakashima, and Y. Matsuoka, Dietary glucosylceramide enhances cornified envelope formation via transglutaminase expression and involucrin production, *Lipids*, **46**(6), 529 (2011).
16. L. L. Zhou, Z. X. Lin, K. P. Fung, C. T. Che, M. Zhao, C. H. K. Cheng, and Z. Zuo, Ethyl acetate fraction of *Radix rubiae* inhibits cell growth and promotes terminal differentiation in cultured human keratinocytes, *J. Ethnopharmacol.*, **142**(1), 241 (2012).