

## HaCaT cell에서 황련 추출물(*Coptis chinensis*)의 피부보습과 항염증 효과

김은희<sup>1,\*</sup> · 문영란<sup>2</sup> · 장영아<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>구월 화장품연구소

<sup>2</sup>비비솔루션(주)

<sup>3</sup>경성대학교 스마트헬스케어융복합연구센터

(2021년 5월 15일 접수: 2021년 6월 29일 수정: 2021년 6월 30일 채택)

## Skin Moisturizing Properties and Anti-Inflammatory effects of extracts from *Coptis chinensis* in HaCaT cells

Eun-Hee Kim<sup>1,\*</sup> · Young-Lan Moon<sup>2</sup> · Young-Ah Jang<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>Gooworl, 24-10, Dongam-ro 12, Buk-gu, Daegu 41422, Korea

<sup>2</sup>BBsolution CO., LTD., 4, Nakdongbuk-ro 126beon-gil, Gangseo-gu, Busan, Korea

<sup>3</sup>Convergence Research Center for Smart Healthcare of KS R&DB Foundation

(Received May 15, 2021; Revised June 29, 2021; Accepted June 30, 2021)

**요 약** : 황련은 한의학에서 진정, 소염, 항균 및 해열 등의 여러 질병의 치료에 이용되어져 왔다. 본 연구에서는 UVB와 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 로 유도된 HaCaT 세포에서 피부장벽과 염증관련 인자에 대한 황련 열수 추출물(CCW)의 효과를 조사하고, 보습 및 항염증 소재로서의 가능성을 알아보고자 하였다. 각 질형성세포인 HaCaT 세포에서 CCW의 보습 및 항염 효과를 확인하기 위해 MTT assay를 통한 시료의 독성 평가를 실시하였다. 이를 바탕으로, HA(Hyaluronic acid) 생성량과 filaggrin의 protein 및 mRNA 발현을 측정하였다. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 로 자극된 HaCaT 세포에서 CCW는 농도 의존적으로 HA의 생성량을 증가 시켰고, filaggrin의 protein 및 mRNA 발현 측정 결과 CCW의 농도 증가에 따라 발현율도 증가하였다. UVB로 유도된 HaCaT 세포에서 CCW는 ROS의 생성을 감소 시켰고, 양성대조군(positive control)인 EGCG(-)-epigallocatechin-3-gallate와 유의한 결과를 보여 주었다. 또한, CCW는 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 발현을 억제 시켰고, TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 로 자극된 HaCaT 세포에서 피부 염증에 따른 주요 인자인 COX-2의 protein 및 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, 황련 열수 추출물의 보습 및 항염증 효과를 가지는 화장품 소재로서의 가치를 제안할 수 있다.

주제어 : 황련, 피부보습, 항염증, 필라그린, HaCaT 세포

†Corresponding author  
(E-mail: yaviol@nate.com)

**Abstract** : *Coptis chinensis* has been used in the treatment of various diseases such as soothing, anti-inflammation, antimicrobial and antipyretic in oriental traditional medicine. In this study, we investigated the effect of hot water extract of *Coptis chinensis*(CCW) on skin barrier and inflammation-related factors in UVB and TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced HaCaT cells and evaluated its potential as a moisturizing and anti-inflammatory material. Based on result, the amount of HA (Hyaluronic acid) production and protein and mRNA expression of filaggrin were measured. In TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced HaCaT cells, CCW increased the amount of HA production in a concentration-dependent manner. In the measurement of protein and mRNA expression of filaggrin, the expression rate increased as the concentration of CCW increased. In UVB-induced HaCaT cells, CCW decreased the production of ROS and showed significant results with EGCG ((-)-epigallocatechin-3-gallate), a positive control. In addition, CCW inhibited the expression of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced HaCaT cells. It was confirmed that the protein and mRNA expression of COX-2, a major factor in skin inflammation, was decreased in a concentration-dependent manner. These results suggest that hot water extract from *Coptis chinensis* can be used as a cosmetic material having a moisturizing and anti-inflammatory effect.

**Keywords** : *Coptis chinensis*, skin moisturizing, anti-inflammatory, Filaggrin, HaCaT cell

## 1. 서론

피부는 유해한 환경과 다양한 생활패턴에 따른 각종 자극적인 요소로 인해 스트레스를 받고 연령 증가에 따른 자연적인 피부 노화 및 자외선에 의한 조기노화로 인해 각질층은 수분감소가 일어난다. 피부는 인체의 가장 외부에 존재하는 기관으로 체내 수분을 보호하고 외부 침입인자(항원, 감염원 등)의 내부 침입을 보호하는 필수적인 장벽 기능을 수행한다[1]. 각질층은 피부의 가장 바깥층에 위치하며 외부 환경에 대한 1차적 방어기능과 생체를 보호하는 체액, 수분의 증발 등을 조절하여 피부의 항상성을 유지한다[2]. 또한, 각질층에 존재하는 수분은 피부를 부드럽고 탄력있게 해주는 역할을 한다[3]. 각질 세포간 지질성분과 아미노산, 요소, 유기산 등의 천연보습인자(natural moisturizing factor)와 피지는 건강한 피부유지에 관여하며 이러한 요소들의 균형이 깨지거나 결핍될 때 건조피부가 유발된다. 건조피부는 주로 표피 상층부에서 일어나는 변화에 의해 주로 발생하는 것으로 알려져 있으며, 피부장벽 역할을 하는 표피 상층부의 각질층에서 일어나는 변화가 중요한 원인이 된다[4].

각질세포 지질외막은 각질세포 간 지질의 다중층상 구조 형성을 유도하는 비계(scaffold)역할을

하면서 완전한 피부장벽구조를 형성하도록 한다[5]. 각질세포 외막과 케라틴 중간 미세섬유를 연결하는 중요한 역할을 하는 단백질 중 하나인 filaggrin은 최근 아토피피부염의 유전적 소인 중 하나로 주목을 받고 있다. 정상적인 피부에서 filaggrin은 전구체인 profilaggrin의 형태로 각질 유리과립 내에 존재하다가 단백질 분해효소에 의해 분해되고, 이후 탈인산화를 거쳐 filaggrin이 된다. Filament aggregating protein이라는 이름에서 알 수 있듯이 filaggrin은 케라틴을 서로 붙게 하는 접착제의 역할을 하여 케라틴 섬유들은 견고하게 붙게 되고 궁극적으로 각질세포의 형태도 점점 평평해지면서 피부 장벽의 강력한 물리적인 지지력에 기여하게 된다[6]. Filaggrin은 Peptidylarginine deiminase isoforms 1과 3에 의해 탈아미노산화가 일어나면 케라틴 중간 미세섬유에 의한 접착력이 떨어지고 분리된 filaggrin 단위체는 caspase14, calpain, bleomycin hydrolase 등에 의해 최종 분해 산물인 pyrrocarboxylic acid (PCA)나 trans-urocanic acid (UCA) 등의 아미노산으로 분해된다. 이는 천연보습인자(natural moisturizing factor)로서 피부 보습을 유지하는 기능과 함께 각질층의 약산성을 유지하고, 자외선에 의한 손상으로부터 피부를 보호하는 기능을 한다[7]. 각질층의 구조가 파괴되어 경피 수분 손

실을 일으키면 피부 소양감 이외에도 피부의 화끈거림, 갈라짐, 발적 등을 일으킬 수 있으며, 이러한 증상으로 인해 피부 생리학적 기능을 무너트려 피부암(skin cancer), 노화(senescence), 홍반(erythema), 부종(edema)과 같은 염증을 유발한다[8,9]. 따라서, 천연보습인자는 수분을 직접적으로 보유하거나 흡수하여 표피의 수분을 유지시키는 데 중요한 역할을 하므로 filaggrin이 유전적 변이나 후천적 요인으로 감소되었을 때 피부 장벽에 이상을 초래할 수 있다. Hyaluronic acid (HA)는 Glycosaminoglycan (GAG)의 일종으로 콜라겐, 엘라스틴과 함께 피부 3대 요소 가운데 하나로 친수성이 강해 물과 결합하여 겔을 형성하는 성질이 있어 피부 수분 유지에 중요한 역할을 하는 천연 보습제로 알려져 있다[10,11]. HA는 연령의 증가에 따라 피부에서 감소되며 자외선의 장기 노출과 같은 환경적 요인에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이러한 HA의 감소는 피부 수분 함량의 감소와 함께 탄력의 감소, 거친 피부 및 주름 등의 원인으로 알려져 있다. 따라서 HA의 합성을 유도하거나 분해를 억제하는 물질은 피부 보습과 노화 방지에 효과적이며, 특히 hyaluronic acid synthase (HAS) 중 HAS-2와 HAS-3은 HA 합성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[12,13]. 피부장벽의 이상과 더불어 과도한 활성 산소종(reactive oxygen species: ROS)의 발생, 세포 재생능력의 감소와 염증 관여 효소인 prostaglandin, inorganic, nitric oxide synthase(NOS), 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1(IL-1), Interleukin 6(IL-6) 등의 생성과 사이토카인 전사 조절인자인 NF- $\kappa$ B 분비의 증가는 면역시스템의 기능 저하를 초래한다[14,15]. 자외선 또한 체내에서 일시적인 염증, 일광화상, 소양증 등을 유발하고[16,17], 지속적인 항원 부하와 만성적인 스트레스로 인해서 만성 염증 인자인 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 등이 생성되어 노화를 촉진 시킨다[18,19]. 염증반응은 체내에서 발생한 산화스트레스에 의해 촉진되며, 산화스트레스는 세포사멸뿐만 아니라 퇴행성 질환을 일으키는 특정세포의 유전자 발현을 증가시켜 염증 반응을 개시하거나 악화시킨다. 유해한 자극 감염 및 외상 등에 의해 염증이 발현될 경우 세포막 인지질로부터 arachidonic acid(AA)가 유리된 후 lipooxygenase (LO) 혹은 cyclooxygenase(COX)의 작용을 거쳐 leukotriene,

thromboxane, prostaglandin 등 다양한 염증반응의 매개체들을 생성한다[20].

황련(*Coptis chinensis*)은 미나리아재비과의 여러해살이 초본식물로 중국이 원산이며, 생약용으로 한국, 일본, 중국 등지에서 재배하기도 한다. 한방에서는 11월경에 5-6년 된 황련, 일황련의 뿌리를 채취하여 햇볕에 말린 것을 황련이라 하며, 특이한 냄새를 가지고, 그 맛은 쓰며, 성질은 차다[21]. 성분은 isoquinoline계 alkaloid인 berberin, jateorrhizine, palmatine, coptisine, magnoflorine, epiberberin, berbestine, worenine 및 ferulic acid 등 함유한다[22]. 황련 추출물의 항염증 효과에 대한 연구로는 Lipopolysaccharide (LPS)를 준 복강대식세포에서 iNOS, COX-2 및 TNF- $\alpha$ 의 생성저해[23], 췌장세포의 세포사멸억제[24], Keratinocytes에서 TNF- $\alpha$  생성억제[25] 등이 보고되었다.

본 연구는 각질형성세포에서 황련의 보습효과와 항염증 효과에 대해 조사하고, 피부의 건조 및 염증에 대해 유효성을 가지는 천연 소재의 가능성을 검증하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

#### 2.1.1. 식물재료 및 추출

본 실험에서 사용한 황련은 2020년 (주)옴니허브로부터 건조된 시료를 구입하였으며, 세척 후 3일 동안 음건하여 4°C에서 보관하였다. 건조된 황련(500 g)과 물을 1:9의 비율로 85°C에서 3시간 동안 3회 반복하여 감압 환류추출 한 다음 filter paper (Whatman No. 2, GE, Tokyo, Japan)를 사용하여 여과하였다. Vacuum Rotary Evaporator (N-3010, EYELA, Tokyo, Japan)로 추출물을 감압농축한 다음, 96시간동안 동결건조기(MCFD8508, IlShin BioBase, Dongducheon, Korea)로 건조하여 황련 열수 추출 분말(102.3 g)을 얻었고, 수율은 20.46% 였다. 본 실험에서 황련 열수 추출물(CCW)의 농도 조절은 D. I water로 하여 수행하였다.

#### 2.1.2. 실험세포 및 시약

본 연구에 사용된 Human keratinocyte 인

HaCaT 세포는 대구한의대학교 피부면역학 연구실에서 제공 받아 실험하였다. 세포독성실험을 위한 시약인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 0.4% trypan blue stain은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질정량 시약 Lysis buffer는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, filaggrin, COX-2,  $\beta$ -actin, GAPDH의 primary antibody와 secondary antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다.

### 2.1.3. 세포의 배양

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% CO<sub>2</sub> incubator (FormaTM, Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

## 2.2. 실험방법

### 2.2.1. 세포독성측정

세포 생존을 측정은 Mosmann[26]의 방법에 따라 측정하였다. 세포를 96-well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 황련 열수 추출물을 농도별로 조제한 후 0.02 ml 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 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 (Power Wave XS, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.2.2. Hyaluronic acid Production

세포배양액 내의 Hyaluronic acid의 생성량은

ELISA kit (Echelon, Salt Lake City, UT, USA)를 이용하여 측정하였다. HaCaT 세포는 DMEM 배지를 이용하여  $5 \times 10^4$  cells/mL로 조절한 후 48 well plate에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 세포에 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 와 농도별로 제조한 황련 열수 추출물을 처리한 후 24시간 배양하였고, 배양이 끝난 후 상층액을 취하여 Hyaluronic acid의 생성량을 측정하였다.

### 2.2.3. Reaction Oxygen Species (ROS)

#### 생성량 측정

HaCaT 세포를 배양한 후 96 well plate에  $2 \times 10^5$  cell/well 로 접종하고 24시간 안정화하였다. 동일 배지로 교체한 후 20 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB로 자극 한 뒤, 황련 열수 추출물을 12.5, 25, 50  $\mu$ g/mL의 농도로 희석하여 처리한 후 24시간 배양하였다. 그 후 제조사의 매뉴얼(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 따라 ROS Glo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assay를 수행하였다.

### 2.2.4. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 생성량 측정

세포를 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL로 24시간 배양 후 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 와 농도별로 제조한 황련 열수 추출물을 처리한 후 18시간 뒤 세포 배양액을 취하여 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 생성량을 측정하였다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 함량은 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였으며, 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

### 2.2.5. COX-2, filaggrin protein Expressions

세포는 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 접종 및 배양하여 세포 밀도가 80% 되었을 때 무혈청 배지로 교환하고 24시간 배양한 후 추출물을 농도별로 처리하였다. 샘플처리 후 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 를 Normal 군을 뺀 모든 well에 넣어 자극시키고 24시간 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후에 scrapper로 세포를 수확하였다. 수확된 각 세포에 lysis buffer를 well 당 100  $\mu$ L 를 첨가하고 1시간동안 냉장하여 세포를 용해시킨 후 원심분리 하여 (12,000 rpm, 4°C, 10 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 Bradford

assay로 정량하였으며, 10  $\mu$ L의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 전기영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 transfer 하였다. Transfer가 끝나면 5% skim milk에 1~2시간동안 방치하여 background를 제거시켰다. 1×TBST로 3회 washing 후 1차 antibody (1:1000)를 24시간 붙인 후 1×TBST로 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.

### 2.2.6. 유전자 발현 분석을 위한 RNA 분리 및 RT-PCR

HaCaT cell을 24well plate에  $4 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 24시간 뒤 황련 열수 추출물을 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 수용액층과 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 COX-2와 filaggrin mRNA 발현 확인을 위해 TB Green® Premix Ex Taq II를 이용하여 증폭하였다. PCR 조건은 94°C에서 30초 (denaturation), 55°C에서 30초 (annealing), 72°C에서 30초 (extension)를 40회

반복하였다. 사용한 primer는 다음과 같다(Table 1).

### 2.2.7. 통계처리

결과 통계처리는 SPSS 10.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)프로그램을 이용하여 t-test를 이용하여 통계적 유의수준  $p < 0.05$ , 에서 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 황련 열수 추출물의 세포 생존율 측정

황련 열수 추출물이 keratinocyte인 HaCaT cell의 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 실시하여 세포 생존율을 평가하였다 (Fig. 1). 황련 열수 추출물을 12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/mL의 농도로 세포에 처리한 결과 12.5  $\mu$ g/mL에서 100.5 %, 25  $\mu$ g/mL에서 98.3 %, 50  $\mu$ g/mL에서 88.2 %, 100  $\mu$ g/mL에서 79.8%, 200  $\mu$ g/mL에서 63.1%의 세포 생존율을 보였다. 이러한 결과에 따라 세포 실험은 추출물 자체의 세포 독성으로 인한 독성 가능성을 배제하기 위해 세포생존율이 85% 이상으로 나타난 추출물의 안전한 농도인 50  $\mu$ g/mL 이하의 범위로 진행하였다.

### 3.2. HA (Hyaluronic acid) 생성량 측정

Hyaluronic acid 는 분자량이 20 - 40만에 이르는 고분자 화합물로서 표피의 수분 증발을 막아 피부의 탄력성을 유지할 뿐만 아니라, 영양성분의 저장과 확산, 세포이동 등에 관여한다[27, 28]. 보습기능 이외에도 항산화, 항염, 항균, 부종 억제 등 다양한 기능을 한다고 알려져 있다[29]. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 로 자극된 HaCaT 세포에서 황련

Table 1. The Sequence of Primers used for PCR

Primer	F/R	Sequence (5' to 3')
COX-2	Forward	ATGCTCCTGCTTGAGTATGT
	Reverse	CACTACATCCTGACCCACTT
Filaggrin	Forward	AAGCTTCATGGTGATGCGAC
	Reverse	TCAAGCAGAAGAGGAAGGCA
GAPDH	Forward	CCACCCAGTACAGCGTCAAC
	Reverse	CATGGTGCTTCTGTGCTCT

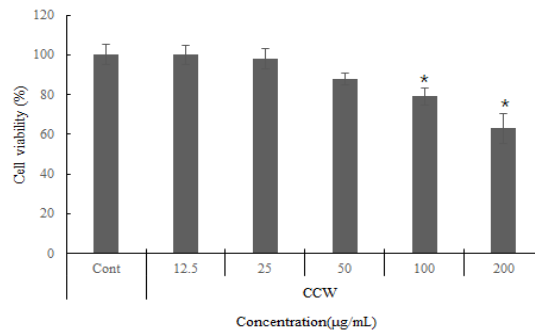


Fig. 1. Cell viability of CCW on treated HaCaT cells. HaCaT cells were treated with various concentrations (12.5 – 200 µg/mL) of CCW. Cell viability was measured using the MTT assay. CCW : *Coptis chinensis* water extract. The results are presented as mean ± standard deviation of triplicate date. The results were expressed as the average of triplicate. \* $p < 0.05$ .

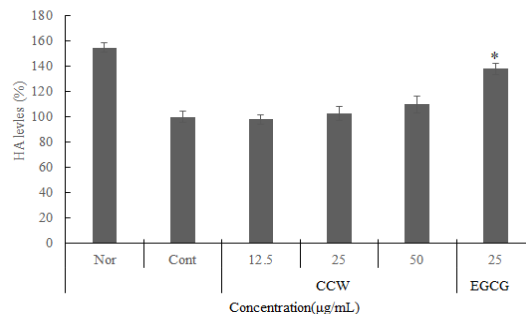


Fig. 2. Effect of CCW in the expression of hyaluronic acid in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced HaCaT cells. Cells were treated for 24 h with CCW (12.5, 25, 50 µg/mL) during TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced. Nor : Non treated TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . Cont : TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  induced group. CCW : *Coptis chinensis* water extract. EGCG : (-)-epigallocatechin-3-gallate (positive control). The results are presented as mean ± standard deviation of triplicate date. The results were expressed as the average of triplicate. \* $p < 0.05$ .

열수 추출물의 HA 생성효과를 측정하였다. 그 결과, 황련 열수 추출물을 12.5, 25, 50 µg/mL 농도로 처리하였을 때 HA의 생성량은 98.1%, 103.6%, 110.2%로 증가하여 농도의존적으로 유의미한 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 녹차의 카테킨 화합 중 가장 관심을 모으는 물질은 Epigallocatechin Gallate (EGCG)로서, 항산화, 보습 등의 효능이 우수한 화합물로 알려져 있으며[30], 황련 추출물의 50 µg/mL 농도에서 HA 생성량이 대조군(EGCG), 25 µg/mL 농도 대비 낮은 결과를 보여 주었으나, 이는 천연물로서의 효능은 높다고 볼 수 있다.

### 3.3. Filaggrin의 protein 및 mRNA 발현 측정

Filaggrin의 변이는 피부 장벽의 손상을 유발하고 손상된 피부장벽을 통해 면역글로블린E 감각이 용이해지며 피부염증반응 등이 쉽게 일어나는 것이다[31]. 또, filaggrin은 분해되어 자연보습인자인 아미노산 및 PCA, trans-UCA로 대사되므로 filaggrin의 감소는 각질층의 수분 함유 감소로 이어질 수 있다[32]. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 로 유도된 HaCaT 세포에서 황련 열수 추출물의 보습활성을 알아보기 위해 피부장벽 구성인자인 filaggrin의 protein 및 mRNA의 발현정도를 western blot과 RT-PCR을 실시하여 확인하였다. 그 결

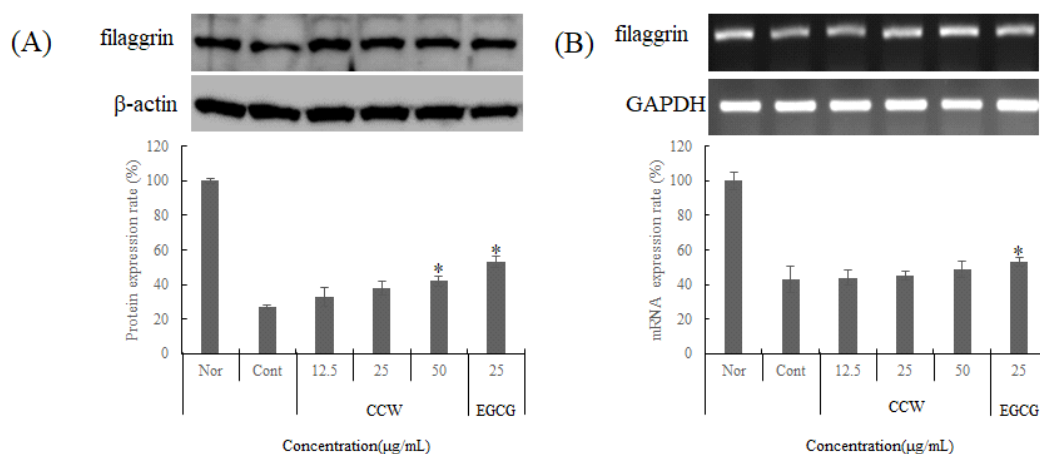


Fig. 3. Expressions of filaggrin evaluated by protein level(A) and mRNA level(B) in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced HaCaT cells after CCW treatment. (A)The expression levels of filaggrin in the protein was measured after treatment of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 24 h and the indicated concentration of CCW. (B)The expression levels of filaggrin in the mRNA was measured after treatment of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 4 h and the indicated concentration of CCW. Nor : Non treated TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . Cont : TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  induced group. CCW : *Coptis chinensis* water extract. EGCG : (-)-epigallocatechin-3-gallate (positive control). The results are presented as mean  $\pm$  standard deviation of triplicate date. The results were expressed as the average of triplicate. \* $p < 0.05$ .

과 control군과 대비하여 황련 열수 추출물을 처리한 시험군의 filaggrin의 protein 및 mRNA 발현량은 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의미하게 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

### 3.4. Reaction Oxygen Species (ROS) 생성량 측정

염증 세포는 ROS를 생성하고 인체 내에서는 이에 대한 방어기전으로 산화 억제 물질을 생성하여 대부분의 ROS를 제거한다. 하지만, 과도하게 생성된 ROS는 DNA, 단백질 및 지질에 손상을 입히고 이로 인해 종양 유발 신호의 활성화 등으로 인체에 유해한 반응이 일어나게 된다[33]. 본 실험에서는 UVB로 유도된 HaCaT 세포에서 황련 열수 추출물이 과도한 ROS 생성에 미치는 효능을 확인하고자 하였다. UVB를 처리한 대조군은 무처리군에 비해 높은 ROS 생성량을 나타내었으며, 황련 열수 추출물을 12.5, 25, 50  $\mu$ g/mL 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 ROS의 생성량이 저해됨을 확인하였다(Fig. 4).

### 3.5. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 생성량 측정

각질형성세포는 외부 환경적인 자극에 의해 다양한 사이토카인을 분비함으로써 염증반응을 일으킨다고 보고된 바 있으며(34), 특히, TNF- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ 에 의한 자극은 각질형성세포로부터 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 등과 같은 염증성 사이토카인의 비정상적인 분비를 이끌어 피부 염증부위로 T cell과 백혈구가 침투되도록 유도하며, 이것이 지속될 경우 피부의 노화, 아토피성 피부염, 건선 등과 같은 피부질환이 발생하는 것으로 알려져 있다(35, 36). 염증 반응의 매개체로 작용하는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 발현량을 측정하였다. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 로 유도된 HaCaT cell에 황련 열수 추출물을 12.5, 25, 50  $\mu$ g/ml 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 발현량이 저해됨을 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다.

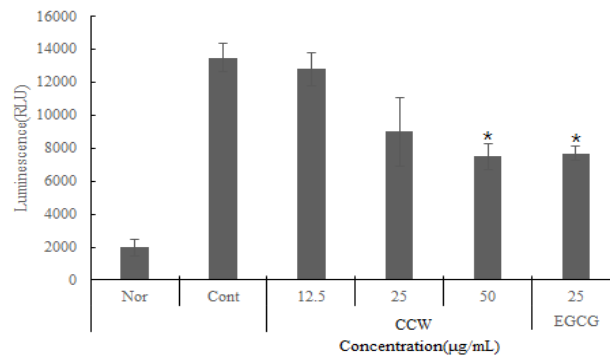


Fig. 4. Effect of CCW in the expression of ROS in the UVB-induced HaCaT cells. Cells were treated for 24 h with CCW (12.5, 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ ) during UVB (20  $\text{mJ/cm}^2$ ) activation. Nor : Non treated UVB. Cont : UVB induced group. CCW : *Coptis chinensis* water extract. EGCG : (-)-epigallocatechin-3-gallate (positive control). The results are presented as mean  $\pm$  standard deviation of triplicate date. The results were expressed as the average of triplicate. \* $p < 0.05$

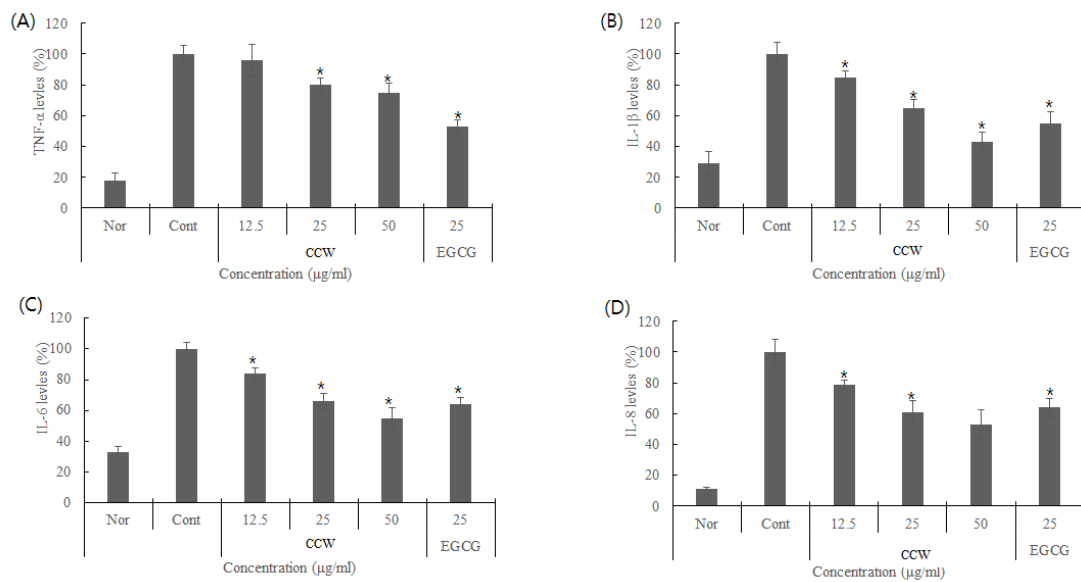


Fig. 5. Effects of CCW on productions of pro-inflammatory cytokines in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced HaCaT cells. The expression levels of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C), IL-8 (D) in the protein was measured after treatment of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 18 h and the indicated concentration of CCW. Nor : Non treated TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . Cont : TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  induced group. CCW : *Coptis chinensis* water extract. EGCG : (-)-epigallocatechin-3-gallate (positive control). The results are presented as mean  $\pm$  standard deviation of triplicate date. The results were expressed as the average of triplicate. \* $p < 0.05$



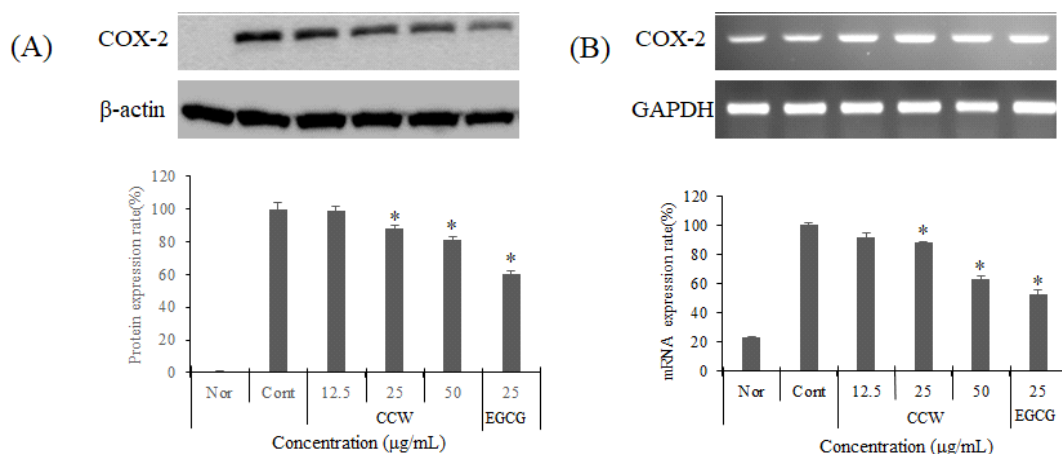


Fig. 6. Expressions of COX-2 evaluated by protein level(A) and mRNA level(B) in TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced HaCaT cells after CCW treatment. (A)The expression levels of COX-2 in the protein was measured after treatment of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 24 h and the indicated concentration of CCW. (B)The expression levels of COX-2 in the mRNA was measured after treatment of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  for 4 h and the indicated concentration of CCW. Nor : Non treated TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ . Cont : TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  induced group. CCW : *Coptis chinensis* water extract. EGCG : (-)-epigallocatechin-3-gallate (positive control). The results are presented as mean  $\pm$  standard deviation of triplicate date. The results were expressed as the average of triplicate. \* $p < 0.05$ .

### 3.6. COX-2의 protein 및 mRNA 발현 측정

염증반응은 체내에 발생한 산화스트레스에 의해 촉진되며, 산화스트레스는 특정세포의 유전자 발현을 증가시켜 염증반응을 개시하거나 악화시킨다. 유해한 자극 감염 및 외상 등에 의해 염증이 발현될 경우, 세포막 인지질로부터 arachidonic acid가 유리된 후 cyclooxygenase(COX) 등의 작용을 거쳐 leukotriene, thromboxane, prostaglandin 등 다양한 염증반응의 매개체들을 생성한다[37]. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 로 염증이 유도된 HaCaT cell에서 황련 열수 추출물이 염증유발인자인 COX-2의 protein 및 mRNA의 발현 억제에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot과 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 control 군과 대비하여 황련 열수 추출물을 처리한 시험군의 COX-2의 protein 및 mRNA 발현량은 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의미하게 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

## 4. 결론

피부장벽의 이상과 면역시스템의 기능 저하는 피부의 건조와 염증을 유발하는 주요한 원인으로 작용하고 있다. 본 연구에서는 황련 열수 추출물의 피부 보습과 항염 효능을 검증할 수 있는 실험을 통하여 화장품 원료로서의 가능성을 확인하였고, 결과는 다음과 같다.

1. 추출물의 안전성 검증을 위해 keratinocyte인 HaCaT 세포에 대한 세포독성을 평가한 결과 황련 열수 추출물은 12.5, 25, 50  $\mu$ g/mL의 농도에서 90% 이상의 높은 세포 생존율을 보여 50  $\mu$ g/mL 이하의 농도로 실험을 진행하였다.
2. 피부장벽 보호를 위한 보습효과 검증을 위해 HA (Hyaluronic acid) 생성량과

filaggrin의 protein 및 mRNA 발현을 측정  
한 결과 자극군(Cont)에 비하여 황련 열수  
추출물을 12.5, 25, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로  
처리하였을 때 농도 의존적으로 HA의 생성  
량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

3. 피부장벽의 주요인자인 filaggrin의 protein  
및 mRNA 발현 측정 결과 황련 열수 추출  
물의 농도 증가에 따라 발현율도 증가하는  
것을 알 수 있었으며, 이는 황련 열수 추출  
물은 HA의 생성량과 filaggrin의 발현량을  
증가시켜 보습활성을 가질 수 있음을 의미  
한다.
4. 항염 효능을 검증하기 위해 Reaction  
Oxygen Species (ROS) 생성량 측정, 염증  
성 Cytokine의 발현과 염증 관련 단백질  
COX-2의 protein 및 mRNA 발현에 미치  
는 영향을 평가한 결과 ROS를 처리한 자극  
군은 무처리군에 비해 생성량이 6.5배 증가  
되었으며, 황련 열수 추출물의 경우 농도 의  
존적으로 ROS 생성량이 감소되는 것을 확  
인 할 수 있었고, 양성대조군(positive  
control)인 EGCG ( (-)-epigallocatechin-  
3-gallate)와 유의미한 결과를 보여 주었다.  
황련 열수 추출물은 UVB로 유도한 ROS의  
생성을 감소시킴으로써 ROS로 인하여 활성화  
되는 피부 손상인자들의 활성화 억제에 영  
향을 미쳤다.
5. 황련 열수 추출물은 사이토카인인 TNF- $\alpha$ ,  
IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8의 발현을 억제 시켰고,  
IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 발현 억제에서는 양성  
대조군 EGCG와도 유의한 결과를 보여주어  
염증 초기작용기전을 억제함으로써 피부 자  
극 완화 효과를 줄 수 있을 것으로 기대되  
어진다.
6. TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 로 자극된 HaCaT 세포에  
서 피부 염증에 따른 주요 인자인 COX-2  
의 protein 및 mRNA 발현에 황련 열수 추  
출물이 미치는 영향을 측정한 결과 시료를  
처리하지 않은 자극군은 무처리군에 비해  
COX-2의 발현이 3배 정도 증가하는 것을  
확인하였으며, 황련 열수 추출물을 농도별  
로 처리 시 농도에 따라 COX-2의 protein

및 mRNA 발현이 감소함을 확인할 수 있  
었고, 이러한 결과들로 피부 염증에도 효과  
가 있을 것이라고 판단된다.

결론적으로 황련 열수 추출물은 UV 및 TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ 에 의해 발생된 각질형성세포의 구조  
손상에 따른 염증발생을 완화 시킬 뿐만 아니라  
피부의 수분 함유 능력 증강, 피부 건조의 방지  
등 표피 보호 효능을 가질 수 있음을 의미한다.  
따라서, 황련 열수 추출물은 각질형성세포인  
HaCaT 세포에서 염증 매개 인자의 발현을 억제  
시켜줌과 더불어 피부 장벽 개선 효능을 갖는 것  
으로 확인되어 보습과 항염증 소재로써 이용 가  
능성이 높은 화장품 소재임을 확인할 수 있었다.

## References

1. H. J. Kim, J. U. Shin and K. H. Lee.  
"Atopic dermatitis and skin barrier  
dysfunction.", *Allergy Asthma &  
Respiratory Disease*, Vol.1, No.1 pp.  
20-28, (2013).
2. O. K. Jacobi. "About the mechanism of  
moisture regulation in the horny layer of  
the skin", *Proceedings of the Scientific  
Section of the Toilet Goods Association*,  
Vol.31, No.5 pp. 22-24, (1959).
3. C. S. Park, "Skin barrier and moisturizer",  
*The Korean Society for Skin Barrier  
Research*, Vol.9, No.1 pp. 11-17, (2007).
4. L. Hruza and A. P. Pentland, "Mechanisms  
of UV-induced inflammation", *Journal of  
Investigative Dermatology*, Vol.100, No.1  
pp. 35-41, (1993).
5. H. J. Kim, "Atopic dermatitis and skin  
barrier dysfunction", *Allergy Asthma &  
Respiratory Disease*, Vol.1, No.1 pp.  
20-28, (2013).
6. P. M. Steinert, J. S. Cantieri, D. C. Teller,  
J. D. Lonsdale-Eccles and B. A. Dale.  
"Characterization of a class of cationic  
proteins that specifically interact with  
intermediate filaments", *Proceedings of the  
National Academy of Sciences of the  
United State of America*, Vol.78, No.40

- pp. 97-101, (1981).
7. C. R. Harding, A. Watkinson, A. V. Rawlings and I. R. Scott, "Dry skin, moisturization and corneodesmolysis." *International Journal of Cosmetic Science*, Vol.22, No.1 pp. 21-52, (2000)
  8. C. F. Nathan, "Secretory products of macrophages", *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.79, No.2 pp. 319-326, (1987).
  9. C. Maziere, M. A. Conte, J. Degonville, D. Ali, and J. C. Maziere, "Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP-1 and NF-kappaB.", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.265, No.1 pp. 116-122, (1999).
  10. K. T. Kim, Y. H. Kim, J. G. Kim, C. S. Han, S. H. Park, and B. Y. Lee, "Preparation of oligo hyaluronic acid by hydrolysis and its application as a cosmetic ingredient.", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.33, No.3 pp. 189-196, (2007).
  11. J. Necas, L. Bartosikova, P. Braunder, and J. Kolar, "Hyaluronic acid (hyaluronan): a review", *Veterinarni Medicina*, Vol.53, No.8 pp. 397-411, (2008).
  12. P. J. Lee, H. T. Kim, K. S. Yoon, H. C. Park, and H. Y. Ha, "The effect of *Astragalus membranaceus* methanol extract on hyaluronic acid production in HaCaT cells.", *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*, Vol.26, No.1 pp.75-81, (2013).
  13. H. J. Song, H. J. Mu, and S. H. Lee, "Effect of Ferulic acid isolated from *Cnidium officinale* on the synthesis of hyaluronic acid.", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.39, No.4 pp. 281-288, (2013).
  14. R. Briante, F. Febbraio and R. Nucci, "Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the mediterranean diet.", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.51, No.24, pp. 6975-6981, (2003).
  15. V. Morrisette-Thomas, A. A. Cohen, T. Fulop, E. Riesco, V. Legault, Q. Li, E. Milot, F. Dusseault-Belanger and L. Ferrucci, "Inflamm-aging does not simply reflect increases in pro-inflammatory markers.", *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol. Jul, No.139 pp. 49-57, (2014).
  16. M. Helenius, L. Makelainen and A. Salminen, "Attenuation of NF-kappa B signaling response to UV B light during cellular senescence.", *Experimental Cell Research*, Vol.248, No.1 pp. 194-202, (1999).
  17. D. Walker and H. Jacobe, "Phototherapy in the age of biologics.", *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, Vol.30, No.4 pp. 190-198, (2011).
  18. T. E. Strandberg and R. S. Tilvis, "C-reactive protein, cardiovascular risk factors, and mortality in a prospective study in the elderly.", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Vol.20, No.4 pp. 1057-1060, (2000).
  19. H. Bruunsgaard, "Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations.", *European Cytokine Network*, Vol.13, No.4 pp. 389-391, (2002).
  20. C. D. Funk, "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.", *Science*, Vol.294, No.5548 pp. 1871-1875. (2001).
  21. Y. J. Ji, J. W. Lee and I. S. Lee, "Antimicrobial effect of medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA).", *Korean Society of Life Science*, Vol.17, No.3 pp. 412-419, (2007).
  22. B. S. Kim, H. S. Jang, C. S. Choi, J. S. Kim, G. S. Kwon, I. S. Kwun, K. H. Son and H. Y. Sohn, "Antifungal activity of *Zanthoxylum schinifolium* against *Fusarium graminearum*, a Barley Powdery Mildew

- Fungus.", *Journal of Life Science*, Vol.18, No.7 pp. 974–979, (2008).
23. D. U. Lee, Y. J. Kang, M. K. Park, Y. S. Lee, H. G. Seo, T. S. Kim, C. H. Kim and K. C. Chang, "Effects of 13-alkylsubstituted berberine alkaloids on the expression of COX-II, TNF- $\alpha$ , iNOS, and IL-12 production in LPS-stimulated macrophages.", *Journal of Life Science*, Vol.73, No.11 pp. 1401–1412, (2003).
  24. E. K. Kim, K. B. Kwon, M. J. Han, M. Y. Song, J. H. Lee, N. Lv, S. O. Ka, S. R. Yeom, Y. D. Kwon, D. G. Ryu, K. S. Kim, J. W. Park, R. Park and B. H. Park, "Coptidis rhizoma extract protects against cytokine-induced death of pancreatic beta-cells through suppression of NF- $\kappa$ B activation.", *Experimental & Molecular Medicine*. Vol.39, No.2 pp. 149–159, (2007).
  25. R. Enk, R. Eehalt, J. E. Graham, A. Bierhaus, A. Remppis and H. J. Greten, "Differential effect of *Rhizoma coptidis* and its main alkaloid compound berberine on TNF- $\alpha$  induced NF- $\kappa$ B translocation in human keratinocytes.", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.109, No.1 pp. 170–175, (2007).
  26. T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of Immunological Methods*, Vol.65, No.1–2 pp. 55–63, (1983).
  27. B. Dube, H. J. Luke, M. Aumailley, and P. Prehm, "Hyaluronan reduces migration and proliferation in CHO cells.", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, Vol.1538, No.2–3 pp. 283–289, (2001).
  28. H. J. Song, M. H. Jin, and S. H. Lee, "Effect of ferulic acid isolated from *Cnidium Officinale* on the synthesis of hyaluronic acid.", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.39, No.4 pp. 281–288, (2013).
  29. P. Dahiya and R. Kamal, "Hyaluronic Acid: a boon in periodontal therapy.", *North American Journal of Medical Sciences*, Vol.5, No.5 pp. 309–315, (2013).
  30. B. Debasis, "Green tea: Antioxidant Power to Fight Disease." pp.25–48, Keats Publishing, (1999)
  31. G. M. O'Regan and A. D. Irvine, "The role of filaggrin in the atopic diathesis.", *Clinical & Experimental Allergy*, Vol.40, No.7 pp. 965–972, (2010).
  32. H. J. Kim, J. U. Shin and K. H. Lee, "Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction.", *Allergy, Asthma & Respiratory Disease*, Vol.1, No.1 pp. 20–28, (2013).
  33. A. M. Cameron, A. Castoldi, D. E. Sanin, L. J. Flachsmann, C. S. Field, D. J. Puleston, R. L. Kyle, A. E. Patterson, F. Hassler, J. M. Buescher, B. Kelly and E. L. Pearce, "Inflammatory macrophage dependence on NAD<sup>+</sup> salvage is a consequence of reactive oxygen speciesmediated DNA damage.", *Nature Immunology*, Vol.20, No.4 pp. 420–432, (2019).
  34. L. Kong, J. Liu, J. Wang, Q. Luo, H. Zhang, B. Liu, F. Xu, Q. Pang, Y. Liu and J. Dong, "Icariin inhibits TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$  induced inflammatory response via inhibition of the substance P and p38-MAPK signaling pathway in human keratinocytes." *International Immunopharmacology*, Vol.29, No.2 pp. 401–407, (2015).
  35. J. H. Yang, Y. H. Hwang, M. J. Gu, W. K. Cho and J. Y. Ma, "Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- $\alpha$  /IFN- $\gamma$  -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells.", *Phytomedicine*, Vol.22, No.14 pp. 1262–1268, (2015).
  36. Y. Y. Sung, Y. S. Kim and H. K. Kim, "*Illicium verum* extract inhibits TNF- $\alpha$  - and IFN- $\gamma$  -induced expression of

chemokines and cytokines in human keratinocytes." *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.144, No.31 pp. 182-189, (2012).

37. C. D. Funk, "Prostaglandins and leukotrienes: advances in Eicosanoid Biology.", *Journal of Science*, Vol.294, No.5548 pp. 1871-1875, (2001).