

미세먼지로 인한 피부 각질 세포 손상에서 몰약 에탄올 추출물의 항염증 효과

정영희¹, 노연화², 정명수^{3*}

¹원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, ²원광대학교 한의과대학 병리학교실

³원광대학교 한의과대학 예방의학교실 & 원광대학교 전통의학연구소

Anti-inflammatory Effects of Myrrh Ethanol Extract on Particulate Matter-induced Skin Injury

Young Hee Jung¹, Yeun Wha Roh², Myongsoo Chong^{3*}

¹Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

²Dept. of Korean Pathology, College of Korean Medicine, Wonkwang University

³Dept. of Preventive Medicine, College of Korean Medicine & Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Objectives: Myrrh have been used as a traditional remedy to treat infectious and inflammatory diseases. However, it is largely unknown whether myrrh ethanol extract could exhibit the inhibitory activities against particulate matter (PM)-induced skin injury on human keratinocytes, HaCaT cells. Therefore, this study was aimed to investigate the inhibitory activity of myrrh ethanol extract on PM-induced skin injury in HaCaT cells.

Methods: To investigate the inhibitory effects of myrrh ethanol extract in HaCaT cells, the skin injury model of HaCaT cells was established under PM treatment. HaCaT keratinocyte cells were pre-treated with myrrh ethanol extract for 1 h, and then stimulated with PM. Then, the cells were harvested to measure the cell viability, reactive oxygen species (ROS), pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL) 1-beta, IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α , hyaluronidase, collagen, MMPs. In addition, we examined the mitogen activated protein kinases (MAPKs) and inhibitory kappa B alpha ($I\kappa$ -B α) as inhibitory mechanisms of myrrh ethanol extract.

Results: The treatment of myrrh ethanol extract inhibited the PM-induced cell death and ROS production in HaCaT cells. In addition, myrrh ethanol extract treatment inhibited the PM-induced elevation of IL-1beta, IL-6, and TNF- α . Also, myrrh ethanol extract treatment inhibited the increase of hyaluronidase, MMP and decrease of collagen. Furthermore, myrrh ethanol extract treatment inhibited the activation of MAPKs and the degradation of $I\kappa$ -B α .

Conclusions: Our result suggest that treatment of myrrh ethanol extract could inhibit the PM-induced skin injury via deactivation of MAPKs and nuclear factor (NF)- κ B in HaCaT cells. This study could suggest that myrrh ethanol extract could be a beneficial agent to prevent skin damage or inflammation.

Key Words : Myrrh, Myrrh ethanol extract, Particulate matter, Keratinocyte, Skin, Inflammation

• Received : 31 March 2022 • Revised : 27 May 2022 • Accepted : 22 July 2022

• Correspondence to : Myongsoo Chong

460 Wonkwang University Oriental Medicine School, Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do

Tel : +82-63-850-6912, Fax : +82-63-852-5594, E-mail : neurokid@wku.ac.kr

서론

신체의 피부조직은 화학물질, 병원균, 대기오염물질, 자외선 등의 환경인자들로부터 신체 내 장기를 보호하는 장벽 기능과 체내 수분 손실을 예방하는 보습기능을 제공한다.¹⁾ 그 중에서 피부 표피의 90% 이상을 차지하는 각질 형성 세포(keratinocytes)는 수많은 항원에 접촉하며, 스트레스 환경에 노출되면 다양한 사이토카인과 케모카인 등 염증매개인자를 생성하여 염증 및 면역반응에 관여한다.²⁾ 외부 물질 침입 시 각질 형성 세포에서 보호 작용이 원활하지 않게 되면, 염증성 매개 물질이 과도하게 생성되어 피부가 손상되게 되고, 그에 따라 피부 노화, 염증 등이 발생할 수 있다.³⁾

최근에는 피부에 영향을 주는 물질로서 미세먼지(particulate matter, PM)가 대두되고 있다. 미세먼지는 입자의 크기가 매우 작아서 호흡을 통해 인체에 축적되어 호흡기질환, 폐기능 감소, 심근경색, 심장질환, 폐암 및 각종 피부질환을 유발한다.⁴⁾ 미세먼지는 다양한 중금속과 탄소 물질로 구성되어 있으며, 구성 물질에 따라 유해 효과가 달라진다.⁵⁾ 입자의 크기가 2.5 μm 이하인 미세먼지를 초미세먼지라고 부르고, 인체에 침투 시 과도한 ROS(Reactive oxygen species)를 생성하여 산화적 스트레스를 유도한다.³⁾ 이러한 산화적 스트레스는 피부 세포의 DNA 손상, 피부 세포 사멸, 피부 수분 손실, 피부 노화, 염증 등을 일으키게 된다.⁶⁾ 현재까지 피부 염증 질환의 치료 소재로서 항히스타민제나 스테로이드제가 처방되고 있으나, 장기간 사용시 피부장벽약화 및 골다공증 등의 부작용을 유발하는 것으로 보고되고 있다.⁷⁾ 따라서 부작용이 없고, 피부 염증 억제 효능의 약재 발굴이 필요하다.

몰약은 감람과(Burseraceae)에 속하는 몰약나무의 樹脂로 性味는 苦平 하고, 心·肝·脾 經에 작용한다. 溫通하고 香氣로 走竅하여 行瘀散血에 의한 活血止痛, 消腫生肌하는 效能효능이 있고 破血作用이 강하여 痛

經, 經閉, 胃脘痛, 風濕痺痛, 跌打損傷 등 제반 통증에 쓰이며, 外科·傷科의 瘡瘍이 潰破된 후 오랫동안 아물지 않은 要藥으로 쓰인다.⁸⁾ 몰약의 通經, 消腫生肌 등에 대한 효과가 피부 질환에 유효한 의미가 있을 것으로 판단되어 본 연구에 소재로 이용하게 되었다. 몰약은 기존에 항비만 효과,⁹⁾ 혈당 저하 효과,¹⁰⁾ 항염증 효과,¹¹⁾ 항균효과,¹²⁾ 간 보호 효과,¹³⁾ 기억력 개선효과¹⁴⁾ 등이 보고되어 있으나, 미세먼지로 유도된 피부 각질 형성 세포의 염증 반응에 관한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 피부 각질 형성 세포주인 HaCaT 세포에서 몰약 에탄올 추출물의 항염증 효과 및 항염증 기전을 연구하였다. HaCaT 세포에 미세먼지로 염증을 유도하여, 염증 반응을 조사하였고, 항염증 기전을 조사하기 위하여 MAPKs의 활성화와 I κ -B α 의 분해를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료의 조제

본 논문에 사용한 몰약은 광명당 제약 (Ulsan, Korea)에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 몰약 에탄올 추출물은 70% 에탄올 1 L에 몰약 100 g을 넣고 실온에서 초음파 분쇄한 후 3일간 추출하였다. 거즈로 여과하고 여과지(No. 2)를 사용해 진공펌프로 여과한 후 rotary evaporator로 감압 농축하여 22.68 g (수득률 22.68%)의 건조된 추출물을 얻었다. 시료는 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였고 DMSO는 최종 0.01% 이하의 농도 범위에서 사용하였다.

2) 시약

Fetus bovine serum (FBS), Dulbecco modified eagle medium (DMEM) high glucose, antibiotics

는 GIBCO (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Diethylpyrocarbonate (DEPC), trizol 용액은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), high-capacity RNA-to-cDNA kit는 Applied biosystems (ABI, San Diego, CA, USA), 2X taq PCR pre-mix kit는 Solgent (Daejeon, Korea)사에서 각각 구입하였다. Total 및 phospho-specific Mitogen activated protein kinases (MAPKs) 항체 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2 [ERK 1/2], c-Jun NH2-terminal protein kinase [JNK], p38)은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), Inhibitory kappa ($I\kappa$)-B α 는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 사의 제품을 사용하였다. 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하여 사용하였다. 미세먼지는 polycyclic aromatic hydrocarbons, nitro-substituted PAHs, polychlorinated biphenyl congeners, chlorinated pesticides의 validation이 완료된 Urban Particulate Matter를 NIST (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 기기

실험에 사용된 spectrophotometer는 SpectraMax ABS plus (Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였고, flow cytometry는 FACS Calibur (BD Biosciences, NJ, USA)를 이용하였다. PCR machine은 Steponeplus real time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하였다.

4) 세포주

본 실험에서는 정상 사람 피부의 각질 형성 세포와 형태 및 반응 양식이 같으면서, 계대배양이 제한되어 있지 않다는 장점이 있는 형질 전환 각질 형성 세포인 HaCaT 세포를 한국세포주은행 (KCLB; Seoul, Korea)에서 분양받아 실험에 사용하였다.

HaCaT 세포주는 DMEM high glucose 배지에 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C에서 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2. 실험방법

1) MTT 분석

세포의 사멸을 측정하기 위하여 MTT 분석을 시행하였다. 피부 각질 형성 세포에 몰약 에탄올 추출물을 처리한 후 24시간 동안 배양한 뒤 MTT 용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. 30분 후, 배양액을 제거하고 Formazan 생성물은 DMSO로 용해했다. Formazan의 용해액을 96-well plate에 loading 한 후, spectrophotometer (MD, USA)를 이용하여 540nm에 흡수되는 양을 측정하였다. 세포의 생존율은 어떠한 처리도 가하지 않은 naive cell과의 비율로 나타내었다.

2) 형광 유세포 분석 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

세포 내 활성 산소의 생성을 측정하기 위하여 형광 유세포 분석을 진행하였다. HaCaT 세포에 몰약 추출물을 1시간 전처리한 후 미세먼지를 처리한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하기 전에 10 μ M DCF-DA(Sigma, MO, USA)를 처리하여 37°C에서 20분 동안 배양하였다. 배양한 세포는 PBS로 세척하고, 1% Trypsin-EDTA(Sigma, MO, USA) 용액을 처리하여 세포를 수확하고 다시 PBS로 세척하여 flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences)로 형광을 측정하였다. 정보의 분석은 Cell Quest software (Becton Dickinson)을 이용하였다.

3) Total RNA 추출 및 mRNA 발현 측정

전염증성 사이토카인 발현을 측정하기 위하여, RNA를 추출하고 mRNA의 발현을 측정하였다. 세포를 획득한 후, trizol 용액을 1 mL 넣어서 세포를 용해한 후 100 μ L의 chloroform 용액을 가하고 잘

섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 수집하여, 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조했다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 µL씩 넣어 RNA를 용해하고 정량하였다. 추출한 RNA는 cDNA Kit를 이용하여 Master mix 11 µL, RNA 1 µg을 튜브에 넣고 PCR machine (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에서 cDNA로 합성하였다. 그 후에 PCR machine을 이용하여 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)은 2X Taq PCR Pre-Mix kit를 사용해 각각의 튜브에 합성한 cDNA를 1 µL 넣고 95°C에서 2분 반응시켰다. 그 후에 95°C에서 20초 합성 후, 각각 primer 65°C 40초, 72°C에서 1분 합성하였으며, 이 과정을 30 cycle 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 합성하였다. 사용한 primer는 Applied biosystems (ABI, San Diego, CA, USA)사에서 상용되는 PCR primer를 구입하였다.

4) Western blot 분석

몰약 에탄올 추출물의 기전을 연구하기 위하여, MAPK와 *Iκ-Bα*를 조사하기 위하여 Western blot을 시행하였다. 세포를 획득하여 RIPA lysis buffer를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min) 하여 pellet을 가라앉히고 단백질을 정량하였다. 같은 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 전기영동한 후 membrane에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. 단백질 발현은 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

5) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean ± S.E.M.로 나타내었다. 실험 결과에 대한 통계처리는 Graphpad prism (v7.0)의 one way

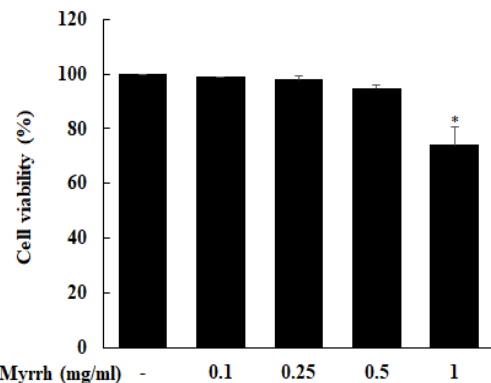
ANOVA를 사용하였고, Duncan method로 사후검증을 하였다. P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 몰약 에탄올 추출물의 HaCaT 세포에 대한 독성

HaCaT 세포에 몰약 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 정상 군의 생존율이 100% 일 때, 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL 농도에서는 유의성 있는 세포 독성이 관찰되지 않았고, 몰약 에탄올 추출물은 농도 1 mg/mL에서 유의성 있는 세포 독성이 관찰되었다(Fig. 1). 따라서, 몰약 에탄올 추출물의 미세먼지로 인한 피부 염증 보호 효과를 확인하기 위하여 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL의 농도를 선정하여 모든 분석에 적용하였다.

2. 미세먼지의 HaCaT 세포에 대한 독성



Myrrh (mg/ml)	-	0.1	0.25	0.5	1
Cell viability (%)	100.00±0.5	99.02±0.3	98.12±1.1	95.47±1.2	74.24±6.5

Fig. 1. The cytotoxicity of Myrrh ethanol extract in HaCaT cells

The cell viability was measured by MTT assay. HaCaT cells were incubated with or without Myrrh ethanol extract as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal.

HaCaT 세포에 미세먼지 용액을 25, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 생존율을 관찰하였다. 유의성 검증 및 사후 검정 결과, HaCaT 세포에서 정상 군의 생존율이 100%일 때, 미세먼지를 처리한 세포는 농도 의존적으로 유의성 있는 세포 독성이 관찰되었다. 하지만 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서, 미세먼지의 농도가 증가하여도 HaCaT 세포의 사멸이 증가하지 않았다. 따라서, 미세먼지로 인한 피부 세포 사멸을 관찰하기 위하여 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 선정하여 모든 분석에 적용하였다 (Fig. 2).

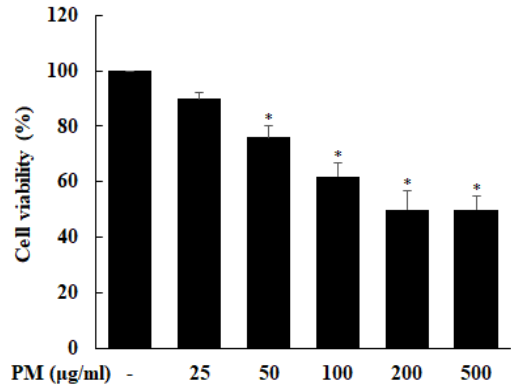
3. 미세먼지로 인한 HaCaT 세포 사멸에서 몰약 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에 몰약 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL 의 농도로 1시간 전처리하고, 미세먼지 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 24시간 동안 자극 후, 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 정상 군의 생존율이 100% 일 때, 미세먼지를 처리한 세포는 유의성 있는 피부 세포 사멸이 관찰되었다. 그러나 몰약 에탄올 추출물 처리 때문에 미세먼지로 인한 세포 사멸이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 3).

4. HaCaT 세포에서 미세먼지 자극에 대한 ROS 생성 효과

HaCaT 세포에 미세먼지 용액을 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, ROS 생성을 관찰하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 미세먼지를 처리한 세포는 농도 의존적으로 유의성 있는 ROS 생성이 관찰되었다 (Fig. 4). 따라서, 미세먼지로 인한 ROS 생성을 관찰하기 위하여 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도를 선정하여 모든 분석에 적용하였다.

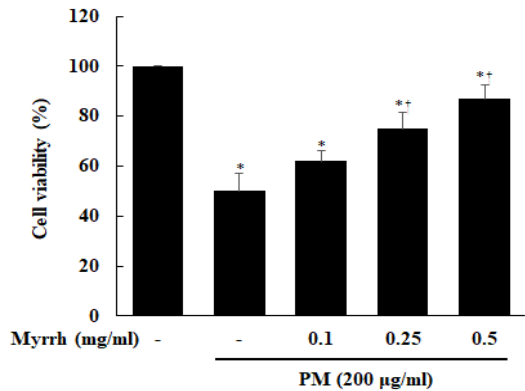
5. HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 ROS 생성에서 몰약 에탄올 추출물의 효과



PM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	25	50	100	200	500
Cell viability (%)	100.00±0.5	90.78±2.0	76.27±4.12	62.26±5.12	50.68±7.95	49.87±5.24

Fig. 2. The cytotoxicity of PM (particulate matter) in HaCaT cells

The cell viability was measured by MTT assay. HaCaT cells were incubated with or without PM as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. * $p < 0.05$ significant as compared to normal. N.S. indicates non-significant.



Myrrh (mg/ml)	-	-	0.1	0.25	0.5
PM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	200	200	200	200
Cell viability (%)	100.00±0.5	51.63±7.23	62.36±4.21	75.11±6.21	87.33±5.59

Fig. 3. The effects of Myrrh ethanol extract on PM-induced cell death in HaCaT cells

The cell viability was measured by MTT assay. HaCaT cells were pre-treated with Myrrh ethanol extract for 1 h, and then incubated with PM as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. * $p < 0.05$ significant as compared to normal. * $p < 0.05$ significant as compared to PM alone.

HaCaT 세포에 몰약 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL 의 농도로 1시간 전처리하고, 미세먼지

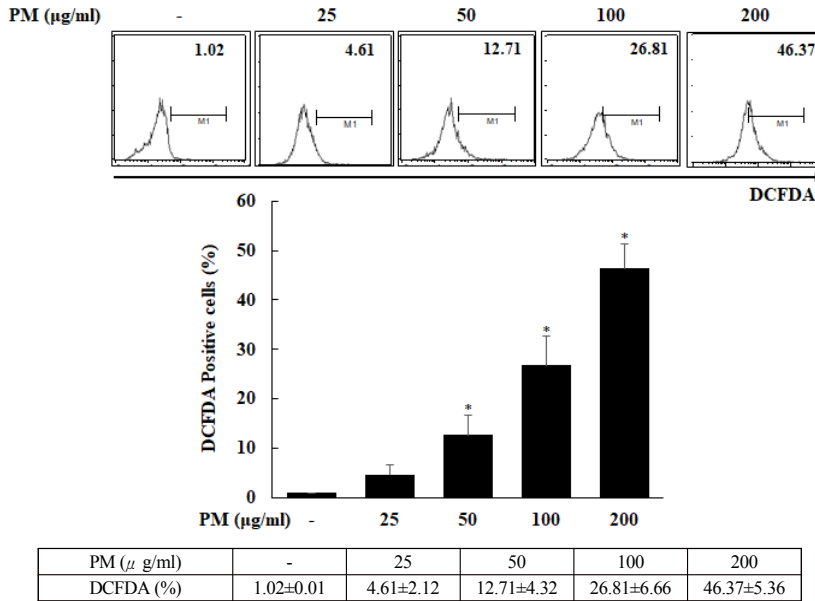


Fig. 4. The effects of PM (particulate matter) on ROS production in HaCaT cells

The ROS production were measured by relative DCFDA intensity using FACS. HaCaT cells were incubated with or without PM as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal.

(200 μ g/mL)로 24시간 동안 자극 후, ROS 생성을 관찰하였다. HaCaT 세포에서 미세먼지를 처리한 세포는 유의성 있는 ROS 생성이 관찰되었다. 그러나 몰약 에탄올 추출물 처리에 의하여 미세먼지로 인한 ROS 생성이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 5).

6. HaCaT 세포에서 미세먼지 자극에 대한 전염증성 사이토카인 생성 효과

HaCaT 세포에 미세먼지 용액을 25, 50, 100, 200 μ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 전염증성 사이토카인 생성을 관찰하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 미세먼지를 처리한 세포는 농도 의존적으로 유의성 있는 전염증성 사이토카인 증가가 관찰되었다 (Fig. 6). 따라서, 미세먼지로 인한 피부 전염증성 사이토카인 생성을 관찰하기 위하여 200 μ g/mL의 농도를 선정하여 모든 분석에 적용하였다.

7. HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 전염증성 사이토카인 생성에서 몰약 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에 몰약 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, 미세먼지 (200 μ g/mL)로 24시간 동안 자극 후, 전염증성 사이토카인 생성을 관찰하였다. HaCaT 세포에서 미세먼지를 처리한 세포는 유의성 있는 전염증성 사이토카인 생성이 관찰되었다. 그러나 몰약 에탄올 추출물 처리에 의하여 미세먼지로 인한 전염증성 사이토카인 생성이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 7).

8. HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 피부 수분 조절에서 몰약 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에 몰약 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, 미세먼지 (200 μ g/mL)로 24시간 동안 자극 후, 피부 수분 조절 인자를 관찰하였다. HaCaT 세포에서 미세먼지를

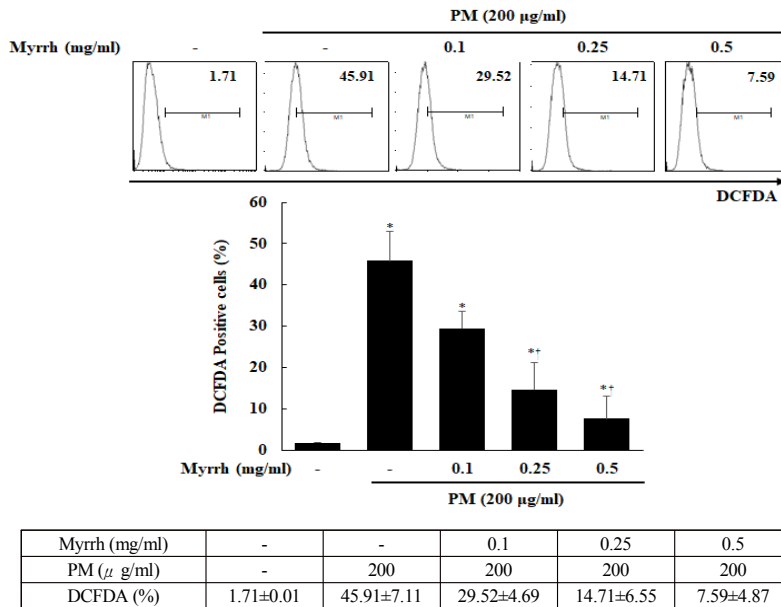


Fig. 5. The effects of Myrrh ethanol extract on PM-induced ROS production in HaCaT cells

The ROS production were measured by relative DCFDA intensity using FACS. HaCaT cells were pre-treated with Myrrh ethanol extract for 24 h, and then incubated with PM as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal. †p < 0.05 significant as compared to PM alone

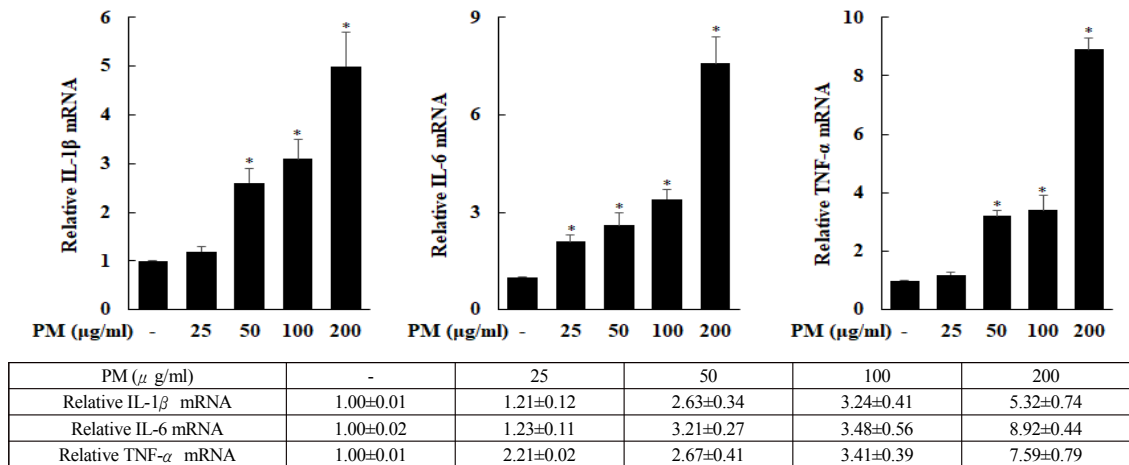
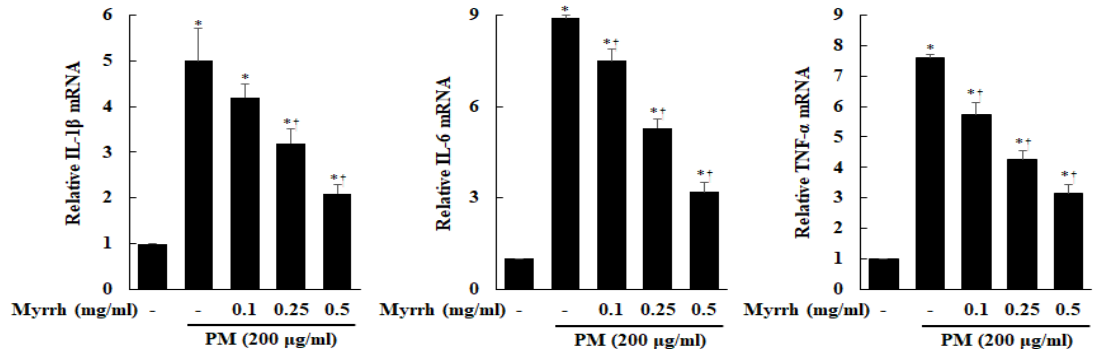


Fig. 6. The effects of PM (particulate matter) on pro-inflammatory cytokines in HaCaT cells

The pro-inflammatory cytokines were measured by realtime RT-PCR. HaCaT cells were incubated with or without PM as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal.

처리한 세포는 유의성 있는 피부 수분 분해 인자인 hyaluronidase 2, 4의 활성을 증가시켰다. 그러나 몰약 에탄올 추출물 처리 때문에 미세먼지로 인한

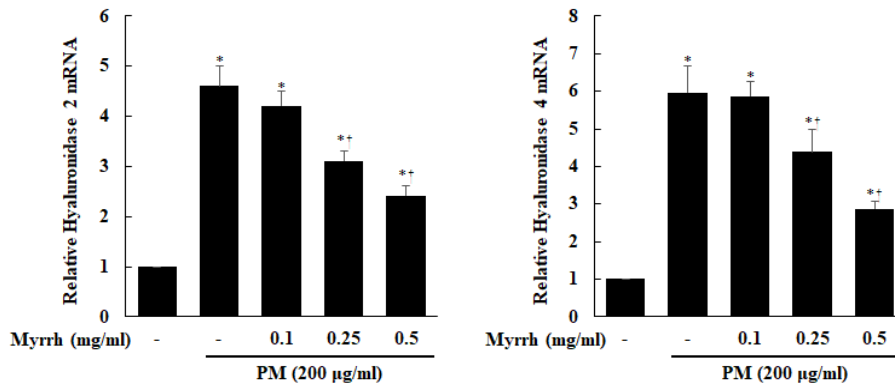
hyaluronidase 2, 4의 활성이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 8).



Myrrh (mg/ml)	-	-	0.1	0.25	0.5
PM (μ g/ml)	-	200	200	200	200
Relative IL-1 β mRNA	1.00 \pm 0.01	5.32 \pm 0.74	4.25 \pm 0.31	3.21 \pm 0.29	2.27 \pm 0.21
Relative IL-6 mRNA	1.00 \pm 0.02	8.92 \pm 0.12	7.49 \pm 0.37	5.37 \pm 0.32	3.27 \pm 0.33
Relative TNF- α mRNA	1.00 \pm 0.01	7.59 \pm 0.79	5.74 \pm 0.76	4.27 \pm 0.62	3.21 \pm 0.47

Fig. 7. The effects of Myrrh ethanol extract on PM-induced pro-inflammatory cytokines in HaCaT cells

The pro-inflammatory cytokines were measured by realtime RT-PCR. HaCaT cells were pre-treated with Myrrh ethanol extract for 1 h, and then incubated with PM as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal. †p < 0.05 significant as compared to PM alone



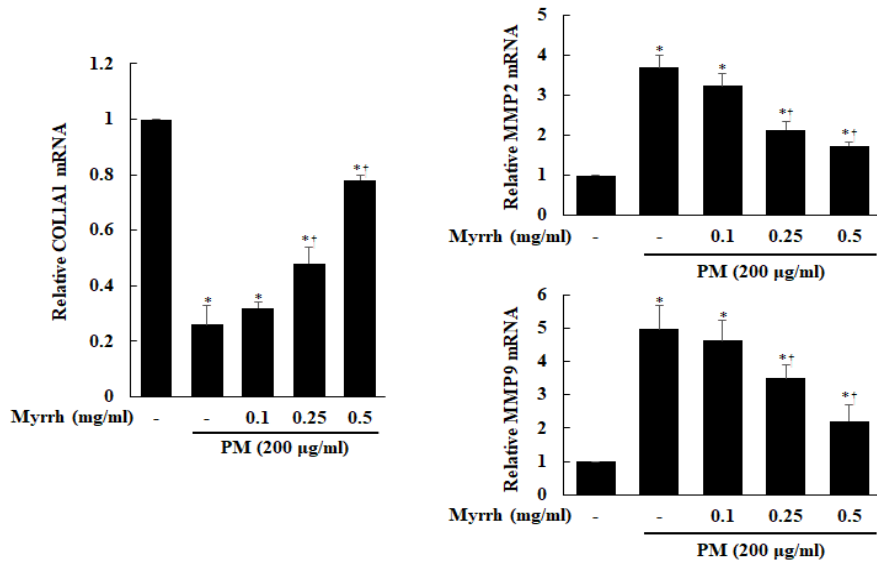
Myrrh (mg/ml)	-	-	0.1	0.25	0.5
PM (μ g/ml)	-	200	200	200	200
Relative hyaluronidase 2 mRNA	1.00 \pm 0.02	4.61 \pm 0.43	4.21 \pm 0.33	3.11 \pm 0.20	2.42 \pm 0.29
Relative hyaluronidase 4 mRNA	1.00 \pm 0.02	5.97 \pm 0.62	5.87 \pm 0.39	4.38 \pm 0.67	2.87 \pm 0.17

Fig. 8. The effects of Myrrh ethanol extract on PM-induced hyaluronidase 2 and 4 in HaCaT cells

The mRNA expression of hyaluronidase 2 and 4 were measured by realtime RT-PCR. HaCaT cells were pre-treated with Myrrh ethanol extract for 1 h, and then incubated with PM as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal. †p < 0.05 significant as compared to PM alone

9. HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 피부 노화 및 주름 관련 인자 발현에서 몰약 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에 몰약 에탄올 추출물을 0.1, 0.25, 0.5 mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, 미세먼지 (200 μ g/mL)로 24시간 동안 자극 후, 피부 노화 및



Myrrh (mg/ml)	-	-	0.1	0.25	0.5
PM (µg/ml)	-	200	200	200	200
Relative COL1A1 mRNA	1.00±0.02	0.26±0.07	0.32±0.02	0.48±0.06	0.78±0.02
Relative MMP2 mRNA	1.00±0.01	3.69±0.32	3.24±0.30	2.14±0.21	1.74±0.11
Relative MMP9 mRNA	1.00±0.01	4.96±0.72	4.62±0.69	3.49±0.42	2.21±0.51

Fig. 9. The effects of Myrrh ethanol extract on PM-induced collagen and MMP 2 and 9 in HaCaT cells
 The mRNA expression of COL1A1, MMP-2 and MMP-9 were measured by realtime RT-PCR. HaCaT cells were pre-treated with Myrrh ethanol extract for 1 h, and then incubated with PM as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal. +p < 0.05 significant as compared to PM alone

주름 생성과 관련이 있는 collagen(유전자 COL1A1)과 matrix metalloproteinase(MMP-2, 9)를 관찰하였다. HaCaT 세포에서 미세먼지를 처리한 세포는 유의성 있는 COL1A1 감소 및 MMP-2, 9의 mRNA 증가가 관찰되었다. 그러나 몰약 에탄올 추출물 처리에 의하여 미세먼지로 인한 COL1A1 감소 및 MMP-2, 9의 증가를 농도 의존적으로 억제하였다 (Fig. 9).

었다. NF-κB의 활성은 Iκ-Bα의 분해를 통하여 측정하였다. HaCaT 세포에서 미세먼지를 처리한 세포는 ERK1/2, P38, JNK의 인산화가 증가하였고, Iκ-Bα의 분해 또한 증가됨을 관찰할 수 있었다 하지만 몰약 에탄올 추출물 처리에 의하여 미세먼지로 인한 MAPK와 NF-κB의 활성 증가가 억제되었다 (Fig. 10).

10. HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 MAPK 및 NF-κB 활성화에 대한 몰약 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에 몰약 에탄올 추출물을 0.5 mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, 미세먼지 (200 µg/mL)로 30분 동안 자극 후, MAPK와 NF-κB를 관찰하

고찰

현대 산업 발달과 더불어 일상생활에 쉽게 노출되고 있는 미세먼지는 직접적으로 질병 유발에 관여하고 급·만성적으로 인체에 손상을 유도한다. 세계보건기구는 전 세계 인구의 92% 이상이 대기오염으로 인해 건강에 영향을 받고 있으며, 미세먼지로 인해

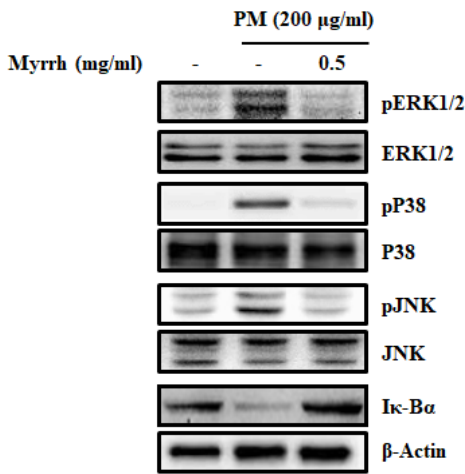


Fig. 10. The Effects of Myrrh ethanol extract on PM-induced MAPKs and the degradation of *Iκ-Bα* in HaCaT cells
 HaCaT cells were pre-treated with Myrrh ethanol extract for 1 h, and then incubated with PM for 30 min. The phosphorylation of ERK1/2, P38 and JNK, and the degradation of *Iκ-Bα* were analyzed by western blotting. Total ERK1/2, P38, JNK and β -actin were used as loading controls. The similar results were obtained from three additional experiments.

연간 700만명이 조기사망하고 있다고 보고한 바 있다.¹⁵⁾ 미세먼지는 입자가 매우 작기 때문에 호흡을 통해 몸 속에 쌓이고 체내 침착 시 인체 내 독성물질로 작용하여¹⁶⁾ 호흡기 질환, 당뇨병, 심혈관 질환 및 면역질환 등 다양한 질병을 유발하며,¹⁷⁾ 가려움이나 따끔거림과 같은 일시적인 피부자극에서부터 피부장벽을 뚫고 침투해 피부세포 손상을 야기하고 노화를 앞당기기도 한다.¹⁸⁾

몰약은 고대 근동 지방이나 중동지역에서는 매우 귀한 것으로 값비싼 향료·향수·화장품의 성분이었으며, 미라를 만들 때 방부제로 사용된 이래 항비만효과,⁹⁾ 항균 효과,¹⁹⁾ 항암효과,²⁰⁾ 항염증 효과²¹⁾가 연구되었다. 몰약의 항균성, 항염증 효과가 우수하다는 보고에 따라 몰약 에탄올 추출물이 미세먼지로 인한 피부 염증 개선에 효과가 있을 것으로 판단되어 연구를 진행하였다.

피부 표피에 해당하는 각질 형성 세포(keratinocytes)는 외부 환경에 직접적으로 노출되는 최외각 층으로

서, 외부 자극 스트레스에 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 생성한다.²²⁾ 과도하게 생성된 ROS은 피부의 세포 손상, 염증유발, 항산화시스템 교란, 세포사멸 등을 유발한다.²²⁾ 따라서 외부 물질 침입 시, ROS 생성을 억제하여 각질 형성 세포의 사멸을 억제하는 것은 피부 손상 및 노화를 억제하는 아주 중요한 방법이다. 본 연구에서는 미세먼지를 각질 형성 세포에 반응시켰을 때, 각질 형성 세포에서 ROS 생성이 많이 증가하는 것을 알 수 있었으며(Fig. 4), 그에 따라 세포 사멸이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 2). 이 결과를 통하여 인체에 미세먼지가 노출되면 피부 각질 형성 세포에 직접적으로 자극을 주며, 그에 따라 피부 손상을 일으킴을 알 수 있었다. 하지만, 몰약 에탄올 추출물은 미세먼지로 인한 ROS 생성 및 피부세포 사멸을 억제하는 것을 볼 수 있었고(Fig. 5, Fig. 3), 이는 몰약 에탄올 추출물이 미세먼지로 인한 피부 손상에서 몰약 에탄올 추출물이 유효한 효과가 있을 수 있음을 확인할 수 있었다.

각질형성세포는 환경적, 생리적 스트레스에 노출되면 염증반응이 일어나고 TNF- α 와 IL-1, IL-6 같은 염증성 cytokine 등을 분비하여 피부각질형성세포의 증식속도를 감소시키고, 진피층의 기질형성을 방해함으로써 손상된 피부의 치유속도를 저하시키게 된다.²³⁾ 따라서 피부 염증 반응 시, 각질 형성 세포에서 분비되는 전염증성 사이토카인 조절 및 억제는 피부 염증 반응 및 피부 손상 질환 치료에서 중요하다. 본 연구에서는 미세먼지로 각질 형성 세포를 자극하였을 때, 전염증성 사이토카인이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 6). 이는 미세먼지도 피부에 직접적으로 자극을 주어 피부 염증 및 피부 손상을 일으키고 있음을 보여준다. 하지만 몰약 에탄올 추출물을 전처리한 후 미세먼지로 각질 형성 세포를 자극하였을 때, 전염증성 사이토카인이 억제되었다. 이는 몰약 에탄올 추출물이 전염증성 사이토카인 억제를 통하여 피부 염증 반응 억제에 효과가 있음을 보여준

다(Fig. 7).

표피의 각질층은 체내 수분을 보존하고 외부환경으로부터 피부를 지키는 역할을 수행한다. 산화스트레스 등 여러 요인으로 인한 피부장벽의 손상은 피부의 수분 보유량을 감소시켜 피부노화를 촉진한다.²⁴⁾ Hyaluronic acid (HA)는 피부의 extracellular matrix (ECM)물질의 주요 구성 성분으로, 수분을 보유할 수 있다.²⁵⁾ 체내에서 HA의 50% 이상은 피부에 분포되어 있으며, HA는 노화 시에 감소하는 것으로 알려져 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소와 관련 있는 지표로서 유명하다.²⁶⁾ HA는 hyaluronidase에 의하여 분해되며,²⁷⁾ 따라서 노화 시에 hyaluronidase에 의해 HA가 감소하고 그에 따라 피부 수분 손실이 일어남을 추측할 수 있다. 본 연구에서는 미세먼지로 각질 형성 세포에 피부 자극을 주었을 때 피부 수분 손실에 미치는 영향을 조사하였고, 그 결과 미세먼지로 인하여 hyaluronidase-2와 hyaluronidase-4의 생성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 이는 미세먼지로 인하여 hyaluronidase가 증가하여 HA를 감소시키고, 그에 따라 피부 수분 손실이 발생하고 있음을 보여주는 것이다. 하지만 몰약 에탄올 추출물을 전처리한 후 미세먼지로 각질 형성 세포를 자극하였을 때, hyaluronidase-2와 hyaluronidase-4의 생성이 억제되었고, 이는 몰약 에탄올 추출물이 수분 보유 단백질은 HA의 분해를 유도하는 hyaluronidase의 생성 억제를 통하여 피부 수분 손실 억제에 효과가 있음을 보여준다(Fig. 8).

산화적 스트레스에 의해 ROS가 생성되면 피부노화가 시작된다. 피부노화가 진행되면 피부 세포 내 수분이 소실될 뿐만 아니라 세포 구성성분인 단백질, DNA 및 지질을 손상시켜 collagen 및 elastin과 같은 ECM물질을 분해하는 matrix metalloproteinases (MMP)의 발현이 증가하여 결과적으로 피부탄력이 저하된다.²⁸⁾ 따라서 피부 각질 형성 세포에서 분비되는 MMP는 콜라겐 감소에 영향을 미친다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 미세먼지로 각질 형성 세포를

자극하였을 때, MMP-2, 9가 증가하고, 콜라겐이 감소하는 것을 볼 수 있었는데(Fig. 9), 이는 미세먼지도 피부에 직접적으로 자극을 주어 피부 주름 형성 및 노화에 영향을 주고 있음을 보여준다. 하지만 몰약 에탄올 추출물을 전처리한 후 미세먼지로 각질 형성 세포를 자극하였을 때, 콜라겐 감소 및 MMP의 증가가 농도 의존적으로 억제되었다. 이는 몰약 에탄올 추출물이 콜라겐 증가 및 MMP 감소를 통하여 피부 주름 형성 및 노화 반응 억제에 유익한 효과가 있음을 보여준다(Fig. 9). 현재 MMP의 생성이 이루어지는 과정이 명확하지 않지만, 피부 자극에 의한 ROS 생성은 전염증성 사이토카인을 촉진시켜 다양한 신호전달체계를 자극하여 ECM 단백질 분해효소인 MMP의 발현을 활성화시키는 것으로 알려져 있다.²⁹⁾ 따라서, 몰약 에탄올 추출물의 MMP 발현 억제는 상위 기전인 ROS 및 전염증성 사이토카인 생성 억제를 통하여 효과가 있을 것으로 추측된다.

피부 염증 반응이 진행되면 MAPKs (ERK, JNK, p38)과 NF- κ B가 활성화되고, 그에 따라 ROS 및 전염증성 사이토카인들의 생성이 증가하게 된다.³⁰⁾ MAPKs는 인산화과정을 통해 활성화되어 염증성 매개물질 및 전염증성 사이토카인을 분비하게 되고, NF- κ B는 세포질 내 I κ -B α 의 분해가 일어나면서 활성화되어 염증 반응을 촉진하게 된다.³¹⁾ 실제로 많은 논문에서는 MAPKs와 NF- κ B를 피부 염증 및 손상에서 주요 기전으로 인식하고, 그 역할에 대하여 많은 보고를 하였다.^{32,33)} 따라서 MAPKs와 NF- κ B의 활성을 조사하는 것은 피부 손상 모델에서 치료 기전 조사에 있어서 아주 중요하다. 본 연구에서는 미세먼지로 각질 형성 세포에 피부 자극을 주었을 때 MAPKs와 NF- κ B의 활성에 미치는 영향을 조사하였고, 그 결과 미세먼지로 인하여 MAPKs의 인산화 및 I κ -B α 의 분해가 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10). 이는 미세먼지가 MAPKs와 NF- κ B를 활성화하여, 염증성 물질 분비, 수분 감소, 피부 주름 및 노화 증가에 이바지함을 보여주는 것이다. 이러한

MAPKs와 NF- κ B의 활성화는 몰약 에탄올 추출물 처리로 억제되었음을 확인하였고(Fig. 10), 이는 몰약 에탄올 추출물이 MAPKs와 NF- κ B 억제를 통하여 피부 손상을 개선하였음을 보여준다.

종합적으로, 몰약 에탄올 추출물은 피부세포 사멸, ROS 생성, 전염증성 사이토카인 생성, hyaluronidase 및 MMP의 생성을 억제하였고, 이는 MAPKs와 NF- κ B의 활성화 억제를 통해서 일어나는 것으로 보인다. 미세먼지로 인한 피부 질환의 예방과 치료를 위한 약 개발이 미비한 상황에서, 기존에 다용되고 있는 몰약 에탄올 추출물을 이용한 미세먼지로 인한 손상된 피부 개선에 새로운 효과를 보고한 것은 의미가 있다고 생각된다.

결론

피부 각질 형성 세포 HaCaT 세포에 미세먼지로 피부 염증 반응을 일으켰을 때, 몰약 에탄올 추출물의 피부 보호 효과와 기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 몰약 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 세포 사멸과 ROS 생성을 억제하였다.
2. 몰약 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 전염증성 사이토카인의 생성과 Hyaluronidase의 생성을 억제하였다.
3. 몰약 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 미세먼지로 인한 collagen 감소 및 MMP의 생성을 억제하였고, MAPKs 및 NF- κ B의 활성을 억제하였다.

이상의 결과는 몰약 에탄올 추출물이 HaCaT 세포에서 MAPK 및 NF- κ B의 활성화 억제를 통하여 피부 염증을 억제하였음을 보여준다. 몰약 및 몰약 에탄올 추출물 관련 제품은 추후 미세먼지 관련 다양한 피부 염증 질환에 응용하여 예방 및 치료제 개발

에 응용될 수 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Yun, M. S., Kim, C., & Hwang, J. K. (2019) *Agastache rugosa* Kuntze attenuates UVB-induced photoaging in hairless mice through the regulation of MAPK/AP-1 and TGF- β /Smad pathways. *J Microbiol Biotechnol*, 29, 1349-1360. <https://dx.doi.org/10.4014/jmb.1908.08020>
2. Jo, I. J. (2022) Inhibitory activity of Terminalia chebula extract against TNF- α /IFN- γ -induced chemokine increase on human keratinocyte, HaCaT cells. *Kor J Herbol*, 37(3), 41-47. <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2022.37.3.41>.
3. Kwon, D. J., Bae, Y. S., Ju, S. M., Goh, A. R., Choi, S. Y., & Park, J. (2011) Casuarinin suppresses TNF- α -induced ICAM-1 expression via blockade of NF- κ B activation in HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 409, 780-785. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.088>.
4. Lee, Y. J. & Seo, S. H. (2021) The effects of perception of particulate matter harmfulness on skin health management behavior. *J Kor Soc Cosmetol*, 27(5), 1229-1237. <https://doi.org/10.52660/JKSC.2021.27.5.1229>
5. Pan, T. L., Wang, P. W., Aljuffali, I. A., Huang, C. T., Lee, C. W., & Fang, J. Y. (2015) The impact of urban particulate pollution on skin barrier function and the subsequent drug absorption. *J Derma Sci*, 78, 51-60. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.01.011>.
6. Hu, R., Xie, X. Y., Xu, S. K., Wang, Y. N., Jiang, M., Wen, L. R., et al. (2017) PM2.5 Exposure elicits oxidative stress responses and

- mitochondrial apoptosis pathway activation in HaCaT keratinocytes. *Chin Med J*, 130, 2205-2214. <https://dx.doi.org/10.4103/0366-6999.212942>.
7. Choe, Y., Moon, K. M., Yoo, J. C., Byun, J., Hwang, S., Moon, D. K., & Woo, D. K. (2021) Atorvastatin and fluvastatin can reduce IL-1 β -induced inflammatory responses in human keratinocytes. *J Life Science*, 31(4), 418-424. <https://doi.org/10.5352/JLS.2021.31.4.418>
 8. Herbology Textbook Compilation Committee. (2020) Herbal Medicine. 4th Ed. Seoul: Youngrimsa, 442-443.
 9. Baek, S. J. & Kim, D. H. (2016) The Study on Anti-obesity of Myrrh ethanol extract. *Kor J Herbol*, 31(4), 11-18. <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2016.31.4.11>.
 10. Salama, A., Ibrahim, W., El-Nimr, T., Abd El, M. A., & Tousson, E. (2014) Effect of myrrh extract (Mirazid®) on experimentally diabetic rats. *Pharmacologia*, 5(4), 135-142. <https://dx.doi.org/10.5567/pharmacologia.2014.135.142>.
 11. Kim, D. C., Yoon, C. S., Ko, W., Lee, D. S., Kim D. S., Cho, H. K., et al. (2015) Anti-inflammatory Effects of 1 β ,6 α -Dihydroxyeudesm-4(15)-ene Isolated from Myrrh on LPS-induced Neuroinflammation in BV2 cells. *Kor J Pharmacogn*, 46(1), 12-16.
 12. Baek, H. S., Kang, S. K., Auh, Q. S., Chun, Y. H., & Hong, J. P. (2013) Effect of antibacterial effects of myrrh, rhatany, chamomomilla. *J Oral Medicine and Pain*, 38(4), 299-312. <http://dx.doi.org/10.14476/jomp.2013.38.4.299>.
 13. El-Shahat, M., El-Abd, S., Alkafafy, M., & El-Khatib, G. (2012) Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: myrrh (*Commiphora molmol*) vs. turmeric (*Curcuma longa*). *Acta Histochemica*, 114(5), 421-428. <https://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2011.08.002>.
 14. Ahn, J., Kim, D. S., Cho, H. K., Kim, Y. C., Kim, S. Y., Oh, H., et al. (2015). Ameliorating effects of HPM-1 on Scopolamine-induced memory impairments in mice. *Kor J Pharmacogn*. 46(3), 243-249.
 15. Yang, S. J., Kim, K. M., Song, J. W., & Lee, S. H. (2021). Relaxing effect of novel cosmetic ingredient using *Lactobacillus gasseri* HDB1102 on skin problems caused by particulate matter. *J Kor Soc Cosmetol*, 27(5), 1152-1158. <https://dx.doi.org/10.52660/jksc.2021.27.5.1152>.
 16. Seo, S. K., Ku, C. S., Son, B. M., Lee, S. G., Kang, E. M., Kim, M. O., et al. (2016) Anti-pollution capacity of mixtures of *Anemarrhena asphodeloides* root extract, β -glucan and poly- γ -glutamic acid from stimulation with particulate matter. *J Invest Cosmetol*, 12(4), 313-322. <https://dx.doi.org/10.5352/JLS.2020.30.2.191>.
 17. Jang, A. S. (2014) Impact of particulate matter on health. *J Kor Med Assoc*, 57(9), 763-768. <http://dx.doi.org/10.5124/jkma.2014.57.9.763>
 18. Lee, J., Kim H, Kim, J., & Han C. J. (2019) A study on the awareness of skin harmfulness and skin reaction symptoms and skin care behavior about the particulate matter of adult women. *J Kor Soc Cosmetol*, 25(6), 1309-1315.
 19. Park, U. K., Oh, J. H., Park, S. I., Lim, J. H., Kwon, S. J., Kim, E. J., et al. (2020). Antimicrobial activities of *Commiphora myrrha* Holmes mixture extract against *Clavibacter michiganensis*

- subsp. *michiganensis* and *capsici*. Natural Science, 31, 23-33.
20. Chen, Y., Zhou, C., Ge, Z., Liu, Y., Liu, Y., Feng, W., et al. (2013). Composition and potential anticancer activities of essential oils obtained from myrrh and frankincense. *Oncol Lett*, 6(4), 1140-1146. <https://dx.doi.org/10.3892/ol.2013.1520>.
21. Kim, M. S., Bae, G. S., Park, K. C., Koo, B. S., Kim, B. J., Lee, H. J., et al. (2012) Myrrh inhibits LPS-induced inflammatory response and protects from cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 278718. <https://dx.doi.org/10.1155/2012/278718>.
22. Poon, F., Kang, S., Chien, A. L. (2015) Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 31, 65-74. <https://dx.doi.org/10.1111/phpp.12145>.
23. Lee, W. R., Kim, K. H., An, H. J., Kim, J. Y., Han, S. M., Lee, K. G., et al. (2014) The effects of bee venom on tumor necrosis factor (TNF)- α induced inflammatory human HaCaT keratinocytes. *Kor J Pharmacogn*, 45(3), 256-261.
24. Yoo, H. R. & Lee C. H. (2018) A change in sebum, moisture and satisfaction according to hyaluronic acid content. *Kor J Oral Maxillofacial Pathology*, 42(3). 73-86. <https://doi.org/10.17779/KAOMP.2018.42.3.003>
25. Myung, D. B., Han, H. S., Shin, J. S., Park, J. Y., Hwang, H. J., Kim, H. J., et al. (2019) Hydrangenol isolated from the leaves of *Hydrangea serrata* attenuates wrinkle formation and repairs skin moisture in UVB-irradiated hairless mice. *Nutrients*, 11(10), 2354. <https://dx.doi.org/10.3390/nu11102354>.
26. Kim, E., Hwang, K., Lee, J., Han, S. Y., Kim, E. M., Park, J., et al. (2018) Skin protective effect of Epigallocatechin gallate. *Int J Mol Sci*, 19(1), 173. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms19010173>.
27. Kang, S. J., Choi, B. R., Kim, S. H., Yi, H. Y., Park, H. R., Park, S. J., et al. (2015) Inhibitory effects of pomegranate concentrated solution on the activities of hyaluronidase, tyrosinase, and metalloproteinase. *J Cosmet Sci*. 66(3), 145-159.
28. Yun, M. E., Lee, Y. S., Lee, Y. J., Park, Y. M., Park, S. N. (2018) Antimicrobial, antioxidant and cellular protective effects of *Houttuynia cordata* extract and fraction. *Appl Chem Eng*, 29, 452-460. <https://doi.org/10.14478/ace.2018.1035>
29. Pittayapruek, P., Meephanan, J., Prapapan, O., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2016) Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 17, 868-888. <https://doi.org/10.3390/ijms17060868>
30. Zhang, M., Zhou, J., Wang, L., Li, B., Guo, J., Guan, X., et al. (2014) Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 and IL-1 β levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. *Biol Pharm Bull*, 37, 347-354. <https://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00459>.
31. Bae, G. S. & Park, S. J. (2019) Anti-inflammatory Effect of *Nyssa fruticans* Wurmb. on tumor necrosis factor (TNF)- α -induced inflammatory response in HaCaT cells. *Kor J Herbol*, 34(1), 51-57. <https://doi.org/10.6116/kjh.2019.34.1.51>

32. Choi, H. J., Alam, M. B., Baek, M. E., Kwon, Y. G., Lim, J. Y., & Lee, S. H. (2020) Protection against UVB-induced photoaging by *Nyssa fruticans* via inhibition of MAPK/AP-1/MMP-1 signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 290536. <https://dx.doi.org/10.1155/2020/2905362>.
33. Liu, A., Zhao, W., Zhang, B., Tu, Y., Wang, Q., & Li, J. (2020) Cimifugin ameliorates imiquimod-induced psoriasis by inhibiting oxidative stress and inflammation via NF- κ

B/MAPK pathway. *Biosci Rep*, 40(6), BSR20200471. <https://dx.doi.org/10.1042/BSR20200471>.

ORCID

정영희 <https://orcid.org/0000-0003-3808-4687>
노연화 <https://orcid.org/0000-0002-8238-8736>
정명수 <https://orcid.org/0000-0002-8140-9566>