J. Soc. Cosmet. Sci. Korea
Vol. 49, No. 1, March 2023, 87-96

pISSN 1226-2587
eISSN 2288-9507
http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2023.49.1.87

꿀풀 추출물과 그 활성 화합물인 카페인산의 Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1) 발현 조절을 통한 피부 pH 개선 효과에 대한 연구

박 노 준* · 봉 심 규* · 박 상 아* · 박 기 현** · 고 영 철** · 김 혜 원** · 김 수 남*,†

*한국과학기술연구원 천연물연구소
**씨엠에스랩

(2023년 3월 21일 접수, 2023년 3월 29일 수정, 2023년 3월 30일 채택)

Study on Skin pH Improvement Effect through Regulation of Na^+/H^+ Exchanger 1 (NHE1) Expression of *Prunella vulgaris* Extract and Its Active Compound, Caffeic Acid

No-June Park[1], Sim-Kyu Bong[1], Sang-A Park[1], Gi Hyun Park[2], Young Chul Ko[2], Hae Won Kim[2], and Su-Nam Kim[1,†]

[1]Natural Products Research Institute, Korea Institute of Science and Technology,
679, Saimdang-ro, Gangneung-si. Gangwon-do 25451, Korea
[2]CMS LAB

(Received March 21, 2023; Revised March 29, 2023; Accepted March 30, 2023)

요 약: 본 연구는 인간 각질형성 세포주를 이용하여 피부 표면의 산성화를 조절하는 물질을 발굴하고, 이를 통해 각질층의 보습 능력 및 피부 장벽 기능에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었다. 꿀풀은 아프리카 북서부 및 북미에 널리 분포하는 허브 중 하나로 세포사멸, 항산화 및 항염에 대한 효능이 연구되어 왔다. 하지만 NHE1의 발현 조절 및 피부 장벽기능 회복에 대한 연구는 진행되지 않았다. 꿀풀의 피부 pH 조절 효과를 확인하기 위하여 꿀풀의 활성 성분 분석 결과 로즈마린산과 카페인산이 검출되었다. 꿀풀과 이것으로부터 검출된 성분인 카페인산은 인간 각질형성 세포주인 HaCaT 세포에 고농도(100 μg/mL 또는 100 μM)를 처리한 결과 독성을 보이지 않았다. 노화된 피부에서는 각질층의 산성 pH를 유지하기 위한 나트륨-수소 이온 교환 펌프(NHE1)의 발현 감소가 나타나는 것으로 알려져 있으며, 이러한 이유로 노화 피부에서 나타나는 피부 장벽 기능 회복의 저하에 중요한 원인으로 작용할 것으로 추측된다. 꿀풀 추출물 및 카페인산은 각질형성 세포에서 NHE1의 발현을 증가시켰으며, 자연 보습 인자 전구체인 필라그린과 세라마이드 합성 효소인 serine plmitoyl transferase (SPT)의 발현을 증가시켰다. 또한, 직접적인 pH 조절 효과를 확인하기 위해 각질형성 세포 내/외 pH 수치를 측정한 결과 꿀풀과 카페인산은 세포 외부 pH를 감소시켰다. 위 결과들을 종합해 볼 때, 꿀풀과 카페인산은 NHE1 조절을 통해 피부 pH를 조절할 수 있고, 자연 보습 인자(NMF)와 세라마이드 합성을 증가시켜 피부 장벽 기능 회복을 도울 수 있을 것으로 추측된다. 이러한 결과는 꿀풀과 카페인산이 피부 건강에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 보여주며, 이를 활용한 새로운 피부 보호 제품 개발에 대한 토대가 될 수 있다.

Abstract: This study was conducted to discover substances that regulate skin surface acidification using human epidermal keratinocyte cell lines, and to investigate their effects on the moisturizing ability and skin barrier function of the stratum corneum. *Prunella vulgaris* (*P. vulgaris*) is an herb widely distributed in Northwest Africa and North America that has been studied for its anti-apoptotic, antioxidant, and anti-inflammatory effects. However, research on the regulation of NHE1 expression and the restoration of skin barrier function has not been conducted. Analysis of *P. vulgaris* revealed the presence

† 주 저자 (e-mail: snkim@kist.re.kr)
call: 033-650-3503

of rosmarinic acid and caffeic acid as active ingredients, which were tested for toxicity in human epidermal keratinocyte cell lines (HaCaT), and showed no toxic effects were observed at high concentarion (100 μg/mL or 100 μM). It is known that sodium-hydrogen ion exchange pumps (NHE1) decrease in expression in aging skin to maintain the acidic pH of the stratum corneum, and it is hypothesized that this decrease plays an important role in the impaired restoration of skin barrier function in aging skin. *P. vulgaris* extract and caffeic acid increased the expression of NHE1 in keratinocytes, increased the expression of natural moisturizing factor (NMF) precursor filaggrin and ceramide synthesis enzyme serine palmitoyl transferase (SPT). In addition, *P. vulgaris* and caffeic acid decreased the extracellular pH of keratinocytes, indicating a direct effect on skin pH regulation. Taken together, these results suggest that *P. vulgaris* and caffeic acid can regulate skin pH through NHE1 modulation, and may help to restore skin barrier function by increasing NMF and ceramide synthesis. These results show the possibility that honeysuckle and caffeic acid can have a positive effect on skin health, and can be the basis for the development of new skin protection products using them.

Keywords: *skin pH, Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1), filaggrin, serine palmitoyl transferase (SPT), Prunella vulgaris, caffeic acid*

1. 서 론

피부 표면은 산성 pH를 가지며 각질층에 수반되는 pH 구배는 정상적인 피부상태에 매우 중요하며 피부에 상주하는 피부 미생물들을 제어하고 지질의 구조형성이나 장벽의 항상성 같은 중요한 생리학적 과정을 지원한다[1,2]. 피부의 산성 표면 pH와 pH의 구배는 피부 건강 유지에 매우 중요하다. 각질층의 pH 변화는 피부 장벽의 기능적 이상을 초래한다. 각질층 pH의 증가는 아토피성 습진, 건선, 여드름, 건조한피부를 포함한 염증성 피부질환을 발병시킬 수 있다[3-5]. 따라서 이러한 경우 피부 pH를 낮추는 전략적 치료가 사용되고 있다.

피부 장벽은 기능성 막 이중층으로 조직화된 각질층으로 구성되어 있다[6]. 피부 장벽에서 가장 중요한 지질 성분은 스핑고신 유도체와 지방산 유도체가 결합된 세라마이드이다. 세라마이드는 serine palmitoyltransferase (SPT) 활성에 의해 세라마이드 생합성을 증가시켜 피부 장벽 기능을 강화시킬 수 있다[7,8]. 세포 매트릭스 지질 처리에 관여하는 지질 가수분해효소인 β-glucocerebrosidase 및 acid sphingomyelinase는 세포 외 산도에 의해 활성화되지만 pH가 증가함에 따라 비활성화되어 투과성 장벽 항상성을 손상시킨다[9]. 각질층 pH의 중요성은 온전한 피부가 알칼리성 pH에 노출될 때 각질층이 중화되어 장벽 기능이 악화되고 투과성 장벽 회복 지연 및 각질층 응집력 감소로 이어진다[10]. 세린 프로테아제, 특히 중성 pH 최적성을 나타내는 각질층 트립신 효소 및 각질층 키모트립신 효소는 desmoglein-1 (DSG1), desmocollin-1 (DSC1) 및 corneodesmosin (CDSN)과 같은 각질 데스모솜의 세포 외 단백질 구조를 분해한다[11,12]. 따라서 상승된 pH는 지질처리 효소를 억제하고 세린 프로테아제를 활성화하여 각질세포 장벽 기능과 응집력을 손상시키게 된다. 각질층의 산성화는 한 가지 요인에 의존하지 않고, 내인성 및 외인성 메커니즘 모두에 의해 조절된다. 피부 표면의 pH에 영향을 미치는 외인성 요인으로는 피지 중의 지방산, 땀에서의 젖산, 각질층의 아미노산, 우로카닌산(UCA) 등이 알려져 있다[13,14]. 대표적인 외인성 요인으로 땀에서 발생하고 표피 대사 과정에서 발생하는 젖산과 피지 중에 있는 지방산이 피부로 확산되어 주로 표면층을 산성화시킨다[15]. 필라그린은 이어서 우로카닌산(UCA) 및 피롤리돈 카르복실산(PCA)을 포함하는 흡습성 아미노산으로 분해되며, UCA와 PCA는 각질층의 수분 공급에 기여하고 pH를 조절하는 피부의 천연 보습 인자(natural moisturizing factor, NMF)의 구성 요소로 작용한다[16]. pH를 조절하는 외인성 메커니즘뿐만 아니라, 각질층의 pH를 조절하는 내인성 인자로서 secretory phospholiphase A2 (sPLA2)와 세포막의 나트륨-수소 이온 교환 펌프 (sodium-hydrogen exchanger 1, NHE1)가 알려져 있다. 피부의 장벽기능은 나이가 들면서 감소하고 피부는 각질층 수분함유량 감소와 표면 pH 상승을 나타낸다 [17]. 피부 pH는 연령에 따라 차이를 보여 젊은 사람에 비해 노인에서 각질층의 pH가 높아 중성 환경에 가까워진다고 알려져 있다[18]. 노화피부에서는 각질층의 산성 pH를 유지하기 위해 결정적인 역할을 수행하는 NHE1의 발현 감소가 나타난다고 알려져 있는데, 이러한 이유로 각질층-과립층 사이의 산성 pH 유지 능력이 저하되는 것이 노화 피부에서 나타나는 피부 장벽 기능 회복의 저하에 중요한 원인으로 작용할 것이라 생각된다. 노화와 같은 내인성 요인에 의한 NHE1의 기능 감소는 약산성 피부 상태를 유지하지 못하고 알칼리화 상태의 피부로 만들

어 유해 물질과 세균의 침투와 증식에 대한 방어 기능을 감소시킬 수 있다[3].

꿀풀(*Prunella vulgaris* (*P. vulgaris*))은 유럽, 아시아, 아프리카 북서부 및 북미에 널리 분포된 약 15 종의 허브로 알려져 있다[19,20]. 꿀풀은 항에스트로겐 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌으며[21] 종양세포의 세포사멸과 항산화를 통해 항암효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다[22,23]. 꿀풀의 주요 성분으로는 카페인산, 로즈마린산, 케르세틴 및 루틴과 같은 페놀류가 풍부하며 이러한 총 페놀들은 다양한 메커니즘을 통해 항염, 항산화, 항암에 대한 활성을 나타낸다[24-26]. 꿀풀의 NHE1 발현 조절에 대한 연구는 알려진 바 없지만, 꿀풀의 함유 화합물 중 하나인 로즈마린산이 NHE1 발현을 조절하여 피부 pH를 조절할 수 있다는 연구 결과가 있다[27]. 이에 근거하여, 본 연구는 로즈마린산을 함유한 꿀풀과 이것으로부터 분리된 또 다른 성분인 카페인산이 '각질형성 세포에서 NHE1 발현 조절을 통해 피부 pH를 산성화시키고 이로 인해 피부 방어 기능을 강화시킬 수 있다' 라는 가설을 세우고 이를 밝히기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 꿀풀 추출

본 실험에 사용한 꿀풀(*Prunella vulgaris,* (*P. vulgaris*))은 경동시장의 약재상(Korea)에서 국내산 건초를 구입하여 재료로 사용하였다. 건조된 꿀풀 200 g을 95% 에탄올(EtOH) 2 L에 48 h 동안 실온에서 추출하였다. 추출용액을 filterpaper (Whatman No.1)로 여과하였고, 얻어진 여액을 감압 농축하여 에탄올 추출물을 얻어 각 실험에 사용하였다.

2.2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석

Agilent 1260 Series HPLC system/DAD를 이용하여 HPLC 분석을 수행하였다. 고정상은 역상 컬럼 YMC triart C_{18} (4.6 × 150 mm, 3 μm)을 사용하였다. 분석시료는 10 μL 주입하며, 컬럼의 온도는 25 ℃를 유지하였다. 이동상은 아세토니트릴 (A) 및 물 (B) 혼합용액을 기본으로 하며, 유속은 0.7 mL/min으로 하여 5% A 및 95% B의 조성으로 시작하여 용출 용매 B의 부피를 점차적으로 감소시키는 gradient solvent system으로 전개하였다. 검출 파장을 최적화하기 위하여 215 nm, 254 nm, 280 nm, 365 nm의 UV 파장을 적용한 크로마토그램을 비교하며, 가장 높은 감도를 보인 파장을 최적 검출 파장인 280 nm를 선정하였다. HPLC 조건은 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Condition of HPLC Analysis

HPLC condition
- Agilent Infinity 1260 series HPLC-DAD system
- Column : YMC Hydrosphere C_{18} (4.6 × 150 mm, 3 μm)
- Column temperature : 25 °C
- Injection volume : 10 μL
- Flow rate : 0.7 mL/min
- Mobile phase : Gradient system
  (A) 0.1% FA in Acetonitrile
  (B) 0.1% FA in Water

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (B)
0	5	95
3	5	95
23	95	5
28	95	5
30	5	95

2.3. 세포배양

각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 AddexBio (Catalog No. T0020001, USA)에서 구매하여 사용하였다. 각질형성 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA)와 1% penicillin/streptomycin (10,000 Upen/mL, 10,000 μg strep/mL) (Invitirogen, USA)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지를 이용하여 37 ℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다. 세포는 배양접시 면적의 80%의 confluency를 가지도록 2 ~ 3 일 간격으로 계대 배양을 시행하고, passage 15 ~ 20에 해당하는 세포를 실험에 사용하였다.

2.4. 세포 생존능 측정

각질형성 세포는 96 wall plate에 2 × 10^4 cells/well 밀도로 분주하여 24 h 동안 DMEM 배지에서 배양하였고, 이후 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*) 및 카페인산을 농도별로 세포에 처리하여 37 ℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 24 h 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 Ez-cytox (DogenBio, Korea)를 배지에 첨가하여 다기능 마이크로플레이트 리더기로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 (시료 처리군의 흡광도 / 무처리군의 흡광도) × 100으로 계산하였다.

2.5. RNA 추출, cDNA 합성 및 Real-time PCR

각질형성 세포를 6 wall plate에 5×10^5 cells/well 밀도로 분주하여 24 h 동안 DMEM 배지에서 배양하였고, 24 h 후 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)및 카페인산을 처리하여 24 h 배양하였다. Total RNA는 Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조자가 제시한 방법대로 수행하여 얻었다. 토탈 RNA 농도는 1 ug으로 보정하고 cDNA synthesis Kit (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, USA)을 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 실험에 사용하였다. 합성한 cDNA로부터 NHE1, Fliaggrin, SPT, β-actin의 발현 양을 확인하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. Real-time PCR은 SYBR Green (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA)을 사용하여 7500 Real-time PCR 시스템(Applied Biosystems)으로 분석하였다. Real-time PCR에 사용된 프라이머는 Table 2에 정리하였다.

2.6. Western Blot

각질형성 세포는 6 wall plate에 5×10^5 cells/well 밀도로 분주한 후 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하고, 24 h 후에 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산을 농도별로 처리하여 24 h 배양하였다. 배양 후 1 X RIPA buffer (Tech&innovation, Korea)를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 Bicinchoninic acid (BCA, Sigma, St. Louis, USA) 정량법을 이용하여 토탈 단백질을 정량한 후 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel을 이용하여 분리하였고, 분리된 단백질을 PVDF membrane (Immobilon-P membrane, Merck Millipore, Germany)에 이동시켰다. 실험에 사용된 1 차 항체는 NHE1 (1 : 1000, Santacruz, #SC-136239), Filaggrin (1 : 1000, Biolegend, #PRB-417P), GAPDH (1 : 3000, cell signaling, #2118)를 사용하였다. 밴드는 LAS-4000 (General Electric ImageQuant LAS 4000 Biomolecular Imager, GE Healthcare, USA)를 이용해 측정하였고, 밴드의 강도는 Image J 프로그램을 이용하여 각각 밴드를 GAPDH로 나누어 평가하였다.

2.7. 세포 내/외 pH 측정

각질형성 세포는 6 wall plate에 5×10^5 cells/well의 밀도로 분주한 후 37 ℃, 5% CO_2 조건에서 배양하고, 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산을 농도별로 처리하여 48 h동안 배양하였다. 배양 후 각질형성 세포의 세포 내 pH는 pHrodo™ Green AM Intracellular pH Indicator (ThermoFisher Scientific, MA, USA)를 사용하여 측정하여 세포 내 pH를 측정하였다. 또한, 세포 외 pH에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각질형성세포에 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산을 농도별로 48 h 동안 처리하여 배양한 후 Thermo Fisher-Orion™ 3-Star Benchtop pH Meter (ThermoFisher Scientific)를 이용하여 세포 외 pH를 측정하여 평가하였다.

2.8. 통계처리

본 연구에서 시행된 실험은 세포주마다 총 3 회 수행되었고, 데이터의 통계적 유의성 검정은 student's *t*-test로 시행되었다. 결과값은 mean ± standard deviation (SD)으로 표시하였고 p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 꿀풀 추출물의 HPCL 패턴 분석

꿀풀(*P. vulgaris*) 95% EtOH 추출물의 HPLC 크로마토그램에서 주요 피크 4 종을 선정하여 피크의 UV 스펙트럼

Table 2. Primer Sequence

Gene	Sequence	Genebank Accession	Size (bp)
NHE1-F	5′-GCCCTGTTAATCATTCCGTC-3′	NM_003047.5	149
NHE1-R	5′-CACATGGAAACCTATCTTCATGAG-3′		
Filaggrin-F	5′-GGCACTGAAAGGCAAAAAGG-3′	M24355	90
Filaggrin-R	5′-AAACCCGGATTCACCATAATCA-3′		
SPT-F	5′-TGGTCACGGTGGAACAAACA-3′	AH010598.2	318
SPT-R	5′-GCCTGGGCTACCTCCTTGA-3′		
β-actin-F	5′-CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC-3′	M28424.1	112
β-actin-R	5′-GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3′		

및 피크 유지시간을 비교하였고, 추출물 내 화합물 존재 유무를 판정하였다(Figure 1A). 그 결과 카페인산 및 로즈마린산 피크가 검출되었다(Figure 1B).

3.2. 꿀풀 추출물과 카페인산의 각질형성세포에서 세포 생존능 분석

꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산의 세포 생존능을 확인하기 위하여 HaCaT 세포에 꿀풀 추출물 및 카페인산을 농도별(1, 3, 10, 30, 100 μg/mL 또는 1, 3, 10, 30, 100 μM)로 처리한 후 Ez-cytox로 세포 생존능을 분석하였다. 꿀풀 추출물과 카페인산의 고농도(100 μg/mL 또는 100 μM)에서 무처리군 대비 90% 이상의 생존율을 나타내어 세포 독성이 없음을 확인하였다(Figure 2).

3.3. 꿀풀 추출물과 카페인산의 각질형성세포에서 NHE1 발현 조절 효과 분석

NHE1은 피부 pH를 조절하는 매우 중요한 내인성 인자로서 각질에서 NHE1의 발현 감소는 피부 표면 pH를 증가시키고 피부 수화를 감소시킨다. 꿀풀 추출물과 카페인산이 pH를 조절하는데 중요한 역할을 하는 NHE1의 발현 조절에 미치는 영향을 확인하기 위하여 HaCaT 세포에 시료를 농도별로 처리하여 NHE1의 mRNA 발현과 단백질 발현을 평가하였다. Real-time PCR 결과, 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*) 처리군의 NHE1 mRNA 발현이 각각 무처리군 대

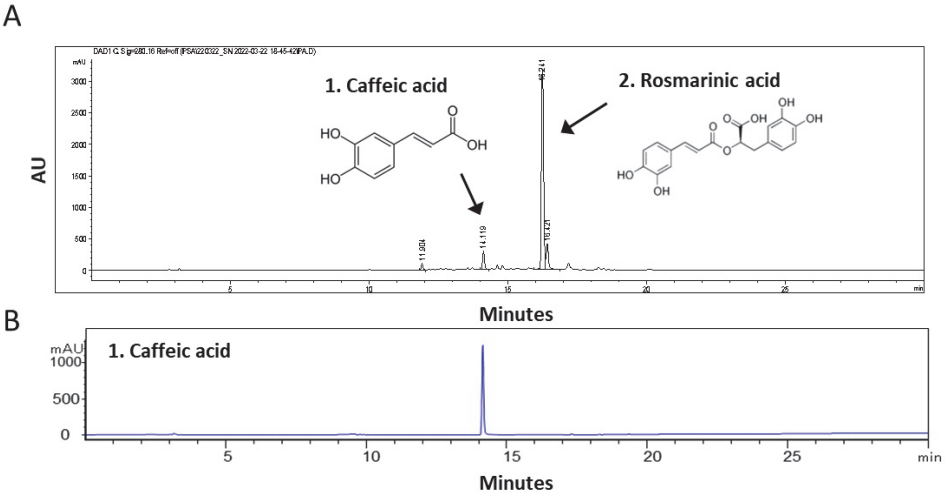

Figure 1. HPLC analysis of *Prunella vulgaris* extract. HPLC chromatograms of *P. vulgaris* extract (A) and caffeic acid standard sample (B). HPLC chromatograms of *P. vulgaris* extract was performed using LC/MS at 280 nm.

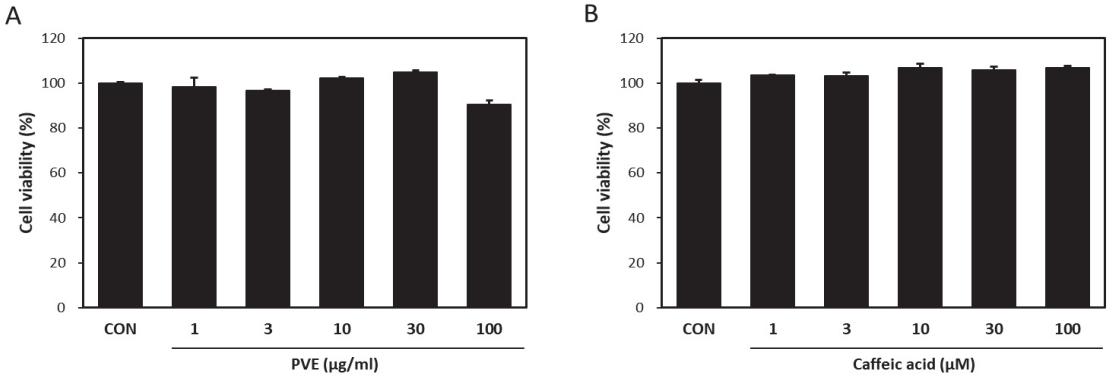

Figure 2. Cell viability of *P. vulgaris* extract (A) and caffeic acid (B) in HaCaT cells. The percent cell viability was calculated relative to the nontreated cells. Each bar presented as mean ± SD (N = 3). PVE: *P. vulgaris* extract.

비 3 ㎍/mL 농도에서 112%, 10 ㎍/mL 농도에서 150%로 증가 되었고(Figure 3A), 카페인산은 각각 무처리군 대비 1 ㎛M 농도에서 110%, 3 ㎛M 농도에서 146%, 10 ㎛M 농도에서 155%로 증가 되었다(Figure 3C). NHE1 단백질 발현 또한 무처리군 대비 꿀풀 추출물은 30 ㎍/mL 농도에서 약 2.5 배 증가 되었고(Figure 3B), 카페인산 또한 30 ㎛M 농도에서 약 1.8 배 증가 되었다(Figure 3D). 이 결과로 꿀풀과 카페인산이 NHE1의 mRNA 수준과 단백질 수준을 증가시켜 피부 각질층의 pH를 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

3.4. 꿀풀 추출물과 카페인산의 각질형성세포에서 Filaggrin 발현 조절 효과 분석

필라그린은 NMF 전구체로 피부 보습 기능에 중요하고, UCA, PCA로 분해되어 pH를 조절하는 중요한 구성요소이다. 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산이 필라그린 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 HaCaT 세포에 시료를 농도별로 처리하여 필라그린의 mRNA 발현과 단백질 발현을 평가하였다. Real-time PCR 결과, 꿀풀 추출물 처리군의 필라그린 mRNA 발현이 각각 무처리군 대비 1 ㎍/mL 농도에서 145%, 3 ㎍/mL 농도에서 189%, 10 ㎍/mL 농도에서 221%로 증가 되었고(Figure 4A), 카페인산은 각각 무처리군 대비 3 ㎛M 농도에서 151%, 10 ㎛M 농도에서 182%로 증가 되었다(Figure 4C). 필라그린 단백질 발현 또한 30 ㎍/mL 꿀출 추출물 처리군에서 무처리군 대비 약 1.5 배 증가 되었고 (Figure 4B), 30 ㎛M 카페인산 처리군에서 무처리군 대비 약 1.9 배 증가 되었다(Figure 4D). 이 결과로 꿀풀과 카페인산이 필라그린의 mRNA 수준과 단백질 수준을 증가시켜 피부 보습 및 pH 조절에 영향이 있을 것으로 사료된다.

3.5. 꿀풀 추출물과 카페인산의 세라마이드 생합성 조절 효소 (SPT) mRNA 발현 분석

Serine palmitoyl transferase (SPT)는 피부 장벽을 구성하는 주요 요소인 세라마이드를 생합성하는 데 사용되는 효

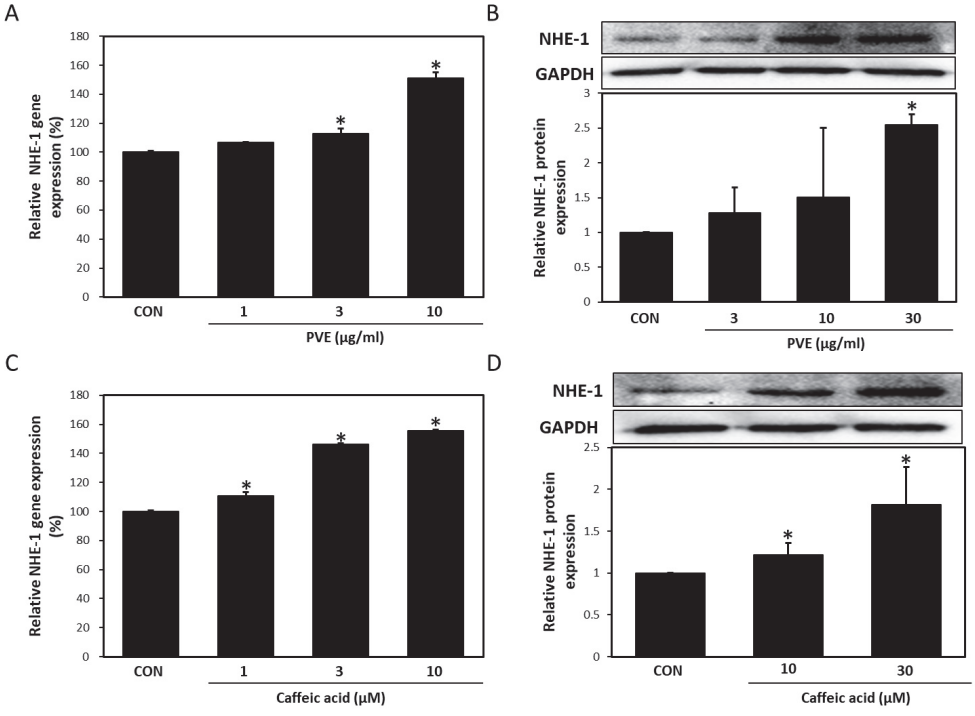

Figure 3. The regulatory effect of *P. vulgaris* extract (A,B) and caffeic acid (C,D) on NHE1 mRNA expression and protein expression. Real-time PCR analysis of NHE1 mRNA expression in HaCaT cells treated *P. vulgaris* and caffeic acid. The intensity of SPT were normalized to the band of GAPDH. NHE1 protein levels were measured in HaCaT cells by western blot. The band densities were calculated using Image J software and normalized to the protein content of GAPDH. Each bar presented as mean ± SD (N = 3). $^{*}p < 0.05$ vs. control (CON). PVE: *P. vulgaris* extract.

소이다. 꿀풀 추출물과 카페인산이 SPT mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 HaCaT 세포에서 시료를 처리한 후 real-time PCR을 진행하였다. 그 결과, 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*) 처리군의 SPT mRNA 발현이 무처리군 대비 각각 3 ㎍/mL 농도에서 168%, 10 ㎍/mL 농도에서 177%로 증가 되었고(Figure 5A), 카페인산 10 ㎛ 처리군은 무처리

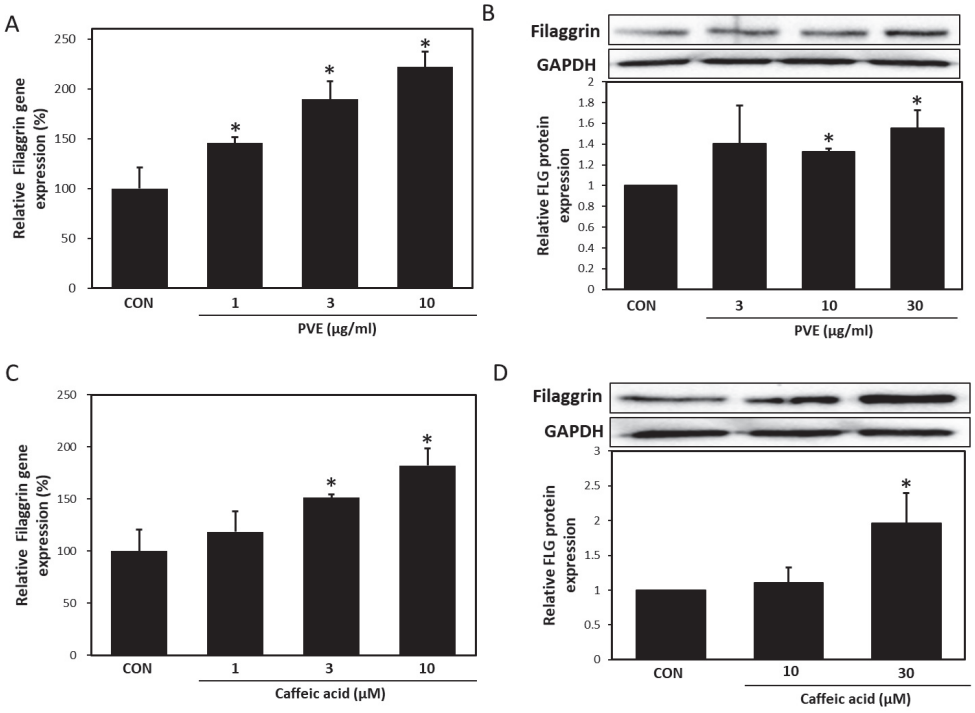

Figure 4. The regulatory effect of *P. vulgaris* extract (A,B) and caffeic acid (C,D) on filaggrin mRNA expression and protein expression. Real-time PCR analysis of filaggrin mRNA expression in HaCaT cells treated *P. vulgaris* and caffeic acid. The intensity of Filaggrin were normalized to the band of GAPDH. Filaggrin protein levels were measured in HaCaT cells by western blot. The band densities were calculated using Image J software and normalized to the protein content of GAPDH. Each bar presented as mean ± SD (N = 3). $^*p < 0.05$ vs. control (CON). PVE: *P. vulgaris* extract.

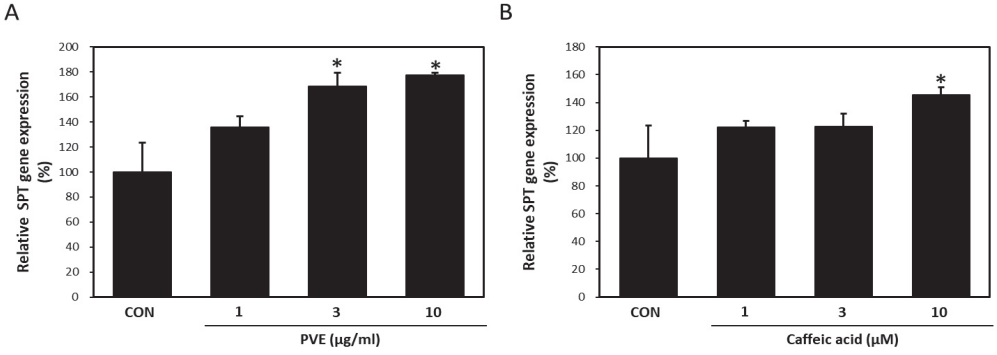

Figure 5. Promoting effect of mRNA expression by *P. vulgaris* extract (A) and caffeic acid (B). Real-time PCR analysis of SPT mRNA expression in HaCaT cells treated *P. vulgaris* and caffeic acid. Each bar presented as mean ± SD (N = 3). $^*p < 0.05$ vs. control (CON). PVE: *P. vulgaris* extract.

군 대비 154%로 증가 되었다 (Figure 5B). 이 결과로 꿀풀과 카페인산이 SPT의 mRNA 발현을 증가시켜 세라마이드의 생합성을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

3.6. 꿀풀 추출물과 카페인산의 각질형성세포 세포내/세포외 pH 조절 효과 분석

각질형성 세포 내/외 pH 변화는 건강한 피부 장벽기능을 구성하는데 있어 매우 중요한 요인이다. 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산이 NHE1, 필라그린, SPT의 발현을 증가시켰고, 그로 인해 세포 내/세포 외 pH에 미치는 영향을 확인하기 위하여 꿀풀 추출물과 카페인산을 처리하여 세포 내/외 pH를 측정하였다. pH 측정 결과 꿀풀 추출물 10 μg/mL 농도에서 무처리군 대비 세포 내 pH가 0.2 증가 되었고(Figure 6A), 세포 외 pH 수치는 무처리군 대비 0.2 감소하여 낮은 pH를 나타내었다 (Figure 6B). 카페인산 처리군 또한 무처리군 대비 세포 내 pH 수치는 0.13 증가 되었고(Figure 6C), 세포 외 pH 수치는 0.3 감소 되었다(Figure 6D). 이 결과로 각질형성 세포에서 측정한 낮은 세포 외 pH 수치는 피부 각질층의 항상성을 유지할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 결 론

각질층의 산성 pH를 조절하는 대표적인 요인으로 필라그린-히스티딘-우로카닌산 경로, secretory phospholiphase A2 (sPLA2)에 의한 유리 지방산 가수분해경로, 멜라닌 함유 과립의 분출 및 NHE1의 활성화 등이 있다[14,28-30]. 피부 pH를 조절하는 다양한 요인들 중, 우리는 직접적인 피부의 pH 농도구배 조절을 통한 피부 장벽기능 회복에 대해 연구하기 위해 NHE1을 조절하는 물질을 발굴하고, NHE1 조절이 피부 표면의 약산성화에 기여함과 동시에 각질층의 보습 능력 및 피부 장벽 기능에 어떻게 관여하는지에 대한 연구를 진행하였다. 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)은 항산화, 종양세포의 세포사멸, 항염 등의 효능에 대한 연구가 보고되었다. 하지만, 피부 pH 조절 및 장벽기능 회복에 대한 연구는 전혀 진행되어 있지 않다. 꿀풀 HPLC 분석 결과, 꿀풀 에탄올 추출물에서 로즈마린산 및 카페인산이 검출되었다. 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산 모두 각질형성 세포주인 HaCaT 세포에서 고농도(100 μg/mL 또는 100 μM) 처리 결과 독성을 보이지 않았다. 노화된 피부에서는 각질층의 산성 pH를 유지하기 위해 결정적인 역할을 수행하는 NHE1의 발현 감소가 나타난다고 알려져 있는데, 이러한

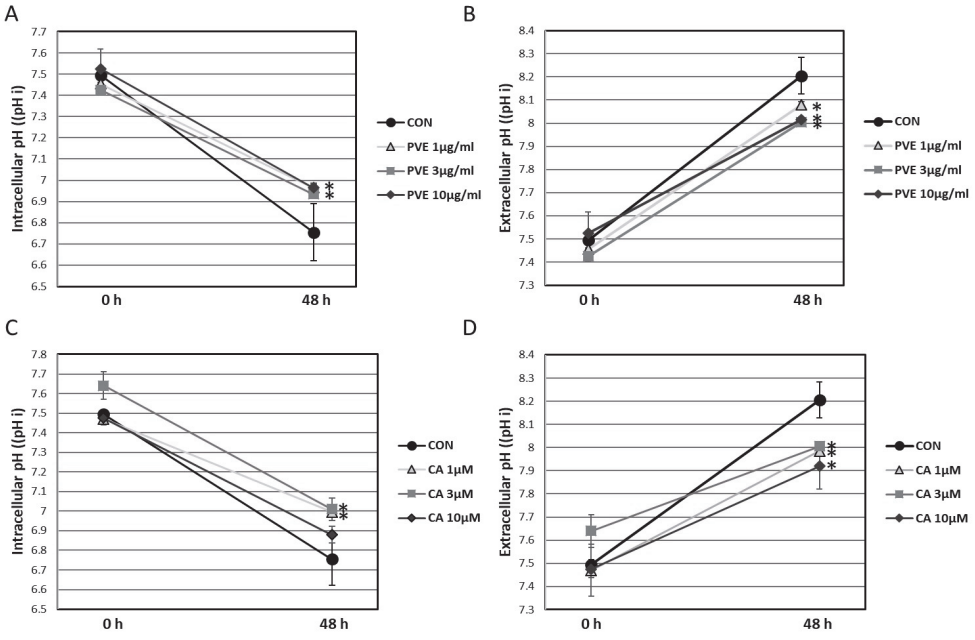

Figure 6. Intra/extracellular pH control effect of *P. vulgaris* extract (A,B) and Caffeic acid (C,D). *P. vulgaris* and caffeic acid were treated in HaCaT cells, and after 0 h and 48 h culture, intracellular/extracellular pH was measured. Each error bar presented as mean ± SD (N = 3). $^{*}p < 0.05$ vs. control (CON). PVE: *P. vulgaris* extract, CA: caffeic acid.

이유로 각질층-과립층 사이의 산성 pH 유지 능력이 저하되는 것이 노화 피부에서 나타나는 피부 장벽 기능 회복의 저하에 중요한 원인으로 작용할 것으로 사료된다. NHE1 발현 조절 실험 결과, 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산 모두 무처리군 대비 NHE1의 발현량이 증가되었다. 보습 기능에는 자연 보습 인자(NMF)가, 장벽기능은 세라마이드가 중요한 역할을 하기 때문에, 꿀풀 추출물과 카페인산이 NMF의 전구체인 필라그린 및 세라마이드 합성 효소인 serine palmitoyl transferase (SPT)의 발현을 조절하는지 확인하였다. 그 결과 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산은 필라그린의 발현량이 증가되었고, 세라마이드 합성 효소인 SPT의 발현이 증가되었다. 즉 꿀풀과 카페인산은 NHE1을 증가시켜 pH를 조절할 수 있고, 자연 보습 인자 전구체인 필라그린과 세라마이드 합성효소인 SPT의 발현을 증가시켜 피부 장벽기능의 회복을 도울 수 있을 것으로 사료된다. 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산의 NHE1 발현 증가가 pH 조절에 직접적인 영향을 미치는지 확인하기 위해 각질형성 세포에 처리하여 세포 내/외 pH를 측정하였다. 그 결과 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산 모두 무처리군 대비 세포 내 pH는 증가되었고 세포 외 pH를 감소시켰다. 즉 꿀풀 추출물(*P. vulgaris*)과 카페인산은 NHE1의 발현 증가를 통해 세포 외 기질의 pH를 낮춤으로써 피부 표면을 약산성화 시킬 수 있을 것으로 추정된다. 따라서, 세포실험을 통해 증명된 꿀풀과 카페인산의 NHE1 발현 증가 효과가 직접적으로 피부 pH를 조절하여 피부 장벽회복에 도움이 되는지 임상을 통해 검증 되어야 할 필요가 있다. 또한, 필라그린-히스티딘-우로카닌산 경로, sPLA2에 의한 유리 지방산 가수분해경로 및 멜라닌 함유 과립분비 등 피부 pH 조절하는 더 많은 요인들에 대해 추가 연구가 필요하다.

피부에서의 pH 조절은 건강한 피부를 결정하는데 매우 중요하다. 꿀풀과 카페인산은 각질형성 세포 내에서 발현되는 pH 조절인자인 NHE1의 활성을 높임으로써 보다 본질적이고, 지속적으로 피부 pH를 약산성으로 유지시키며, pH 조절뿐만 아니라, 수분함유량 및 지질 합성의 조절을 통해 노화나 외부요인에 의한 피부 장벽기능의 저하를 개선하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. J. W. Fluhr and P. M. Elias, Stratum corneum pH: formation and function of the ‘acid mantle’, *Exogenous Dermatology,* **1**(4), 163 (2002).
2. F. Rippke, V. Schreiner, and H. J. Schwanitz, The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH, *American Journal of Clinical Dermatology*, **3**(4), 261 (2002).
3. E. H. Choi, M. Q. Man, P. Xu, S. Xin, Z. Liu, D. A. Crumrine, Y. J. Jiang, J. W. Fluhr, K. R. Feingold, P. M. Elias, and T. M. Mauro, Stratum corneum acidification is impaired in moderately aged human and murine skin, *J Invest Dermatol.*, **127**(12), 2847 (2007).
4. J. W. Fluhr, R. Darlenski, N. Lachmann, C. Baudouin, P. Msika, C. De Belilovsky, and J. P. Hachem, Infant epidermal skin physiology: adaptation after birth, *Br. J. Dermatol.,* **166**(3), 483 (2012).
5. B. Eberlein-König, T. Schäfe, J. Huss-Marp, U. Darsow, M. Möhrenschlagez, O. Herbert, D. Abeck, U. Krämer, H. Behrendt, and J. Ring, Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children: clinical report, *Acta Derm Venereol.*, **80**(3), 188 (2000).
6. P. M. Elias, Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, *J Invest Dermatol.*, **80**(6 Suppl), S44 (1983).
7. K. Nakajima, M. Terao, M. Takaishi, S. Kataoka, N. Goto-Inoue, M. Setou, K. Horie, F. Sakamoto, M. Ito, H. Azukizawa, S. Kitaba, H. Murota, S. Itami, I. Katayama, J. Takeda, and S. Sano, Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model, *J Invest Dermatol.*, **133**(11), 2555 (2013).
8. Y. Shirakura, K. Kikuchi, K. Matsumura, K. Mukai, S. Mitsutake, and Y. Igarashi, 4, 8-Sphingadienine and 4-hydroxy-8-sphingenine activate ceramide production in the skin, *Lipids Health Dis.*, **11**, 108 (2012).
9. T. Mauro, S. Grayson, W. M. Gao, M. Q. Man, E. Kriehuber, M. Behne, K. R. Feingold, and P. M. Elias, Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing, *Arch. Dermatol. Res.*, **290**(4), 215 (1998).
10. J. P. Hachem, D. Crumrine, J. Fluhr, B E. Brown, K. R. Feingold, and P. M. Elias, pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion, *J Invest Dermatol.*, **121**(2), 345 (2003).
11. M. Brattsand and T. Egelrud, Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum

trypsin-like serine protease with possible function in desquamation, *J. Biol. Chem.*, **274**(42), 30033 (1999).
12. E. Ekholm and T. Egelrud, Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in relation to other markers of epidermal differentiation in a skin explant model, *Exp. Dermatol,* **9**(1), 65 (2000).
13. M. J. Patterson, S. D. Galloway, and M. A. Nimmo, Variations in regional sweat composition in normal human males, *Exp. Physiol.*, **85**(6), 869 (2000).
14. J. W. Fluhr, J. Kao, S. K. Ahn, K. R. Feingold, P. M. Elias, and M. Jain, Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity, *J Invest Dermatol,* **117**(1), 44 (2001).
15. M. Behne, Y. Oda, S. Murata, W. M. Holleran, and T. M. Mauro, Functional role of the sodium-hydrogen antiporter, NHE1, in the epidermis: pharmacologic and NHE1 null-allele mouse studies, *J Invest Dermatol*, **114**(797), 201 (2000).
16. G. M. O'Regan, A. Sandilands, W. H. I. McLean, and A. D. Irvine, Filaggrin in atopic dermatitis, *J. Allergy Clin Immunol.*, **122**(4), 689 (2008).
17. Z. Wang, M. Q. Man, T. Li, P. M. Elias, and T. M. Mauro, Aging-associated alterations in epidermal function and their clinical significance, *Aging*, **12**(6), 5551 (2020).
18. A. K. Han, J. S. Won, and O. S. Kim, Skin hydration status and skin surface pH according to the body parts of the aged with immobilization, *J. Korean Acad. Fundam. Nurs.*, **17**(3), 314 (2010).
19. T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. H. Valentine, S. M. Walters, and D. A. Webb, Flora Europaea: Plantaginaceae to Compositae, *Cambridge university press*, **4**, (1993).
20. J. Psotová, M. Kolář, J. Soušek, Z. Švagera, J. Vičar, and J. Ulrichová, Biological activities of *Prunella vulgaris* extract, *Phytother. Res.,* **17**(9), 1082 (2003).
21. N. H. Collins, E. C. Lessey, C. D. DuSell, D. P. McDonnell, L. Fowler, W. A Palomino, M. J. Illera, X. Yu, B. Mo, A. M. Houwing, and B. A. Lessey, Characterization of antiestrogenic activity of the Chinese herb, P*runella vulgaris*, using *in vitro* and *in vivo* (Mouse Xenograft) models, *Beprod.*, **80**(2), 375 (2009).
22. K. J. Zhang, M. Z. Zhang, Q. D. Wang, and W. L. Liu, The experimental research about the effect of *Prunella vulgaris L.* on Raji cells growth and expression of apoptosis related protein, *Zhong Yao Cai*, **29**(11), 1207 (2006).
23. L. Feng, X. Jia, M. M. Zhu, Y. Chen, and F. Shi, Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris L. in vitro* and in tumor-bearing mice, *Molecules*, **15**(12), 9145 (2010).
24. T. Tanaka, T. Kojima, T. Kawamori, A. Wang, M. Suzui, K. Okamoto, and H. Mori, Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids, *Carcinogenesis.*, **14**(7), 1321 (1993).
25. D. O. Moon, M. O. Kim, J. D. Lee, Y. H. Cho, and G. Y. Kim, Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-α-induced NF-κB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells, *Cancer Lett.*, **288**(2), 183 (2010).
26. C. W. Lin, W. C. Hou, S. C. Shen, S. H. Juan, C, H. Ko, L. M. Wang, and Y. C. Chen, Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKCδ/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells, *Carcinogenesis.*, **29**(9), 1807 (2008).
27. S. W. Jung, G. H. Park, E. Kim, K. M. Yoo, H. W. Kim, J. S. Lee, M. Y. Chang, K. Shin, K. Park, and E. H. Choi, Rosmarinic acid, as an NHE1 activator, decreases skin surface pH and improves the skin barrier function, *Int. J. Mol.r Sci.*, **23**(7), 3910 (2022).
28. J. W. Fluhr, P. M. Elias, M. Q. Man, M. Hupe, C. Selden, J. P. Sundberg, E. Tschachler, L. Eckhart, T. M. Mauro, and K. R. Feingold, Is the filaggrin–histidine–urocanic acid pathway essential for stratum corneum acidification?, *J Invest Dermatol.*, **130**(8), 2141 (2010).
29. M. Q. Man,T K. Lin, J. L. Santiago, A. Celli, L. Zhong, Z. M. Huang, T. Roelandt, M. Hupe, J. P. Sundberg, K. A. Silva, D. Crumrine, G. Martin-Ezquerra, C. Trullas, R. Sun, J. S. Wakefield, M. L. Wei, K. R. Feingold, T. M. Mauro, and P. M. Elias, Basis for enhanced barrier function of pigmented skin, *J Invest Dermatol.*, **134**(9), 2399 (2014).
30. E. Proksch, pH in nature, humans and skin, *J. Dermatol.*, **45**(9), 1044 (2018).