

## 머위(*Petasites japonicus*)의 피부장벽과 항염증 효과

김재현<sup>1,\*</sup> · 문외숙<sup>2</sup> · 장영아<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>경성대학교 화장품학과

<sup>2</sup>(주)에코마인

<sup>3</sup>경성대학교 스마트헬스케어융복합연구센터

(2023년 3월 6일 접수: 2023년 4월 25일 수정: 2023년 4월 26일 채택)

### Skin barrier and anti-inflammatory effect of petasites japonicus

Chae-hyun Kim<sup>1,\*</sup> · Woi-Sook Moon<sup>2</sup> · Young-Ah Jang<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmetic Science, Kyung Sung University

<sup>2</sup>Department of R&D, ECOMINE Co., Ltd.

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

(Received March 6, 2023; Revised April 25, 2023; Accepted April 26, 2023)

**요약** : 본 연구에서는 머위에탄올추출물 (PJE)의 기능성 소재로서의 활용 가능성을 알아보기 위해 UVB로 유도된 Human keratinocyte (HaCaT cell)를 통해 피부장벽과 염증 개선에 대한 활성을 알아보고자 하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정, ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 측정, Hydrogen peroxide 소거능 측정을 통해 항산화 효과를 확인한 결과, 1 mg/ml 농도에서 대조군인 ascorbic acid과 비슷한 항산화 효과를 가지고 있음을 확인하였다. UVB로 유도된 HaCaT 세포의 filaggrin과 aquaporin-3의 생성능의 mRNA의 발현을 확인해본 결과, UVB 자극에 의해 줄어든 발현량이 머위 추출물 처리 시, 농도 의존적으로 증가하고 있음을 확인하였다. TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 발현은 UVB 자극에 의해 증가되었으며 머위 추출물을 처리하였을 때 감소되는 것을 확인할 수 있었다. Migration assay 결과 농도 의존적으로 피부 각질세포의 증식과 상처의 회복을 증가시켰음을 확인하였다. 실험결과를 바탕으로 머위가 피부 보습 및 피부장벽 기능을 개선할 수 있는 기능성 소재의 화장품으로 사용될 수 있음을 시사한다.

**주제어** : 머위, 피부장벽, 항염증, 필라그린, HaCaT 세포

**Abstract** : In this study, to investigate the possibility of using ethanol extract of *Petasites japonicus* (PJE) as a functional material, we investigated the activity of improving skin barrier and inflammation through UVB-induced human keratinocyte (HaCaT cell). As a result of confirming the antioxidant

<sup>†</sup>Corresponding author

(E-mail: [yaviol@ks.ac.kr](mailto:yaviol@ks.ac.kr))

\* 본 과제(결과물)는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업 (LINC 3.0)의 연구결과입니다.

effect through DPPH radical scavenging activity, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity, and hydrogen peroxide scavenging activity, it was confirmed that it had an antioxidant effect similar to that of ascorbic acid, a control, at a concentration of 1 mg/ml. As a result of confirming the mRNA expression of the production ability of filaggrin and aquaporin-3 in HaCaT cells induced by UVB, it was confirmed that the reduced expression level by UVB stimulation increased in a concentration-dependent manner when the PJE was treated. It was confirmed that the mRNA expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were increased by UVB stimulation and decreased when the PJE was treated. As a result of the migration assay, it was confirmed that the proliferation of skin keratinocytes and the recovery rate of wounds were increased in a concentration-dependent manner. Based on the experimental results, it suggests that *Petasites japonicus* can be used as a functional cosmetic product that can improve skin moisturizing and skin barrier function.

*Keywords* : *Petasites japonicus*, *Skin barrier*, *Anti-inflammatory*, *Filaggrin*, *HaCaT cell*

## 1. 서론

피부는 자외선, 외부의 감염원 등으로부터 신체를 보호하는 기능을 수행하며 크게 표피, 진피, 피하지방층으로 나눌 수 있다[1, 2]. 표피는 아래에서부터 기저층, 유극층, 과립층, 투명층 그리고 최외각층인 각질층으로 구분되며 기저층에서부터 각질세포의 형성, 분화, 탈각 과정이 반복되어 표피 기능의 항상성을 유지한다[3]. 그 중 각질층은 각질세포와 그 사이를 채우는 지질층으로 이루어져 있으며 주성분은 세라마이드 (ceramide), 콜레스테롤 (cholesterol), 자유지방산 (free fatty acids) 등으로 알려져 있다[5]. 각질세포간 지질은 외부로부터 병원균을 포함한 다양한 자극으로부터 보호막을 해주어 피부장벽의 역할을 하며 filaggrin, lorixin 등의 유전자와 단백질에 의해 유지된다[4]. 외부 자외선으로부터 생성된 활성산소로 인한 기능에 결함이 생기면 세포 내 신호전달체계가 활성화되어 사이토카인(cytokine) 및 가려움 인자들의 발현이 증가하여 피부건조를 유발하고 증상이 심해지면 아토피와 같은 만성피부질환과 염증성 피부염이 나타날 수 있다[6]. 실제로 Interlukine-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interlukine-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등의 염증 관련 신호전달시스템에 결함이 생긴 마우스의 피부모델에서 급성 피부장벽손상의 복구가 지연된다는 보고도 있다[7]. 최근 “피부장벽 (피부의 가장 바깥쪽에 존재하는 각질층의 표피를 말한다)의 기능을 회복하여 가려움 등의 개선에 도움을 주는 화장품”이 기능성화장품 범위로

확대됨에 따라 관련 기능을 개선할 수 있는 천연물 소재의 소비자 수요가 높아 개발범위가 확대되고 있다[8]. 관련 연구는 자외선으로 인한 피부장벽 손상 및 염증 반응 시 세포 내 분비되는 전염증성 cytokines와 filaggrin을 포함한 피부장벽 회복에 도움을 주는 연구결과가 주를 이루며 천연물 중 금전초는 피부각질세포에서 UV에 의해 감소된 filaggrin, involucrin 등의 보습관련 인자 발현을 상승시키고, 자색양파는 filaggrin과 serine palmitoyl transferase의 발현을 증가시켜 피부장벽을 보호하는 것으로 보고되었다[9, 10]. 또한 복분자 씨앗 추출물은 Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )/TNF- $\alpha$ 와 UVB에 의해 유도된 Interlukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, Interlukine-8 (IL-8)과, reactive oxygen species (ROS) 유도 활성의 발현을 억제하였다고 보고되었다[11]. 머위(*Petasites japonicus*)는 국화과에 속하는 다년생 초본식물로 머꿍대, 봉두채, 머우, 봉두엽이라고도 불리며 일본 중국, 우리나라의 남부지방과 중부지방에서 자생한다[12, 13]. 머위에는 다양한 활성성분들이 존재한다고 보고되어 있는데 꽃에는 fukinolic acid, caffeic acid 등의 항산화 물질이 발견되었고 뿌리와 줄기에는 sesqui-terpenoid인 eremopetasidione과 phenolic compound인 petasiphenone과 eremophilenoide 등이 존재한다고 알려져 있다[14, 15]. 머위는 항산화, 항염증, 항알레르기 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 카드뮴으로부터 유도된 피부세포 손상모델에서 세포사멸인자인 Bcl-2와 procaspase-3 단백질 발현을 증가시켜 세포보호능이 있음이 밝혀졌다[12, 16]. 따라서

본 연구에서는 머위 70% 에탄올 추출물이 피부 각질형성세포인 HaCaT 세포 내 UVB로 유도된 모델에서 피부장벽, 항염증에 미치는 영향을 알아 보고 피부장벽 화장품 소재로서 가능성이 있는지에 대한 연구를 수행하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 실험 재료

머위뿌리는 전북 진안에서 재배된 것을 (주)들숨에서 2020년 12월에 구입하였으며 건조한 시료를 파쇄한 후 70% 에탄올을 용매로 하여 시료중량의 10배 양을 가하여 실온에서 24시간 동안 침지하고 상층액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 개별 시료를 원심 분리 및 여과한 다음 rotary vacuume vaporator (HS-10SP; Hahnshin S&T, Korea)를 사용하여 농축한 후 동결기(FD5525; Ilshin BioBase, Korea)로 건조하였다. 건조한 시료는 냉장실에 보관하여 사용하였다.

### 2.2. DPPH 라디칼 소거능 측정

추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같이 측정하였다. 시료와 양성대조군 ascorbic acid 각 100  $\mu$ L에 0.2 mM의 DPPH 50  $\mu$ L를 넣어 최종농도를 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL로 만들어 교반한 후 30 min 방치한 다음 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Power Wave™ XS Microplate Spectrophotometer; BioTek Instruments, USA)를 이용해 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.3. ABTS<sup>+</sup>라디칼 소거능 측정

ABTS<sup>+</sup>라디칼 소거능 측정은 7 mM ABTS와 2.4mM potassium persulfate를 1:1로 혼합하여 암실 및 실온에서 24 h 동안 반응시킨 후, 사용 전에 ABTS 용액을 에탄올에 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이  $0.706 \pm 0.001$ 이 되게 사용하였다. 시료와 양성대조군 ascorbic acid 각 50  $\mu$ L에 ABTS와 potassium persulfate 혼합액 950  $\mu$ L를 첨가하여 최종농도를 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL로 만든 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.4. Hydrogen peroxide 소거능 측정

Hydrogen peroxide 소거능 측정은 희석한 시료 500  $\mu$ L와 4 mM Hydrogen peroxide 500  $\mu$ L를 가한 후 37°C 에서 10분 동안 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 230 nm에서 흡광도를 측정하여 소거능을 측정하였다.

### 2.5. 세포 배양

본 연구에서 사용된 human keratinocyte인 HaCaT 세포는 대구한의대학교 피부면역약리학 실험실로부터 분양받아 사용하였다. HaCaT 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (FBS: nitrogen Therapeutics, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, USA) 100 U/mL를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM: Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다.

### 2.6. MTT assay

HaCaT cell을 96-well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, PJE을 농도별로 제조한 후 0.02 mL 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 여기서 5 mg/mL 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 0.2 mL 첨가하여 4시간 배양한 후 상층액을 제거하고, 형성된 formazan에 각 well 당 0.1 mL의 DMSO 용액을 가하여 실온에서 15분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.7. Filaggrin, aquaporin-3 생성량 측정

HaCaT cell을 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL로 24시간 배양 후 UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>)와 농도별로 제조한 머위 추출물을 처리한 후 18시간 뒤 세포 배양액을 취하여 filaggrin과 aquaporin-3을 측정하였다. 상층액을 수거하여 측정전까지 -70°C에서 보관하였고, filaggrin 측정은 Echelon bioscience의 filaggrin ELISA Kit (Cat: LS-F40135-GOS14)를 Aquaporin-3는 Gill Blood Group의 Human Aquaporin-3 ELISA Kit (Cat: MBS700774)를 사용하였으며 protocol에

따라 측정하였다.

## 2.8. Real-time PCR

HaCaT cell을 24 well plate에  $4 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 24시간 뒤 PJE를 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거하고 cold-PBS로 2번 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 filaggrin, aquaporin-3의 mRNA 발현 확인을 위해 TB Green® Premix Ex Taq II를 이용하여 증폭하였다. PCR조건은 94°C에서 30초 (denaturation), 55°C에서 30초 (annealing), 72°C에서 30초 (extension)를 40회 반복하였다.

## 2.9. Wound-healing Assay

HaCaT cell을 12 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well로 분주하고 24시간동안 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척하여 FBS가 없는 배지로

overnight 배양하였다. 200  $\mu$ L Yellow tip을 이용하여 단일 세포층을 긁고 PBS로 1회 세척하였다. 현미경으로 관찰 후 PJE를 농도별로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 현미경으로 세포 이동 정도를 관찰하고 촬영하였다.

## 2.10. 통계처리

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

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH는 free radical로서 보라색의 안정된 화합물로서 항산화 활성 측정 방법 중 비교적 간단한 방법이다[17, 18]. PJE의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 실험결과 PJE 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/ml 농도로 처리하였을 때, 1 mg/ml 농도에서 93.2% 소거활성을 보였다. 동일농도에서 대조군으로 사용

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Target gene		Primer sequence
FLG	forward	5' -TGA AGC CTA TGA CAC CAC TGA-3'
	reverse	5' -TCC CCT ACG CTT TCT TGT CCT-3'
AQP-3	forward	5' -TGC TAC CTA CCC CTC TGG AC-3'
	reverse	5' -GCC AGC ACA CAC ACG ATA AG-3'
TNF- $\alpha$	forward	5' -TGT AGC CCA TGT TGT AGC AAC-3'
	reverse	5' -TTG AAG AGG ACC TGG GAG TAG A-3'
IL-1b	forward	5' -GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA -3'
	reverse	5' -CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G-3'
GAPDH	forward	5'-CCA CCC AGT ACA GCG TCA AC-3'
	reverse	5'-CAT GGT GCT TCT GTC GCT CT-3'

된 ascorbic acid는 96.1%로 PJE가 대조군과 비슷한 소거활성을 나타내었으며 항산화능이 우수함을 확인할 수 있었다.

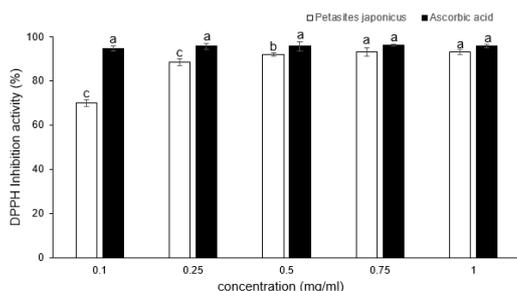


Fig. 1. Electron donating ability of *Petasites japonicus* extracts, ascorbic acid (Positive control), Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data. Values with different letters<sup>a,b,c,d</sup> are significantly different each other by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. ABTS<sup>+</sup> radical activity 측정

ABTS<sup>+</sup>라디칼 소거능은 potassium persulfate에 반응시켜 형성된 짙은 청록색의 free radical의 탈색되는 원리를 이용한 방법이다[19]. 실험결과 PJE 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/ml 농도로 처리하였을 때, 1 mg/ml 농도에서 99.8% 활성을 보였으며, 동일농도의 대조군인 ascorbic acid는 99.9%의 소거활성으로 PJE의 항산화능이 우수함을 확인할 수 있었다.

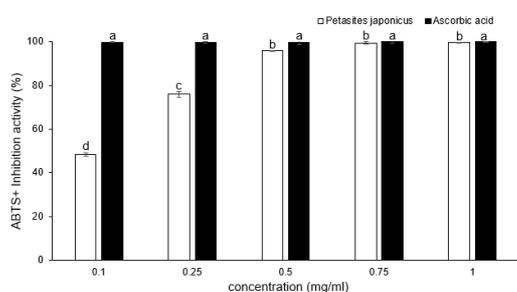


Fig. 2. ABTS<sup>+</sup> inhibition activity of *Petasites japonicus* extracts, ascorbic acid (Positive control), Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data. Values with different letters<sup>a,b,c,d</sup> are significantly different each other by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 소거능 측정

자외선과 같은 지속적인 외부자극에 대한 피부 노출은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 활성산소를 생성해 산화적 스트레스를 유도하며 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 불포화지방산을 과산화지질로 만들어 DNA와 Protein을 손상시켜 노화 및 성인병을 일으키는 것으로 보고되고 있다[20, 21]. PJE의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거능 측정 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. 0.75 mg/mL 농도에서 대조군 ascorbic acid는 99.9%로 동일농도에서 PJE는 99.0%의 소거능을 보였다.

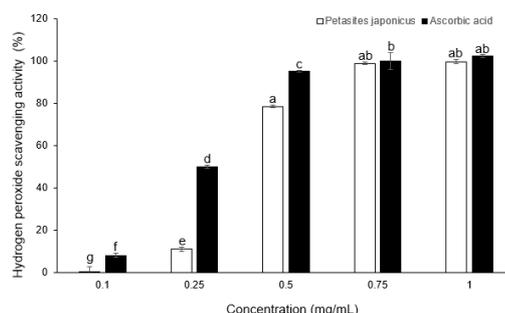


Fig. 3. Hydrogen peroxide scavenging activity of *Petasites japonicus* extracts, Ascorbic acid (Positive control), Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data. Values with different letters<sup>a,b,c,d</sup> are significantly different each other by ANOVA and Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. 세포 독성 측정

인간 각질형성세포주인 HaCaT 세포에 PJE를 0, 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml의 농도로 처리하고 24시간 경과 후 MTT assay를 이용하여 세포생존율을 확인하였으며 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 전 농도에서 95% 이상의 세포생존율을 보여 시료에 대한 독성을 나타내지 않았으며 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml의 농도에서 실험을 진행하였다.

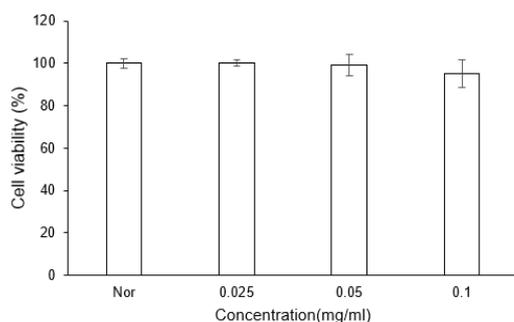


Fig. 4. Cell viability assay on human keratinocytes. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml. The data are representative of three experiments. Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. \* $p < 0.05$ , compared with absence of extract.

### 3.5. Filaggrin과 aquaporin-3 생성능 측정

표피 기저층의 각질형성세포 (keratinocyte)로부터 각질층 내 무핵의 평평한 각질세포가 되는 과정 사이에 filaggrin 단백질이 발현되며 이는 각질간 벽돌 구조를 만드는데 연결하는 접착제의 역

할을 하여 케라틴을 결합해 피부를 보호하고 항상성을 유지하는 피부장벽 기능에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[22, 23]. Profilaggrin은 filaggrin의 전구체로 각질유리과립 내에서 존재하는데 단백질분해효소와 탈인산화를 통해 filaggrin이 되며 최종적으로 천연함습인자 (natural moisturizing factor, NMF)로 피부 보습에 도움이 될 수 있다고 보고되고 있다[24]. 또한 각질세포막의 중요한 구성단백질인 loricrin과 involucrin을 결합하는 역할도 담당하여 피부장벽 유지에 중요하다고 알려져 있으며 filaggrin 유전자의 발현이 후천적 요인 또는 유전적 변이의 의해 감소하게 되면 피부에 염증과 피부 장벽에 이상이 나타날 수 있다고 보고되었다[9]. Aquaporin은 포유류의 표피에 keratinocyte 내에 발현이 되며 막 단백질로서 세포막에서 수분 운반 역할을 담당하여 각질층에서 NMF로 작용한다. 현재까지 사람에게서는 13개의 aquaporins (AQP 0~AQP 12)가 발견되었으며 피부 표피층에서 발견되는 aquaporin-3의 발현량이 감소되면 표피 수분이 줄어들어 노화가 가속된다고 알려져 있다[13][25]. Aquaporin-3이 knockout 된 마우스는 피부장벽에의 보습과 상처치유능 저하에 대한 문제가 나타나는 것으로 알려져 있어 피부 표피 정상 기능에 매우 중요한 인자로 알려져 있다[26]. Fig. 5에서 PJE를 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml 농도로 처리하였을 때, filaggrin의 생성량은 42.1%, 48.0%,

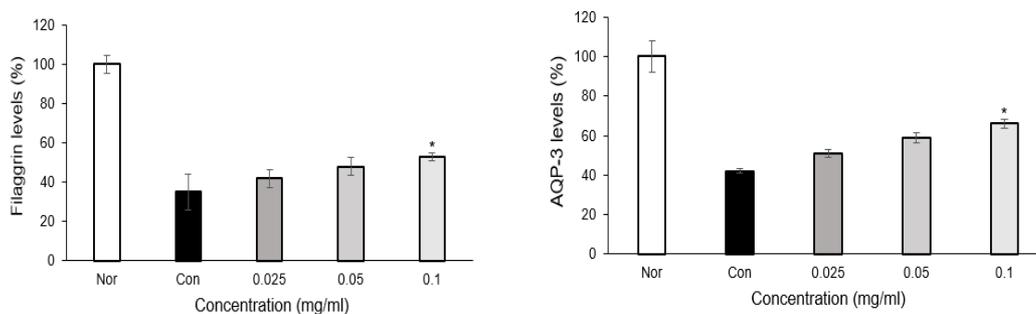


Fig. 5. Expression levels of filaggrin and aquaporin-3 on UVB-irradiated keratinocytes treated with PJE. The cells were treated for 24h with the indicated concentrations of extracts before treatment with UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) for 24 h. There sults were analyze dusing ELISA kits. Nor : Neither extract nor UVB treatment, Con : only UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>) treated. The data are representative of three experiments. Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. \* $p < 0.05$ , compared with absence of extract.

55.3%로 증가하였고 aquaporin-3의 생성량은 50.7%, 59.3%, 66.5%로 증가하여 농도의존적으로 증가를 보이는 것을 확인하였다.

### 3.6. Real-time PCR 측정

피부가 과도한 자외선의 자극을 받게 되면 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등과 같은 전염증성 사이토카인의 증가로 인해 피부의 밀착연접(tight junction)을 파괴하여 피부장벽을 손상시켜 피부 유수분 밸런스를 무너뜨리고 피부건조를 나타내게 된다[27-29]. HaCaT 세포에서 피부 보습과 염증 관련 유전자들에 미치는 영향을 알아보기 위해 PJE를 농도별로 처리하고 filaggrin, aquaporin-3, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  유전자의 mRNA 변화를 Real-time PCR을 이용하여 분석하였다. 그 결과 염증 관련 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 mRNA의 발현량은 control군인 UVB 자극에 의해 생성이 증가하였으며 PJE의 농도가 증가함에 따라 유의

미하게 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, filaggrin, aquaporin-3 유전자의 mRNA 발현량은 UVB자극에 의해 생성량이 감소되었으며 대비하여 PJE를 함께 처리하였을 때 유의미하게 증가됨을 확인할 수 있었다.

### 3.7. Migration assay

상처치유 단계 중 세포의 굽힘에 대한 세포 이동 및 증식은 상처 조직의 재생피화에 의해 피부장벽을 회복하고 유지하는 상처치유에 필수적인 과정으로 알려져 있다[25]. PJE의 세포 증식 및 이동 촉진을 관찰하기 위하여 HaCaT 세포에 스크래치로 상처를 내고 wound healing assay를 수행하였다. 24시간 뒤 머위 추출물 처리군이 noraml군과 비교하여 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml의 농도 수준에서 각 1.71배, 1.92배, 2.23배 세포이동을 촉진하여 피부 각질세포의 증식과 상처의 회복을 증가시켰음을 확인하였다.

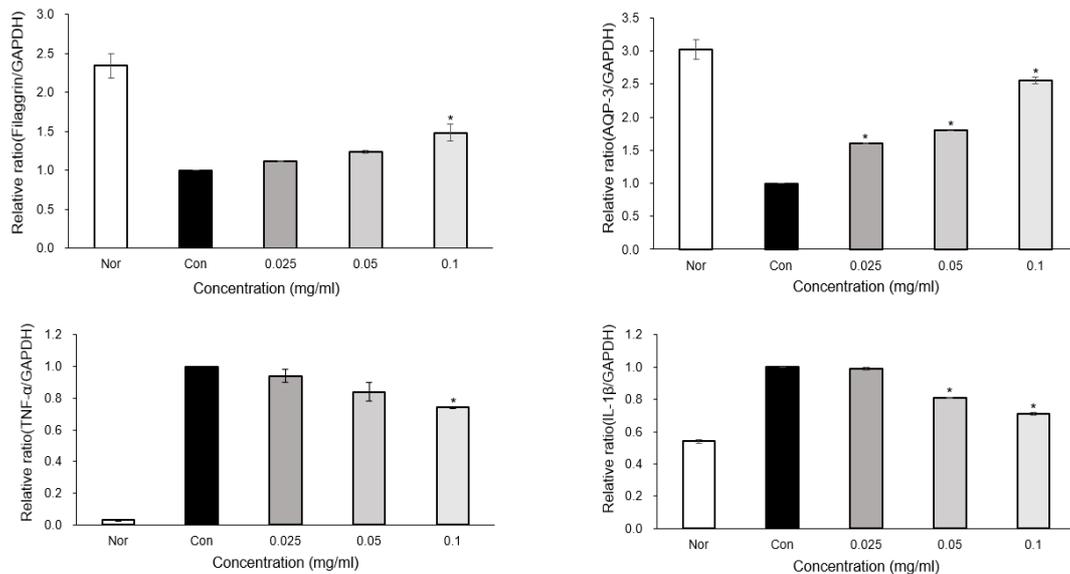


Fig. 6. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , filaggrin and aquaporin-3 mRNA expressions on UVB-irradiated human keratinocytes treated with PJE. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of extracts before treatment with UVB (50 mJ/cm<sup>2</sup>) for 24 h. These results were analyzed using ELISA kits. Nor : Neither extract nor UVB treatment, Con : only UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>) treated. The data are representative of three experiments. Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. The statistical analysis of the data was carried out by use of ANOVA test. \* $p$  < 0.05, compared with absence of extract.

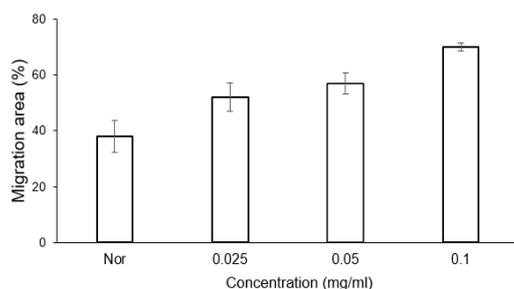


Fig. 7. Effects of a fermented PJE on migration of HaCaT cells. HaCaT cells were treated with PJE at indicated concentration for 24 h. Wound healing assay was performed as described in materials and methods. Phase contrast images were taken at 24 h after scratching to determine healed distance. Values represent mean  $\pm$  S.D. (n=3). \* $p < 0.05$ , compared with absence of extract.

#### 4. 결론

현대사회의 다양한 외부 자극은 피부장벽의 이상과 면역시스템의 기능 저하를 일으키고 피부의 건조와 염증을 유발하는 주요한 원인으로 작용하고 있다. 본 연구의 목적은 PJE이 Human Keratinocyte인 HaCaT cell에서 피부장벽, 피부보습 그리고 염증 완화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정, ABTS 라디칼 소거능 측정, hydrogen peroxide 소거능 측정을 진행한 결과 1 mg/ml 농도에서 대조군인 ascorbic acid와 유사한 소거능을 보여주었다. PJE의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 진행하여 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml 농도에서 세포독성이 없음을 확인하였다. HaCaT cell에 피부장벽과 피부보습 효과를 관찰하기 위해 UVB (50mJ/cm<sup>2</sup>)로 유도된 세포에서 filaggrin과 aquaporin-3의 mRNA 발현 정도를 확인한 결과 0.1 mg/ml 농도에서 대조군 대비 각각 1.48배, 2.55배 증가하여 피부장벽과 피부보습능에 긍정적인 효과를 확인하였다. 피부염증에 대한 피부장벽 보호능에 대한 효능을 알아보기 위해 관찰한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 발현량은 PJE 처리 시 농도

에 따라 mRNA 발현이 감소하는 것을 확인하여 자외선에 의한 피부염증의 완화는 피부장벽의 강화에 효능이 있음을 확인하였다. Migration assay에서 PJE 처리군이 noraml군과 비교하여 0.025, 0.05, 0.1 mg/ml의 농도 수준에서 각 1.71 배, 1.92 배, 2.23배 세포 이동을 촉진함을 확인하여 피부각질세포의 증식과 상처의 회복률을 증가시켰음을 알 수 있었다. 결론적으로 PJE은 UV에 의해 유도된 HaCaT cell에 따른 항염, 피부장벽 및 피부보습에 효과적인 역할을 하여 피부장벽과 항염증 소재로서 화장품에 이용 가능성이 있는 소재임을 확인할 수 있었다.

#### References

1. H. J. Kim, S. K. Jeong, "New trends in skin barrier research", *The Journal of Skin Barrier Research* Vol.14, No.1 pp. 15-28 (2012)
2. K. L. Kim, J. S. Kim, "The effect of sebum and moisture condition of skin on the facial pigmentation", *Kor J Aesthet Cosmetol* Vol.7, No.1 pp. 103-115 (2009)
3. J. L. Kim, H. J. Kim, "A study of control capacity structure of by the lipid state of stratum on the skin" *The Journal of the Convergence on Culture Technology* Vol.3, No.3 pp. 37-42 (2017)
4. J. S. Oh, H. H. Jang, "Epidermal Differentiation and Skin Barrier", *Asian J Beauty Cosmetol* Vol.13, No.6 pp. 713-720 (2015)
5. J. S. Oh, H. H. Jang, "Epidermal Differentiation and Skin Barrier", *Asian J Beauty Cosmetol* Vol.13, No.6 pp. 713-720 (2015)
6. H. J. Kim, K. H. Lee, J. U. Shin, "Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction", *Allergy Asthma & Respiratory Diseases* Vol.1, No.1 pp. 20-28 (2013)
7. L. C. Wood, P. M. Elias, C. Calhoun, J. C. Tsai, C. Grunfeld, K. R. Feingold, "Barrier disruption stimulates interleukin-1 $\alpha$  expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis" *Journal*

- of Investigative Dermatology* Vol.106, No.3 pp. 397-403 (1996)
8. H. J. Kim, "Effect of *Nepeta cataria* extract on the skin barrier function", *Korean J. Food Preserv.*, Vol.27, No.2 pp. 242-246 (2020)
  9. H. B. Kang, Y. S. Choi, J. A. Bak, Y. A. Jang, "Effect of *Lysimachia christinae* Hance extract on moisturizing function and protection of skin barrier", *The Korean Society of Culture and Convergence*, Vol.42, No.12 pp. 941-958 (2020)
  10. D. H. Youn, H. T. Shin, "The Anti-bacterial Effects and Epidermal Permeability Barrier Function of Red Onion Juice Produced in Jeon-Nam province in Korea", *Journal of Society of Preventive Korean Medicine*, Vol.15, No.1 pp 43-56 (2012)
  11. D. H. Kim, T. S. Park, J. H. Son, "Anti-inflammatory effects of the *Rubus occidentalis* seed extracts on UV-B induced inflammation in HaCat cells" *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol.59, No.3 pp. 247-253 (2016)
  12. B. A. Kim, "Cytoprotective Effect of *Petasites japonicus* Extract on Cadmium-induced Cytotoxicity in HaCaT Cell", *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, Vol.43, No.2 pp. 87-92 (2017)
  13. H. S. Choi, "Analyses of the Chemical Composition of *Petasites japonicus* (S. et Z.) Maxim Essential Oil and Comparison of the Major Compounds by Crop Year", *The Korean journal of food and nutrition*, Vol.30, No.1 pp. 156-165 (2017)
  14. M. Kikuchi, "Studies on the constituents of the flower stalk of *Petasites japonicus* Maxim. VII. on the components of the volatile oil", *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, Vol.93, No.1 pp. 123-126 (1973)
  15. M. Y. Kim, J. H. Lee, Y. Y. Hwang, K. S. Song, M. L. Jun, "Solation and Identification of Antioxidant Substances from the Stems of Butterbur (*Petasites japonicus*), *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*", Vol.37, No.8 pp. 979-984 (2008)
  16. Y. W. Choi, K. P. Lee, J. M. Kim, S. Kang, S. J. Park, J. M. Lee, H. R. Moon, J. H. Jung, Y. G. Lee, D. S. Im, "Petatewalide B, a novel compound from *Petasites japonicus* with anti-allergic activity", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.178, No.3 pp. 17-24 (2016)
  17. H. C. Kang, M. Y. Cha, J. Y. Kim, "A Study of the Antioxidant Activities and Whitening Activities of Areca semen Extracts as Cosmetic Ingredient", *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, Vol.41, No.3 pp. 269-277 (2015)
  18. S. H. Hyun, S. K. Jung, M. K. Jwa, C. K. Song, J. H. Kim, S. B. Lim, "Screening of Antioxidants and Cosmeceuticals from Natural Plant Resources in Jeju Island", *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol.39, No.2 pp. 200-208 (2007)
  19. S. J. Jeong, K. H. Kim, H. S. Yook, "Whitening and antioxidant activities of solvent extracts from hot-air dried *Allium hookeri*", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.44, No.6 pp.832-839 (2015)
  20. S. Y. Kim, M. J. Kim, K. J. Ahn, S. K. An, "Antioxidant Effects of Kinetin on HaCaT Human Keratinocytes Damaged by Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)", *Asian J Beauty Cosmeto.*, Vol.13, No.1 pp. 59-64 (2015)
  21. H. K. Lee, S. Y. Kwak, D. H. Choi, H. S. Choi, "A Study on the Antioxidant and Nitrite Scavenging Activities for Developing the Functional Tea using *Pleurotus eryngii* Mycelium", *The Journal of Tea Culture & Industry Studies*, Vol.55 pp. 75-96 (2022)
  22. H. Y. Yu, J. Y. In, V. R. Lincha, I. S. Park, D. U. Lee, H. M. Shin, "The Effects of the Fruits of *Foeniculum vulgare* on Skin Barrier Function and Hyaluronic Acid Production in HaCaT Keratinocytes",

- Journal of life science* Vol.25, No.8 pp. 880-888 (2015)
23. Y. Kim, K. M. Lim, "Skin barrier dysfunction and filaggrin", *Archives of pharmacol research*, Vol.44, No.1 pp. 36-48 (2021)
  24. S. G. Kim, J. G. Choi, Y. Y. Jang, "Emodin Studies on Anti-inflammatory and Skin Barrier Improvement Activities" *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.6 pp. 1383-1392 (2021)
  25. P. Zhao, B. D. Sui, N. Liu, Y. J. Lv, C. X. Zheng, Y. B. Lu, W. T. Huang, C. H. Zhou, J. Chen, D. L. Pang, "Anti-aging pharmacology in cutaneous wound healing: effects of metformin, resveratrol, and rapamycin by local application", *Aging cell*, Vol.16, No.5 pp.1083-1093 (2017)
  26. J. Kim, C. M. Lee, E. J. Hwang, C. S. Kim, S. Y. Moon, S. Y. Lee, "Study on the Moisturizing Effects of *Undaria pinnatifida* Extract", *Journal of Chitin and Chitosan* Vol.27, No.4 pp.223-230
  27. H. Y. Jeon, J. K. Kim, W. G. Kim, S. J. Lee, "Beneficial Effect of Curcumin on Epidermal Permeability Barrier Function in Hairless Rat", *Korea J. Food SCI. Technol.* Vol.40, No.6, pp. 686-690 (2008)
  28. S. H. Lee, D. J. Min, Y. J. Na, J. W. Shim, L. K. Kwon, J. C. Cho, H. K. Lee, "The Protective Effect of Mineral Water Against UVB Irradiation", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.39, No.1 pp. 39-46 (2013)
  29. I. A. Kim, Y. M. Kim, Y. W. Chin, S. Chae, "Protective effects of compounds from *Garcinia mangostana* L.(mangosteen) against UVB damage in HaCaT cells and hairless mice", *International journal of molecular medicine* 2017, *International journal of molecular medicine*, Vol.40, No.6 pp. 1941-1949 (2017)