

앵두 추출물의 세포 수준에서의 스트레스 호르몬 생성 억제를 통한 GABA 조절 및 Filaggrin 과 Claudin-1 의 활성 효과

최원영[†] · 박성민[†] · 김라혜 · 이형진 · 이정노 · 유화선^{††}

(주)코씨드바이오팜 피부사랑임상연구센터

(2024년 5월 24일 접수, 2024년 6월 26일 수정, 2024년 6월 27일 채택)

Effect of GABA Regulation and Activities of Filaggrin and Claudin-1 through Inhibiting Stress Hormone Production by *Prunus tomentosa* Extract *In Vitro*

Won Yeoung Choi[†], Sung Min Park[†], Ra Hye Kim, Hyoung Jin Lee, Jung No Lee, and Hwa Sun Ryu^{††}

SkinSaRang Clinical R&D Center, CoSeedBioPharm Corporation, 68, Osongsaengmyeong 2-ro,
Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, 28161, Korea
(Received May 24, 2024; Revised June 26, 2024; Accepted June 27, 2024)

요약: 본 연구에서는 천연물 6 종 앵두, 으름, 살구, 야콘, 금귤 및 핑거라임을 활용하여 스트레스 완화에 의한 수면 개선 및 피부장벽 개선 효과를 검증하였다. 실험 결과, 6 종의 천연물 중 앵두, 핑거라임, 으름 및 금귤이 유의적으로 스트레스 호르몬인 cortisol의 생성을 억제하였다. 또한, 수면 조절에 관여하는 GABA 생성 효소인 GAD67의 발현은 앵두 정제수 추출물 및 핑거라임 50% 에탄올 추출물에서 유의한 증가 효과를 보였으며 앵두 용매별 추출물은 총 폴리페놀의 함량이 가장 높게 확인되었다. 스크리닝 결과 활성이 가장 높은 앵두 추출물을 활용하여 후속 실험을 진행하였다. 앵두 용매별 추출물 중, 30% 에탄올 추출물이 가장 높은 DPPH radical 소거 활성을 보였으며, 정제수 추출물은 GABA 생성 및 피부 장벽 인자인 filaggrin과 claudin-1의 발현을 가장 높게 증가시켰다. HPLC 분석을 통해 앵두 추출물의 주성분으로 quercitrin이 확인되었고 추출 용매별 quercitrin 함량은 30% 에탄올 > 정제수 > 70% 에탄올 > 50% 에탄올의 추출 용매 순으로 높은 함량을 보였다. Quercitrin은 cortisol의 생성을 농도의존적으로 억제하였으며, cortisol에 의해 감소되었던 GAD67 발현 및 GABA 생성을 유의적으로 증가시켰다. 연구를 통해 앵두 추출물이 스트레스를 완화시켜 수면 개선 및 피부 장벽 강화에 도움을 주는 화장품 소재로서 활용이 가능함을 입증하였다.

Abstract: In this study, six types of natural products, *Prunus tomentosa* (*P. tomentosa*), *Akebia quinata* (*A. quinata*), *Prunus armeniaca* (*P. armeniaca*), *Smallanthus sonchifolius* (*S. sonchifolius*), *Citrus japonica* (*C. japonica*), and *Citrus australasica* (*C. australasica*), were used to verify the effect of improving sleep and skin barriers by stress relief. As a result of the experiment, the production of cortisol, a stress hormone, was significantly inhibited by the *P. tomentosa*, *C. australasica*, *A. quinata*, and *C. japonica* among the six natural products. In addition, the expression of GAD67, a GABA-producing enzyme involved in sleep regulation, showed a significant increase in *P. tomentosa* purified water extract and *C. australasica* 50% ethanol extract, and the extract by each *P. tomentosa* solvent was found to have the highest total polyphenol content. Based on the results, the *P. tomentosa* extract with the highest activity was finally selected, and subsequent experiments were conducted. Among each *P. tomentosa* solvent extract, the DPPH radical scavenging activity was the highest in the 30% ethanol extract, and purified water extract increased GABA production and skin barrier factors filaggrin and claudin-1

† 주 저자 (e-mail: rmd@coseed.co.kr)
call: 070-5003-2234

†† 교신저자 (e-mail: rmd@coseed.co.kr)
call: 070-5003-2221

expression the highest. HPLC analysis confirmed quercitrin as the main component of *P. tomentosa* extract, and quercitrin content by extraction solvent was high in the order of 30% ethanol > purified water > 70% ethanol > 50% ethanol. Quercitrin inhibited the production of cortisol in a concentration-dependent manner, significantly increasing GAD67 expression and GABA production, which had been reduced by cortisol. From the results of this study, it has been demonstrated that *P. tomentosa* can be used as a cosmetic material to help improve sleep and strengthen skin barriers by relieving stress.

Keywords: anti-stress, cortisol, sleep improvement, GABA, skin barrier

1. 서 론

피부는 우리 몸에서 가장 노출이 많이 되는 기관으로, 자외선, 온도 변화, 화학 물질 등의 다양한 외부적 환경에 영향을 받는다. 이 외에도 심리적 요인, 수면 부족, 부족한 영양 공급 등의 내부적 자극에 의해서도 영향을 받아 신체적 및 심리적 스트레스를 받게 된다[1]. 스트레스가 유도되면 시상하부-뇌하수체-부신 축(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)은 스트레스 상황에서 신속한 대응을 위해 코르티코트로핀 방출 호르몬(corticotropin releasing hormone, CRH), 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH), 당질 코르티코이드(glucocorticoids), 카테콜아민(catecholamines) 및 아드레날린(adrenaline), 노르에피네프린(norepinephrine)과 같은 스트레스 호르몬과 신경전달물질인 γ -aminobutyric acid (GABA), 사이토카인 등의 발현을 조절한다고 알려져 있다[2,3].

HPA axis는 스트레스로 인한 신경 내분비 자극으로 인해 CRH와 같은 신경펩타이드 수용체를 발현하여 신경 세포 뿐만 아니라 피부의 여러 세포에 영향을 주는 것으로 보고되어 있다[4]. CRH는 표피(epidermal), 모발 세포(follicular keratinocytes), 멜라닌 세포(melanocytes), 내피세포(endothelial cells), 피부 신경(dermal nerve) 및 피지선(sebaceous glands)에서 검출되며 스트레스에 대한 반응으로 염증을 유발하여 피부장벽을 손상시키거나, 피지선을 과도하게 자극하여 여드름과 같은 다양한 피부 질환을 유발할 수 있는 것으로 보고되었다[5].

또한, HPA axis 활성화에 의해 분비되는 글루코코르티코이드는 면역 조절, 성장, 발달, 대사 및 항상성 조절에 관여하고 있으며 대표적으로 코르티솔(cortisol)이라는 스트레스 호르몬이 있다. 코르티솔은 HPA axis와 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD)라는 효소의 활성화에 의해 생성이 조절된다[6]. 피부는 세포 내 비활성 코르티손(cortisone)이 11β -HSD type 1 (11β -HSD1)의 촉매 효소로 인해 활성형 cortisol로 전환되는 주요 부위이다. 코르티솔은 진피 섬유아세포(fibroblasts), 각질세포(keratinocytes), 멜라닌 세포, 모낭(hair follicles) 등의 피부세포에 존재하며, 섬유아세포의

증식 및 피부노화에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[4]. 또한, 심리적 스트레스로 인해 11β -HSD1이 활성화되어 코르티솔의 방출이 증가되고 이로 인해 피부 장벽의 기능이 약해짐이 보고되었다[7].

현대인의 고질병으로 관심이 높아지고 있는 급성 및 만성 스트레스는 지속적으로 노출되면 스트레스에 대응하기 위해 방출되는 호르몬의 불균형을 초래하고, 생리학적 효능에 부적절한 영향을 끼칠 수 있다[8]. 그 중, 억제성 신경전달물질로 작용하여 수면을 유도하는 GABA 수준(level)을 감소시켜[9,10] 불안장애, 우울증, 수면 장애 등을 포함하는 다양한 신경정신질환을 야기한다[11]. 중추신경계의 60 ~ 75%의 시냅스와 관련이 있는 GABA는 박테리아, 식물[12] 및 척추동물[13]에 존재하는 탄소 4 개를 갖는 비단백질 아미노산으로 glutamate decarboxylase (GAD)의 탈탄소화 반응으로 인해 glutamate에서 GABA로 전환되며[14], 신경 세포의 흥분을 억제하여 피로회복과 기억력 강화, 수면 조절에 중요한 역할을 한다[15,16]. 포유류에서 분자량에 따라 GAD65, GAD67 두 개의 동형으로 존재하며 GAD가 결핍될 경우 GABA의 생성이 감소되어 발작, 경련, 치매 등 신경성 질환을 유발한다고 보고되어 있다[17]. 또한, 스트레스와 수면의 관계에 보고된 결과에 따르면, 동물모델에서 스트레스 자극 후에 GABA_A 수용체의 변화가 발생하는 다양한 연구 결과가 발표되었으며[18], HPA 축 조절과 관련된 뇌 영역인 시상하부 등의 조절에 따라 GAD65 및 GAD67의 발현이 증가되는 다양한 연구가 보고되었다[19].

본 연구에서는 스트레스로 인해 유도되는 스트레스 호르몬인 cortisol의 증가로 인하여 야기되는 수면 장애 및 다양한 피부 문제를 해결하여 피부 건강을 회복시키기 위해 천연물을 활용한 화장품 소재로서의 개발 가능성을 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

본 실험에서 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Thermo Fisher Scientific (USA)에서 구입하였으며, folin & ciocalteu's phenol reagent (FCR), gallic acid, quercetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), dimethyl sulfoxide (DMSO), ascorbic acid 및 agarose는 Sigma-Aldrich (USA) 제품을 사용하였다. Phosphate buffered saline (PBS)는 Gibco (USA) 제품을 사용하였다. Sodium carbonate 및 aluminium chloride는 Deajung (Korea) 제품을 사용하였으며 96 well plate, 6 well plate 및 24 well plate는 SPL (Korea) 제품을 사용하였다. 흡광도 측정을 위해 ELISA plate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, UK)를 이용하였다.

2.2. 앵두 외 5종 추출물의 제조

본 실험에서 사용한 앵두(*Prunus tomentosa*, *P. tomentosa*)와 으름 덩굴 열매(*Akebia quinata*, *A. quinata*)는 동의한재 (Korea)에서 구매하였고, 앵두는 씨앗을 제거하고 말린 것을 사용하였다. 살구(*Prunus armeniaca*, *P. armeniaca*)는 말리 지오(Turkey)에서 건조된 것을 구매하였고 야콘(*Smallanthus sonchifolius*, *S. sonchifolius*)은 건조하여 분말 형태로 가공한 것을 가루랑(Korea)에서 구매하였다. 금귤(*Citrus japonica*, *C. japonica*)은 백미양식(Korea)에서 신선한 상태의 과실을 구매하였고, 핑거라임(*Citrus australasica*, *C. australasica*)은 팜이즈(Korea)에서 냉동상태의 과실을 구매하였으며, 두 과실 모두 건조하여 사용하였다. 핑거라임은 10 g, 살구 외 4종의 원물들은 20 g에 각각 정제수, 30%, 50% 및 70% (w/w) 에탄올(Daejung, Korea)을 원물 중량의 10 배를 혼합하여 추출하였다. 정제수 추출은 100 °C, 에탄올 추출은 온도별 90 °C에서 2 h 동안 환류 추출한 후 Whatman No. 2 (Watman, UK)로 여과하였다. 여과액은 감압 농축하여 사용하였다.

2.3. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 측정은 FCR이 시료의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 청색으로 발색하는 원리를 이용한 Folin-Denis 방법[20]을 이용하여 측정하였다. 1 mg/mL의 농도로 정제수에 용해 시킨 시료액 20 μ L와 FCR 20 μ L를 첨가하여 5 min 동안 상온 및 암 조건에서 반응시켰다. 20% sodium carbonate (Na₂CO₃) 용액 100 μ L와 정제수 60 μ L를 가하여 상온에서 30 min 동안 반응 시킨 후 ELISA plate reader를 이용하여 730 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용하여 표준곡선을 작성하고, 얻어진 검량곡선으로부터 시료 중 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

2.4. 총 플라보노이드 함량 측정

시료를 1 mg/mL의 농도로 정제수에 용해 시킨 후, 시료액을 20 μ L 및 2% aluminium chloride 100 μ L를 가하고, 200 μ L를 맞추기 위하여 에탄올 80 μ L를 첨가한 후 상온에서 5 min 동안 반응하였다. 반응한 혼합액은 ELISA plate reader를 이용하여 430 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin 용액을 이용하여 작성된 검량곡선으로부터 시료 중 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

2.5. DPPH Radical 소거 활성 측정

96 well plate에 양성대조군인 ascorbic acid와 농도별 시료를 20 μ L씩 각각 넣고 실험군에는 DPPH, 대조군에는 메탄올 180 μ L를 첨가 하여 20 min 동안 반응 시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거 활성(%)을 구하였다.

2.6. 세포 배양

쥐 신경교종세포(C6)와 인간 각질형성세포(HaCaT)는 각각 American Type Cell Culture (USA)와 AddexBio (USA)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. C6와 HaCaT 세포는 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 10% (v/v) fetal bovine serum (Coming, USA), 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Gibco, USA)이 함유된 Dulbecco's modified eagle medium (Gibco, USA)을 사용하여 2 ~ 3 일 간격으로 계대 배양하였다.

2.7. 세포 독성 평가

96 well plate에 C6와 HaCaT 세포 각각을 1 \times 10⁵ cells/mL의 농도로 well에 동일하게 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 배양된 세포에 시료를 농도 별로 희석 후 처리하여 24 h 반응 시킨 뒤, MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 2 ~ 3 h 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 뒤, DMSO 100 μ L를 분주하여 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(%)은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

2.8. Cortisol 생성량 평가

HaCaT 세포를 12 well plate에 5 \times 10⁴ cells/well의 농도로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 FBS가 없는 DMEM 배지로 변경하고 cortisol과 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 반응시켰다. 배양 후, 세포내 용해물을 수집하고 cortisol ELISA Kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 cortisol 함량을 측정하였다.

2.9. GABA 생성량 평가

C6 세포를 12 well plate에 5×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 하루 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 FBS가 없는 DMEM 배지로 변경하고, cortisol과 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 반응시켰다. 배양 후, 상층액을 수집하고 GABA ELISA Kit (LS-Bio, USA)를 사용하여 GABA 함량을 측정하였다.

2.10. Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석을 통한 유전자 발현 평가

6 well plate에 4×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 하루 동안 배양한 후, cortisol과 시료를 농도별로 처리하여 6 h 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 세포를 scraper를 이용하여 수집하고 PBS 용액으로 한번 세척한 후, Trizol (Invitrogen, USA) 시약을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. Nanodrop (Epoch2 NSC-SN, BioTek, USA)을 이용하여 RNA를 정량하고 filaggrin 및 claudin-1 primer를 이용하여 PCR (ABS-4375786, Applied Biosystems, USA)을 수행한 후 2% agarose gel에서 전기영동 하여 밴드를 검출하였다. 밴드는 Enhanced chemiluminescence (WSE-6100 LuminoGraph, Atto, JPN)/UV transilluminator (WUV-M20, Atto, JPN)를 사용하여 밴드를 관찰하고 ImageJ 1.47 software를 이용하여 밴드를 수치화하였다. 실험에 사용된 Primer sequences는 Table 1에 나타내었다.

2.11. HPLC 분석을 통한 Quercitrin 함량 분석

정제수, 30%, 50% 및 70% 에탄올을 이용하여 각각 추

출한 앵두 농축물을 정제수에 녹인 후, syringe filter (HM 0.45 μm)를 사용하여 여과시키고 이 여과액을 HPLC 분석을 위한 시료로 이용하였다(Figure 1). HPLC 분석은 등용매 용리법으로 분석하였으며, 분석조건은 다음 Table 2과 같다.

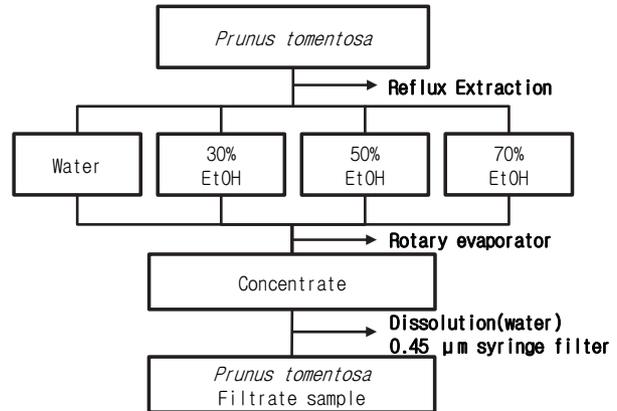


Figure 1. The flowchart of *Prunus tomentosa* extracts (PTE).

Table 2. HPLC Analysis Conditions

Instrument	Waters e2695 Separations Module	Injection volume	10 μL
Column size	C ₁₈ column (250 × 4.6 mm, 5 μm)	Flow rate	1.0 mL/min
Column temperature	40 °C	Wavelength	254 nm
Detector	2998 Photodiode array (PDA) detector		
Mobile phase conditions for isocratic-elution			
Mobile phase	Acetonitrile 20%	0.1% Formic acid in water 80%	

Table 1. Polymerase Chain Reaction (PCR) Primer Sequences

Species	Gene	Primer	Sequences (5'-3')	Genebank accession no.
Rat	GAD67	Forward	GCTGGCTGAATACCTCTATG	XM_032903463.1
		Reverse	CCCAACCTCTCTATTTCCCTC	
	β-actin	Forward	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	NM_007393.5
		Reverse	TAAACCGCAGCTCAGTAACAGTCCG	
Human	Filaggrin	Forward	TGAGGCATACCCAGAGGACT	NM_002016.2
		Reverse	CACTTCCGTGCTGAGAGTGT	
	Claudin-1	Forward	CTTCATTCTCGCCTTCCT	NM_021101.5
		Reverse	AAGATGAGGATGGCTGTCA	
	GAPDH	Forward	TCCATGACAACCTTTGGTATC	NM_001289745.2
		Reverse	TGTAGCCAAATTCGTTGTCA	

2.12. 통계 분석

본 연구의 실험은 3 회 반복하여 수행하였으며, 실험 결과는 mean ± SD로 나타내었다. 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 분석하였으며, 유의성 수준은 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 을 기준으로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 앵두 외 5 종 추출물의 용매별 수율

앵두, 금귤, 핑거라임, 으름, 야콘 및 살구를 각각 정제수, 30%, 50% 및 70% (w/w) 에탄올로 추출하여 계산한 추출 수율은 Table 3과 같다. 금귤의 경우 정제수 추출물에서 75%라는 높은 수율을 보였으나 에탄올 함량이 적어짐에 따라 수율이 크게 감소하였다. 그러나 금귤을 제외한 앵두 외 4 종은 모든 용매에 대해 상대적으로 일관된 수율을 유지하였다.

3.2. 앵두 외 5 종 추출물 세포 독성 평가

본 실험에 들어가기 전, C6 세포와 HaCaT 세포에서 앵두, 살구, 야콘, 핑거라임, 으름 및 금귤 6 가지 천연물에 대한 세포 독성을 확인하였다. 각각의 천연물들은 용매별로 최종 처리농도가 0.3, 1, 3, 10, 30 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 희석하여 처리하고 24 h 반응 시킨 후, MTT 용액(5 mg/mL)을 이용하여 세포 독성을 평가하였다. 후속 실험은 추출물마다 90% 이상의 생존율이 확인된 농도를 선택하여 진행하였다(Figure 2, 3).

3.3. 앵두 외 5 종 추출물의 스트레스 완화 효과

3.3.1. Cortisol 생성 억제 효과

Cortisol은 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor)에 결합하는 스테로이드 계열 호르몬으로, 거의 모든 척추동물에 존재한다[21]. 스트레스를 유발하는 상황에 대응하여 부신피질에서 생성되며, 스트레스를 측정하는 대표적인 지표로서 사용 되고 있다[22]. 본 실험에서는 앵두, 살구, 야콘, 핑거라임, 으름 및 금귤 6 가지 천연물을 선택하여 스트레스 호르몬인 cortisol의 생성에 대한 영향을 확인하여 항 스트레스 효능을 평가하였다. 그 결과, cortisone에 의해

Table 3. Comparison of the Extraction Yield of Each Solvent

Sample name	Sample amount (g)	Extraction yield (g)			
		Extraction solvent			
		DW	30% EtOH	50% EtOH	70% EtOH
<i>Prunus tomentosa</i>	20	10.97 (54.8%)	10.95 (59.7%)	11.18 (55.9%)	11.46 (55.7%)
<i>Citrus japonica</i>	20	15.01 (75.0%)	5.34 (26.7%)	7.27 (36.3%)	8.57 (42.8%)
<i>Citrus australasica</i>	10	3.45 (34.5%)	2.95 (29.5%)	3.36 (33.6%)	3.09 (30.9%)
<i>Akebia quinata</i>	20	2.49 (12.4%)	2.73 (13.6%)	3.45 (17.3%)	2.21 (11.1%)
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	20	10.39 (51.9%)	11.24 (56.2%)	11.75 (58.7%)	11.56 (57.8%)
<i>Prunus armeniaca</i>	20	11.01 (55.1%)	11.85 (59.3%)	10.74 (53.7%)	10.15 (50.8%)

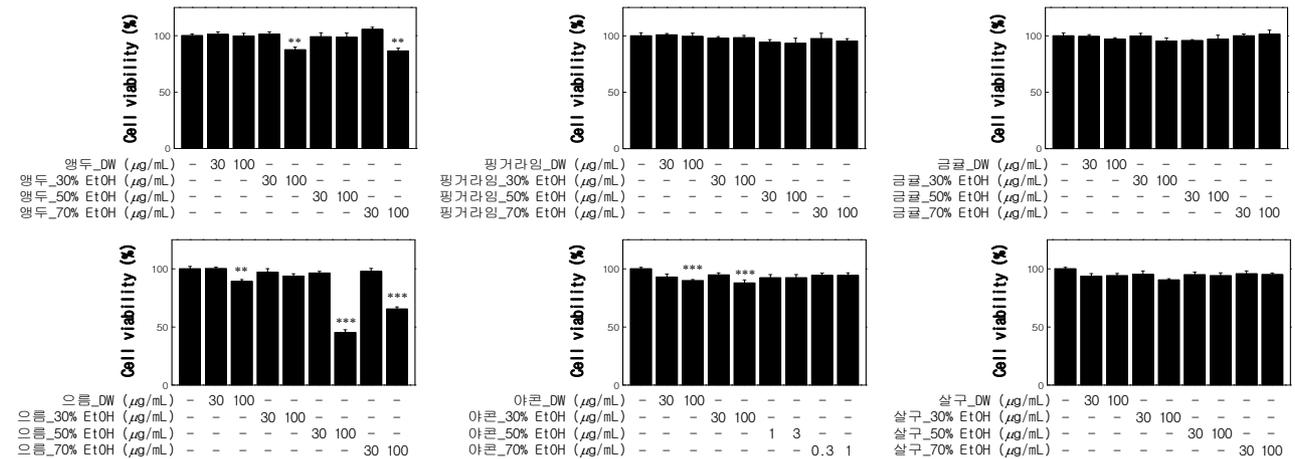


Figure 2. Effect of extracts on cell viability in C6 cells. Cells were treated with extract for 24 h. All data are the mean ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ represent significant difference compared to control.

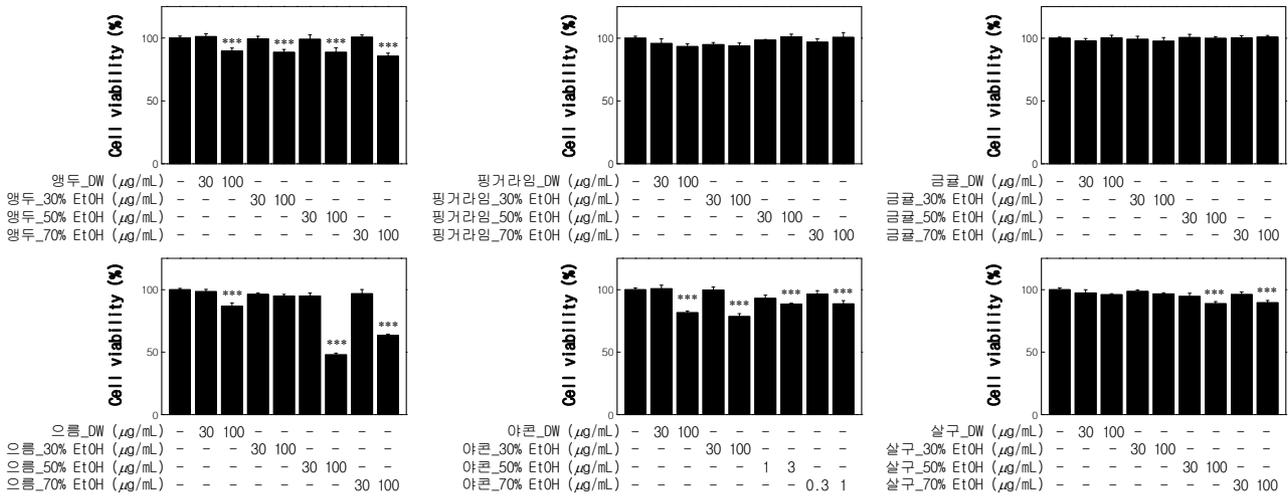


Figure 3. Effect of extracts on cell viability in HaCaT cells. Cells were treated with extract for 24 h. All data are the mean ± SD of three independent experiments. *** $p < 0.001$ represent significant difference compared to control.

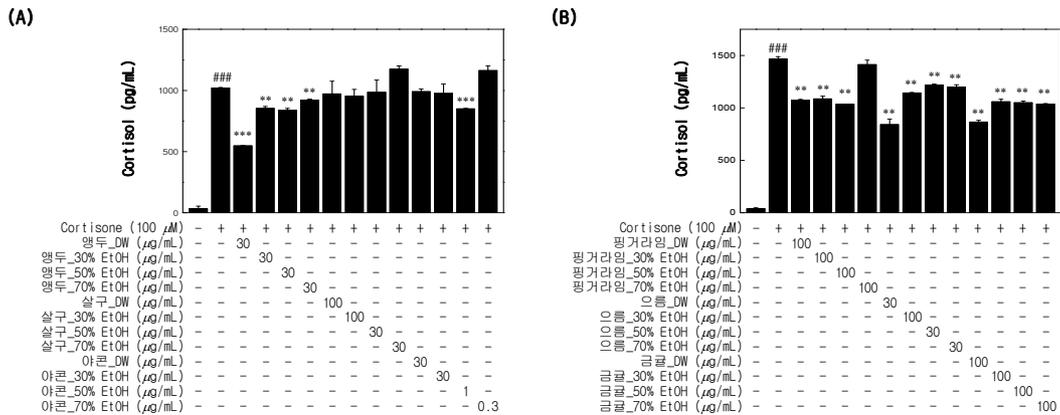


Figure 4. Effect of extracts on cortisol production. HaCaT cells were treated with cortisone (100 µM) followed by treatment various concentrations with extracts for 24 h. Amount of cortisol was measured by ELISA kit (A, B). All data are the mean ± SD of three independent experiments. ### $p < 0.001$ represent significant difference compared to control and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to cortisone treated group.

세포 내 cortisol 생성이 유의적으로 증가됨을 확인하였으며, 추출 용매 4 종 중에서는 정제수 추출에서 더 높은 cortisol의 생성 억제율을 보였다. 또한, 후보 천연물 6 종 중에서 앵두, 핑거라임, 으름 및 금굴 정제수 추출물에서 cortisol의 생성이 크게 감소하였다. 4 종 정제수 추출물의 cortisol 생성 억제율(%)을 동일 농도에서 비교한 결과, 앵두 및 으름 정제수 추출물의 경우 30 µg/mL 농도에서 앵두(47.9%) > 으름(43.9%)의 억제율을 나타내었으며, 핑거라임 및 금굴 정제수 추출물의 경우 100 µg/mL 농도에서 금굴(42.0%) > 핑거라임(27.5%)의 억제율을 보였다(Figure 4A,B).

3.3.2. GAD67 발현 억제 효과

스트레스에 과도하게 노출될 경우 HPA 축이 활성화되어 ACTH, CRH, 카테콜아민 및 코르티솔의 생성이 증가되고 억제성 신경전달물질인 GABA의 생성이 억제된다[23]. GABA는 수면에 영향을 미치는 가장 중요한 인자로서 수면 건강 기능을 확인하는 바이오마커로 알려져 있다. GABA의 합성은 L-glutamic acid로부터 GAD의 탈탄소화 반응에 의해 조절되며[14], 스트레스 및 다양한 외부 원인에 의해 GABA 생성이 부족할 경우 불안장애, 우울감 및 수면 장애 등의 신경성 질환을 유발할 수 있다[11]. 따라

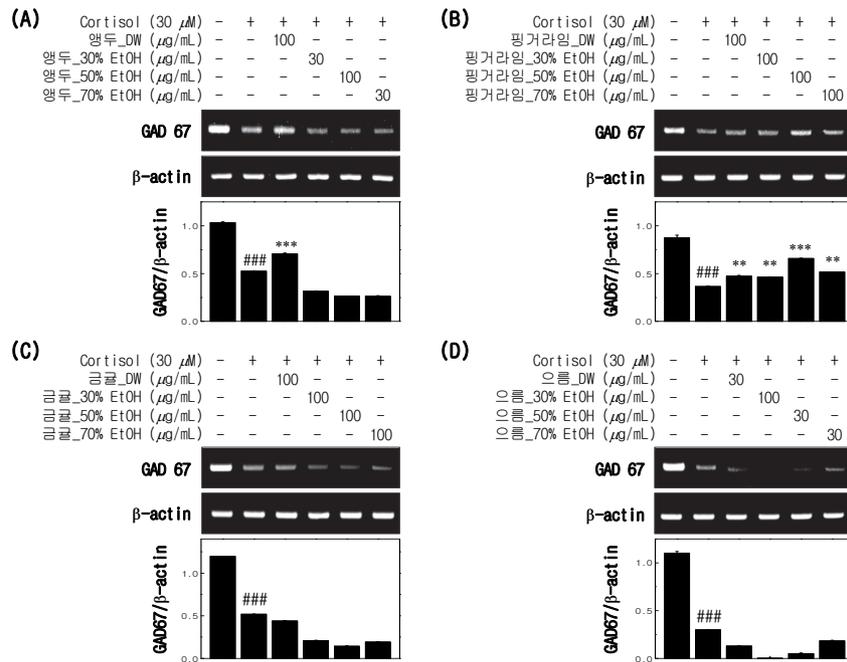


Figure 5. Effect extracts on GAD67 expression. C6 cells were treated with cortisol (30 μ M) followed by treatment various concentrations with extracts for 6 h. mRNA level of GAD67 was examined using RT-PCR. Band intensities relative expression levels were calculated using the ImageJ 1.47 software. All data are the mean \pm SD of three independent experiments. ### p < 0.001 represent significant difference compared to control and ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared to cortisol treated group.

서, GABA의 생성에 관여하는 GAD의 발현에 미치는 영향을 확인하여 수면 개선 효능을 평가하였다. Cortisol의 생성 억제 효과가 있는 앵두, 핑거라임, 금귤 및 으름 4 종에 대하여 GAD 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, 스트레스 호르몬인 cortisol에 의해 GAD67의 mRNA 발현이 유의적으로 감소됨이 확인되었고, 앵두의 3 종의 천연물 중, cortisol에 의해 감소된 GAD67의 mRNA 발현이 핑거라임 및 앵두 추출물에서 유의적인 회복 효과를 나타내었다. 각 추출물 100 μ g/mL의 농도에서 GAD67의 발현 회복율(%)을 비교한 결과, 핑거라임 50% 에탄올(57.5%) > 앵두 정제수(35.7%) > 핑거라임 70% 에탄올(29.6%) > 핑거라임 정제수(21.3%) > 핑거라임 30% 에탄올(19.2%) 순으로 확인되었다(Figure 5).

3.3.3. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석

내·외부의 다양한 자극에 의한 스트레스 반응으로 cortisol의 분비가 증가하면 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성이 촉진되어 산화스트레스와 염증반응으로 인한 세포 노화가 유도된다[24]. 또한 내부적으로 수면이 부족할 경우 체내의 축적된 활성산소를 제거하지 못하여 생리

Table 4. Total Polyphenol Contents of the Extraction Concentrate by Solvent

Sample name	Extraction solvent	Concentration of standard sample (mg/mL)	Total phenolic content (gallic acid, mg)
<i>Prunus tomentosa</i>	DW	0.100	109.7 (0.59%)
	30% EtOH	0.180	197.1 (0.98%)
	50% EtOH	0.160	178.8 (0.89%)
	70% EtOH	0.160	183.3 (0.92%)
<i>Citrus japonica</i>	DW	0.020	30.0 (0.15%)
	30% EtOH	0.050	26.7 (0.13%)
	50% EtOH	0.060	43.6 (0.22%)
	70% EtOH	0.060	51.4 (0.25%)
<i>Citrus australasica</i>	DW	0.130	44.8 (0.45%)
	30% EtOH	0.080	23.6 (0.24%)
	50% EtOH	0.140	47.0 (0.47%)
<i>Akebia quinata</i>	70% EtOH	0.120	37.1 (0.37%)
	DW	0.030	7.5 (0.04%)
	30% EtOH	0.060	16.4 (0.08%)
<i>Akebia quinata</i>	50% EtOH	0.070	24.2 (0.12%)
	70% EtOH	0.070	15.5 (0.08%)

Table 5. Total Flavonoid Contents of the Extraction Concentrate by Solvent

Sample name	Extraction solvent	Concentration of standard sample (mg/mL)	Total flavonoid content (quercetin, mg)
<i>Prunus tomentosa</i>	DW	0.030	3.3 (0.02%)
	30% EtOH	-	-
	50% EtOH	-	-
	70% EtOH	-	-
<i>Citrus japonica</i>	DW	0.010	1.5 (0.01%)
	30% EtOH	-	-
	50% EtOH	0.030	2.2 (0.01%)
	70% EtOH	0.020	1.7 (0.01%)
<i>Citrus australasica</i>	DW	0.100	3.5 (0.03%)
	30% EtOH	0.330	9.7 (0.10%)
	50% EtOH	0.130	4.4 (0.04%)
	70% EtOH	0.210	6.5 (0.06%)
<i>Akebia quinata</i>	DW	0.090	2.2 (0.01%)
	30% EtOH	-	-
	50% EtOH	0.160	5.5 (0.03%)
	70% EtOH	0.100	2.2 (0.01%)

학적 및 신체적으로 다양한 세포의 기능 이상으로 이어진다[25]. 토코페롤, 카로티노이드, 플라보노이드 그리고 폴리페놀화합물 등은 자연에 널리 분포한 천연 항산화 인자로 알려져 있다. 이들 중에서, 항산화력을 광범위하게 결정하는데 있어서 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 매우 중요하다[26,27]. 페놀성 화합물(phenolic compounds)은 phenolic hydroxy기를 갖는 2 차 대사산물로서 식물체에 널리 분포되어 있으며, 다양한 분자량과 구조를 가진다[28]. 앵두, 금귤, 핑거라임 및 으름의 각 추출 용매별 총 폴리페놀 함량은 앵두 용매 추출물 4 중에서 가장 높은 폴리페놀의 함량이 확인되었다. 앵두의 경우 30% 에탄올(197.1 mg) > 70% 에탄올(183.3 mg) > 50% 에탄올(178.8 mg) > 정제수(109.7 mg) 추출물 순으로 총 폴리페놀 함량이 높게 나타내었다. 그 외 3종 천연물 중에는 금귤 70% 에탄올 추출물이 51.4 mg의 총 폴리페놀 함량이 확인되었다(Table 4). 또한, 앵두, 금귤, 핑거라임 및 으름의 각 추출 용매별 총 플라보노이드 함량을 확인하였을 때, 4종 천연물 모두 총 플라보노이드 함량이 10.0 mg 이하의 값을 나타내었다 (Table 5).

3.4. 앵두 추출물의 DPPH Radical 소거 활성

천연물의 자유 라디칼 소거 활성 효과를 비교하기 위하여 DPPH assay를 통해 확인하였다. DPPH는 화학적으로

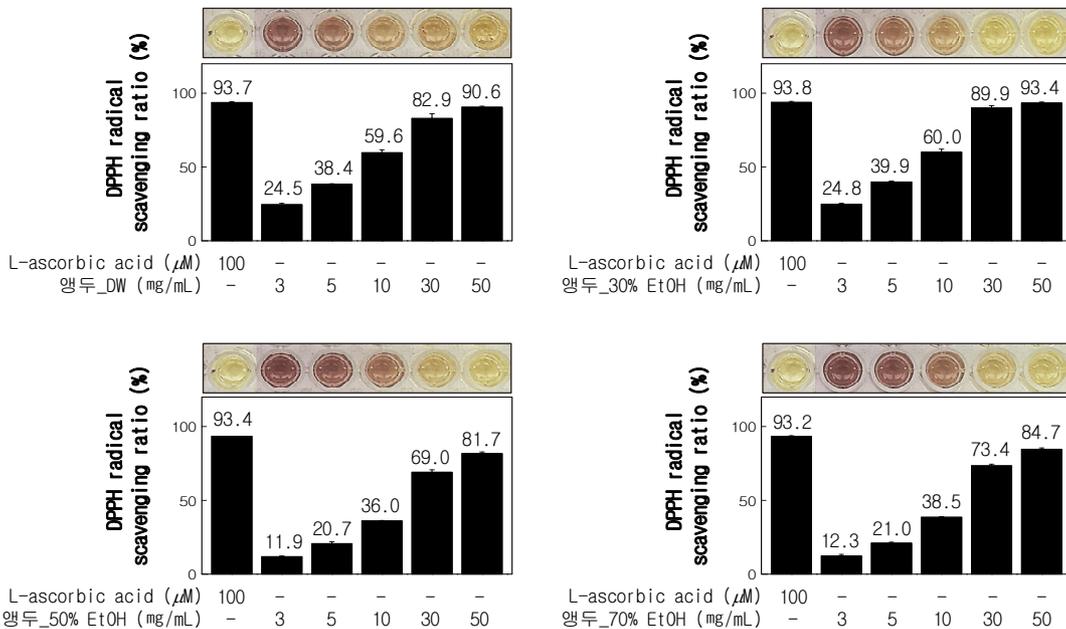


Figure 6. DPPH radical scavenging activity of *Prunus tomentosa* extracts (PTE).

안정화된 자유 라디칼을 가지는 물질로, 짙은 보라색을 띠며, 항산화력이 높은 물질에 의해 환원되어 옅은 노란색으로 탈색된다[29]. 앵두, 금귤, 핑거라임 및 으름 4 종의 천연물 중에서 cortisol 생성 억제 및 GAD67 발현 증가 효과가 높은 앵두를 최종 항 스트레스 개선 연구 천연물로 선정하였다. 용매별 앵두 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 평가한 결과, 앵두 용매별 추출물 4 종 모두 30 mg/mL 이상의 농도에서 50% 이상 높은 라디칼 소거 활성을 보였으며, 정제수 추출물과 30% 에탄올 추출물 100 mg/mL 농도에서는 양성대조군인 ascorbic acid와 비슷한 수준의 높은 항산화 효과를 나타내었다(Figure 6).

3.5. 앵두 추출물 4 종의 GABA 생성 촉진 효과

체내의 GABA 수치가 수면의 질과 깊은 연관이 있다는 것은 여러 연구에 의해 밝혀졌다[30]. 수면은 신경 세포의 전하 수치에 의해 조절되는데, 세포가 쉬는 동안은 -70 mv의 음전하를 띄고, 신경 세포 역치값(threshold, -55 mv)의 자극을 받아 신경이 흥분되어 -55 mv에 도달하면 각성 상태에 빠져 깊은 수면에 들기 힘들어진다. GABA는 GABA receptor에 의해 유도된 이온통로에 작용하여 염소이온(Cl⁻)과 같은 음전하의 유입을 증가시켜 신경 억제를 통해 수면을 유도한다[31]. 앵두 용매별 추출물 4 종에 대하여 GABA 생성량에 미치는 영향을 확인하였다. Cortisol에 의해 유의적으로 GABA 생성량이 감소되었으며 추출 용매 4 종 중에서는

정제수 및 50% 에탄올의 경우 100 ug/ml, 30% 에탄올 및 70% 에탄올의 경우에는 30 ug/ml의 농도에서 유의적인 회복 효과를 보였다. 용매별 앵두 추출물 4 종의 GABA 생성 억제율(%)을 동일 농도별로 비교하였을 때, 정제수 및 50% 에탄올 추출물의 경우 100 μg/mL 농도에서 정제수(>100.0%) > 50% 에탄올(64.8%)의 억제율을 보였으며, 30% 및 70% 에탄올 추출물의 경우 30 μg/mL 농도에서 70% 에탄올(55.2%) > 30% 에탄올(50.1%) 순으로 높은 GABA의 발현 회복 효과를 나타내었다(Figure 7). GABA 생성 및 GABA 생성 효소인 GAD67 발현(Figure 5A)에 대한 실험 결과를 바탕으로 추출 용매 4 종 중에서 정제수 추출물이 가장 높은 활성을 나타낼 것으로 판단하였다. 또한, 이러한 결과는 앵두 추출물이 GAD67의 유전자 발현을 증가시켜 GABA 생성을 촉진함으로써 수면을 개선하는 효능이 있음을 시사한다.

3.6. 앵두 추출물 4 종의 피부 장벽 보호 효과

피부는 자외선, 미생물 및 유해 화학물질 등의 외부 자극으로부터 내부 조직을 보호하는 1 차 방어 장벽 역할을 한다[32]. 만성적인 스트레스는 피부에서 스트레스 축인 HPA 축을 통해 많은 양의 cortisol을 지속적으로 방출하며 [33], 이로 인해 피부의 지질막이 비정상적으로 기능하여 경피의 수분 손실을 유발하고, 세포 재생이 느려지며, 활성산소의 과한 축적과 박테리아 침투 등으로 피부 장벽 기능이 붕괴된다[34]. 피부의 최외각인 각질층은 각질세포와 각질세포간 지질 등으로 이루어져 있으며 그 중, filaggrin은 각질세포 외막과 케라틴 섬유를 연결하는 단백질로 피부 장벽 구조 내 물리적인 장벽으로서 중추적인 역할을 한다[35,36]. 또한, 치밀이음(tight junction)의 주요 세포와 세포 사이를 연결하는 밀착연접 단백질인 claudin-1은 세포투과 장벽 기능 및 피부 장벽 유지하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[36,37]. 따라서 피부 장벽 관련 인자인 filaggrin 및 claudin-1의 발현 변화를 통해 앵두 추출물 4 종의 피부 장벽 보호 효과를 평가하였다. 스트레스 호르몬인 cortisone 처리에 의해 filaggrin 및 claudin-1의 유전자 발현이 유의적으로 감소되었으며, 앵두 추출물 4 종은 cortisone 처리에 의해 감소된 filaggrin과 claudin-1의 mRNA 발현을 유의하게 증가시켰다. 피부 각질층의 물리적 장벽 기능을 하는 filaggrin의 경우, 30% 에탄올, 정제수(57.0%) > 50% 에탄올(42.3%) > 70% 에탄올(41.9%)의 순으로 4 종의 추출 용매 모두 filaggrin의 발현 회복 효과를 보였다. 그러나 표피층에 존재하는 tight junction 단백질인 claudin-1의 발현에

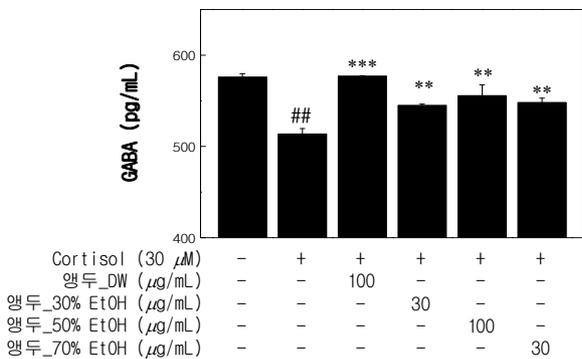


Figure 7. Effect of *Prunus tomentosa* extracts (PTE) on GABA production. C6 cells were treated with cortisol (30 μM) followed by treatment various concentrations with PTE for 24 h. Amount of GABA was measured by ELISA kit. All data are the mean ± SD of three independent experiments. ##*p* < 0.01 represent significant difference compared to control and ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 compared to cortisol treated group.

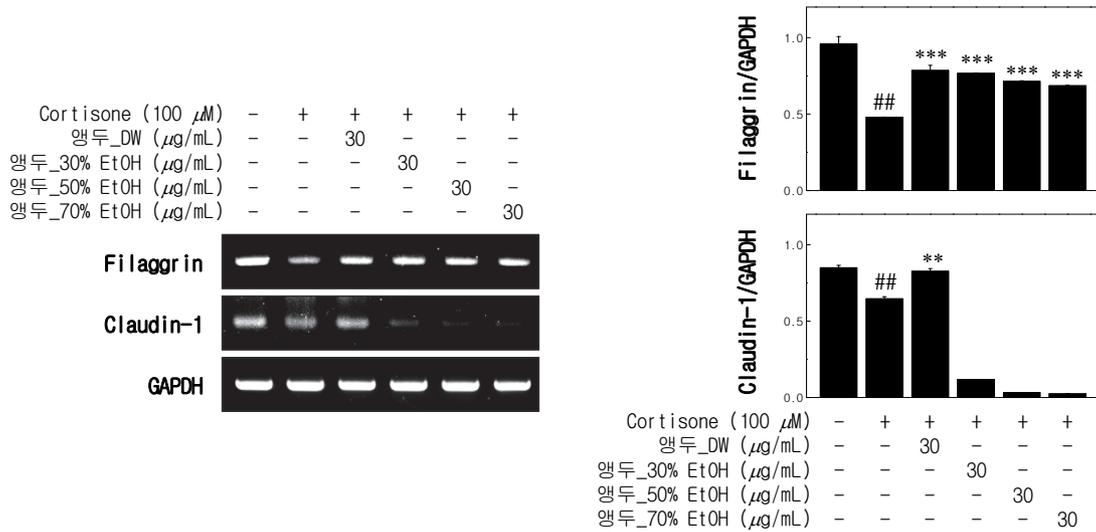


Figure 8. Effect *Prunus tomentosa* extracts (PTE) on skin barrier. HaCaT cells were treated with cortisone (100 μ M) followed by treatment various concentrations with PTE for 6 h. mRNA level of Filaggrin and Claudin-1 were examined using RT-PCR. Band intensities relative expression levels were calculated using the ImageJ 1.47 software. All data are the mean \pm SD of three independent experiments. ## $p < 0.01$ represent significant difference compared to control and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to cortisone-treated group.

는 앵두 정제수 추출물만 88.4% 유의적인 발현 회복 효과를 나타내었다(Figure 8).

3.7. 앵두 추출물 4 종의 HPLC 분석을 통한 유효 성분 확인

앵두는 주요 성분으로 대부분 당질과 유기산 등으로 이루어져 있으나 quercitrin, tannic acid, catechin과 같은 플라보노이드류를 함유하고 있다고 보고되어 있다[38]. 용매별 앵두 추출물 4 종에 대하여 HPLC 분석을 통해 유효성분을 분석하였다. 문헌자료를 바탕으로 quercitrin 표준 물질과 비교하였을 때, peak retention time이 일치함을 확인하였

고 이를 통해 미지의 peak가 quercitrin으로 확인되었다(Figure 9).

Quercitrin의 함량은 표준물질을 이용하여 얻어진 검량곡선을 이용하여 구하였고, 그 결과는 Table 6에 나타내었다. 앵두 추출물 4 종 중 quercitrin의 함량은 30% 에탄올 추출

Table 6. Comparison of Quercitrin Content of Extraction Concentrates by Solvent in *Prunus tomentosa* Extracts

Extraction solvent	DW	30% EtOH	50% EtOH	70% EtOH
Contents (ppm)	294.6	318.5	220.0	244.7

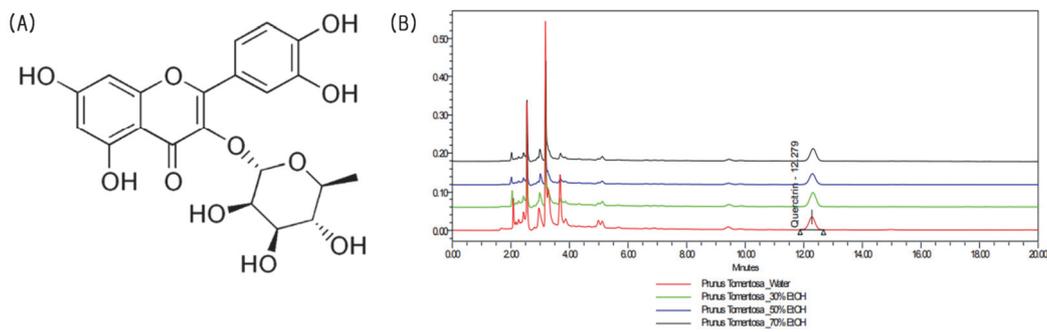


Figure 9. HPLC chromatogram data of quercitrin in *Prunus tomentosa* extracts (PTE). (A) chemical structure of quercitrin. (B) HPLC chromatogram of quercitrin and PTE.

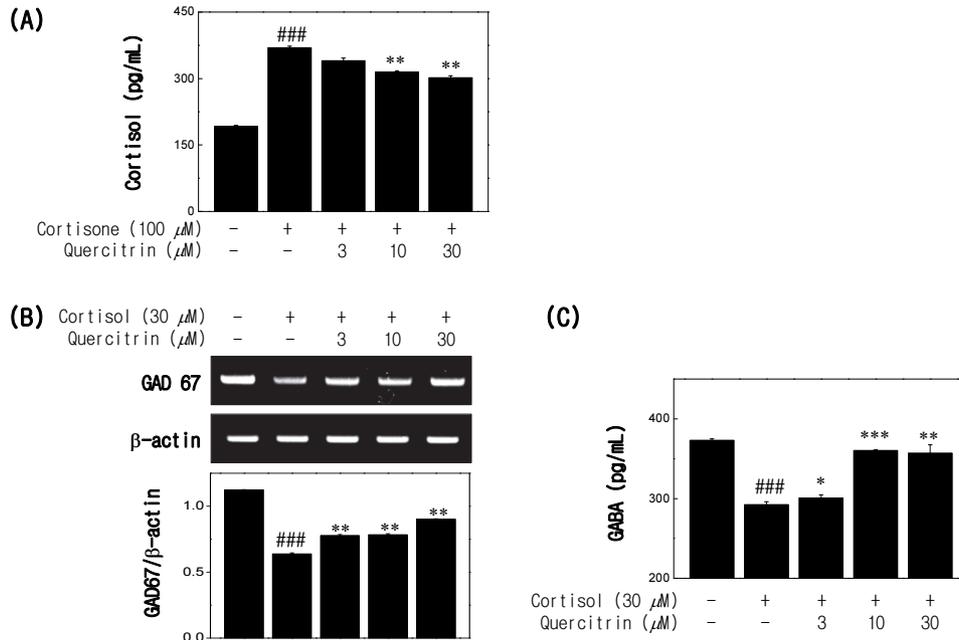


Figure 10. Effect of quercitrin on cortisol production, GAD67 expression and GABA production. HaCaT cells were treated with cortisone (100 μM) followed by treatment various concentrations with quercitrin for 24 h. Amount of cortisol was measured by ELISA kit (A). C6 cells were treated with cortisol (30 μM) followed by treatment various concentrations with quercitrin for 6 h and 24 h. mRNA level of GAD67 was examined using RT-PCR (B). Band intensities relative expression levels were calculated using the ImageJ 1.47 software. Amount of GABA was measured by ELISA kit (C). All data are the mean ± SD of three independent experiments. ##### $p < 0.001$ represent significant difference compared to control and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to cortisone or cortisol treated group.

물에서 318.5 ppm으로 가장 높은 함량을 나타내었고, 정제수 추출물 294.6 ppm, 70% 에탄올 244.7 ppm, 50% 에탄올 220.0 ppm 순으로 측정되었다(Table 6).

3.8. Quercitrin의 Cortisol 생성 및 GAD67 발현에 대한 영향 확인

Quercitrin은 식용 식물에서 유기화합물 중 생리기능을 나타내는 물질로 강력한 항산화 작용[39], 항염증[40], 항바이러스 및 항균 효과 등 여러 효능이 보고되어 있다[41]. 앵두 추출물 4 종의 유효성분으로 quercitrin이 확인됨에 따라, quercitrin의 항 스트레스 효과를 분석하기 위하여 cortisol 및 GABA 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 먼저, cortisol의 생성에 대한 영향을 확인한 결과, Figure 10A에 나타낸 바와 같이 quercitrin은 30 μM의 농도에서 cortisone 처리군 대비 최대 50.6% cortisol의 생성을 억제하였다. 또한, quercitrin은 GABA 생성 효소인 GAD67의 발현을 30 μM 농도에서 cortisol 처리군 대비 최대 54.2% 증가시켰으며(Figure 10B), GABA 생성은 cortisol 처리군 대비 10 μM

및 30 μM 농도에서 각각 84.2%, 80.0% 유의적인 증가 효과를 나타내었다(Figure 10C).

4. 결론

본 연구에서는 인간 각질형성세포와 쥐 신경교종세포에서 세포 내 스트레스에 의한 수면 및 장벽 개선에 대한 추출물의 효과를 평가하였다. 문헌 조사를 통해 현재 연구가 되어 있지 않은 앵두, 으름, 살구, 야콘, 금굴 및 핑거라임 6 종의 천연물 열매 및 뿌리를 최종 후보 물질로 선정하고 추출 용매에 따른 스트레스에 의한 수면 및 장벽 개선 효과를 분석하였다. 먼저, 6 종 천연물에 대하여 스트레스 호르몬인 cortisol의 생성에 미치는 영향을 확인한 결과, 앵두, 핑거라임, 으름 및 금굴의 용매별 추출물에서 유의적으로 cortisol의 생성이 억제됨을 확인하였으며, 그 중에서 앵두 정제수 추출물이 47.9% 가장 높은 억제율을 보였다. Cortisol 억제 효과가 있는 앵두 외 3 종에 대하여 스트레스에 의한 수면 개선 효과를 확인한 결과, GABA 생성 효소인

GAD67의 발현이 핑거라임 50% 에탄올 추출물(57.5%) 및 앵두 정제수 추출물(35.7%)에서 유의적인 증가 효과를 보였다. 또한 4 종 천연물의 항산화 활성을 분석하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 확인한 결과, 앵두 추출물이 가장 많은 폴리페놀을 함유하고 있었으나 플라보노이드의 경우 4 종 모두 10.0 mg 이하로 확인되었다. 스크리닝 결과를 토대로 가장 활성이 높은 앵두 추출물에 대하여 항 스트레스 관련 후속 실험을 진행하였다.

먼저, 스트레스에 의해 발생하는 활성 산소에 대한 직접적인 영향을 분석하기 위하여 앵두 용매별 추출물 4 종의 자유 라디칼 소거 활성을 확인한 결과, 추출 용매 4 종 모두 높은 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였으며 특히 정제수 추출물과 30% 에탄올 추출물이 양성대조군인 ascorbic acid 와 유사한 높은 항산화 효과를 보였다. 다음으로, 수면에 영향을 주는 GABA의 생성에 미치는 영향을 확인한 결과, 추출 용매 4 종 모두 GABA 생성이 유의적으로 증가하였으며 특히 정제수 추출물에서 cortisol에 의해 감소된 GABA의 발현이 100% 회복되었다. 마지막으로 앵두 추출물의 스트레스 및 수면부족으로 인한 피부 장벽 손상에 미치는 영향을 평가하였다. 각질 세포 외막과 미세섬유를 연결하는 filaggrin과 피부 연접 단백질인 claudin-1 모두 추출 용매 4 종 중, 정제수 추출물에서 유의적인 발현 증가 효과를 보였다. HPLC 분석을 통해 앵두 추출물의 유효 성분이 quercitrin임을 확인하였고 quercitrin의 항 스트레스 효과를 평가하였다. Quercitrin은 cortisol의 생성을 농도의존적으로 억제하였으며 GAD67 발현 및 GABA 생성을 유의하게 증가시켰다.

본 연구에서는 국내 자생하는 식물의 열매인 앵두 추출물이 스트레스 호르몬인 cortisol의 생성 억제를 통해 직접적인 항 스트레스 효과를 나타낼 뿐만 아니라 GAD67의 생성을 증가시켜 GABA 생성을 유도함으로써 스트레스에 의한 수면 감소를 개선하는 효과를 나타냄을 보여주었다. 또한, 스트레스로 인해 유도되는 산화 스트레스 및 무너진 피부 장벽을 회복하는 효과가 있음을 입증하였다. 이를 통해 앵두 추출물이 스트레스 억제를 통해 수면 개선 및 피부 장벽 강화 효능을 갖는 화장품 소재로서 활용 가능성이 있음을 보였으나, 추후 관련 인지들의 추가적인 기전 연구를 통해 구체적인 효능 확립이 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 충북경제자유구역청 및 충북테크노파크의 충북형 산업혁신 뉴딜사업(충북혁신뉴딜을 위한 향기원료 개발 및 제품 사업화)의 연구비 지원을 받아 수행됨

References

1. M. Yaar and B. A. Gilchrist, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
2. M. Joëls and T. Z. Baram, The neuro-symphony of stress, *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**(6), 459 (2009).
3. A. Papadimitriou and K. N. Priftis, Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Neuroimmunomodulation*, **16**(5), 265 (2009).
4. C. C. Zouboulis, H. Seltmann, N. Hiroi, W. Chen, M. Young, M. Oeff, W. A. Scherbaum, C. E. Orfanos, S. M. McCann, and S. R. Bornstein, Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**(10), 7148 (2002).
5. I. Mody and J. Maguire, The reciprocal regulation of stress hormones and GABAA receptors, *Front. Cell. Neurosci.*, **6**, 4 (2012).
6. J. W. Tomlinson and P. M. Stewart, Cortisol metabolism and the role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **15**(1), 61 (2001).
7. S. L. Choe, D. Kim, E. J. Kim, J. S. Ahn, E. J. Choi, E. D. Son, and E. H. Choi, Psychological stress deteriorates skin barrier function by activating 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and the HPA axis, *Sci. Rep.*, **8**(1), 6334 (2018).
8. S. Cohen, D. Janicki-Deverts, and G. E. Miller, Psychological stress and disease. *JAMA*, **298**(14), 1685 (2007).
9. L. C. Houtepen, R. R. Schür, J. P. Wijnen, V. O. Boer, M. P. M. Boks, R. S. Kahn, M. Joëls, D. W. Klomp, and C. H. Vinkers, Acute stress effects on GABA and glutamate levels in the prefrontal cortex: A 7T ¹H magnetic resonance spectroscopy study, *Neuroimage. Clin.*, **14**, 195 (2017).

10. G. B. Acosta and M. C. Rubio, GABAA receptors mediate the changes produced by stress on GABA function and locomotor activity, *Neurosci. Lett.*, **176**(1), 29 (1994).
11. C. Gottesmann, GABA mechanisms and sleep, *Neuroscience.*, **111**(2), 231 (2002).
12. F. C. Steward, J. F. Thompson, and C. E. Dent, γ -Aminobutyric acid: a constituent of potato tubers?, *Science* **110**, 439 (1949).
13. E. Roberts and S. Frankel, γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid, *J. Biol. Chem.*, **187**(1), 55 (1950).
14. V. S. Narayan and P. M. Nair, Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants, *Phytochemistry.*, **29**(2), 367 (1990).
15. R. D. Schwartz, The GABAA receptor-gated ion channel: biochemical and pharmacological studies of structure and function, *Biochem. Pharmacol.*, **37**(18), 3369 (1988).
16. O. A. Petroff, Book review: GABA and glutamate in the human brain, *Neuroscientist.*, **8**(6), 562 (2002).
17. J. E. Lee, S. Y. Jo, and M. C. Kook, Production of γ -aminobutyric acid and antioxidative effects by *Levilactobacillus brevis*, *Resour. Sci. Res.*, **3**(1), 16 (2021).
18. K. J. Skilbeck, G. A. Johnston, and T. Hinton, Stress and GABAA receptors, *J. Neurochemistry.*, **112**(5), 1115 (2010).
19. G. Bowers, W. E. Cullinan, and J. P. Herman, Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits, *J. Neurosci.*, **18**(15), 5938 (1998).
20. O. Folin and W. Denis. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *J. Biol. Chem.*, **12**(2), 239 (1912).
21. T. G. Williams and L. Edwards, Chronic stress and the HPA axis, *The standard.*, **9**(2), 1 (2010).
22. E. A. Lucassen and C. Giovanni, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis, obesity, and chronic stress exposure: sleep and the HPA axis in obesity, *Curr. Obes. Rep.*, **1**, 208 (2012).
23. S. J. Yoon, T. S. Kim, and J. H. Chae, Understanding stress by neuroscience, *J. Korean Acad. Fam. Med.*, **26**(8), 439 (2005).
24. A. Y. Kim and N. Kim, Associations of perceived stress level, serum cortisol level, and telomere length of community-dwelling adults in Korea, *J. Korean Biol. Nurs. Sci.*, **24**(4), 235 (2022).
25. P. Mourrain and G. X. Wang, Sleep: DNA repair function for better neuronal aging?, *Current Biology.*, **29**(12), R585 (2019).
26. N. R. Perron and J. L. Brumaghim, A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding, *Cell. Biochem. Biophys.*, **53**, 75 (2009).
27. Dragsted, Antioxidant actions of polyphenols in humans, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **73**(2), 112 (2003).
28. N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.*, **99**(1), 191 (2006).
29. M. R. Al-Sereiti, K. M. Abu-Amer, and P. Sena, Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials, *Indian. J. Exp. Biol.*, **37**, 124 (1999).
30. P. Hepsomali, J. A. Groeger, J. Nishihira, and A. Scholey, Effects of oral gamma-aminobutyric acid (GABA) administration on stress and sleep in humans: A systematic review, *Front. Neurosci.*, **14**, 559962 (2020).
31. F. Stahl and G. Dömer, Responses of salivary cortisol levels to stress-situations, *Endokrinologie.*, **80**(2), 158 (1982).
32. J. A. Bouwstra and M. Ponc, The skin barrier in healthy and diseased state, *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, **1758**(12), 2080 (2006).
33. J. H. Choo, H. G. Lee, S. Y. Lee, and N. G. Kang, *Iris pallida* extract alleviates cortisol-induced decrease in type 1 collagen and hyaluronic acid syntheses in human skin cells, *Curr. Issues. Mol. Biol.*, **45**(1), 353 (2023).
34. M. Maarouf, C. L. Maarouf, G. Yosipovitch, and V. Y. Shi, The impact of stress on epidermal barrier function: an evidence-based review, *Br. J. Dermatol.*, **181**(6), 1129 (2019).
35. A. Sandilands, C. Sutherland, A. D. Irvine, and W. I. McLean, Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease, *J. Cell. Sci.*, **122**(9), 1285 (2009).

36. H. Kim, J. U. Shin, and K. H. Lee, Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction, *Allergy Asthma Respir. Dis.*, **1**(1), 20 (2013).
37. H. N. Kim and M. Y. Yun, Effect on skin of immune functioning and claudin-1 by using *Scutellaria baicalensis* bio-conversion substance, *J. Korean. Soc. Cosmetol.*, **22**(6), 1160 (2016).
38. H. S. Hwang, J. M. Kim, Y. J. Jeon, Y. A. Song, and H. S. Park, Flavonoids and antimicrobial activity of the ethanol extract of Korean cherry (*Prunus tomentosa* Thunberg), *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **32**(6), 833 (2003).
39. S. C. Chou, C. R. Su, Y. C. Ku, and T. S. Wu, The constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata*, *Chem. Pharm. Bull.*, **57**(11), 1227 (2009).
40. M. Comalada, D. Camuesco, S. Sierra, I. Ballester, J. Xaus, J. Gálvez, and A. Zarzuelo, *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through downregulation of the NF- κ B pathway, *Eur. J. Immunol.*, **35**(2), 584 (2005).
41. A. Veckenstedt and R. Pusztai, Mechanism of antiviral action of quercetin against cardiovirus infection in mice, *Antivir. Res.*, **1**(4), 249 (1981).