

## 紫草 열수추출물이 각질형성세포 HaCaT의 세포 연결 관련 유전자의 발현에 미치는 영향 연구

조남준<sup>1#</sup>, 이병권<sup>1</sup>, 이웅희<sup>2</sup>, 김기광<sup>1</sup>, 김균언<sup>1</sup>, 한효상<sup>3\*</sup>

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 충남대학교 생물과학연구소, 3 : 중부대학교 보건행정학과

### Investigation of the effect of Lithospermi Radix on tight-junction related genes in HaCaT cells

Namjoon Cho<sup>1#</sup>, Byeongkwon Lee<sup>1</sup>, Woonghee Lee<sup>2</sup>, Keekwang Kim<sup>1</sup>  
Kyoon Eon Kim<sup>1</sup>, Hyosang Han<sup>3\*</sup>

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

2 : Institute of Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

3 : Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : The aim of this research was to determine the diverse effects of Lithospermi Radix Water Extract (LR) on human keratinocyte HaCaT cells, and to examine whether those effects could be applied to the human skin.

**Methods** : We examined effect of LR on the cell viability of using the MTS assay in human keratinocyte HaCaT cells. The antioxidation effect of LR was analyzed relative to the well-known antioxidant resveratrol, using an ABTS assay. Quantitative RT-PCR analysis revealed that, in HaCaT cells, LR influenced the mRNA expression of tight-junction genes associated with skin moisturization. Furthermore, a wound-healing assay demonstrated altered cell migration in LR-treated HaCaT cells.

**Result** : The cytotoxicity was confirmed to be higher in LR at a concentration of 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  using the MTS assay in HaCaT cells. In comparison to 100  $\mu\text{M}$  resveratrol, 1,600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LR showed either a similar or superior antioxidation effect. LR treatment in HaCaT cells reduced the mRNA expression levels of claudin 3, claudin 4, claudin 6, claudin 8, and ZO-2 to less than 0.80-fold, whereas JAM-A and Tricellulin mRNA expression level increased more than 1.33-fold. In addition, HaCaT cells migration was decreased to 83.9% by LR treatment.

**Conclusions** : LR of antioxidation activity will have an anti-aging effect on the skin by reducing oxidative stress. Further studies are required to address the implications for human skin, given LR's effects of altering mRNA expression of tight junction-related gene and decreasing cell migration of HaCaT cells.

**Key words** : Lithospermi Radix, Cell viability, Anti-oxidant, Tight-junction, Cell migration

#### I. 서 론

紫草는 神農本草經 中品<sup>1)</sup>에 “紫草. 味苦寒. 主心腹邪氣五疸.

補中益氣, 利九竅, 通水道. 一名紫丹, 一名紫芙. 生川谷.”이라고 처음 수록된 이래 涼血活血, 解毒透疹의 효능이 있어 血熱毒盛, 斑疹紫黑, 麻疹不透, 瘡瘍, 濕疹, 水火燙傷의 증상을 치료하

\*Corresponding author : Hyo-Sang Han, Department of Health Administration, College of Tourism Health, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea.

· Tel : +82-41-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr

#First author : Namjoon Cho, Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

· Tel : +82-42-821-5485 · Fax : +82-42-822-7548

· Received : 31 March 2017 · Revised : 2 May 2017 · Accepted : 20 May 2017

는데 상용되고 있다.<sup>2)</sup>

紫草의 基原은 대한약전<sup>3)</sup>, 일본약국방<sup>4)</sup>, 중국약전<sup>5)</sup>에는 모두 지치과 (Boraginaceae)에 속하는 지치 *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini, 新疆紫草 *Arnebia euchroma* Johnst. 혹은 内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 의 뿌리로 되어 있다.

함유성분으로는 naphthoquinones 계 색소인 acetylshikonin과 그 同族體, lithospermic acid, 靑酸배당체인 lithospermoside, allantoin<sup>4)</sup>, lithospermidin A, B, C를 함유하고 있으며<sup>2)</sup>, 이밖에 caffeic acid와 stearyl alcohol, 1-epicosanol, 1-docosanol, 1-tetracosanol 등 에스테르 화합물을 함유하고 있다.<sup>2)</sup>

紫草의 약리작용은 항암<sup>6-11)</sup>, 항알러지 및 항AIDS<sup>12)</sup>, 항염<sup>13)</sup>, 항산화<sup>14,15)</sup> 등 여러 연구들이 보고되었다.

표피 각질층의 밀착연접 (Tight-junction)은 두 개 이상의 세포 간 부착을 연계하고, 세포외기질을 통해 물질수송을 조절하는 다중 단백질 복합체 (multiprotein complexes)로 occludin, claudin 등이 알려진다.<sup>16,17)</sup> 그리고 피부의 수분 증발을 막아 피부보습의 유지에도 중요한 역할을 한다.<sup>18)</sup>

紫草가 인간 유래 각질 형성 세포인 HaCaT 세포의 밀착연접에 미치는 영향은 보고되지 않았다. 이에 저자는 紫草를 열수추출하여 얻은 시료로 항산화 효능 및 HaCaT 세포에 가지는 독성과 밀착연접에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 紫草 (*Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini)는 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 2016년 9월에 구입 (NO: 2016-0904)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 초음파 세척기를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

#### 2) Cell line

실험에 사용된 세포는 인간 유래 각질형성 세포인 HaCaT 세포로 고려대학교 생명공학부에서 분양 받아 실험에 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 Dulbecco's modified Eagle medium (WELGENE, Korea), fetal bovine serum (WELGENE, Korea), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (WELGENE, Korea), filter paper (Advantec No.2, Japan), DPBS (Corning, USA), Trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), potassium persulfate (Sigma, USA), ABTS (Sigma, USA), MTS solution (Promega, USA), eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea), 5X M-MLV RT reaction buffer

(Promega, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzynomics, Korea), 2X Prime Q-mater Mix (GENET BIO, Korea) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> incubator (Thermo, USA), water bath (HAAKE, Germany), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA) 등이다.

## 2. 방법

### 1) 紫草 열수추출물 제조

紫草 약재를 50 g으로 정확하게 중량을 측정된 뒤, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 紫草 19.4 g, 수율 38.8%였다.

### 2) 세포 배양

HaCaT 세포의 배양은 표준 세포 배양법인 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% fetal bovine serum과 1% 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium을 이용하여 배양하였다.

### 3) 항산화능 평가

ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay를 이용하여 紫草의 항산화 효능을 측정하였다. potassium persulfate 2.4 mM과 ABTS 7 mM을 1:1 부피비로 맞추어 혼합해주고 24 시간 동안 실온에서 차광된 상태로 반응시켜 주어 ABTS free radical을 만들어주었다. 그 후 ABTS free radical을 650 nm 흡광도가 0.7 부근이 되도록 D.W를 이용해 희석하여 ABTS working solution을 만들었다. 96 well plate의 각 well에 ABTS working solution 80 µl와 sample 20 µl를 혼합하고, 4 분간 차광된 상태로 반응시킨 후 microplate reader로 650 nm의 흡광도를 측정하였다. 항산화 효능은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \left( 1 - \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sampleblank}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

### 4) 세포활성도 평가

HaCaT 세포에 紫草를 처리한 뒤 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay를 진행해서 세포활성도를 확인하였다. 96 well plate에 HaCaT 세포를 5,000 cells/well씩 분주하고 24 시간 동안 배양하였다. 각각의

well에 紫草를 농도별로 첨가한 후 다시 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 MTS 시약을 첨가하고 492 nm의 흡광도를 microplate reader로 측정하였다. 상대적인 세포활성도를 계산하기 위하여 紫草를 처리한 실험군의 측정값을 시료를 처리하지 않은 대조군의 측정값과 비교를 통해 백분율로 표시하였다.

$$\text{세포활성도 (\%)} = \frac{(\text{시료첨가군의 흡광도} - \text{시료자체의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

### 5) Quantitative RT-PCR

6 well culture dish에 HaCaT 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well 씩 분주하고 24 시간 배양하였다. 그 후 紫草를 200  $\mu\text{g/ml}$  농도로 세포에 처리하고 36 시간 동안 배양하였다. 각 시료가 첨가된 배지를 제거한 후 PBS로 세척한 뒤 eCube Tissue RNA Mini Kit를 이용하여 RNA를 추출하였다. The Qubit 2.0 Fluorometer를 이용해 RNA를 정량한 뒤 total RNA 1  $\mu\text{g}$

에 DEPC-treated water를 이용해 총 부피를 8  $\mu\text{l}$ 로 조정 한 후 Random Hexamer (100 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , dNTP mix (10 mM) 1  $\mu\text{l}$  를 넣어 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 반응시켰다. 그 후 즉시 얼음에 냉각시킨 다음, DEPC-treated water 4  $\mu\text{l}$ 와, 5X M-MLV RT reaction buffer 4  $\mu\text{l}$  M-MLV reverse transcriptase 1  $\mu\text{l}$ , RNase inhibitor 1  $\mu\text{l}$ 를 각각 추가적으로 첨가하였다. 10 분간 실온에서 반응 후 뒤에 1 시간 동안 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 cDNA를 합성하였다. cDNA를 D.W로 1/10로 희석시켜 실험에 사용하였다. 이 후 AriaMx를 이용해서 quantitative RT-PCR (qRT-PCR)을 실시하여 밀착연접 관련 유전자들의 mRNA 발현량을 비교하였다. cDNA 5  $\mu\text{l}$ 에 nuclease free water 2  $\mu\text{l}$ , 2X Prime Q-mater Mix 10  $\mu\text{l}$ , 10 pmol/ $\mu\text{l}$  forward primer 1.5  $\mu\text{l}$ , 10 pmol/ $\mu\text{l}$  reverse primer 1.5  $\mu\text{l}$  를 넣고 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 초, 58 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 초를 40 cycle로 qRT-PCR를 실시하였다.

Table 1. Primer sequence

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )
Claudin1	F	GCA GAT CCA GTG CAA AGT CT	136	58
	R	CAT ACA CTT CAT GCC AAC GG		
Claudin3	F	GCA TGG ACT GTG AAA CCT CA	145	58
	R	AAT ATC AAG TGC CCC TTC CA		
Claudin4	F	CGC ATC AGG ACT GGC TTT AT	131	58
	R	AGT TGA GGA CCT GGA AGG CT		
Claudin6	F	GGC CCT CTG AGT ACC CTA CC	136	58
	R	GCA GGA GGC AGA AAC AAA AG		
Claudin7	F	ATG TAC AAG GGG CTG TGG AT	132	58
	R	CAC CAG GGA GAC CAC CAT TA		
Claudin8	F	GGC TGT TTC TTG GTG GTG TT	137	58
	R	CAC GCA ATT CAT CCA CAG TC		
Occludin	F	TTT GTG GGA CAA GGA ACA CA	137	58
	R	ATG CCA TGG GAC TGT CAA CT		
JAM-A	F	TGC CTC TTC ATA TTG GCG AT	144	58
	R	TGT CAC GGA CTT GAA GGT GA		
Zo-1	F	AGA GCA CAG CAA TGG AGG AA	133	58
	R	GAC GTT TCC CCA CTC TGA AA		
Zo-2	F	AGC AGG AGC AGA AGC AGA AG	148	58
	R	CAT ATC AGC TCT TCC ATG CC		
Tricellulin	F	GGC AGC TCG GAG ACA TAG AG	147	58
	R	TTT GCT GTT CTC AGT TCC TTG A		
$\beta$ -actin	F	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

6) Wound healing assay

HaCaT 세포를 6 well plate에  $6 \times 10^5$  cells/well로 분주한 뒤, plate에 confluent 될 때까지 배양해 주었다. HaCaT 세포의 표면에 200p tip을 이용하여 scratch를 만든 다음 PBS로 1회 세척한 뒤 紫草를 100  $\mu\text{g/ml}$  농도와 200  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하여 다시 12 시간 동안 배양하였다. 시간의 따른 healing 정도를 현미경을 이용하여 관찰하였으며, 남아 있는 scratch의 면적을 측정하여 다음 시료를 처리하지 않은 대조군과 대조하여 세포 이동 면적을 백분율로 표시하였다.

3. 통계처리

대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 student's t-test로 분석하여 p-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 항산화 효능 측정

ABTS assay를 통해 紫草가 가지는 항산화 효능을 항산화 효능이 잘 알려진 resveratrol과 비교하여 확인하였다. 그 결과 resveratrol 100  $\mu\text{M}$ 의 항산화 효능은 60.6%로 나타났으며 紫草 1,600  $\mu\text{g/ml}$ 의 항산화 효능은 resveratrol 100  $\mu\text{M}$  65.3%로 나타났다.

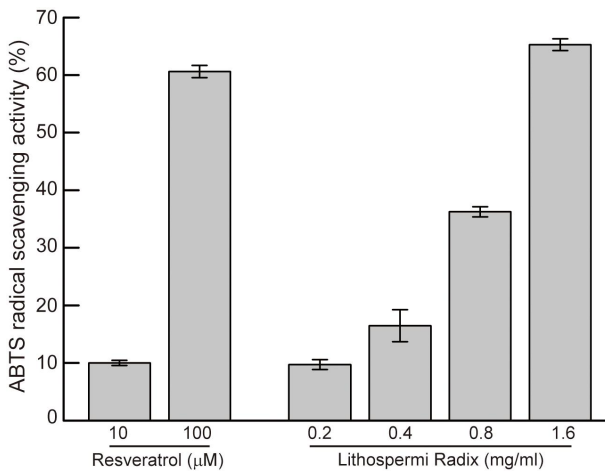


Fig 1. ABTS radical scavenging activity of Lithospermi Radix and resveratrol.

2. HaCaT 세포의 세포활성도에 미치는 영향

紫草가 HaCaT 세포의 세포활성도에 미치는 영향을 MTS assay를 통해 확인하여 실험에 적용할 수 있는 유효농도를 확인하고자 하였다. 그 결과 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 紫草를 24 시간 처리한 HaCaT 세포에서 대조군 대비 97.9%의 세포활성도를 나타내었다. 800  $\mu\text{g/ml}$  농도에서부터 세포독성이 확인되었다. 따라서 200  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도로 紫草를 HaCaT 세포에 처리하여 연구를 진행하였다.

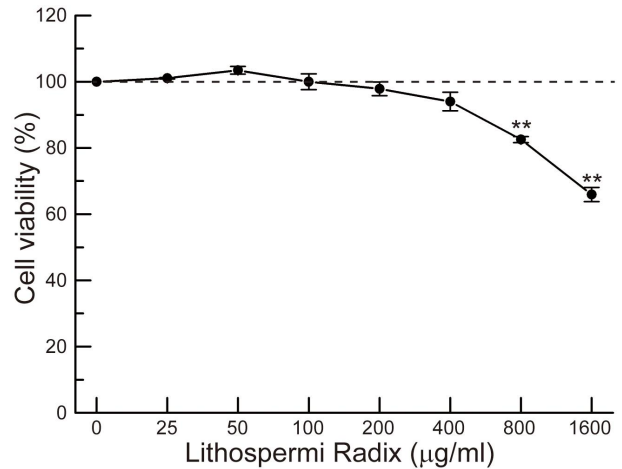


Fig 2. Effect of Lithospermi Radix on cell viability. HaCaT cells were treated with indicated concentrations of Lithospermi Radix for 24 h. \*\*p < 0.01 versus control.

3. 밀착연접 관련 유전자 발현 조절

HaCaT 세포에 紫草를 200  $\mu\text{g/ml}$  농도로 36 시간 처리하였고 qRT-PCR을 통해 밀착연접에 관여하는 다양한 유전자의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 紫草를 처리한 HaCaT 세포에서 claudin 3, 4, 6, 8, ZO-2의 mRNA 발현이 0.80배 이하로 감소하였다. 특히 claudin 3의 mRNA 발현은 0.43배, claudin 6의 mRNA 발현은 0.54배, claudin 8은 0.51배 까지 감소하였다. 반면 JAM-A의 발현은 1.33배, Tricellulin은 1.47배 증가하였다. 이 결과를 통해 紫草가 HaCaT 세포의 밀착연접 유전자 발현에 다양한 변화를 일으키는 것을 확인하였다.

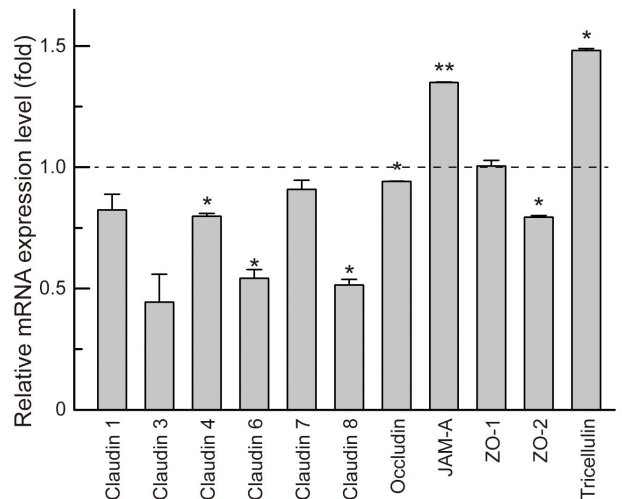


Fig 3. Effect of Lithospermi Radix in tight-junction related mRNA expression level. After 36 h of 200  $\mu\text{g/ml}$  Lithospermi Radix treatment on HaCaT cells, mRNA expression level was measured by qRT-PCR. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 versus control.

4. 세포이동에 미치는 영향

이전 실험을 통해 紫草를 처리한 HaCaT 세포에서 밀착연접 유전자의 mRNA 발현이 다양하게 변화한 것을 확인하였다.

이러한 紫草의 작용이 HaCaT 세포의 세포이동에 미치는 영향을 확인해 보기 위하여 wound healing assay를 진행하였다. 그 결과 紫草 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 HaCaT 세포의 세포이동은 대조군과 대비하였을 때 83.9%로 감소하였다.

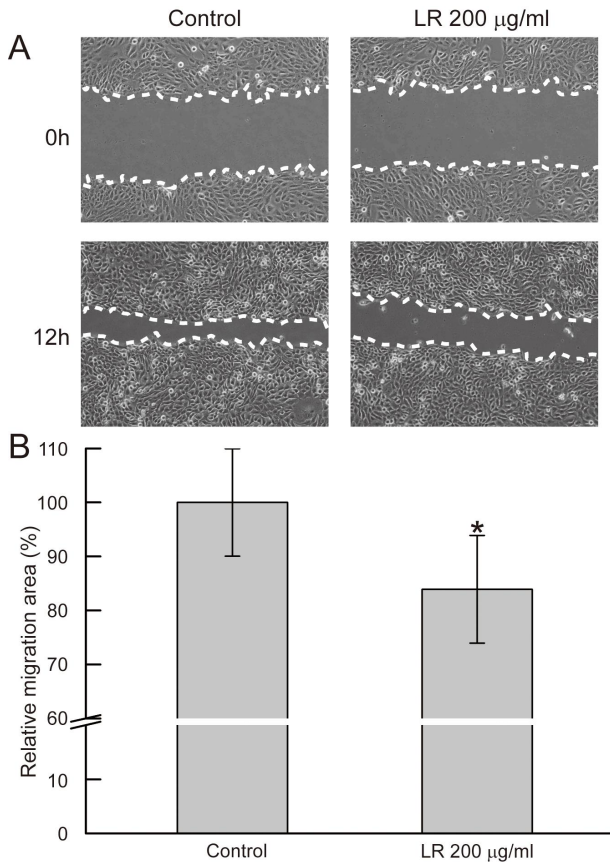


Fig 4. Reduction by Lithospermi Radix 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of HaCaT cells migration. (A) Representative images of wound healing assay. (B) Percentage of migration area of HaCaT cells treated with Lithospermi Radix 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 12 h. \* $p < 0.05$ , versus control.

#### IV. 고찰

紫草는 (Lithospermi Radix)의 기원 식물은 현재 한국과 중국에서 사용하는 기원식물이 각각 달라 자국의 약전에 규정하고 있는 실정이며 紫草의 기원에 따른 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다.<sup>19)</sup>

紫草의 성분으로는 naphthoquinones계 색소인 acetylshikonin과 그 同族體인 propionylshikonin, isobutyrylshikonin,  $\beta, \beta$ -dimethylacrylshikonin, isovalerylshikonin,  $\beta$ -hydroxyisovalerylshikonin,  $\alpha$ -methyl-n-butyrylshikonin을 함유하고 있고<sup>1)</sup>, lithospermic acid, 靑酸배당체인 lithospermoside, allantoin<sup>4)</sup>, lithospermidin A, B, C를 함유하고 있으며, 알카로이드 성분인 pyrrolizidine alkaloids, hydroxymyoscorpine, 테르펜류 성분인 shikonofuran A, B, C, D, E, F를 함유하고 있고, 이밖에 caffeic acid, stearyl alcohol, 1-epicosanol, 1-docosanol, 1-tetracosanol 등 에스테르 화합물을 함유하고 있다<sup>2)</sup>.

약리작용으로는 Ju 등<sup>21)</sup>, Kim 등<sup>22)</sup>은 아토피 피부염에 관련 효과를 보고하였고, Kim 등<sup>23)</sup>은 항알리지 염증반응에 대한 효과를 보고하였으며, Lee 등<sup>24)</sup>은 Galactosamine으로 유도된 간손상에 미치는 보호 효과를 보고하였다.

본 연구에서는 紫草가 가지는 항산화 효능의 비교 및 HaCaT 세포에서 밀착연접에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

활성산소에 의한 산화적 스트레스는 세포 손상을 일으키고 유전자와 단백질의 변성을 야기한다. 이는 피부의 면역기능을 감소시키고 피부암, 염증을 포함한 각종 피부질환을 일으키며 피부 노화를 촉진한다.<sup>25)</sup> 이러한 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있는 항산화 효능은 피부 건강을 유지하는데 있어 매우 중요하다. resveratrol은 항산화 효능에 대한 많은 연구 결과가 보고되어 있다.<sup>26)</sup> 이러한 이유로 resveratrol과 紫草의 항산화 효능을 ABTS assay를 통해 비교하여 확인하였다. 그 결과 resveratrol 100  $\mu\text{M}$ 의 항산화 효능은 60.6%로 나타났으며 紫草 1,600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항산화 효능은 resveratrol 100  $\mu\text{M}$  65.3%로 나타났다. 이를 통해 紫草는 resveratrol과 같이 뛰어난 항산화 효능을 보유하고 있으며, 紫草를 사람 피부에 적용할 경우 활성산소를 효과적으로 감소시켜 피부 질환의 예방 및 피부 노화의 방지 효과가 있을 것으로 생각된다.

紫草가 HaCaT 세포의 세포활성도에 미치는 영향을 MTS assay를 통해 확인하여 실험에 적용할 수 있는 유효농도를 확인하고자 하였다. 그 결과 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 紫草를 24 시간 처리한 HaCaT 세포에서 대조군 대비 97.9%의 세포활성도를 나타내었다. 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서부터 세포독성이 확인되었다. 따라서 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도로 紫草를 HaCaT 세포에 처리하여 연구를 진행하였다.

밀착연접은 세포-세포 간 결합을 연계하는 하는 다중 단백질 복합체로 각질층의 밀착연접은 외부 환경으로부터 장벽을 형성하여 박테리아와 바이러스의 침입을 막고, 물리화학적 공격을 방어한다.<sup>27)</sup> 또한 claudin 1을 결핍시킨 마우스에서 표피층에 심각한 수분 손실이 확인된 연구 결과가 있으며, 그 외에도 밀착연접과 피부 보습의 관계에 대한 많은 연구 결과가 보고되어 있다.<sup>28)</sup> 이번 연구를 통해 紫草가 HaCaT 세포의 밀착연접의 발현에 미치는 영향을 확인하여 紫草가 가지는 피부 보습 증진 효과와의 상관관계를 확인하고자 하였다.<sup>29,30)</sup> HaCaT 세포에 紫草를 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 36 시간 처리하였고 qRT-PCR을 통해 밀착연접에 관여하는 다양한 유전자의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 紫草를 처리한 HaCaT 세포에서 claudin 3, 4, 6, 8, Zo-2의 mRNA 발현이 0.80배 이하로 감소하였다. 특히 claudin 3의 mRNA 발현은 0.43배, claudin 6의 mRNA 발현은 0.54배, claudin 8은 0.51배 까지 감소하였다. 반면 JAM-A의 발현은 1.33배, Tricellulin은 1.47배 증가하였다. 이 결과를 통해 紫草가 HaCaT 세포의 밀착연접 유전자 발현에 다양한 변화를 일으키는 것을 확인하였다. 紫草가 가지는 피부 보습 효과와 밀착연접 관련 유전자 발현에 미치는 영향과의 상관관계 및 피부에 부작용으로 나타날 가능성에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 한다.

세포이동은 여러 기관의 발달, 면역 세포의 작용, 암의 전이, 그리고 피부의 상처 회복에 중요한 역할을 한다. 피부의 빠른 세포이동은 상처의 회복을 촉진하지만 비정상적인 세포이동은

압의 발생을 초래한다.<sup>31)</sup> 이러한 세포이동은 세포-세포 연결에 의해 조절되며, 밀착연접은 이러한 세포이동을 조절하는 중요한 요소로 작용하게 된다.<sup>32)</sup>

이전 실험을 통해 紫草를 처리한 HaCaT 세포에서 밀착연접의 mRNA 발현이 다양하게 변화한 것을 확인하였다. 이러한 紫草의 작용이 HaCaT 세포의 세포이동에 미치는 영향을 확인해 보기 위하여 wound healing assay를 진행하였다. 그 결과 紫草 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 HaCaT 세포의 세포이동은 대조군과 대비하였을 때 83.9%로 감소하였다. 紫草를 처리한 HaCaT 세포에서 세포이동의 감소 현상의 원인 및 사람피부에 미치는 영향은 앞으로 더욱 연구되어야 한다.

이러한 결과들을 통해 紫草는 항산화 효능을 보유하고 있어 피부의 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시켜 피부의 노화 방지 효과가 있을 것으로 생각된다. 또한 紫草는 다양한 밀착연접 유전자의 발현에 영향을 일으키는 것으로 생각된다. 향후 紫草 열수추출물을 이용한 항산화제 개발을 위하여 분자수준의 기전연구 등 더욱 세심한 연구가 요구되어지는 바이다.

## V. 결 론

본 연구에서 紫草를 열수추출하여 얻은 시료를 대상으로 항산화 효능의 비교 및 HaCaT 세포에서 밀착연접에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 紫草를 항산화 효능이 잘 알려진 resveratrol과 비교하여 ABTS 라디칼 소거능을 확인한 결과 resveratrol 100  $\mu\text{M}$ 의 항산화 효능은 60.6%로 나타났으며 紫草 1,600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항산화 효능은 resveratrol 100  $\mu\text{M}$  65.3%로 나타내었다.
2. 紫草가 HaCaT 세포에 미치는 세포활성도를 MTS assay를 이용하여 확인한 결과 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 紫草를 24 시간 처리한 HaCaT 세포에서 대조군 대비 97.9%의 세포활성도를 나타내었다.
3. 紫草가 HaCaT 세포의 밀착연접에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. HaCaT 세포에 紫草를 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 36 시간 처리하였고 qRT-PCR을 통해 밀착연접에 관여하는 다양한 유전자의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 紫草를 처리한 HaCaT 세포에서 claudin 3, 4, 6, 8, Zo-2의 mRNA 발현이 0.80배 이하로 감소하였다. 특히 claudin 3의 mRNA 발현은 0.43배, claudin 6의 mRNA 발현은 0.54배, claudin 8은 0.51배 까지 감소하였다. 반면 JAM-A의 발현은 1.33배, Tricellulin은 1.47배 증가하였다.
4. 紫草의 작용이 HaCaT 세포의 세포이동에 미치는 영향을 확인해 보기 위하여 wound healing assay를 진행하였다. 그 결과 紫草 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리한 HaCaT 세포의 세포이동은 대조군과 대비하였을 때 83.9%로 감소하였다.

이상의 실험결과는 紫草가 항산화 효능을 보유하고 있어

피부의 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시켜 피부의 노화 방지 효과가 있을 것으로 생각된다. 또한 紫草는 다양한 밀착연접 유전자의 mRNA 발현에 영향을 일으키는 것으로 생각되며, 앞으로 紫草 열수추출물의 항산화효능에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

## 감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다. 충남대학교 김균언 교수님께는 공동 연구 및 교신저자 역할을 성실히 수행해 주심에 다시 한번 감사 드립니다.

## References

1. Wu B, Shennongbencaojing, Beijing : Kexuejishuwenxian publisher, 1999 : 65, 66.
2. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China, Zhonghuabencao, Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : 525-31.
3. Korea Food and Drug Administration, The Korean Pharmacopoeia Eleventh Edition, Seoul : Korea Food and Drug Administration, 2015 : 91-2.
4. Ministry of Health, Labour and Welfare, The Japanese Pharmacopoeia, Fourteenth Edition, Tokyo : Hirokawa Shoten, 2001 : 493-503.
5. The Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010, Beijing : China Medical Science and Technology Press, 2010 : 46.
6. Chung HS, Kang MK, Cho CW, Park SK, Kim HY, Yoon YS, Kang JH, Shin MK, Hong MC, Bae HS, Inhibition of lipopolysaccharide and interferon-gamma-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha by Lithospermum radix in mouse peritoneal macrophages, J Ethnopharmacology, 2005 ; 102(3) : 412-7.
7. Kim SH, Kang IC, Yoon TJ, Park YM, Kang KS, Song GY, Ahn BZ, Antitumor activities of a newly synthesized shikonin derivative, 2-hyim-DMNQ-S-33, Cancer Lett, 2001 ; 172(2) : 171-5.
8. Singh F, Gao D, Lebowitz MG, Wei H, Shikonin modulates cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor signaling in human epidermoid carcinoma cells, Cancer Lett, 2003 ; 200(2) : 115-21.
9. Zhang ZQ, Cao XC, Zhang L, Zhu WL, Effect of shikonin, a phytochemical from Lithospermum erythrorhizon, on rat vascular smooth muscle cells proliferation and apoptosis in vitro, Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2005 ; 85(21) : 1484-8.

10. Hsu PC, Huang YT, Tsai ML, Wang YJ, Lin JK, Pan MH. Induction of apoptosis by shikonin through coordinative modulation of the Bcl-2 family, p27, and p53, release of cytochrome c, and sequential activation of caspases in human colorectal carcinoma cells. *J Agric Food Chem.* 2004 ; 52(20) : 6330-7.
11. Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS. Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(7) : 5877-85.
12. Bulgakov VP, Veselova MV, Tchernoded GK, Kiselev KV, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene on rabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. *Planta.* 2005 ; 221(4) : 471-8.
13. Hwang HJ, Kim HY, Yu HJ, Oh MH, Lee IH, Kim SG. Gene encoding pathogenesis-related 10 protein of *Lithospermum erythrorhizon* is responsive to exogenous stimuli related to the plant defense system. *Plant Science.* 2003 ; 165 : 1297-1302.
14. Pan YM, Liang Y, Wang HS, Liang M. Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. *Food Chemistry.* 2004 ; 88(3) : 347-50.
15. Choi WH, Hong SS, Lee SA, Han XH, Lee KS, Lee MK, Hwang BY, Ro JS. Monoamine oxidase inhibitory naphthoquinones from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Arch Pharm Res.* 2005 ; 28(4) : 400-4.
16. Cereijido M, Anderson JM. Tight junctions. *New York: CRC Press.* 2001 : 39.
17. Morita K, Miyachi Y. Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci.* 2003 ; 31(2) : 81-9.
18. Tsuruta D, Green KJ, Getsios S, Jones JC. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends Cell Biol.* 2002 ; 112(8) : 355-7.
19. Kim, I.R., Kim, H.C., Kuk, Y.B., Park, S.J., Park, Y.K., Park, J.H., Seo, B.I., Seo, Y.B., Shin, M.K., Lee, Y.J., Lee, Y.C., Lee, J.H., Leem, K.H., Cho, S.I., Chung, J.K., Joo, Y.S., Choi, H.Y. *Boncho-Hak*, Seoul : Young-Lim Press, 2007 : 238-9.
20. Bulgakov VP, Kozyrenko MM, Fedoreyev SA, Mischenko NP, Denisenko VA, Zvereva LV, Pokushalova TV, Zhuravlev YN. Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitoterapia.* 2001 ; 72(4) : 394-401.
21. Ju JH, Cho HH, Lee YS. Progress on Phytochemical and Atopic Dermatitis related Study of the Root of *Lithospermum erythrorhizon*. *Korean J Pharmacogn.* 2010 ; 41(2) : 73-88.
22. Kim YR, Cho SY, Seo DB, Kim SH, Lee SJ, Cho YH. Effects of Oral Intake of Gromwell Water Fraction on Ceramides Content and the Development of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *korean j. food sci. technol.* 2009 ; 41(5) : 547-51.
23. Kim SH, Lee JY, Kim DK. Effects of Mori Folium, *Arctii Fructus*, *Lithospermum Erythrorhizon* on the Anti-allergic Response. *J Kyung Hee Univ Med Cent.* 2005 ; 21(1) : 71-9.
24. Lee HH, Yoon JS, Song SY. Protective Effect of *Lithospermum erythrorhizon* oh Galactosamine Induced Liver Injury. *Korean J. Microscopy.* 2010 ; 40(1) : 29-35.
25. David R, Bickers, Mohammad A. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *Journal of Investigative Dermatology.* 2006 ; 126(12) : 2565-75.
26. Mary N, Carol P, Hasan M, Nihal A. The Grape Antioxidant Resveratrol for Skin Disorders: Promise, Prospects, and Challenges. *Arch Biochem Biophys.* 2011 ; 508(2) : 164-70.
27. Daisuke T, Kathleen J, Spiro G, Jonathan C.R. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends Cell Biol.* 2002 ; 12(8) : 355-7.
28. Masato M, Fumiyoshi Y, Akemi I, Keiko Y, Chikaako K, Shinji F, Eiichiro U, Yohichi M, Kohichi T, Hirokazu Y, Mituru H, Hajime I, Masahito I, Masaru O, Gen K, Taroh K, Junji T, Kiyofumi Y. Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 ; 95(3) : 1044-9.
29. Chang MJ, Huang HC, Chang HC, Chang TM. Cosmetic formulations containing *Lithospermum erythrorhizon* root extract show moisturizing effects on human skin. *Arch Dermatol Res.* 2008 ; 300(6) : 317-23.
30. Kim YR, Cho SY, Seo DB, Kim SH, Lee SJ, Cho YH. Effects of Oral Intake of Gromwell Water Fraction on Ceramides Content and the Development of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Korean J Food Sci. Technil.* 2009 ; 41(5) : 547-51.
31. Esther N. A, Esther H, Fiona M. W. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2012 ; 12(3) : 170-80.
32. Peter F, Darren G. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 ; 10(7) : 445-57.