

인간유래각질형성세포에서 호장근 추출물이 피부장벽 보호능과 보습능에 미치는 영향

강은정^{1,*} · 박지아² · 최윤식^{3,†}

¹경성대학교 약학과, 석사과정

²경성대학교 제약공학과, 강사

³경성대학교 약학과, 교수

(2023년 9월 25일 접수: 2023년 10월 22일 수정: 2023년 10월 24일 채택)

The effects of the *Reynoutria japonica* on skin-barrier and moisturizing in HaCaT cells

Eun Jeong Kang^{1,*} · Jia Bak² · Yun-Sik Choi^{3,†}

^{1,3}Department of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 48434, Republic of Korea

²Department of Pharmaceutical Science and Technology, Kyungsoong University,
Busan 48434, Republic of Korea

(Received September 25, 2023; Revised October 22, 2023; Accepted October 24, 2023)

요 약 : 호장근은 마디풀과에 속하는 다년초로 우리나라를 포함한 동아시아에서 잘 자생한다. 호장근은 호장의 뿌리로 항염증과 진경제로 사용되어 왔으며 유효성분으로 emodin을 포함하고 있다. 피부의 표피는 자극, 해로운 물질을 차단하고 수분 증발을 방지함으로써 체내를 보호하는 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 호장근과 그 유효성분인 emodin이 피부 장벽과 보습능에 미치는 영향에 대해 평가하고자 하였다. 먼저 호장근은 ABTS⁺ radicals을 우수하게 제거함으로써 항산화 효능이 뛰어난 것을 확인하였다. 다음으로, 실시간 중합연쇄효소반응을 통해 각질형성세포의 분화에 중요한 역할을 하는 filaggrin의 유전자 발현을 비교한 결과, 호장근과 emodin에 의해 농도-의존적으로 filaggrin mRNA 발현이 증가하였다. 또한, 호장근과 emodin은 히알루론산 합성에 중요한 역할을 하는 HAS-2 mRNA 발현을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 종합적으로, emodin을 유효성분으로 포함하는 호장근은 피부 장벽 강화와 보습능 증강을 위한 기능성 화장품 소재로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

주제어 : 호장근, emodin, 항산화, 피부 장벽, 피부 보습

[†]Corresponding author
(E-mail: tiana@ks.ac.kr)

Abstract : *Reynoutria japonica* is a perennate plant belonging to *Polygonaceae* and grows wild in East Asia containing Korea. Roots of *Reynoutria japonica* (*R. japonica*), part of roots of *Reynoutria japonica*, has been used for anti-inflammation and antispasmodics and contains emodin as active compound. Epidermis of skin is crucial roles to defense our body against stimulants, harmful substance and prevent water loss. In this study, we examined the effect of *R. japonica* and emodin, its active compound, on skin-barrier and moisturizing on HaCaT cells. First, antioxidant effect of *R. japonica* was prominent by scavenging ABTS⁺ radicals. Next, we conducted real time PCR and expression of filaggrin mRNA which is crucial role in differentiation of keratinocyte increased by *R. japonica* and emodin dose-dependently. In addition, *R. japonica* and emodin significantly elevated the expression of HAS-2 mRNA which play a role in hyaluronic acid synthesis on HaCaT cells. Taken together, *R. japonica* containing emodin, as active compound has potential as a cosmetic material for enhancing the function of skin-barrier and moisturizing in epidermis.

Keywords : *Reynoutria japonica*, emodin, anti-oxidant, skin-barrier, moisturizing

1. 서론

사람의 피부에는 표피(epidermis)가 이루고 있는 피부 장벽(skin barrier)이 존재하여 외부 환경으로부터 일차적으로 신체를 방어하고 체내 수분 증발을 억제하는 능력이 있다[1-4].

표피는 대부분의 각질형성세포로 이루어져 있으며, 가장 아래의 기저층(stratum basale)의 줄기세포에서 각질형성세포가 유래하고 유극층(stratum spinosum)에서의 합성, 과립층(stratum granulosum)에서의 자기분해과정을 통해 상부로 올라가 최종적으로 핵을 소실한 납작한 모양의 각질세포로 분화하여 단단한 각질층(stratum corneum)을 형성한다[2,5,6]. 이러한 각화(keratinization)과정이 발생하는 동안 각질형성세포의 분화를 촉진하는 transglutaminase 1과 3, involucrin, loricrin, profilaggrin 등의 단백질이 합성된다[6]. 특히 profilaggrin은 단백질분해과정과 탈인산화를 통해 filaggrin으로 분해되어 자외선을 차단하고 표피의 pH를 약산성으로 유지하며 각질형성세포의 세포골격을 이루고 있는 keratin 단백질을 응집시켜 피부 장벽을 단단하게 유지하게 한다[2,6,7]. 이후 amino peptidase, carboxypeptidase 등의 단백질분해효소에 의해 최종적으로 아미노산으로 분해되어 천연보습인자(natural moisturizing factor)를 구성하여 피부 내 수분을 유지하는데 중요한 역할을 한다[2,5].

피부 수분 장벽 형성에는 천연보습인자 이외에도 hyaluronic acid도 보습인자로서의 중요한 역

할을 한다. Hyaluronic acid는 고분자 화합물로, 다량의 물을 보유할 수 있는 능력이 있으며 각질형성세포와 섬유아세포(fibroblast)의 hyaluronic acid synthase (HAS)에 의해 합성된다[1,4]. Hyaluronic acid는 피부 내 수분 증발을 억제하여 피부 장벽을 유지하는데 필수적인 역할을 하며 이러한 인자들의 결핍이나 불균형으로 인해 피부 건조가 유발되고 피부 장벽이 손상된다[1,8].

노화, 자외선 또는 자극 물질로부터의 노출, 스트레스, 흡연 등은 피부 장벽을 손상시키며 이로 인한 filaggrin과 hyaluronic acid의 감소 혹은 이상은 다양한 피부 질환의 원인이 될 수 있다[9-12]. 특히 노화에 의한 피부 장벽의 손상은 경표피 수분손실(transepidermal water loss, TEWL)을 증가시켜 피부 건조증, 가려움 및 염증을 유발할 수 있으며[13-15], 아토피피부염 환자에서는 filaggrin 기능소실 돌연변이가 존재하는 것으로 보고되었다[16].

이와 같이 피부 장벽의 기능과 중요성에 대한 관심이 높아짐에 따라, 천연 소재를 활용한 피부 장벽 강화 기능성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다[1,17-20].

호장(*Reynoutria japonica*)은 마디풀과에 속하는 다년초로, 우리나라 각지를 비롯한 동아시아에서 주로 잘 자생하며 호장의 뿌리를 호장근이라 한다[21-23]. 호장근은 예로부터 민간에서 방광염, 요도염, 관절염 등의 염증을 다스리고 진경제로 사용되어 왔으며 이외에도 항혈전, 항균, 항암

효능, 거담작용에 관한 효능이 보고되었고[21, 24-26] 유효성분으로는 emodin, emodin-8-O-glucoside, physcion, resveratrol, fallacinol, quercetin 등으로 알려져 있다[21,25,27,28].

호장근의 피부 기능에 대한 작용으로는 tyrosinase 활성 저해와 SK-MEL-2세포주에서 멜라닌 생합성 저해를 통한 미백 효능[22], UVA 영역의 자외선이 진피까지 도달하는 것을 감소시켜주는 자외선 차단 효능과 UVB에 의한 피부 광노화 억제 효능[22,23], 그리고 matrix metalloproteinase (MMPs)의 유전자 발현 억제를 통한 주름 개선 효능[27]이 있음이 보고되었으나 피부 장벽에 관한 연구는 미비한 수준이다. 따라서 본 연구에서는 호장근 추출물과 그 유효성분인 emodin의 피부 장벽 및 보습능 강화 효능을 평가하고 기능성 화장품의 원료로서의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

2. 연구방법

2.1. 시약

실험에 사용된 ABTS single solution은 Invitrogen (Waltham, MA, USA)에서 구입하였으며 ascorbic acid와 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)과 fetal Bovine Serum (FBS)는 GeneDEPOT (Barker, TX, USA)에서, trypsin-EDTA와 penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. LDH cytotoxicity assay kit는 Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였으며 TRI-solution은 Bio science technology (Daegu, Korea)에서, PrimeScript™ RT master mix와 TB Green® Premix Ex Taq™ II는 Takara (Kyoto, Japan)에서 구입하였다. 유효성분 분석을 위한 emodin 표준품은 TCI chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 추출물 제조

본 연구에 사용된 호장근 추출물은 경성대학교 화장품학과 피부면역학실험실에서 제공받아 사용하였다(voucher specimen 8800663008915). 간략하게는, 호장근 추출물 제조는 70% 에탄올을(1:9 v/v) 이용하여 실온에서 24시간 동안 침지시켰으

며 3회 반복 추출하였다. 이후 감압 농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 후 동결건조(iLShinBioBase, Dongducheon, Korea) 후 -20 °C에서 보관하였다.

2.3. 지표성분 분석

호장근 추출물 내 emodin 함량 분석은 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC, Agilent 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 진행하였으며 호장근 추출물은 dimethylsulfoxide (DMSO)를 이용하여 100 µg/ml 농도로 희석하였고 표준검량곡선 작성을 위한 emodin은 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml로 제조하였으며 함량 분석 조건은 Kim et al., 2021을 참고하였다[29].

2.4. ABTS⁺ radical 소거능 평가

호장근의 항산화 효능을 평가하기 위해 ABTS⁺ radical 소거능을 측정하였다. ABTS⁺ radical 생성을 위해 ABTS single solution과 5 mM potassium persulfate를 2:1로 혼합하여 실온에서 18시간 동안 차광하여 반응시켰으며 사용 직전 415 nm에서 흡광도 값이 0.7 ± 0.05 가 되도록 증류수에 희석하여 사용하였다. 호장근 추출물(10, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml) 10 µl에 ABTS 혼합용액 50 µl를 첨가하여 반응시킨 후 microplate reader (INNO, South Korea)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음과 같은 식으로 계산하였다. ABTS⁺ radical scavenging (%) = $\{1 - (\text{시료의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도})\} \times 100$

2.5. 세포 배양

실험에 사용된 각질형성세포주인 HaCaT 세포 (Human keratinocyte)는 경성대학교 피부면역학실험실로부터 제공받아 사용하였다. 세포 배양은 10% FBS와 100 U/ml penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM을 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건하에 진행하였으며 주기적으로 배지를 교체하면서 세포의 밀도가 약 80% 찼을 때 계대배양을 하였다.

2.6. MTT assay

세포 생존율은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. HaCaT 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 호

장근 추출물을 농도별(10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하고 24시간 추가 배양하였다. 배양 후 5 mg/ml 의 MTT 시약을 모든 well에 10 μl 씩 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 반응시켰다. 이후, 현미경으로 formazan 결정의 형성을 확인한 후 상층액을 제거하고 100 μl DMSO를 첨가하여 생성된 결정을 완전히 용해시키고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. LDH release assay

호장근에 의한 세포 독성은 LDH release assay를 통해 평가하였으며 실험 과정은 회사에서 제공하는 매뉴얼에 따라 진행하였다. 간략하게는, HaCaT 세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 안정화시킨 후 호장근 추출물을 농도별로 (10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 이후 상층액을 회수하여 원심분리한 후 50 μl 를 취하여 반응액(Lactic acid, NAD^+ , INT, Diaphorase) 50 μl 과 혼합하여 실온에서 차광상태로 30분간 반응시켰다. 반응 산물의 흡광도는 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 측정하였다.

2.8. Quantitative real-time PCR

호장근 추출물과 그 유효성분인 emodin이 피부 장벽과 보습에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 실시간 증합효소연쇄반응을 수행하였다. 먼저, HaCaT 세포를 24 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에 24시간 동안 배양한 후 호장근 추출물(10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 emodin (10, 25 μM)을 배지에 희석하여 추가로 4시간 동안 배양하였다. RNA 추출을 위해 상층액을 제거하고 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)로 세포를 세척

한 후, TRI-solution을 첨가하여 세포벽을 용해시켰으며 추가로 chloroform을 넣어 수용액 층과 유기용매 층으로 분리하여 수용액 층만 회수한 후, isopropanol을 넣고 RNA를 침전시켰다. 이후 75% EtOH로 RNA 침전물을 세척하고 건조시킨 후 RNase-free water를 넣어 RNA 침전물을 녹여냄으로써 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 nanodrop (microdigital, Seongnam, South Korea)으로 정량하고 RT master mix를 이용해 역전사 반응을 시켜 cDNA로 합성한 후, TB Green® Premix Ex Taq™ II를 이용하여 증폭하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 (denaturation), 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 (annealing), 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 (extension)과정을 40회 반복하였다. 유전자 증폭에 사용한 primer는 Table 1에 정리하였다.

2.9. 통계 분석

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준오차(mean \pm SEM)로 나타내었으며, 결과에 대한 통계는 GraphPad Prism (Version 3.0)을 이용하여 One-way analysis of variance (ANOVA)를 통해 유의성을 확인한 후 Dunnett's multiple comparison 또는 student's t-test 사후 검정을 진행하여 $p < 0.05$ 이하일 때 통계적 유의수준을 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 호장근 추출물 내 emodin 함량 분석

호장근의 유효성분으로 알려진 emodin은 항균, 항바이러스, 항염증, 혈관신생 억제 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다[27,30,31]. Emodin 표준용액을 농도별로 희석하여 HPLC 분석 후 y축을 피크 면적, x축을 농도로 하여 검량곡선을 작

Table 1. Primer sequence

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')
Filaggrin	Forward	5'-AAGCTTCATGGTGATGCGAC-3'
	Reverse	5'-TCAAGCAGAAGAGGAAGGCA-3'
HAS-2	Forward	5'-CAGAATCCAAACAGACAGTTC-3'
	Reverse	5'-TAAGGTGTTGTGTGTGACTG-3'
β -actin	Forward	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
	Reverse	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

성하였다(Fig. 1A). Emodin 검량곡선은 $y=57.09926x-22.19311$, 상관계수(r^2)는 0.99995로 우수한 직선성을 보였으며 emodin 표준용액의 retention time은 18.064 분으로 확인하였다. 이는 70% 에탄올로 추출한 호장근(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 내 emodin의 retention time과 일치하였으며 함량은 5.534 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 5.534% 포함됨을 확인하였다(Fig. 1B, 1C).

3.2. 항산화 활성

호장근 추출물의 항산화 활성은 ABTS⁺ radical 소거능 측정함으로써 평가하였다. ABTS⁺ radical은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)가 과황산칼륨(potassium persulfate)와 반응하여 형성되는 양이온 라디칼로, 짙은 청록색을 띠며 전자공여능이 큰 항산화 물질과 반응하면 라디칼이 소거되어 색이 없어지게 된다[1,2]. 호장근 추출물은 농도 의존적으로 ABTS⁺ radical을 소거하였으며 100, 25, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 97.82, 99.41, 98.75% 효능을 보였으며 양성대조군인 ascorbic

acid (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 98.63% 효능과 유사한 수준으로 나타나 항산화 활성이 우수함을 확인하였다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 Kim and Ryu, 2012의 결과에 따르면, 호장근 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 각각 209.2 ± 1.2 , 83.4 ± 2.0 mg/g으로 폴리페놀 함량이 더욱 높은 것으로 나타났으며[22] 본 연구 결과와 비교해볼 때, 호장근의 유효성분으로 확인한 emodin은 폴리페놀 화합물로 이로 인한 항산화 효능이 우수함을 알 수 있다.

3.3. 호장근과 emodin의 세포 독성

호장근과 emodin의 세포 독성평가를 위해 MTT assay와 LDH release assay를 진행하였다. HaCaT 세포에 호장근 추출물 또는 emodin을 농도별로 처치하여 24시간 동안 배양한 후 상층액을 수거하여 LDH release assay를 진행하였으며 새로운 배지로 교체하고 남아 있는 세포에 MTT (5 mg/mL) 용액을 첨가하여 세포 생존율을 평가하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 환원효소에 의해 MTT 시

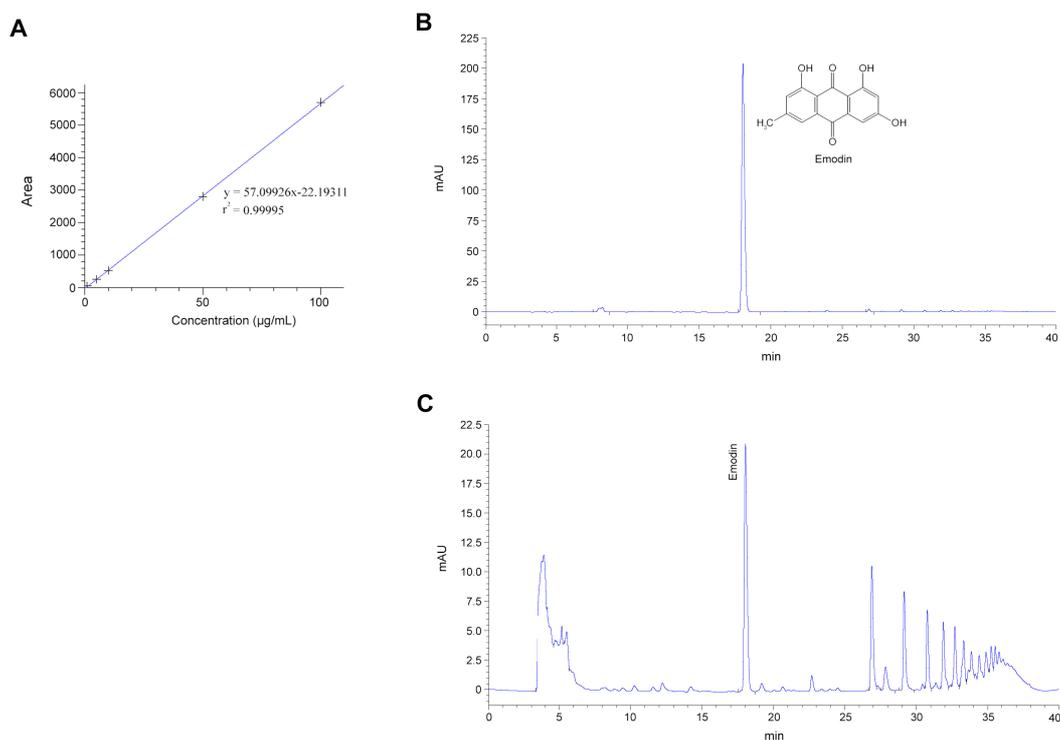


Fig. 1. HPLC analysis. (A) Calibration curve of emodin (B) Emodin (C) *Reynoutria japonica*

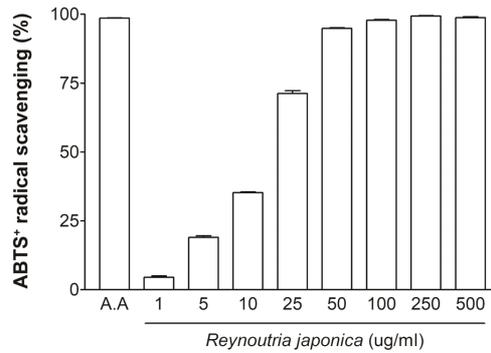


Fig. 2. Antioxidant effect of *Reynoutria japonica*. ABTS⁺ radical dose-dependently decreased by *Reynoutria japonica*. A.A; ascorbic acid

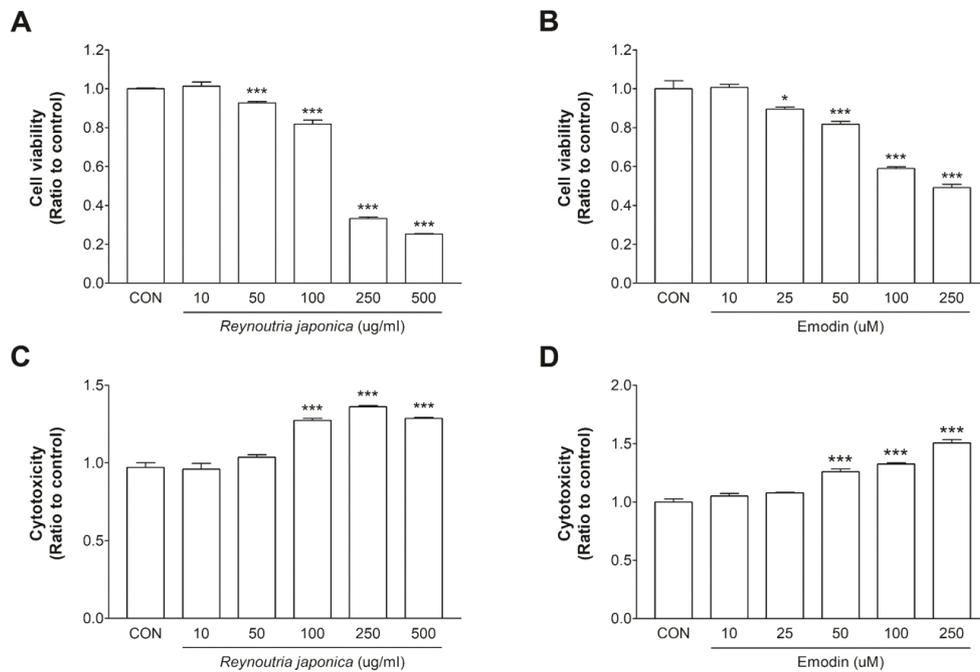


Fig. 3. Effect of *Reynoutria japonica* on cell viability and toxicity in HaCaT cells. Cell viability was measured by MTT assay and significantly decreased by *Reynoutria japonica* (A) and emodin (B) dose-dependently. Cell toxicity was determined by LDH release assay and significantly increased by *Reynoutria japonica* (C) and emodin (D) dose-dependently. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to control.

약이 불용성 물질인 formazan 결정을 형성하여 세포 내에 침전되어 이를 DMSO로 녹여내 흡광도를 측정함으로써 세포 생존율을 평가하는 법이다[1]. 세포 생존율 측정 결과, 대조군 대비 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 호장근 추출물에서 각

각 1.01, 0.93, 0.82, 0.33, 0.25배로 나타났으며 10, 25, 50, 100, 250 μM emodin에서 대조군 대비 각각 1.01, 0.90, 0.82, 0.33, 0.25배로 나타났다(Fig. 3A, 3B). 반면, LDH release assay는 세포 사멸 시 세포막 손상으로 인해 세포 외부로

분비되는 LDH 양을 반응물을 이용하여 간접적으로 측정함으로써 세포 독성을 평가하는 방법이다[32]. 실험 결과, 10, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 호장근 추출물에서 세포 독성이 대조군 대비 0.96, 1.04, 1.27, 1.36, 1.29배로 나타났으며 10, 25, 50, 100, 250 μM emodin에 의한 세포 독성은 대조군 대비 1.05, 1.08, 1.26, 1.32, 1.51배로 나타났다(Fig. 3C, 3D). 이와 같은 결과를 바탕으로 호장근 추출물(10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 emodin (10, 25 μM)의 유효성 평가를 위한 농도를 설정하였다.

3.4. HaCaT세포 내 피부 장벽 관련 인자 발현

3.4.1. 호장근 추출물이 filaggrin mRNA 발현에 미치는 영향

Filaggrin은 각질형성세포가 각질세포로 분화하는데 관여하고 케라틴 단백질을 응집시킴으로써 각질층 및 피부 장벽 형성에 중요한 역할을 한다. 또한 filaggrin은 최종적으로 amino acid로 분해되어 천연보습인자로서의 역할을 하여 피부 내 수분 증발을 억제하여 보습 및 피부 장벽 관련 인자로 작용하고 있다. 호장근이 filaggrin mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해, 배양된 HaCaT 세포에 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 호장근 추출물을 4시간 동안 처리한 후 RNA를 추출하여 유전자 발현을 평가하였다. 실험 결과, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 호장근 추출물에 의해 filaggrin mRNA 발현

율이 대조군 대비 각각 1.44, 1.69배로 농도의존적으로 유의하게 증가하였으며 특히 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 양성대조군인 EGCG의 효능에 비해 1.17배 우수한 것으로 나타났다(Fig. 4A). 호장근이 피부 표피에 미치는 영향에 관해 Lim et al., 2010에서 발표한 연구 결과에 따르면, hairless mouse에 5주간 UVB를 조사하여 피부 자극을 유도한 결과, UVB 자극에 의해 hairless mouse의 표피층의 비후와 염증이 발견되었으며 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 호장근 추출물을 도포한 군에서는 피부 표피 손상이 회복됨을 확인하였다[23]. 만성적인 자외선 노출은 표피의 과립층과 각질층을 과도하게 증가시켜 과각화증, 이상각화증 등을 유도하고 화상 및 염증 반응을 야기하여 심각한 피부 손상을 일으킨다[23]. 따라서 본 연구 결과와 Lim et al., 2020에서 발표한 결과를 종합해보면, 호장근에 의한 피부 표피 정상화 효능 기전은 filaggrin 유전자 발현의 증가에 따른 영향으로 볼 수 있으며, 피부 장벽 개선 및 강화를 위한 호장근의 가능성 소재로의 가능성을 제시한다.

3.4.2. Emodin이 filaggrin mRNA 발현에 미치는 영향

Emodin이 filaggrin mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해, 배양된 HaCaT 세포에 10, 25 μM emodin을 4시간 동안 처리한 후 RNA를 추출하여 유전자 발현을 평가하였다. 실험 결과, 10, 25 μM emodin에 의해 HaCaT 세포 내

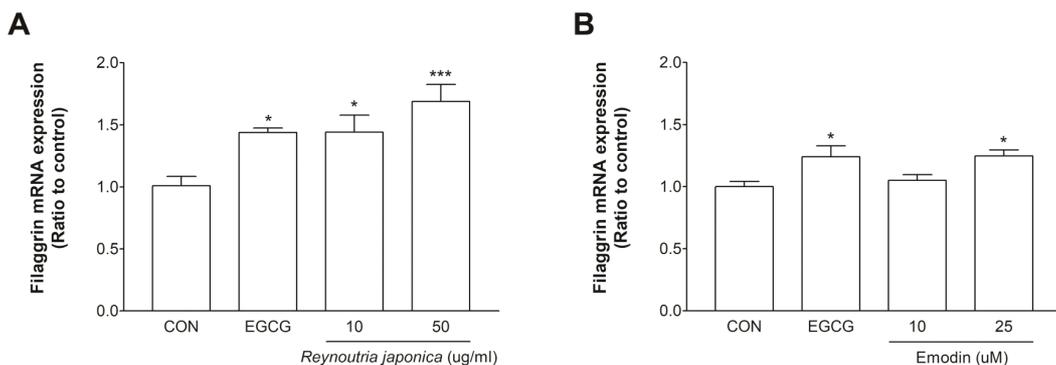


Fig. 4. Effects of *Reynoutria japonica* and emodin on filaggrin mRNA expression in HaCaT cells. Filaggrin mRNA significantly increased by *Reynoutria japonica* (A) and emodin (B) dose-dependently for 4 hr incubation. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to control. EGCG; (-)-Epigallocatechin Gallate.

filaggrin mRNA 발현이 대조군 대비 각각 1.05, 1.25배로 나타났으며, 25 μM emodin에서는 양성대조군인 EGCG의 효능과 유사하게 나타났다 (Fig. 4B). 이러한 결과는 호장근에 의한 filaggrin 유전자 발현 증가와 일치하여 호장근의 유효성분이 emodin임을 확인하였다. 또한 Kim et al., 2021에서 보고한 emodin의 항염증 및 피부 장벽 개선에 관한 연구 결과와 비교하였을 때, TNF- α /IFN- γ (10 ng/ml)로 염증을 유도한 각질형성세포에서 감소한 filaggrin mRNA 발현이 20 μM emodin에 의해 대조군과 유사한 수준으로 회복된 것으로 보아[33], 본 연구에서 나타난 emodin의 filaggrin 유전자 발현 증가 효능과 일치하였으며, 이와 같은 결과는 emodin은 손상된 피부 장벽 개선뿐만 아니라 정상 상태에서도 피부 장벽 강화 효능이 있음을 알 수 있다. 특히 filaggrin은 단백질분해효소에 의해 아미노산으로 분해되어 천연보습인자를 형성하므로 emodin에 의한 filaggrin 유전자 발현 증가는 보습효능도 함께 강화될 것으로 사료된다.

3.5. HaCaT 세포 내 피부 보습인자의 발현

3.5.1. 호장근 추출물이 HAS-2 mRNA 발현에 미치는 영향

Hyaluronic acid synthase-2 (HAS-2)는 각질형성세포와 섬유아세포에서 hyaluronic acid 합성에 관여하여 피부 내 보습 유지에 중요한 역할을

하며 피부 장벽 손상은 수분 증발을 증가시켜 피부 건조증, 가려움, 감염 등이 발생할 수 있다 [12,13]. Real time PCR을 이용하여 호장근 추출물이 HAS-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 호장근 추출물에 의해 HAS-2 mRNA 발현이 대조군에 비해 각각 1.41, 1.80배 증가하였으며 양성대조군으로 사용한 EGCG의 효능 대비 각각 1.04, 10.33배 증가하여 피부 보습능 증가 효능이 우수한 것으로 나타났다(Fig. 5A). 이와 같은 결과는 호장근 추출물이 피부 장벽을 강화함과 동시에 피부 내 수분 함량 증가에도 영향을 미쳐 피부 건조증, 아토피 피부염 등의 피부 질환에서도 개선 효능이 우수할 것으로 예상된다. 이와 관련된 연구 결과로 Lim et al., 2010에서 자외선을 조사하여 hairless mouse의 표피에 피부 손상을 유도한 후 피부 수분함량을 측정된 결과, 자외선 자극군에 비해 1000 $\mu\text{g/ml}$ 호장근 추출물을 도포한 군에서 피부 수분 함량이 약 1.13배 개선되었다[23]. 이러한 호장근에 의한 피부 수분 함량 증가는 본 연구 결과의 HAS-2 유전자 발현 증가와 일치하였다. 따라서 본 연구 결과는 호장근의 보습능 강화 효능 기전이 hyaluronic acid 합성과 관련되어 있음을 제시한다.

3.5.2. Emodin이 HAS-2 mRNA 발현에 미치는 영향

호장근의 유효성분인 emodin이 각질형성세포 내

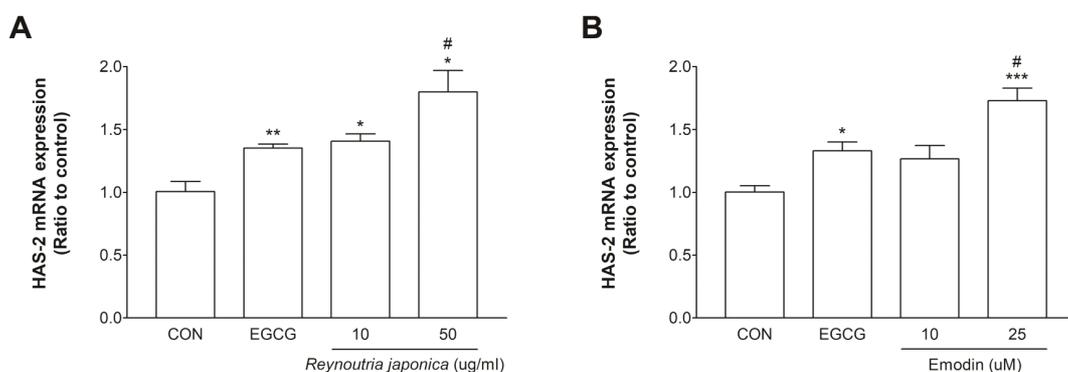


Fig. 5. Effects of *Reynoutria japonica* and emodin on HAS-2 mRNA expression in HaCaT cells. HAS-2 mRNA significantly increased by *Reynoutria japonica* (A) and emodin (B) dose-dependently for 4 hr incubation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control; # $p < 0.05$ compared to EGCG.

HAS-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해 real time PCR을 진행하였다. 실험 결과, emodin 10, 25 μM 을 4시간 동안 처리한 결과, HAS-2 mRNA 발현이 대조군 대비 각각 1.27, 1.73배 증가하였으며 양성대조군인 EGCG에 비해 각각 0.96, 1.31배 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 이러한 결과는 호장근 추출물과 emodin의 보습능 증가 효능이 일치하였으며 emodin이 호장근의 유효성분으로서 작용함을 제시하였다. Emodin은 호장근, 적하수오(*Polygonum multiflorum*), 대황(*Rheum palmatum*), 알로에 베라(*Aloe vera*) 등에 포함된 폴리페놀 화합물로 항산화, 항염 효능이 우수한 것으로 알려져 있다[34-36]. 특히 알로에는 피부 진정, 보습을 위한 제품으로 시중에 많이 출시되어 있으며 상처치유에도 효능이 있으므로 알려져 있다[36]. 따라서 피부 장벽 강화 효능과 더불어 hyaluronic acid 합성 과정을 활성화 시키는 emodin의 효능을 바탕으로 호장근 추출물을 이용하여 wound healing을 위한 제품화 연구의 필요성도 고려해 볼 수 있다.

4. 결론

본 연구에서는 호장근 추출물의 피부 장벽 및 보습능 강화를 위한 기능성 소재로서의 활용 가능성을 제시하는 것을 목표로 하였다. 이를 위해 호장근 추출물 내 유효성분인 emodin의 함량 분석과 호장근 추출물의 항산화 효능을 연구하였으며, 유효성 평가를 위해 각질형성세포 내에서 피부 장벽과 보습 관련 인자의 유전자 발현을 비교하였다. 먼저, 유효성분으로 설정한 emodin의 호장근 추출물 내 함량은 5.53%임을 확인하였으며 호장근 추출물의 ABTS⁺ radical 소거능은 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 97.82, 99.41, 98.75% 효능을 보여 양성대조군인 ascorbic acid (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 98.63% 효능과 유사한 수준으로 나타나 항산화 효능이 매우 우수함을 확인하였다. 다음으로, 유효성 평가를 위해 각질형성세포에 호장근 추출물과 emodin을 각각 처리한 후 filaggrin과 HAS-2 mRNA 발현을 평가하였다. 그 결과, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 호장근 추출물에 의해 filaggrin mRNA 발현이 대조군에 비해 각각 1.44, 1.69배 증가하였으며 HAS-2 mRNA의 발현은 대조군에 비해 각각 1.41, 1.80배 증가하는 것으로 나타났다. 또한 10, 25 μM emodin에 의

해 filaggrin mRNA 발현이 대조군 대비 각각 1.05, 1.25배 증가하였으며 HAS-2 mRNA 발현은 대조군 대비 각각 1.27, 1.73배 증가하여 호장근 추출물과 그 유효성분인 emodin의 피부 장벽 강화 및 보습능 증가 효능을 입증하였다.

피부는 외부로부터 신체를 방어하는 일차적인 방어 기전으로 작용하며 특히 표피층은 피부 장벽으로서 이물질의 침투, 피부 내 수분 증발 억제 등의 역할을 함으로써 신체를 보호한다[1,2]. 호장근 추출물은 이러한 피부 장벽 기능 및 보습능을 강화하여 피부 질환 예방 및 개선, 항노화를 위한 기능성 화장품의 천연 소재로서의 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 재단법인부산테크노파크에서 지원하는 지식학협력 기업R&D 지원사업의 지원을 받아 수행된 연구결과이다.

References

1. E. J. Kang, Y. Jang, J. Lee, S. H. Kim, S. Kim, J. Bak, Y. Choi, "The Effects of *Chamaecyparis obtusa* Oil on Anti-Wrinkle, Skin-Barrier and Moisturizing", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.40, No.2 pp. 309-321, (2023).
2. H. B. Kang, Y. Choi, J. Bak, Y. 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).
3. M. Kim, "Skin Barrier and Protein", *Journal of Skin Barrier Research*, Vol.11, No.1 pp. 28-34, (2009).
4. H. Y. Yu, I. J. Yang, V. R. Lincha, I. S. Park, D. 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).
5. Hwang J. *화장품과 피부과학 연구동향*. pp. 43–49, Korea Health Industry Development Institute, (2001).
 6. J. S. Oh, H. H. Jang, “Epidermal Differentiation and Skin Barrier”, *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, Vol.13, No.6 pp. 713–720, (2015).
 7. M. Hashimoto, K. Maeda, “New Functions of Low-Molecular-Weight Hyaluronic Acid on Epidermis Filaggrin Production and Degradation”, *Cosmetics*, Vol.8, No.4 pp. 118, (2021).
 8. E. Kim, Y. Moon, Y. Jang, “Skin Moisturizing Properties and Anti-Inflammatory effects of extracts from *Coptis chinensis* in HaCaT cells”, *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.3 pp. 870–888, (2021).
 9. S. Park, S. Ho, D. Kim, Y. Shin, J. O. Lee, Y. Kim, J. M. Lee, Y. Jang, “Effects of PB203 on the Skin Photoaging of Ultraviolet B (UVB)-irradiated Hairless Mice and Human keratinocytes”, *Journal of Biomedical and Translational Research*, Vol.23, No.4 pp. 215–234, (2022).
 10. X. Wang, L. Ye, Q. Lai, S. Wen, Z. Long, X. Qiu, P. M. Elias, B. Yang, M. Man, “Altered Epidermal Permeability Barrier Function in the Uninvolved Skin Supports a Role of Epidermal Dysfunction in the Pathogenesis of Occupational Hand Eczema”, *Skin Pharmacology and Physiology*, Vol.33, No.2 pp.94–101, (2020).
 11. F. Renò, V. Rocchetti, M. Migliario, M. Rizzi, M. Cannas, “Chronic Exposure to Cigarette Smoke Increases Matrix metalloproteinases and Filaggrin mRNA Expression in Oral keratinocytes: role of nicotine stimulation”, *Journal of Oral Oncology*, Vol.47, No.9 pp. 827–830, (2011).
 12. G. M. O’Regan, A. Sandilands, W. H. I. McLean, A. D. Irvine, “Filaggrin in Atopic Dermatitis”, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol.122, pp. 689–693, (2008).
 13. M. H. Kwon, K. Min, Y. Kim, “Inhibitory Effects of *Peonia japonica* Water Extract on Skin Aging (I) – Focussed on Alleviative Effects of Inflammation and Skin Barrier Damage –”. *The Korean Society of Environmental Health and Toxicology*, Vol.24, No.2 pp. 159–167, (2009).
 14. S. H. Kim, “A Study on the Effects of Skin Barrier Damage on TEWL and the Efficacy of *Jojoba* oil in Skin Barrier Restitution”, *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, Vol.3, No.1 pp. 189–200, (2005).
 15. S. B. Kwon, G. T. Lee, S. J. Choi, N. K. Lee, H. W. Park, K. S. Lee, K. K. Lee, K. J. Ahn, I. S. An, “The Effect of Glycerin, Hyaluronic Acid and Silicone Oil on the Hydration, Moisturization and Transepidermal Water Loss in Human Skin”, *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, Vol.11, No.4 pp. 761–768, (2013).
 16. E. H. Choi, N. Y. Yoon, “Pathogenesis of Atopic Dermatitis”, *Journal of the Korean Medical Association*, Vol.57, No.3 pp. 218–225, (2014).
 17. M. J. Kim, B. S. Hwang, Y. Hwang, Y. T. Jeong, D. W. Jeong, Y. T. Oh, “Anti-Inflammatory and Antiatopic Effects of *Rorippa cantoniensis* (Lour.) Ohwi in RAW 264.7 and HaCaT Cells”, *Molecules*, Vol.28, No.14 pp. 5463, (2023).
 18. R. Wang, S. Yan, X. Ma, J. Zhao, Y. Han, Y. Pan, H. Zhao, “The Pivotal Role of Bifida Ferment Lysate on Reinforcing the Skin Barrier Function and Maintaining Homeostasis of Skin Defenses *in vitro*”, *Journal of Cosmetic Dermatology*, doi:10.1111/jocd.15831, (2023).
 19. S. Park, I. Jo, S. Park, M. Park, Y. Mun, “*Poria cocos* Extract from Mushrooms Stimulates Aquaporin-3 via the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway”, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, Vol.15, pp. 1919–1931, (2022).

20. Y. Yoshino, K. Marunaka, M. Kobayashi, H. Matsunaga, S. Shu, T. Matsunaga, A. Ikari, "Protective Effects of Ethanol Extract of Brazilian Green Propolis and Apigenin against Weak Ultraviolet Ray-B-Induced Barrier Dysfunction via Suppressing Nitric Oxide Production and Mislocalization of Claudin-1 in HaCaT Cells", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.22, No.19 pp. 10326, (2021).
21. K. Yang, Y. Sung, H. K. Kim, "Antithrombotic Effect and Antiplatelet Activity of *Polygonum cuspidatum* Extract", *The Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.41, No.2 pp. 168-173, (2012).
22. M. Kim, M. Ryu. "Inhibition of Melanogenesis and Anti-UV properties *Reynoutria elliptica*", *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*, Vol.10, No.4 pp.961-968, (2012).
23. A. Lim, Y. Jung, K. Kim, Y. Kim, J. Kwak, J. Hong, H. Y. Kim, D. Kim, "Skin UVB Photo Aging Effect from Extract of Fermented *Reynoutria elliptica*", *The Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.39, No.3 pp. 369-375, (2010).
24. J. Chang, H. Liu, K. Wang, M. Chen, L. Chiang, Y. Hua, C. Lin, "Ethanol Extract of *Polygonum cuspidatum* Inhibits Hepatitis B virus in a Stable HBV-producing Cell line", *Antiviral Research*, Vol.66, pp. 29-34, (2005).
25. J. Hwang, Y. Park, Y. Kim, J. Kim, C. Lim, "Isolation and Identification of Antifungal Compounds from *Reynoutria elliptica*", *Journal of Agricultural Science*, Vol.39, No.4 pp. 583-589, (2012).
26. B. R. Kim, J. Ha, S. Lee, J. Park, S. Cho, "Anti-cancer Effects of Ethanol Extract of *Reynoutria japonica* Houtt. radix in Human Hepatocellular Carcinoma Cells via Inhibition of MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.245, pp. 112-179, (2019).
27. H. Jung, S. Roh, M. Oh, "The Effects of *Polygonum Cuspidatum* on the Skin Functions", *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*, Vol.19, No.1 pp. 73-89, (2009).
28. H. Zhang, C. Li, S. Kwok, Q. Zhang, S. Chan, "A Review of the Pharmacological Effects of the Dried Root of *Polygonum cuspidatum* (Hu Zhang) and Its Constituents", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol.2013, pp. 13, (2013).
29. E. Kim, J. Kim, H. K. Kim, Y. Jang "Antimicrobial and Anti-inflammatory Effects of the Ethanol Extract of *Polygonum cuspidatum* as a Mouthwash Component", *Natural Product Communications*, Vol.16, No.4 doi:10.1177/1934578X211005255, (2021).
30. T. Lee, J. Kim, J. So, "Emodin from *Polygonum cuspidatum* showed Angiogenesis Inhibiting Activity in vitro", *The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, Vol.46, No.1 pp. 50-54, (2003).
31. C. Hsu, Y. Chan, J. Chang, "Antioxidant Activity of Extract from *Polygonum cuspidatum*", *Biological Research*, Vol.40, No.1 pp. 13-21, (2007).
32. J. Bak, H. J. Kim, S. Y. Kim, Y. Choi, "Neuroprotective Effect of Caffeic acid Phenethyl Ester in 3-nitropropionic acid-induced Striatal Neurotoxicity", *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol.20, No.3 pp. 279-286, (2016).
33. S. Kim, J. Choi, Y. Jang, "Emodin Studies on Anti-inflammatory and Skin Improvement Activities", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.38, No.6 pp. 1383-1392, (2021).
34. S. M. Ahn, H. N. Kim, Y. R. Kim, Y. W. Choi, C. M. Kim, H. K. Shin, B. T. Choi, "Emodin from *Polygonum multiflorum* ameliorates oxidative toxicity in HT22 cells and deficits in photothrombotic ischemia", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.188, pp. 13-20, (2016).

35. I. Y. Hwang, C. S. Jeong, "A Study on the Antigastric Effects of Rheum Species Extracts and Their Active Components", *Journal of Food Hygiene Safety*, Vol.28, No.4 pp. 330-336, (2013).
36. K. J. Lee, W. Jang, Y. A. Kim, B. J. Park, H. Kang, "Antioxidant, Inhibitory on NO Production and *In-vitro* Cell Regeneration Effects of Pink-aloe", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.46, No.3 pp. 273-282, (2020).