

The Food and Life has published all type articles such as research articles, review articles, survey articles, research note, short communication or editorial since 2020. It covers the all scientific and technological aspects of food and life science.

<https://www.foodnlife.org>



개머루덩굴 추출물의 자극에 의한 피부장벽 개선 효과

박선경¹, 임형진¹, 원영선¹, 박은재¹, 오제훈², 김지은², 이민자², 이소영¹, 이승웅¹, 이승재^{1,3,*}, 노문철^{1,*}

¹기능성바이오표재연구센터 한국생명공학연구원

²주영엔에스(주)

³응용바이오표재전공 과학기술연합대학원대학교

Effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract on skin barrier function

Seon Gyeong Bak¹, Hyung Jin Lim¹, Yeong-Seon Won¹, Eun Jae Park¹, Je Hun Oh², Ji Eun Kim², Min Jee Lee², Soyoung Lee¹, Seung Woong Lee¹, Seung Jae Lee^{1,3,*}, Mun Chual Rho^{1,*}

¹Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup 56212, Korea

²Ju Yeong NS Co., Ltd., Seoul 05854, Korea

³Applied Biological Engineering, KRIBB School of Biotechnology, University of Science and Technology, Daejeon 34113, Korea

Abstract

The skin is the largest organ that blocks invasion to the outside. Due to external stimuli, the skin barrier collapses and immune function abnormalities occur. This leads to skin diseases such as atopic dermatitis and psoriasis. Through this study, we attempted to develop a natural material that can be used for various dermatitis diseases. In this study, the gene expression of skin barrier-related proteins was confirmed using tumor necrosis factor- α /interferon- γ -stimulated HaCaT cells through real-time PCR. As a result, it was confirmed that the gene expression of skin barrier-related proteins and ceramide-related proteins was improved by the ABE-M. In this study, it was confirmed that the gene expression of filaggrin, involucrin, and loricrin, which are skin barrier-related proteins, was improved by ABE-M, and it was confirmed that the gene expression of the tight junction-related proteins, occludin and zonula occludens proteins-1, was also increased. As such, it is expected that ABE-M can be used as a material for skin inflammation such as atopic dermatitis.

Keywords: skin barrier, tight junction, serine palmitoyltransferase (SPT), ceramidase

서론

피부는 외부로부터 몸을 보호하는 역할을 하며, 인체에서 가장 큰 기관이다. 피부는 크게 표피와 진피로 구분되며, 표피는 각질 형성 세포로 분화 전도에 따라 기저층, 유극층, 과립층, 각질층으로 나뉜다(Benson, 2012). 피부 장벽의 주요 단백질은 filaggrin (FLG), involucrin (IVL), loricrin (LOR) 및 ceramide로 구성되어 있으며, 각질층에 존재한다(Howell et al., 2009; Imokawa and Ishida, 2014; Kim et al., 2008). 또한 표피층에 존재하는 tight junction을 구성하는 단백질은 claudin, occludin, zonula occludens proteins(ZO)-1 등이 있다(Bäsler and Brandner, 2017;

Bäsler et al., 2016). 하지만, 피부 장벽의 붕괴는 외부 물질의 유입으로 인해 피부 하층의 대식세포, T 세포 등의 면역세포 활성화를 도모함으로써 염증 환경을 조성한다(Bäsler and Brandner, 2017). 하여, 이는 염증 환경의 조성으로 인해 아토피 피부염과 건선 등의 피부질환의 원인이 된다. 최근 연구에 따르면, FLG, LOR, 및 ceramide 등의 피부 장벽 단백질들의 유지를 통해 건선 병변의 완화에 도움을 준다는 흥미로운 결과를 보여준다. 또한, 각질 세포에서 활성화된 STAT3에 의해 피부 장벽 기능이 붕괴되어 건선과 유사한 피부질환이 발생함을 확인한 바 있다(Sano, 2015). 일반적으로 피부질환 치료를 위해

*Corresponding author : Seung Jae Lee. Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup 56212, Korea. Tel: +82-63-570-5267, Fax: +82-63-570-5239, E-mail: seung99@kribb.re.kr

Mun Chual Rho. Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup 56212, Korea. Tel: +82-63-570-5230, Fax: +82-63-570-5239, E-mail: rho-m@kribb.re.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

스테로이드 제제 및 항히스타민제제 등을 사용하나, 사용 기간에 따른 피부 부작용을 초래한다(Arellano et al., 2007; Hajar et al., 2015). 따라서 안전하고 효과적인 치료제 연구가 필요하며, 이를 위해 천연 소재를 이용한 소재 발굴을 하고자 한다.

개머루덩굴은 포도과 개머루 속에 속하는 낙엽성 덩굴 식물로, 아시아와 북미 동부, 멕시코, 과테말라에 널리 분포하여 자생한다(Byng, 2014). 개머루 덩굴의 전통 약용은 허준의 동의보감과 중국의 한약서에 잘 기록되어 있다(Yan et al., 2018). 개머루 덩굴의 효능은 개머루덩굴의 메탄올 추출물은 리놀산과산화와 플라스미드 DNA 산화를 억제 시켰으며(Wu et al., 2004), 개머루덩굴의 에탄올 추출물은 항산화능이 있으며(Rhim and Choi, 2010), JAK2/STAT3의 신호전달을 억제 통해 항염증 활성이 보고되었다(Jang et al., 2018). 또한, 개머루 덩굴 에탄올 추출물이 아토피 피부염의 염증 억제하는 등의 약리 활성이 보고되었다(Choi et al., 2019). 앞선 연구에 따라, 피부염의 완화는 피부 장벽 유지와 연관이 있음이 보고되었기에, 본 연구를 통해 개머루덩굴의 피부 장벽 유지 효능을 확인함에 따라 치료제로서의 소재 가능성뿐만 아니라, 다양한 적용점을 제시하고자 수행되었다.

재료 및 방법

재료 준비

개머루 건조 줄기 39 kg을 추출기에 넣고 55% 주정 468 L를 가하여 78°C에서 9시간 추출한 다음, 1 µm 카트리지 필터를 이용하여 여과하고 고형분 함량 20%가 되도록 농축하였다. 개머루 덩굴 추출물의 성분비가 추출물 80%, 부형제 20%가 되도록 적정량의 부형제(말토덱스트린, (주)대상)를 넣어 혼합하고 분무 건조하여 4.8 kg의 개머루 덩굴 추출물(제조번호: JY206M M210930)을 얻었으며, 수율은 12.3%로 나타내었다.

세포 배양

인간 각질세포주인 HaCaT 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco), 1% penicillin/streptomycin을 배합한 배지에 의해 배양되었으며, 5% CO₂를 지속해서 공급하는 37°C 배양기 내에서 유지되었다.

실시간 중합효소 연쇄반응

세포의 RNA는 TRIzol에 의해 추출하였다. 1 µg의 RNA를 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit(Takara Bio, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였으며, 유전자 발현을 비교 측정하기 위해 Real-time PCR을 진행하였다. 실험이

사용된 특정 Taqman Gene expression assay는 다음과 같다: FLG(Hs00856927_g1), IVL(Hs00846307_s1), LOR(Hs01894962_s1), occludin(Hs05465837_g1), ZO-1(Hs01551867_m1), SPT1(Hs00272311_m1), SPT2(Hs01027014_m1), Ceramidase(ASA2, Hs01015655_m1).

통계 분석

연구 자료의 분석을 위해 Prism 5 소프트웨어 프로그램(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 이용하였으며, 등분산 가정하에 $p < 0.01$ 로 유의 수준을 정하였다.

결과

Improvement of skin barrier function of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract

우리는 각질세포인 HaCaT 세포에서 개머루 덩굴 추출물이 주요 피부 장벽의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 1과 같이 피부 장벽 단백질인 FLG, IVL, 및 LOR의 유전자 발현은 대조군 세포에 비해 tumor necrosis factor(TNF)- α /interferon(IFN)- γ 로 감작 처리한 세포에서 유의하게 감소하였다. 그러나 개머루 덩굴 추출물 처리그룹에서는 농도의존적으로 회복되는 것을 확인하였다. 이는 개머루 덩굴 추출물이 피부 장벽 단백질을 회복 능력이 있는 것으로 나타나고 이에 밀착 접합 주요 요인을 분석하였다.

Tight junction improvement effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract

밀착 접합은 피부 장벽으로서 각질층과 보완적인 기능을 수행하는 것으로 보고되어 있는데, 본 연구에서는 이러한 밀착 접합을 구성하는 occludin 및 ZO-1 단백질의 발현에 개머루 덩굴 추출물이 미치는 영향에 대해 조사하였다. Occludin, ZO-1의 분석 결과, 대조군에 비해 TNF- α /IFN- γ 처리군에서 유의하게 감소하였고, 개머루 덩굴 추출물 처리 그룹에서 농도의존적으로 회복하는 현상을 확인하였다(Fig. 2).

Ceramide-improving effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract

Ceramide 합성을 조절하는 효소인 serine palmitoyltransferase(SPT) 1, 2의 유전자 발현은 대조군에 비해 TNF- α /IFN- γ 처리군에서 유의하게 감소하였고, 개머루 덩굴 추출물 처리시 유의적으로 발현량이 증가함을 확인하였다(Fig. 3). 또한, ceramidase의 유전자 발현은 대조군에 비해 TNF- α /IFN- γ 처리시 증가한 반면, 개머루 덩굴 추출물 처리 그룹에서 농도의존적으로 감소되었다.

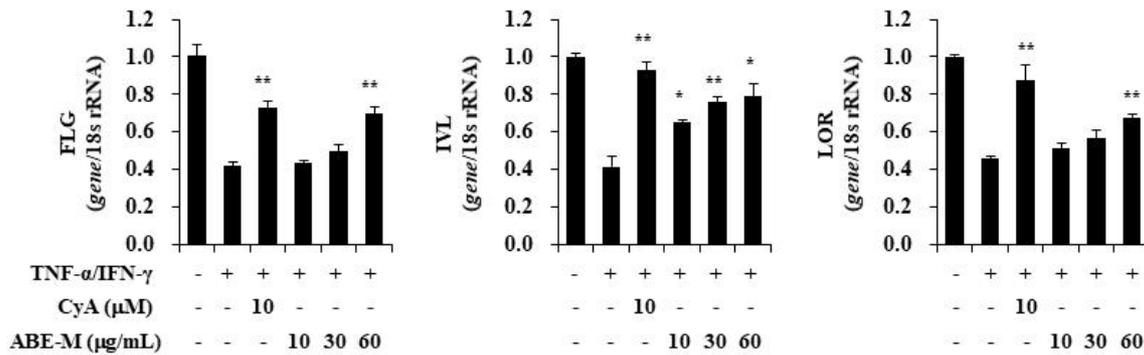


Fig. 1. Effect of ABE-M on gene expression level of skin barrier proteins in TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation. Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- α /IFN- γ for 24 h, and RNA was extracted from the cells using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. * p <0.05, ** p <0.01 compared with the TNF- α /IFN- γ -stimulated group. FLG, filaggrin; IVL, involucrin; LOR, loricrin; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon.

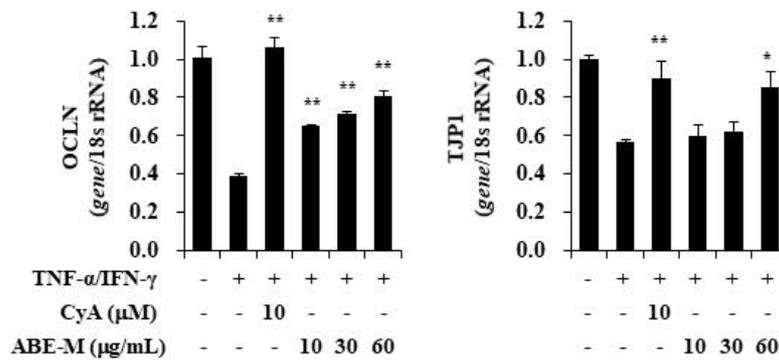


Fig. 2. Effect of ABE-M on gene expression level of tight junction proteins in TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation. Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- α /IFN- γ for 24 h, and RNA was extracted from the cells using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. * p <0.05, ** p <0.01 compared with the TNF- α /IFN- γ -stimulated group. OCLN, occludin; TJP1, tight junction protein 1; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon.

고찰

인체의 항상성 유지에도 매우 중요한 신체 기관 중 일부인 피부는 외부환경의 다양한 자극으로부터 신체를 보호(Yoon et al., 2013)하는 것으로 잘 알려져 있는데, 과도한 자외선 노출, 미세먼지, 미생물의 번식 등의 외부 자극은 피부 세포의 DNA 돌연변이, 세포막 및 단백질 손상, 노화, 면역 기능 이상 등의 문제점을 야기한다. 이러한 결과들은 특히 두드러기, 건선, 습진, 접촉성 피부염, 아토피 피부염과 같은 염증성 피부질환으로 이어지는 것으로 알려져 있다(Benson, 2012). 피부에 염증 자극이 발생하면 면역 세포인 대식세포가 활성화되어 nitric oxide, prostaglandin E2, TNF- α , 및 interleukin(IL) 같은 염증반응의 유발인자들이 분비된다(Saha et al., 2017). 또한 피부염 환자

피부에서는 피부 장벽 약화 및 보습 기능 저하가 흔히 관찰(Morita and Miyachi, 2003)되는데, 일반적으로 피부 장벽 조절과 보습에는 tight junction이 직접적으로 관여한다. 대표적인 tight junction 단백질인 claudin과 occludin 단백질은 transmembrane domain을 포함하고 있어 세포막 내에 존재하고, ZO-1 그리고 ZO-2 단백질이 함께 결합하여 신호 전달에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 수분 또는 이온들의 이동을 조절(González-Mariscal et al., 2003; Tsukita et al., 2001)한다. 이는 아토피 피부염 같은 염증성 피부질환에서 피부 장벽 보호 지표 물질로 볼 수 있다. 본 연구에서 외부 자극에 의한 붕괴된 피부 장벽의 개선 효과를 확인한 결과, 피부 장벽 기능을 이루는 단백질인 FLG, IVL, 및 LOR이 HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 처리에

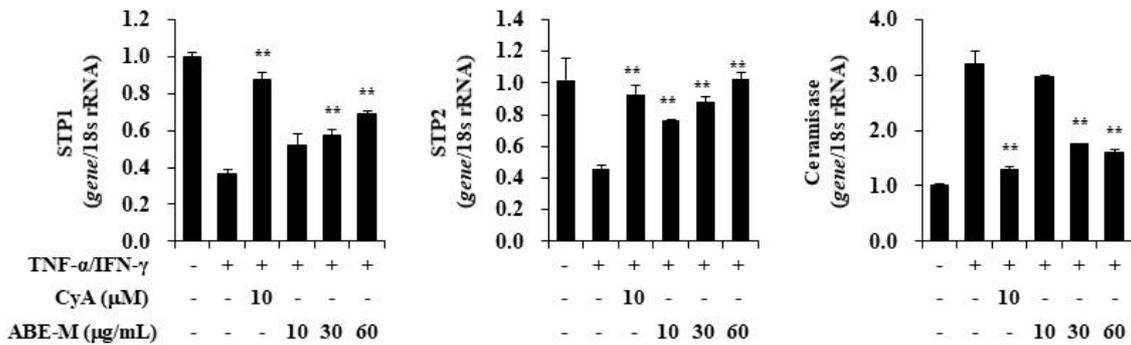


Fig. 3. Effect of ABE-M on gene expression level of SPT1,2 and ceramidase in TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation. Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- α /IFN- γ for 24 h, and RNA was extracted from the cells using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. ** $p < 0.01$ compared with the TNF- α /IFN- γ -stimulated group. SPT, serine palmitoyltransferase; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon.

의해 무처리군 대비 현저히 감소했으나, 개머루 덩굴 추출물에 의해 농도의존적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었고(Fig. 1), Tight junction 단백질인 occludin, ZO-1의 유전자 발현이 개머루 덩굴 추출물에 의해 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Ceramide는 지질 분자의 하나로써, 피부 장벽을 유지하고 각질 세포 간의 구조적 안전성을 유지하는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Elias and Menon, 1991). 또한, 각질 형성 세포의 외부를 둘러싸고 있는 대표적인 수분 보유 물질로 아토피성 피부염에서는 ceramide가 감소한다고 보고되어지기 때문에 ceramide 생성 및 유지는 아토피 피부염 치료의 중요한 요인으로 작용될 수 있다(Imokawa and Ishida, 2014). 이러한 ceramide는 단백질 및 인지질의 분해 과정에서 얻어지는 serine과 palmitoyl-CoA과의 결합 후 SPT에 의해 합성되며, 이후 sphingosine 대사과정을 거쳐 ceramidase에 의해 sphingosine과 fatty acid로 분해된다(Hong et al., 2007). 따라서, 피부질환에서 SPT의 level은 피부 장벽의 손실 정도를 나타내는 중요한 척도로 사용될 수 있기 때문에, 본 연구에서는 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 염증 환경이 조성된 HaCaT 세포에서의 SPT level을 분석하였고 결과로 SPT level이 유의적으로 저하되는 것을 확인할 수 있었고, 개머루 덩굴 추출물 처리에 의해 회복되는 것을 확인하였으며, ceramidase 또한 개머루 덩굴 추출물 처리에 의해 저해되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이는, 개머루덩굴이 SPT의 활성을 유지시키고 ceramidase를 억제함으로써 피부 장벽을 유지시킴에 도움을 줄 수 있음을 시사한다. 이처럼 본 연구에서 사용한 개머루 덩굴 추출물은 피부 장벽을 강화하고 수분 함량 또한 증가됨으로써 피부질환 개선을 위한 천연물 소재로의 활용 가능성이 매우 높을 것으로 예상되지만 이를 증명하기 위해 세포모델에서의 기전연구와 인공피부를 활용한 추가적인 연구

가 필요하다.

Conflicts of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry (IPET) Technology Commercialization Support Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (821024-03), and the KRIBB Research Initiative Program (KGM5242221).

Ethics Approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants

Author Contributions

Conceptualization: Bak SG, Lee SJ, Rho MC.

Data curation: Bak SG, Lim HJ.

Formal analysis: Bak SG, Lim HJ, Won YS.

Methodology: Oh JH, Kim JE, Lee MJ.

Investigation: Park EJ.

Writing - original draft: Bak SG, Lee SJ.

Writing - review & editing: Bak SG, Lim HJ, Won YS, Park EJ, Oh JH, Kim JE, Lee MJ, Lee S, Lee SW, Lee SJ, Rho MC.

Author Information

Seon Gyeong Bak (Post Doctoral Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0002-9035-5002>

Hyung Jin Lim (Post Doctoral Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0002-0158-6766>

Yeong-Seon Won (Post Doctoral Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0009-0000-0950-7834>

Eun Jae Park (Doctor's student, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0003-2283-210X>

Je Hun Oh (Researcher, Ju Yeong NS Co., Ltd.)

<https://orcid.org/0009-0008-5572-060X>

Ji Eun Kim (Researcher, Ju Yeong NS Co., Ltd.)

<https://orcid.org/0009-0001-9535-8341>

Min Jee Lee (Researcher, Ju Yeong NS Co., Ltd.)

<https://orcid.org/0000-0002-6647-4554>

Soyoung Lee (Senior Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0002-9949-6477>

Seung Woong Lee (Principal Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0003-1025-7363>

Seung Jae Lee (Senior Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0002-1908-7666>

Mun Chual Rho (Principal Researcher, KRIBB)

<https://orcid.org/0000-0003-0855-3585>

References

- Arellano FM, Wentworth CE, Arana A, Fernández C, Paul CF. 2007. Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 127:808-816.
- Bäsler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner JM. 2016. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release* 242:105-118.
- Bäsler K, Brandner JM. 2017. Tight junctions in skin inflammation. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 469:3-14.
- Benson HAE. 2012. Skin structure, function, and permeation. In *Topical and transdermal drug delivery: Principles and practice*. 1st ed. Benson HAE, Watkinson AC (ed). John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA. pp 1-22.
- Byng JW. 2014. *The flowering plants handbook: A practical guide to families and genera of the world*. Plant Gateway, Hertford, UK.
- Choi YA, Yu JH, Jung HD, Lee S, Park PH, Lee HS, Kwon TK, Shin TY, Lee SW, Rho MC, Jang YH, Kim SH. 2019. Inhibitory effect of ethanol extract of *Ampelopsis brevipedunculata* rhizomes on atopic dermatitis-like skin inflammation. *J Ethnopharmacol* 238:111850.
- Elias PM, Menon GK. 1991. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 24:1-26.
- González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81:1-44.
- Hajar T, Leshem YA, Hanifin JM, Nedorost ST, Lio PA, Paller AS, Block J, Simpson EL. 2015. A systematic review of topical corticosteroid withdrawal (“steroid addiction”) in patients with atopic dermatitis and other dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 72:541-549.
- Hong KK, Cho HR, Ju WC, Cho Y, Kim NI. 2007. A study on altered expression of serine palmitoyltransferase and ceramide in psoriatic skin lesion. *J Korean Med Sci* 22:862-867.
- Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DYM. 2009. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 124:R7-R12.
- Imokawa G, Ishida K. 2014. Role of ceramide in the barrier function of the stratum corneum, implications for the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Clin Exp Dermatol Res* 5:206.
- Jang HJ, Lee SJ, Lim HJ, Jung K, Lee S, Park CS, Lee SW, Rho MC. 2018. Inhibitory effects of compounds and extracts from *ampelopsis brevipedunculata* on IL-6-induced STAT3 activation. *BioMed Res Int* 2018:3684845.
- Kim BE, Leung DYM, Boguniewicz M, Howell MD. 2008. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol* 126:332-337.
- Morita K, Miyachi Y. 2003. Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci* 31:81-89.
- Rhim TJ, Choi MY. 2010. The antioxidative effects of *Ampelopsis brevipedunculata* extracts. *Korean J Plant Resour* 23:445-450.
- Saha S, Shalova IN, Biswas SK. 2017. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. *Immunol Rev* 280:102-111.
- Sano S. 2015. Psoriasis as a barrier disease. *Dermatol Sin* 33:64-69.

- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293.
- Wu MJ, Yen JH, Wang L, Weng CY. 2004. Antioxidant activity of porcelainberry (*Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv.). *Am J Chin Med* 32:681-693.
- Yan X, Xie G, Zhou J, Milne GW. 2018. Traditional Chinese medicines: Molecular structures, natural sources and applications. Routledge, London, UK.
- Yoon Y, Bae S, Seong-gwan A, Choi Y, Kyu-joong A, In-suk A. 2013. Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Korean J Aesthet Cosmetol* 11:417-426.

© Copyright. Korean Society for Food Science of Animal Resources.

Date Received Dec. 26, 2022

Date Revised Jan. 26, 2023

Date Accepted Jan. 29, 2023