

1 Research Article

2
3 **개머루덩굴 추출물의 자극에 의한 피부장벽 개선 효과**

4 박선경¹, 임형진¹, 원영선¹, 박은재¹, 오제훈², 김지은², 이민지², 이소영¹, 이승웅¹,
5 이승재^{1,3,*}, 노문철^{1,*}

6
7 **Effect of *Ampelopsis brevipedunculata* (Maxim.) Trautv extract on skin barrier function**

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

10
11 ¹ *Functional Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology*
12 *(KRIBB), Jeongeup 56212, Korea*

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

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

16
17 †Correspondence and requests for materials should be addressed to S.-J.L & M.C.R (email:
18 seung99@kribb.re.kr & rho-m@kribb.re.kr)

19
20 Seung-Jae Lee (<https://orcid.org/0000-0002-1908-7666>)

22 Abstract

23 The skin is the largest organ that blocks invasion to the outside. Due to external stimuli, the
24 skin barrier collapses and immune function abnormalities occur. This leads to skin diseases
25 such as atopic dermatitis and psoriasis. Through this study, we attempted to develop a natural
26 material that can be used for various dermatitis diseases. In this study, the gene expression of
27 skin barrier-related proteins was confirmed using TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells
28 through real-time PCR. As a result, it was confirmed that the gene expression of skin barrier-
29 related proteins and ceramide-related proteins was improved by the ABE-M. In this study, it
30 was confirmed that the gene expression of filaggrin, IVL, and LOR, which are skin barrier-
31 related proteins, was improved by ABE-M, and it was confirmed that the gene expression of
32 the tight junction-related proteins, occludin and ZO-1, was also increased. As such, it is
33 expected that ABE-M can be used as a material for skin inflammation such as atopic dermatitis.

34

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

36

37 Introduction (서론)

38 피부는 외부로부터 몸을 보호하는 역할을 하며, 인체에서 가장 큰 기관이다. 피부는 크게
39 표피와 진피로 구분되며, 표피는 각질 형성 세포로 분화 전도에 따라 기저층, 유극층, 과
40 립층, 각질층으로 나뉜다(Benson 2012). 피부 장벽의 주요 단백질은 filaggrin (FLG),
41 involucrin (IVL), loricrin (LOR) 및 ceramide로 구성되어 있으며, 각질층에 존재한다(Howell et
42 al., 2009, Imokawa & Ishida 2014, Kim et al., 2008). 또한 표피층에 존재하는 tight junction을 구
43 성하는 단백질은 claudin, occludin, zonula occludens proteins (ZO)-1 등이 있다(Bäsler et al., 2016,
44 Bäsler & Brandner 2017). 하지만, 피부 장벽의 붕괴는 외부 물질의 유입으로 인해 피부 하
45 층의 대식세포, T 세포 등의 면역세포 활성화를 도모함으로써 염증 환경을 조성한다
46 (Bäsler & Brandner 2017). 하여, 이는 염증 환경의 조성으로 인해 아토피피부염과 건선 등
47 의 피부질환의 원인이 된다. 최근 연구에 따르면, FLG, LOR 및 ceramide 등의 피부 장벽
48 단백질들의 유지를 통해 건선 병변의 완화에 도움을 준다는 흥미로운 결과를 보여준다.
49 또한, 각질 세포에서 활성화된 STAT3에 의해 피부 장벽 기능이 붕괴되어 건선과 유사한
50 피부질환이 발생함을 확인한 바 있다(Sano 2015). 일반적으로 피부질환 치료를 위해 스테
51 로이드 제제 및 항히스타민제제 등을 사용하나, 사용 기간에 따른 피부 부작용을 초래한
52 다(Arellano et al., 2007, Hajar et al., 2015). 따라서 안전하고 효과적인 치료제 연구가 필요하
53 며, 이를 위해 천연 소재를 이용한 소재 발굴을 하고자 한다.

54 개머루덩굴은 포도과 개머루 속에 속하는 낙엽성 덩굴 식물로, 아시아와 북미 동부, 멕시
55 코, 과테말라에 널리 분포하여 자생한다(Byng 2014). 개머루 덩굴의 전통 약용은 허준의
56 동의보감과 중국의 한약서에 잘 기록되어 있다(Yan et al., 2018). 개머루 덩굴의 효능은 개
57 머루덩굴의 메탄올 추출물은 리놀산 과산화와 플라스미드 DNA 산화를 억제 시켰으며
58 (Wu et al., 2004), 개머루덩굴의 에탄올 추출물은 항산화능이 있으며(Rhim & Choi 2010),

59 JAK2/STAT3의 신호전달을 억제 통해 항 염증 활성이 보고되었다(Jang et al., 2018). 또한,
60 개머루 덩굴 에탄올 추출물이 아토피 피부염의 염증 억제하는 등의 약리 활성이 보고되
61 었다(Choi et al., 2019). 앞선 연구에 따라, 피부염의 완화는 피부 장벽 유지와 연관이 있음
62 이 보고되었기에, 본 연구를 통해 개머루덩굴의 피부 장벽 유지 효능을 확인함에 따라
63 치료제로서의 소재 가능성뿐만 아니라, 다양한 적용점을 제시하고자 수행되었다.

64

65 Materials and Methods (재료 및 방법)

66 Sample preparation

67 개머루 건조 줄기 39 kg을 추출기에 넣고 55% 주중 468 L를 가하여 78°C에서 9시간 추출
68 한 다음 1 μm 카트리지 필터를 이용하여 여과하고 고형분 함량 20%가 되도록 농축하였
69 다. 개머루 덩굴 추출물의 성분비가 추출물 80%, 부형제 20%가 되도록 적정량의 부형제
70 (말토덱스트린, (주)대상)를 넣어 혼합하고 분무 건조하여 4.8 kg의 개머루 덩굴 추출물(제
71 조번호: JY206MM210930)을 얻었으며, 수율은 12.3%로 나타내었다.

72

73 Cell culture

74 인간 각질세포주인 HaCaT 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, UK), 10%
75 fetal bovine serum (FBS, Gibco, UK), 1% penicillin/streptomycin을 배합한 배지에 의해 배양되
76 었으며, 5% CO₂를 지속해서 공급하는 37°C 배양기 내에서 유지되었다.

77

78 Real-time PCR

79 세포의 RNA 는 TRIzol 에 의해 추출하였다. 1 μg 의 RNA 를 PrimeScript 1st strand cDNA
80 synthesis kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA 를 합성하였으며, 유전자 발현을
81 비교 측정하기 위해 Real-time PCR 을 진행하였다. 실험이 사용된 특정 Taqman Gene

82 expression assay 는 다음과 같다: FLG (Hs00856927_g1), IVL (Hs00846307_s1), LOR
83 (Hs01894962_s1), occludin (Hs05465837_g1), ZO-1 (Hs01551867_m1), SPT1 (Hs00272311_m1),
84 SPT2 (Hs01027014_m1), Ceramidase (ASAH2, Hs01015655_m1).

85

86 Statistical analysis

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

89

90 Results (결과)

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

92 우리는 각질세포인 HaCaT 세포에서 개머루 덩굴 추출물이 주요 피부 장벽의 단백질 발
93 현에 미치는 영향을 조사하였다. 그림 1과 같이 피부 장벽 단백질인 FLG, IVL 및 LOR의
94 유전자 발현은 대조군 세포에 비해 tumor necrosis factor (TNF)- α /interferon (IFN)- γ 로 감작 처
95 리한 세포에서 유의하게 감소하였다. 그러나 개머루 덩굴 추출물 처리그룹에서는 농도의
96 존적으로 회복되는 것을 확인하였다. 이는 개머루 덩굴 추출물이 피부 장벽 단백질을 회
97 복 능력이 있는 것으로 나타나고 이에 밀착 접합 주요 요인을 분석하였다.

98

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

100 밀착 접합은 피부 장벽으로서 각질층과 보완적인 기능을 수행하는 것으로 보고되어 있는
101 데 본 연구에서는 이러한 밀착 접합을 구성하는 occludin 및 ZO-1 단백질의 발현에 개머
102 루 덩굴 추출물이 미치는 영향에 대해 조사하였다. occludin, ZO-1의 분석 결과 대조 군에
103 비해 TNF- α /IFN- γ 처리 군에서 유의하게 감소하였고, 개머루 덩굴 추출물 처리 그룹에서
104 농도의존적으로 회복하는 현상을 확인하였다(그림 2).

105

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

107 ceramide 합성을 조절하는 효소인 serine palmitoyltransferase (SPT) 1, 2의 유전자 발현은 대
108 조 군에 비해 TNF- α /IFN- γ 처리 군에서 유의하게 감소하였고 개머루 덩굴 추출물 처리시
109 유의적으로 발현량이 증가함을 확인하였다(그림 3). 또한, ceramidase의 유전자 발현은 대
110 조 군에 비해 TNF- α /IFN- γ 처리시 증가한 반면, 개머루 덩굴 추출물 처리 그룹에서 농도
111 의존적으로 감소되었다.

112

113 Discussion (고찰)

114 인체의 항상성 유지에도 매우 중요한 신체 기관 중 일부인 피부는 외부환경의 다양한 자
115 극으로부터 신체를 보호(Yoon et al., 2013)하는 것으로 잘 알려져 있는데, 과도한 자외선
116 노출, 미세먼지, 미생물의 번식 등의 외부 자극은 피부 세포의 DNA 돌연변이, 세포막 및
117 단백질 손상, 노화, 면역 기능 이상 등의 문제점을 야기한다. 이러한 결과들은 특히 두드
118 러기, 건선, 습진, 접촉성 피부염, 아토피 피부염과 같은 염증성 피부질환으로 이어지는
119 것으로 알려져 있다(Benson 2012). 피부에 염증 자극이 발생하면 면역 세포인 대식세포가
120 활성화되어 nitric oxide, prostaglandin E2, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin (IL) 같
121 은 염증반응의 유발인자들이 분비된다(Saha et al., 2017). 또한 피부염 환자 피부에서는 피
122 부 장벽 약화 및 보습 기능 저하가 흔히 관찰(Morita & Miyachi 2003)되는데, 일반적으로
123 피부 장벽 조절과 보습에는 tight junction이 직접적으로 관여한다. 대표적인 tight junction
124 단백질인 claudin과 occludin 단백질은 transmembrane domain을 포함하고 있어 세포막 내에
125 존재하고, ZO-1 그리고 ZO-2 단백질이 함께 결합하여 신호 전달에 관여하는 것으로 알려
126 져 있으며, 수분 또는 이온들의 이동을 조절(Gonzalez-Mariscal et al., 2003, Tsukita et al., 2001)
127 한다. 이는 아토피 피부염 같은 염증성 피부질환에서 피부 장벽 보호 지표 물질로 볼 수

128 있다. 본 연구에서 외부 자극에 의한 붕괴된 피부 장벽의 개선 효과를 확인한 결과, 피부
129 장벽 기능을 이루는 단백질인 FLG, IVL, 및 LOR이 HaCaT 세포에서 TNF- α /IFN- γ 처리에
130 의해 무처리군 대비 현저히 감소했으나, 개머루 덩굴 추출물에 의해 농도의존적으로 증
131 가되는 것을 확인할 수 있었고(그림 1), Tight junction 단백질인 occludin, ZO-1의 유전자 발
132 현이 개머루 덩굴 추출물에 의해 증가되는 것을 확인할 수 있었다(그림 2).

133 ceramide는 지질 분자의 하나로써, 피부 장벽을 유지하고 각질 세포 간의 구조적 안전성
134 을 유지하는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Elias & Mnon 1991). 또한, 각
135 질 형성 세포의 외부를 둘러싸고 있는 대표적인 수분 보유 물질로 아토피성 피부염에서
136 는 ceramide가 감소한다고 보고 되어지기 때문에 ceramide 생성 및 유지는 아토피 피부염
137 치료의 중요한 요인으로 작용 될 수 있다(Imokawa & Ishida 2014). 이러한ceramide는 단백
138 질 및 인지질의 분해 과정에서 얻어지는 serine과 palmitoyl-CoA 과의 결합 후 serine
139 palmitoyl-transferase (SPT)에 의해 합성되며, 이후 sphingosine 대사과정을 거쳐 ceramidase
140 에 의해 sphingosine과 fatty acid로 분해된다(Hong et al., 2007). 따라서, 피부질환에서 SPT의
141 level은 피부 장벽의 손실 정도를 나타내는 중요한 척도로 사용될 수 있기 때문에, 본 연
142 구에서는 TNF- α /IFN- γ 처리에 의해 염증 환경이 조성된 HaCaT 세포에서의 SPT level을
143 분석하였고 결과로 SPT level이 유의적으로 저하되는 것을 확인할 수 있었고, 개머루 덩
144 굴 추출물 처리에 의해 회복되는 것을 확인하였으며 ceramidase 또한 개머루 덩굴 추출물
145 처리에 의해 저해되는 것을 확인하였다(그림 3). 이는, 개머루덩굴이 SPT의 활성을 유지
146 시키고 ceramidase를 억제함으로써 피부 장벽을 유지시킴에 도움을 줄 수 있음을 시사한
147 다. 이처럼 본 연구에서 사용한 개머루 덩굴 추출물은 피부 장벽을 강화하고 수분 함량
148 또한 증가됨으로써 피부질환 개선을 위한 천연물 소재로의 활용 가능성이 매우 높을 것
149 으로 예상되지만 이를 증명하기 위해 세포모델에서의 기전연구와 인공피부를 활용한 추

150 가적인 연구가 필요하다.

151

152 Conflicts of Interest

153 The authors declare no potential conflict of interest.

154

155 Acknowledgments

156 This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food,
157 Agriculture, Forestry (IPET) through functional food development using domestic future agricultural
158 resources project, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (821024-
159 03), and the KRIBB Research Initiative Program (KGM5242221).

160

161 Author Contributions

162 Conceptualization: Bak SG, Rho MC, Lee SJ

163 Data curation: Bak SG, Lim HJ

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

165 Methodology: Oh JH, Kim JE, Lee MJ

166 Investigation: Park EJ

167 Writing - original draft: Bak SG, Lee SJ

168 Writing - review & editing: Rho MC, Lee SJ

169

170 참고문헌

- 171 Arellano FM, Wentworth CE, Arana A, Fernández C & Paul CF. 2007. Risk of lymphoma following
172 exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis. *Journal*
173 *of Investigative Dermatology* 127: 808-816.
- 174 Bäsler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M & Brandner JM. 2016. The role of tight
175 junctions in skin barrier function and dermal absorption. *Journal of Controlled Release* 242:
176 105-118.
- 177 Bäsler K & Brandner JM. 2017. Tight junctions in skin inflammation. *Pflügers Archiv-European*
178 *Journal of Physiology* 469: 3-14.
- 179 Benson HA. 2012. Skin structure, function, and permeation. *Topical and Transdermal Drug Delivery:*
180 *Principles and Practice*, 1st ed.; Benson, HAE, Watkinson, AC, Eds: 1-22.
- 181 Byng JW (2014) *The Flowering Plants Handbook: A practical guide to families and genera of the world.*
182 Plant Gateway Ltd.
- 183 Choi Y-A, Yu J-H, Jung HD, Lee S, Park P-H, Lee H-S, Kwon TK, Shin T-Y, Lee SW & Rho M-C.
184 2019. Inhibitory effect of ethanol extract of *Ampelopsis brevipedunculata* rhizomes on atopic
185 dermatitis-like skin inflammation. *Journal of ethnopharmacology* 238: 111850.
- 186 ELIAS PM & MENON GK. 1991. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal
187 permeability barrier. *Advances in lipid research* 24: 1-26.
- 188 Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P & Jaramillo B. 2003. Tight junction proteins. *Progress in*
189 *biophysics and molecular biology* 81: 1-44.
- 190 Hajar T, Leshem YA, Hanifin JM, Nedorost ST, Lio PA, Paller AS, Block J & Simpson EL. 2015. A
191 systematic review of topical corticosteroid withdrawal (“steroid addiction”) in patients with
192 atopic dermatitis and other dermatoses. *Journal of the American Academy of Dermatology* 72:
193 541-549. e542.
- 194 Hong K-K, Cho H-R, Ju W-C, Cho Y & Kim N-I. 2007. A study on altered expression of serine

195 palmitoyltransferase and ceramidase in psoriatic skin lesion. Journal of Korean medical science
196 22: 862-867.

197 Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes
198 KC & Leung DY. 2009. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression.
199 Journal of Allergy and Clinical Immunology 124: R7-R12.

200 Imokawa G & Ishida K. 2014. Role of ceramide in the barrier function of the stratum corneum,
201 implications for the pathogenesis of atopic dermatitis. J Clin Exp Dermatol Res 5: 206.

202 Jang H-J, Lee S-J, Lim H-J, Jung K, Lee S, Park CS, Lee SW & Rho M-C. 2018. Inhibitory effects of
203 compounds and extracts from ampelopsis brevipedunculata on IL-6-induced STAT3 activation.
204 BioMed research international 2018.

205 Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M & Howell MD. 2008. Loricrin and involucrin expression is down-
206 regulated by Th2 cytokines through STAT-6. Clinical immunology 126: 332-337.

207 Morita K & Miyachi Y. 2003. Tight junctions in the skin. Journal of dermatological science 31: 81-89.

208 Rhim T-J & Choi M-Y. 2010. The antioxidative effects of Ampelopsis brevipedunculata extracts.
209 Korean Journal of Plant Resources 23: 445-450.

210 Saha S, Shalova IN & Biswas SK. 2017. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function.
211 Immunological reviews 280: 102-111.

212 Sano S. 2015. Psoriasis as a barrier disease. Dermatologica Sinica 33: 64-69.

213 Tsukita S, Furuse M & Itoh M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. Nature reviews
214 Molecular cell biology 2: 285-293.

215 Wu M-J, Yen J-H, Wang L & Weng C-Y. 2004. Antioxidant activity of porcelainberry (Ampelopsis
216 brevipedunculata (Maxim.) Trautv.). The American journal of Chinese medicine 32: 681-693.

217 Yan X, Xie G, Zhou J & Milne GW (2018) *Traditional chinese medicines: molecular structures, natural
218 sources and applications*. Routledge.

219 Yoon Y, Bae S, An S, Choe YB, Ahn KJ & An IS. 2013. Effects of ultraviolet radiation on the skin and

220 skin cell signaling pathways. Kor J Aesthet Cosmetol 11: 417-426.

221 **Figure legend**

222 **Fig. 1. Effect of ABE-M on gene expression level of skin barrier proteins in TNF- α /IFN- γ -**
223 **stimulated HaCaT cells.**

224 HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation.
225 Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- α /IFN- γ for 24 h, and RNA was extracted from the cells
226 using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. * $p < 0.05$
227 compared with the TNF- α /IFN- γ -stimulated group.

228

229 **Fig. 2. Effect of ABE-M on gene expression level of tight junction proteins in TNF- α /IFN- γ -**
230 **stimulated HaCaT cells.**

231 HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation.
232 Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- α /IFN- γ for 24 h, and RNA was extracted from the cells
233 using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. * $p < 0.05$
234 compared with the TNF- α /IFN- γ -stimulated group.

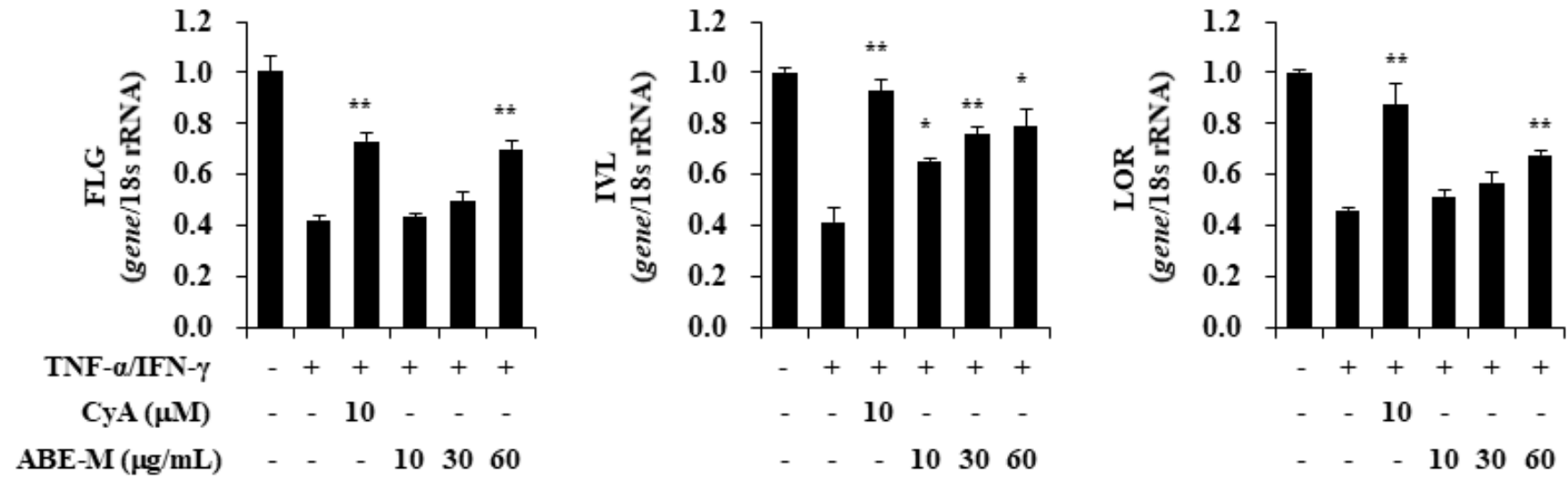
235

236 **Fig. 3. Effect of ABE-M on gene expression level of SPT1,2 and ceramidase in TNF- α /IFN- γ -**
237 **stimulated HaCaT cells.**

238 HaCaT cells were pretreated with 10, 30, and 60 mg/mL of ABE-M for 1 hour before the stimulation.
239 Then, HaCaT cells were stimulated with TNF- α /IFN- γ for 24 h, and RNA was extracted from the cells
240 using TRIzol reagent. The level of skin barrier proteins were measured by real-time qPCR. * $p < 0.05$
241 compared with the TNF- α /IFN- γ -stimulated group.

242

243



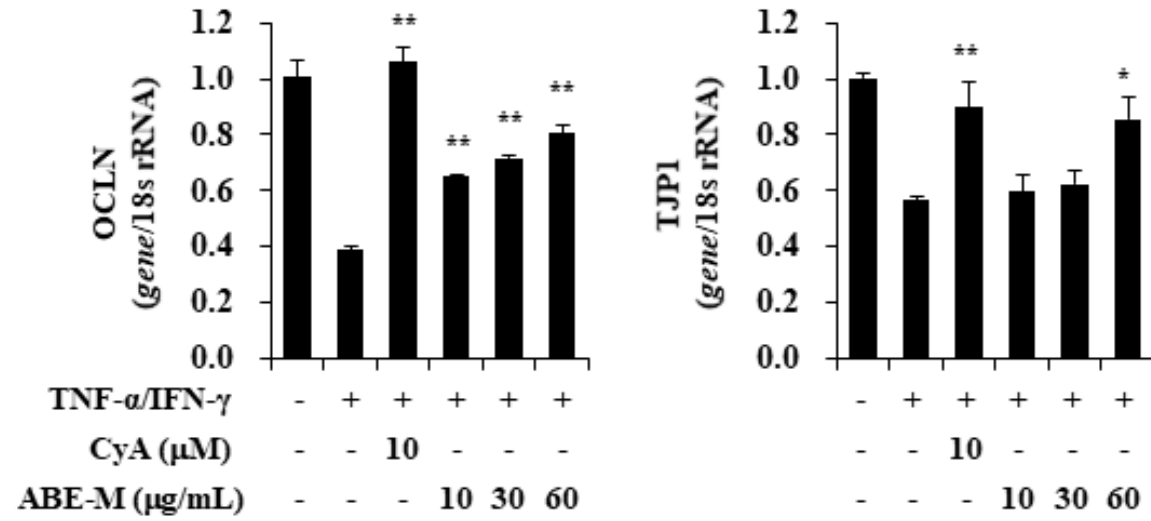
244

245

246 **Fig. 1.**

247

248



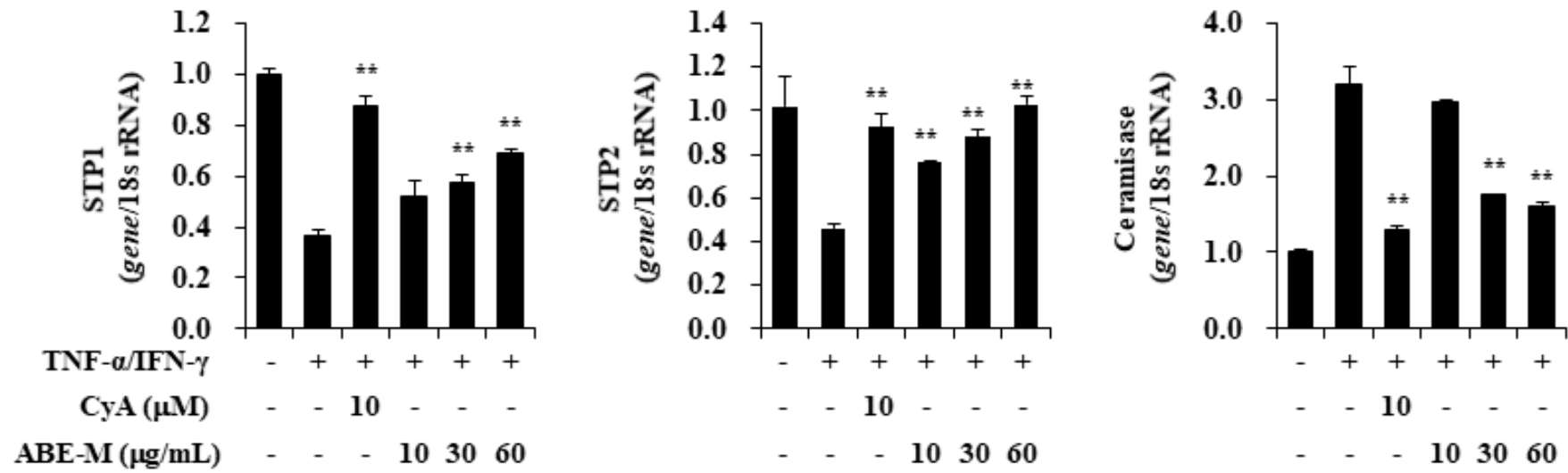
249

250

251 **Fig. 2.**

252

253



254

255

256 Fig. 3.