

황금 (*Scutellaria baicalensis*) 추출물의 ECS조절을 통한 아토피피부염 염증 완화 효과

안상현¹ · 김기봉^{2,3,*}

¹세명대학교 한의과대학 해부학교실, ²부산대학교 한의학전문대학원, ³부산대학교한방병원 한방소아과

Abstract

ECS Modulating Effect of *Scutellaria baicalensis* Extract on inflammation relief in atopic dermatitis-induced mice

Ahn Sang Hyun¹ · Kim Ki Bong^{2,3,*}

¹Dept. of anatomy, college of Korean Medicine, Semyung University

²School of Korean Medicine, Pusan National University

³Dept. of Korean Pediatrics, Korean Medicine Hospital, Pusan National University

Objective

The purpose of this study was to confirm the effect of *Scutellaria baicalensis* extract on skin damage recovery and inflammation relief in atopic dermatitis-induced mice through Endocannabinoid system (ECS) control.

Methods

6-week-old Balb/C mice were divided into control group (Ctrl), atopic dermatitis induced group (ADE), palmitoylethanolamide (PEA) administered group after atopic dermatitis induced (PEAT), and *Scutellaria baicalensis* extract administered group after atopic dermatitis induced (SBT). Seven animals were assigned for each group. After drug administration for 3 weeks after inducing atopic dermatitis, Claudin and 8-OHdG were observed to confirm the recovery of the skin damage in each group. To confirm ECS regulation, CB1, CB2, and GPR55 were observed. To confirm the anti-inflammatory effect, Fc ϵ receptor, and MMP-9 was observed.

Results

Claudin positive reaction was significantly increased in SBT compared to ADE and PEAT. 8-OHdG positive reaction was significantly decreased in SBT compared to ADE and PEAT. CB1, CB2, and GPR55 positive responses were significantly increased in SBT compared to ADE and PEAT. Fc ϵ receptor and MMP-9 positivity were significantly decreased in SBT compared to ADE and PEAT.

Conclusion

It was confirmed that the *Scutellaria baicalensis* extract can reduce the inflammation of atopic dermatitis by restoring the structural damage of the skin lipid barrier through ECS activity.

Key words: *Scutellaria baicalensis*, Atopic dermatitis, Endocannabinoid system (ECS), Fc ϵ receptor

• Received: July 23, 2021 • Revised: August 17, 2021 • Accepted: August 23, 2021
*Corresponding Author: Kim Ki Bong
Department of Korean Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital,
Geumo-ro 20, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea
Tel: +82-55-360-5952, Fax: +82-55-360-5952
E-mail: kkb@pusan.ac.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

Endocannabinoid system (ECS)은 감각, 기억, 기분, 통증, 식욕 등을 조절하는 생물학적 시스템을 말하며, cannabinoids (CB)로 구성되어 있다¹⁾. 최근 연구들을 통하여 병리적 상태와 ECS가 서로 연관되어 있으며, 병리적 변화에 따라 ECS가 증가 또는 감소하는 것이 밝혀졌다²⁾. ECS가 일시적으로 변화하게 되면 시스템이 작동하여 질병의 진행을 억제시킬 수 있으며, ECS가 활성화되면 병원성으로 작용할 수도 있다³⁾. 이러한 ECS는 피부 항상성에도 밀접한 관련이 있는데, 피부세포의 성장, 증식뿐 아니라 면역과 염증 반응 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 피부의 표피 각질 세포에서 CB1와 CB2가 활성화되면 세포의 증식과 분화를 억제하게 되고⁵⁾, 아울러 염증 매개체를 방출하며⁶⁾, 세포사멸 (apoptosis)를 유도하게 된다⁷⁾. 또한 CB1은 염증성 케모카인 (chemokine)의 분비를 억제시키고 피부 염증 반응을 조절하며⁸⁾, 통증 및 가려움증과 같은 감각 현상을 억제한다^{9,10)}. 따라서 ECS는 피부 전반에 걸쳐 피부 세포의 증식과 분화를 균형있게 유지시키며, 피부면역과 염증 반응을 조절한다. 따라서 ECS를 미세하게 조정하여 변화시키면 피부 질환을 촉진하거나 완화시킬 수 있으므로¹¹⁾, ECS는 피부 항상성을 유지하기 위한 필수적인 환경 제어 요소라 볼 수 있다. 이러한 이유로 오늘날 ECS가 피부 질환에 대한 새로운 치료 표적으로 대두되고 있다¹²⁾.

아토피피부염 (Atopic dermatitis, AD)은 피부 지방장벽의 보호 기능이 저하되어 가려움, 염증, 습진, 건조한 피부, 피부 pH 증가 등이 특징적으로 나타나며, 만성 염증성 피부 질환 중 대표적인 질환이다. AD에서는 필라그린 (Filaggrin)의 발현 감소가 두드러지게 관찰되는데, FLG는 피부의 각질층 (stratum corneum, SC)에서 세포 사이 성분으로 작용하는 대표적인 각질유리과립이다¹³⁾. 이러한 필라그린의 발현 감소는 Th2 분화로 인한 염증 반응에 의해 발생하는데^{14,15)}, 필라그린 유전자에 이상이 있는 소아의 경우 일반적으로 연령에 따라 형태를 달리하며 행진하듯이 진행되는 알레르기 행진 (allergic march)을 따라 보다 빠르게 진행되는 경향이 있다. 따라서 필라그린의 회복은 알레르기 질환 치료에서 중요한 부분이라 할 수 있다¹⁶⁾.

본 연구에 사용된 황금 (*Scutellaria baicalensis*, 黃芩)은 임상에서 많이 사용되는 약재로서, 청열조습 (淸熱燥

濕), 청열해독 (淸熱解毒)하는 효능이 있어 폐열해수 (肺熱咳嗽), 습열사리 (濕熱瀉利), 열림 (熱淋), 붕루 (崩漏), 옹종 (癰腫), 정창 (疔瘡) 등과 다양한 질환에 많이 사용된다^{17,18)}. 또한 황금추출물에 대한 최근 연구들¹⁹⁻²¹⁾을 통해 황금추출물이 피부에서 항염증 효과와 표피 회복 효과에 대한 가능성을 제시하고 있으며, 이를 통해 습진, 건선, 피부염 같은 염증성 피부질환에 응용될 수 있을 것이다. 또한 선행연구²²⁾를 통하여 황금추출물이 아토피피부염에서 필라그린을 회복하는데 효과가 있음을 확인하였다.

본 연구는 선행연구에서 확인한 아토피피부염에서 황금추출물의 필라그린 회복을 조절함에서 더 나아가 황금추출물이 ECS 활성을 통하여 아토피피부염으로 손상된 피부의 회복 효과를 확인하고자 하였다. 피부 손상 회복을 확인하기 위해 Claudin, 8-OHdG를 관찰하였으며, ECS 활성 조절을 확인하고자 CB1, CB2, GPR55를 관찰하였고, 비만세포 조절을 통하여 염증 억제를 확인하기 위해 피부각질층 내 Fcε receptor과 염증성 매개물질 중 하나인 MMP-9을 관찰하였다. 이를 통해 황금추출물이 ECS 활성을 통한 AD 유발 상피염증 완화 효과가 있음을 확인하였기에 보고하는 바이다.

II. Materials and Methods

1. 실험동물

태령 4주 Balb /C계 수컷 생쥐 (자바이오, Korea)를 무균사육장치 내에서 2주 동안 적응시킨 후 체중 20 ± 1.3 g 된 생쥐를 사용하였다. 실험동물은 대조군 (Ctrl), 아토피 피부염 유발군 (atopy dermatitis (AD) elicited group, ADE), 아토피 피부염 유발 후 palmitoylethanolamide (PEA) 투여군 (PEA treated group after atopy dermatitis elicitation, PEAT), 아토피 피부염 유발 후 황금추출물 투여군 (*Scutellaria baicalensis* (SB) treated group after atopic dermatitis elicitation, SBT)으로 나누었다. 각 군에 7마리씩 배정하였다. 동물실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (IACUC No. PNU-2014-0732) 후 실시되었고, 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 NIH 가이드라인에 따라 시행되었다.

2. 실험약물

황금 200 g을 증류수 2000 ml에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압, 농축한 후 동결 건조하여 추출물 54.6 g (수득률 27.3%)을 얻었다.

황금추출물을 73 mg/kg량을 생리식염수에 녹인 후 0.2 ml씩 SBT에 AD 유발 후 3주 동안 경구투여하였다. 대조약물로 사용된 PEA (Sigma, USA)을 생리식염수 100 µl에 녹인 후 아토피피부염 유발 후 3주 동안 10 mg/kg 경구투여하였다.

3. 아토피피부염 유발

생쥐 등쪽 부위 피부를 면도한 다음 계면활성제 (surfactant)인 5% sodium dodecyl sulfate (SDS : Sigma, USA) 1 ml을 면봉으로 20회 문질러서 각질층의 lipid lamella를 제거한 후 *D. pteronyssinus* crude extract striper (100 mg, Biostir, Japan)을 3주 동안 주 3회씩 도포하여 유발하였다.

4. 조직표본

피부는 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin, NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 얻어진 등쪽 피부를 10% NBF에 실온에서 24시간 동안 고정된 후 통상적인 방법으로 paraffin에 포매하고 5 µm 두께로 연속절편을 만들었다.

5. 조직화학

연속절편은 피부조직내 염증으로 기인된 조직 변화를 관찰하기 위해 Phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액에 30분간 반응시켰다. 그런 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 관찰하였다. 또한 부종변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 50-60 °C Bouin 용액에서 1시간 동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic -phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리하여 아교섬유 (청색)를 염색한 후 관찰하였다.

6. 면역조직화학

피부 내 미세환경변화의 면역조직학적 관찰을 위해 세포골격 변화는 anti-Claudin, 산화적 스트레스 유도 손상은 anti-8-OHdH, Endocannabinoid system (ECS) 의 변화와 기전은 anti-cannabinoid receptor (CB) 1, anti-CB2, anti-G protein-coupled receptors (GPR) 55, 비만 세포 활성화는 anti-Fc ε Receptor, 부종 유발 변화는 Matrix Metalloproteinase (MMP)-9의 항체를 이용하여 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

우선 피부절편을 proteinase K (20 µg/ml, Dako, USA)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 1% fetal bovine serum (Sigma, USA)이 포함된 10% normal goat serum (Vector Lab, USA)에서 2시간 동안 blocking 반응 시켰다. 1차 항체인 mouse anti-claudin (1:50, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-8-OHdH (1:100, Santa Cruz Biotech), mouse anti-CB1 (1:100, Santa Cruz Biotech), mouse anti-CB2 (1:100, Abcam, USA), mouse anti-GPR 55 (1:50, Abcam, USA), mouse anti-Fc ε Receptor (1:100, Santa Cruz Biotech), mouse anti-MMP-9 (1:100, Santa Cruz Biotech)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:100, Abcam)에 실온에서 24시간 link 하였고, avidin biotin complex kit (Vector Lab)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

7. 영상분석

면역조직화학의 결과는 image Pro Plus (Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means ± standard error) 되었다. 각 군의 피부표본 10개를 임의로 선정한 후 x400 배율에서 촬영한 다음 positive pixels (intensity 80 ~100)/20,000,000 pixels로 영상 분석하였다.

8. 통계

통계는 SPSS software (SPSS 25, SPSS Inc., USA)를 사용하였으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 (p<0.05)을 검증하고, 사후 검증은 Tukey HSD를 실시하였다.

III. Results

1. 피부 손상 회복

ADE의 상피에서는 각질층 탈락, 혈병 생성, 세포파괴형성, 세포사이간격 붕괴 그리고 염증관여세포 이주 증가가 관찰되었다. 또한 진피유두에 혈관신생성 증가, 부종, 백혈구와 림프구의 진피유두로 침윤 증가가 관찰되었다. 이에 반해 PEAT와 SBT는 많은 부분에서 구조적 손상이 회복되었다. 특히 SBT가 PEAT보다 구조적 손상의 회복이 많았다 (Fig. 1).

Claudin 양성반응은 Ctrl (65,788 ± 1,135 /20,000,000 pixel)에 비해 ADE, PEAT, SBT 모두에서 감소하였다. claudin 양성반응은 ADE (21,099 ± 1,050 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 68% 감소하였고, PEAT (33,156 ±

879 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 50%, SBT (46,571 ± 959 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 29% 감소하였다. SBT의 Claudin 양성반응은 ADE에 비해 121%, PEAT에 비해 40% 유의적으로 증가한 양상을 보였다 (Fig. 1).

8-OHdG 양성반응은 Ctrl (5,414 ± 146 /20,000,000 pixel)에 비해 ADE, PEAT, SBT 모두에서 증가하였다. ADE (70,308 ± 1,049 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 1199% 증가하였고, PEAT (38,440 ± 856/20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 610%, SBT (22,527 ± 1,049 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 316% 증가하였다. SBT의 8-OHdG 양성반응은 ADE에 비해 68%, PEAT에 비해 41% 유의적으로 감소한 양상을 보였다 (Fig. 1).

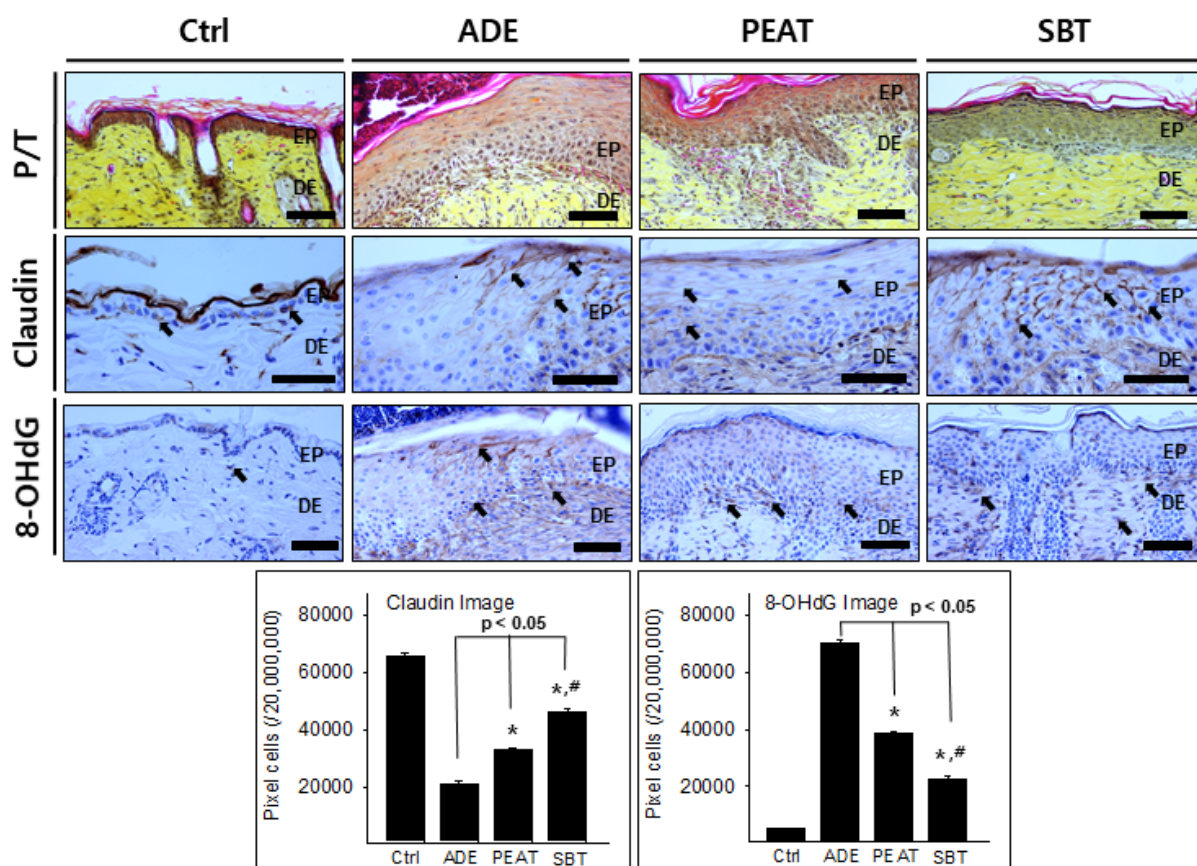


Figure 1. The alleviation effects on symptoms of atopy dermatitis by PEA and SB.

These treatments relieved the destruction of skin damages in PEAT and SBT (phloxine-tartrazine). The expression of claudin (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in PEAT and SBT as compared with LBE, the data of Claudin image analysis showed the same results (Claudin immunohistochemistry). The expression of 8-OHdG (arrow indicates light brown particle) was remarkably decreased in PEAT and SBT as compared with LBE, the data of 8-OHdG image analysis showed the same results (8-OHdG immunohistochemistry). Abbreviations. Ctrl, normal; ADE, atopy dermatitis (AD) elicitate group; PEAT, palmitoylethanolamide (PEA) treated group after AD elicitation; SBG, *Scutellaria baicalensis* (SB) treated group after AD elicitation; P/T, phloxine-tartrazine; EP, epithelium; DE, Dermis; Bar size, 50µm; *, p < 0.05 compared with LBE; #, p < 0.05 compared with PEAT.

2. ECS 활성화

CB1 양성반응은 Ctrl (9,064 ± 277 /20,000,000 pixel)에 비해 ADE, PEAT, SBT 모두에서 증가하였다. ADE (19,711 ± 557 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 117% 증가하였고, PEAT (29,258 ± 747 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 223%, SBT (38,032 ± 636 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 320% 증가하였다. SBT의 CB1 양성반응은 ADE에 비해 93%, PEAT에 비해 30% 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 2).

CB2 양성반응은 Ctrl (6,861 ± 417 /20,000,000 pixel)에 비해 ADE, PEAT, SBT 모두에서 증가하였다. ADE (25,430 ± 969 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 271% 증가하였고, PEAT (29,938 ± 756 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 336%, SBT (38,032 ± 636 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 320% 증가하였다. SBT의 CB2 양성반응은 ADE에 비해 48%, PEAT에 비해 26% 유의하게 증가하였다 (Fig. 2).

GPR55 양성반응은 Ctrl (5,957 ± 175 /20,000,000 pixel)에 비해 ADE, PEAT, SBT 모두에서 증가하였다. GPR55는 ADE (17,098 ± 654 /20,000,000 pixel)에서 Ctrl에 비해 187% 증가하였고, PEAT (26,627 ± 833 /20,000,000 pixel)에서 Ctrl에 비해 347%, SBT (31,964 ± 458 /20,000,000 pixel)에서 Ctrl에 비해 437% 증가하였다. SBT의 GPR55 양성반응은 ADE에 비해 87%, PEAT에 비해 20% 유의적으로 증가하였다 (Fig. 2).

3. 비만세포 조절

Fc ε Receptor 양성반응은 Ctrl (6,744 ± 209 /20,000,000 pixel)에 비해 ADE, PEAT, SBT 모두에서 증가하였다. ADE (64,316 ± 1,021 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 854% 증가하였고, PEAT (30,024 ± 763 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 345%, SBT (21,668 ± 1,122 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 221% 증가하였다. SBT의 Fc ε Receptor 양성반응은 ADE에 비해 66%, PEAT에 비해 28% 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 3).

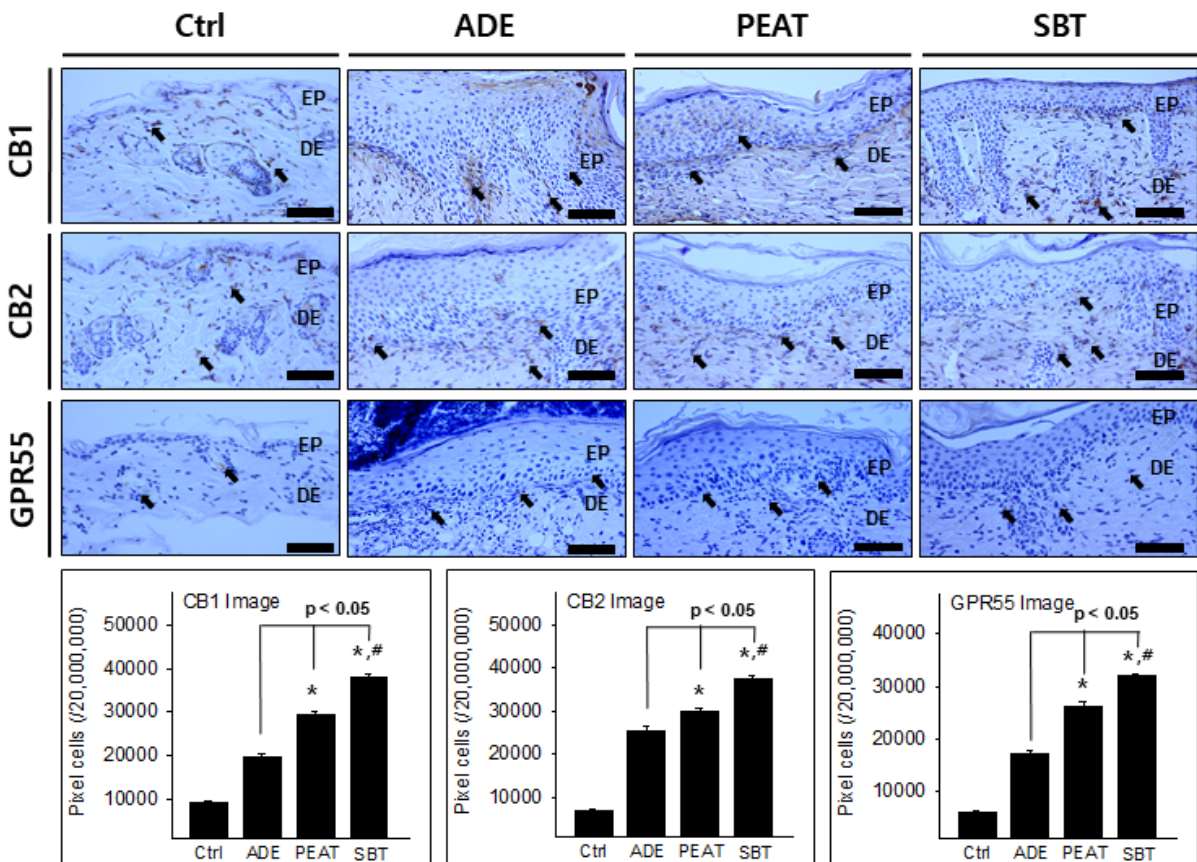


Figure 2. The activation of endocannabinoid system (ECS) in atopy dermatitis by PEA and SB.

The expression of CB1, CB2, and GPR55 (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in PEAT and SBT as compared with LBE, the data of image analysis showed the same results (immunohistochemistry). Abbreviations same as Fig. 1.

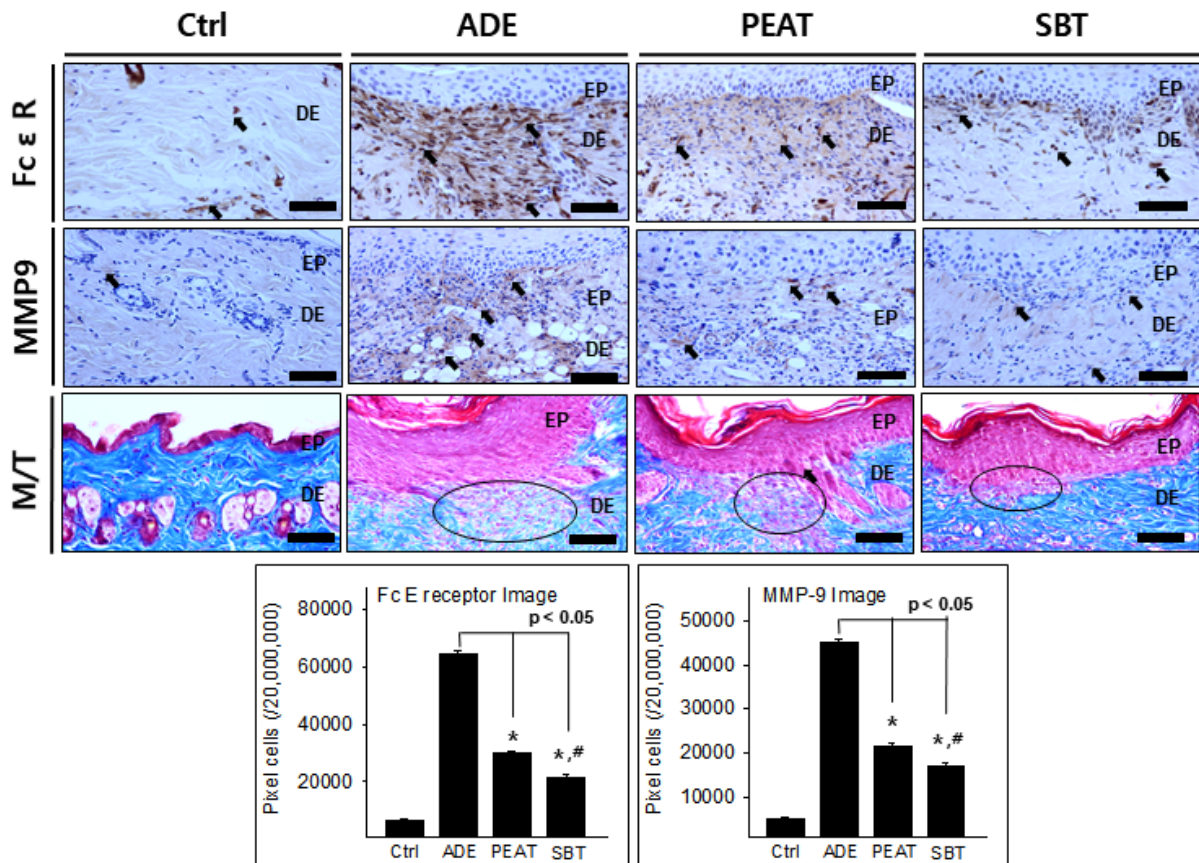


Figure 3. The allviation of edema in atopy dermatitis by PEA and SB.

These treatments relieved collagen fiber of edema evoked skin (circle) in PEAT and SBT (Masson trichrome). The expression of Fc ε Receptor and Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 (arrow indicates light brown particle) was significantly decreased in PEAT and SBT as compared with LBE, the data of image analysis showed the same results (immunohistochemistry). Abbreviations same as Fig. 1.

MMP-9 양성반응은 Ctrl (5,108 ± 310 /20,000,000 pixel)에 비해 ADE, PEAT, SBT 모두에서 증가하였다. ADE (44,960 ± 924 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 780% 증가하였고, PEAT (21,512 ± 734 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 321%, SBT (16,830 ± 775 /20,000,000 pixel)는 Ctrl에 비해 229% 증가하였다. SBT의 MMP-9 양성반응은 ADE에 비해 63%, PEAT에 비해 22% 유의 성있게 감소하였다 (Fig. 3).

ADE의 상피 기저층과 주변 진피유두에서 collagen fiber 분포 감소가 관찰되었다. 이에 반해 PEAT 와 SBT는 감소가 적었다. 특히 SBT의 collagen fiber 분포가 PEAT보다 Ctrl에 가까운 분포 경향을 보였다 (Fig. 3).

IV. Discussion

황금은 성미가 고한 (苦寒)하고 청열조습 (淸熱燥 濕), 사화해독 (瀉火解毒), 지혈, 안태 (安胎)하는 효능 이 있어 폐열해수 (肺熱咳嗽), 습열비만 (濕熱痞滿), 열 림 (熱淋), 사리 (瀉痢), 황달 (黃疸), 토혈 (吐血), 육혈 (衄血), 붕루 (崩漏), 옹종창독 (癰腫瘡毒), 태동불안 (胎 動不安) 등에 사용되어 왔다¹⁷⁾. 황금은 대표적인 항염 증 약물로써, 임상 현장에서도 피부질환에 많이 사용 되고 있으며, 현재 다양한 연구들이 진행되고 있다. 전 등은 접촉피부염에서 황금 열수추출물을 경구 투여한 후 ear edema, 염증세포 침윤 등을 관찰하여 피부 내 항염증 효과를 보고하였다²³⁾. 김 등은 황금추출물이 접 촉피부염과 아토피피부염 유발 흰쥐에서 항산화기능 과 표피 회복 기능이 있음을 보고하였다²⁰⁾, 또한 본 연 구의 선행연구에서 황금추출물이 filaggrin 결핍으로

인한 아토피피부염 발병 과정을 완화시키고, 피부의 지방장벽을 회복시켜 피부 염증반응을 감소시킬 수 있음을 확인하였다²²⁾. 이러한 연구 결과를 통하여 황금이 오늘날 항산화와 항염증 효과가 있어 아토피피부염 같은 염증성 피부질환에 사용되고 있는데는 피부장벽의 구조적인 회복을 도와주어 치료 효과를 높이고 있을 거라고 기대하여 본 연구를 시작하였다.

소아에게서 AD는 가려움, 부종 등이 동반되는 만성 염증성 피부질환이다. AD의 발병은 집먼지진드기 등에 노출됨으로써 protein kinase C (PKC)의 활성을 유도하게 되고²⁴⁾, 이는 Th2 skewed condition에서 유도된 IL-4, IL-5, IL-13 같은 cytokine의 생성이 증가되어 나타난다²⁵⁾. IL-4 생성은 B세포 (B cell)에서 IgE를 분비하게 하며, IgE의 분비는 비만세포 (mast cell)의 탈과립화 (degranulate)를 유도하여 탈과립세포의 침착을 증가시키게 된다. 비만세포는 세포 표면에 FcεR 수용체 (Fcε receptor)를 발현하고, IgE와 항원들이 이 수용체와 서로 교차 결합을 하게 되면 비만세포가 활성화되면서 탈과립화가 진행된다. 탈과립화가 되면 활성화된 비만세포는 substance P, histamine, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), serotonin 등 다양한 염증성 매개물질을 밖으로 분비하여 염증반응을 유도하게 된다²⁶⁾. 뿐만 아니라, IL-4의 증가는 염증반응의 전사인자인 NF-κB를 활성화시켜 혈관 투과성 증가, 부종 등의 염증반응을 촉진한다²⁷⁾. MMP-9은 cytokines과 같은 여러 자극에 의하여 합성되고 분비되어 세포구조의 변화에 영향을 주며²⁸⁾, 기저막을 파괴하여 염증관련 세포 이주를 용이하게 한다^{29,30)}.

본 연구에서 피부구조 손상의 회복 정도를 Phloxine-tartrazine 염색을 통해 조직화학적으로 관찰하였는데, ADE의 상피에서는 각질층 탈락, 세포과형성, 세포사이간격 붕괴, 염증관여세포 이주 증가가 관찰되었고, 진피유두에서는 혈관신생성 증가, 부종, 백혈구와 림프구의 진피유두로 침윤 증가가 관찰되었다. 또한 세포사이결격인 Claudin 변화는 SBT에서 ADE에 비해 121%, PEAT에 비해 40% 유의성있는 증가를 보였다. 피부염유발 산화적 스트레스 손상변화는 SBT에서 8-OHdG 양성반응이 ADE에 비해 68%, PEAT에 비해 41% 유의적인 감소를 보였다. 이러한 결과는 아토피피부염으로 인한 피부의 구조적 손상을 회복함에 있어 황금추출물이 palmitoylethanolamid에 비해 회복 효과가 우수함을 실험적으로 보여주는 것이다.

피부장벽의 구조적 손상의 회복에는 ECS가 관여한

다. ECS는 cannabinoid receptors (CBRs), CBRs의 endogenous ligands 및 CB의 합성 및 분해에 관여하는 효소로 구성된다³¹⁾. 이 중 주요 CBR은 CB1과 CB2이며, 최근 G 단백질 결합 cannabinoid receptors인 GPR55가 새로운 CBR로 추가되어졌다³²⁾. CB1은 비만 세포의 활성화를 낮추고³³⁾, 각질 세포 유래 전 염증 매개체를 감소시켜 전반적인 염증 증상을 완화시킨다³⁴⁾. CB2는 염증 세포간의 이동을 억제시키고 피부 염증 유발을 억제한다³⁵⁾. 비만 세포에서 주로 나타나는 GPR55는 비만 세포 매개 신경 성장인자의 방출을 억제하고 혈관 신생을 감소시켜서 항염증 효과를 유발한다³⁶⁾.

본 연구에서는 아토피 피부염내 ECS 활성 변화를 면역조직화학적으로 관찰하였다. 세포막에서 강한 양성반응을 보이는 CB1은 SBT에서 ADE에 비해 93%, PEAT에 비해 30% 유의성있게 증가하였고, CB2 양성반응은 SBT에서 ADE에 비해 48%, PEAT에 비해 26% 유의하게 증가하였다. 또한 GPR55 양성반응은 SBT에서 ADE에 비해 87%, PEAT에 비해 20% 유의적으로 증가하였다. 이러한 연구결과는 황금추출물이 CB1, CB2와 같은 ECS 구성 요소를 생성한다는 것을 의미하며, 황금추출물이 ECS에 관여하여 AD 증상을 완화할 수 있을 것이라는 가능성을 제시하고 있다.

또한 본 연구에서는 황금추출물의 ECS 조절을 통하여 비만세포의 활성화를 억제하고 비만세포에서 방출되는 염증 매개물질을 억제함을 확인하고자 비만세포 활성화에 관여하는 Fc ε Receptor와 비만세포에서 방출되는 염증 매개물질 중 하나인 MMP-9의 양성반응을 관찰하였다. Fc ε Receptor 양성반응은 SBT에서 ADE에 비해 66%, PEAT에 비해 28% 유의성있게 감소하였다. 또한 MMP-9 양성반응이 SBT에서 ADE에 비해 63%, PEAT에 비해 22% 유의성있게 감소하였음을 확인하였다. MMP-9 양성반응의 감소는 collagen fiber 감소가 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 적었으며, SBT에서 collagen fiber 분포가 Ctrl에 가까운 분포 경향을 보인 결과와도 일맥상통한다. 이러한 연구의 결과들은 황금추출물이 ECS 조절을 통하여 비만세포의 탈과립화를 억제시키고, 이를 통해 염증성 매개물질의 분비 역시 억제시키는 기전에서 효과가 있음을 의미한다.

결론적으로 황금추출물이 ECS 활성을 통하여 피부 지방장벽의 구조적인 손상을 회복시킴으로써 아토피 피부염의 염증을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 황금추출물이 아토피피부염 염증 치료에 효과가 있으며, 아토피피부염 치료제로서의 가능성을

제시하고 있다. 다만 본 연구는 동물실험에 국한되어 있어서 임상적 유효성을 판단하기에는 이르다고 할 수 있다. 향후 임상적 유효성과 안전성에 대한 추가 연구를 통하여 인체에서의 황금추출물의 염증과 부종 완화 효과를 확인할 필요가 있다.

V. Conclusion

황금추출물의 ECS 활성화, 세포골격 형성, 비만세포 조절 효과를 확인하기 위하여 태령 6주의 Balb/C 생쥐에게 피부염을 유발한 후 황금추출물을 투여하고 조직 화학적, 면역조직학적 변화를 통해 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Claudin 양성반응은 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 유의하게 증가하였다.
2. 8-OHdG 양성반응은 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 유의하게 감소하였다.
3. CB1 양성반응은 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 유의하게 증가하였다.
4. CB2 양성반응은 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 유의하게 증가하였다.
5. GPR55 양성반응은 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 유의하게 증가하였다.
6. Fc ϵ Receptor 양성반응은 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 유의하게 감소하였다.
7. MMP-9 양성반응은 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 유의하게 감소하였다.
8. collagen fiber 감소가 SBT에서 ADE와 PEAT에 비해 유의하게 적었다.

VI. Acknowledgement

이 연구는 2019년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. NRF-2019R1A2C1002443).

VII. References

1. Manzanares J, Julian M, Carrascosa A. Role of the cannabinoid system in pain control and therapeutic implications for the management of acute and chronic pain episodes. *Curr Neuropharmacol*. 2006;4(3):239-57.
2. Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):389-462.
3. Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev*. 2011;63(3):461-70.
4. Luger TA. Neuromediators--a crucial component of the skin immune system. *J Dermatol Sci*. 2002;30(2):87-93.
5. Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, Finazzi-Agro A. The endocannabinoid system in human keratinocytes: evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem*. 2003;278(36):33896-903.
6. Karsak M, Gaffal E, Date R, Wang-Eckhardt L, Rehnelt J, Petrosino S. Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science*. 2007;316(5830):1494-7.
7. Casanova ML, Blazquez C, Martinez-Palacio J, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzman M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis *in vivo* by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest*. 2003;111(1):43-50.
8. Gaffal E, Cron M, Glodde N, Bald T, Kuner R, Zimmer A, Lutz B, Tuting T. Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes modulate proinflammatory chemokine secretion and attenuate contact allergic inflammation. *J Immunol*. 2013;190(10):4929-36.
9. Walker JM, Hohmann AG. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;168:509-54.
10. Jhaveri MD, Richardson D, Chapman V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol*. 2007;152(5):

- 624-32.
11. Tóth BI, Dobrosi N, Dajnoki A, Czifra G, Olah A, Szollosi AG, Juhász I, Sugawara K, Paus R, Biro T. Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J Invest Dermatol.* 2011;131(5):1095-104.
 12. Tóth KF, Ádám D, Bíró T, Olah A. Cannabinoid signaling in the skin: therapeutic potential of the "C(ut)annabinoid" system. *Molecules.* 2019;24(5):918.
 13. Egawa G, Kabashima K. Barrier dysfunction in the skin allergy. *Allegology International.* 2018;67(1):3-11.
 14. Takei K, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, Tsuji G, Nakahara T, Furue M. Galactomyces fermentation filtrate prevents T helper2-mediated reduction of filaggrin in an aryl hydrocarbon receptor-dependent manner. *Clin Exp Dermatol.* 2015;40(7):786-93.
 15. Takei K, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, Uchi H, Takahara M, Tsuji G, Kido Nakahara M, Nakahara T, Furue M. Antioxidant soybean tar Glyteer rescues T-helper-mediated downregulation of filaggrin expression via aryl hydrocarbon receptor. *J Dermatol.* 2015;42(2):171-80.
 16. Tenn MW, Ellis AK. The clinical relevance of filaggrin mutations: effect on allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;117(5):483-9.
 17. The textbook compilation committee of Korean herbology. *Bonchohak.* 1st ed. Seoul. Younglimsa. 2010:218-20.
 18. Park WS. Effect of *Scutellariae* radix water extract on hydrogen peroxide production in RAW 264.7 mouse macrophages. *Kor. J. Herbology.* 2011;26(1):53-8.
 19. Yang BD, Kim SR, Choi CH, Jeoung HW, Kim HW. Effects of *Scutellaria baicalensis* extract on skin lesion of contact dermatitis induced by DNFB in Mice. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2017;31(1):59-64.
 20. Kim YH, Park YS. Effect of *Scutellaria baicalensis* water extract on antioxidative activity and epidermal thickness in DNCB-induced allergic contact dermatitis animal model. *Korean Soc Food Sci Nutr.* 2006;35(5):543-8.
 21. Kim BA, Kim MS, Kang BM, Byeon SH, Park IH, Park JH, Jung JW, Ahn EM, Jung HA, Jang JH, Bae W, Lee HY, Choi PN, Park CI. Inhibitory studies of Hwangryunhaedok-tang on development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Kor. J. Herbology.* 2008;23(2):59-65.
 22. Ahn SH, Kim KB. Effect of anti-inflammation through creation of skin fat barrier on *Scutellaria baicalensis* extract. *J Pediatr Korean Med.* 2021;35(1):40-7.
 23. Jun JH, Kang YH. The effects of *Scutellaria baicalensis* GEORGI on allergic contact dermatitis induced by DNCB in mice. *D.J.I.O.M.* 1998;7(1):119-33.
 24. Joo KM, Hwang JH, Bae SJ, Nahm DH, Park HS, Ye YM, Lim KM. Relationship of ceramide-, and free fatty acid-cholesterol ratios in the *stratum corneum* with skin barrier function of normal, atopic dermatitis lesional and non-lesional skins. *J Dermatol Sci.* 2015;77(1):71-4.
 25. Jung BG, Cho SJ, Ko JH, Lee BJ. Inhibitory effects of interleukin-10 plasmid DNA on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Vet Sci.* 2010;11(3):213-20.
 26. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir. Med.* 2012;106(1):9-14.
 27. Cha HY, Ahn SH, Cheon JH, Park IS, Kim JT, Kim KB. Hataedock treatment has preventive therapeutic effects in atopic dermatitis-induced NC/Nga mice under high-fat diet conditions. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:1739760
 28. Woessner JF Jr. MMPs and TIMPs-an historical perspective. *Mol Biotechnol.* 2002;22(1):33-49.
 29. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci.* 2006;11(1):529-43.
 30. Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblast of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem.* 2000;275(1):444-50
 31. Salzet M. Invertebrate molecular neuroimmune processes. *Brain Res Rev.* 2000;34(1):69-79.
 32. Yang H, Zhou J, Lehmann C. GPR55-a putative "type 3" cannabinoid receptor in inflammation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016;27(3):297-302.
 33. Nam GW, Jeong SK, Park BM, Lee SH, Kim HJ, Hong SP, Kim BJ, Kim BW. Selective cannabinoid receptor-1 agonists regulate mast cell activation in an

- oxazolone-induced atopic dermatitis model. *Ann Dermatol*, 2016;28(1):22-9.
34. Kim HJ, Kim B, Park BM, Jeon JE, Lee SH, Mann S, Ahn SK, Hong SP, Jeong SK. Topical cannabinoid receptor 1 agonist attenuates the cutaneous inflammatory responses in oxazolone-induced atopic dermatitis model. *Int J Dermatol*. 2015;54(10):401-8.
35. Haruna T, Soga M, Morioka Y, Imura K, Furue Y, Yamamoto M, Hayakawa J, Deguchi M, Arimura A, Yasui K. The inhibitory effect of S-777469, a cannabinoid type 2 receptor agonist, on skin inflammation in mice. *Pharmacology*. 2017;99(5-6):259-67.
36. Cantarella G, Scollo M, Lempereur L, Saccani-Jotti G, Basile F, Bernardini R. Endocannabinoids inhibit release of nerve growth factor by inflammation-activated mast cells. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(4):380-8.