

# 치자감초시탕 추출물의 Endocannabinoid system 조절을 통한 아토피피부염 염증조절 효과

안상현<sup>1</sup> · 김기봉<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>세명대학교 한의과대학 해부학교실, <sup>2</sup>부산대학교 한의학전문대학원, <sup>3</sup>부산대학교한방병원 한방소아과

## Abstract

### Anti-inflammatory Effect of Chijagamchosi-tang Extract through Endocannabinoid system Control in Atopic Dermatitis

Ahn Sang Hyun<sup>1</sup> · Kim Ki Bong<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University

<sup>2</sup>School of Korean Medicine, Pusan National University

<sup>3</sup>Dept. of Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital

#### Objective

This study aimed to confirm the effect of Chijagamchosi-tang extract on skin damage recovery and inflammation relief in atopic dermatitis-induced mice through Endocannabinoid system (ECS) control.

#### Methods

In this study, we used 4-week-old NC/Nga mice which were divided into four groups: control, atopic dermatitis elicited (ADEG), palmitoylethanolamide (PEA) treated after atopic dermatitis elicitation (PETG), and Chijagamchosi-tang extract treatment groups after atopic dermatitis elicitation (3GTG). Each group was assigned 10 animals. After drug administration for 3 weeks following lipid barrier elimination, cannabinoid receptor (CBR) 1, CBR 2, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OXdG), cluster of differentiation (CD) 68, matrix metalloproteinase (MMP)-9, Fc  $\epsilon$  receptor and substance P were observed to confirm the regulation of the ECS, macrophage and mast cell activities.

#### Results

We found that CBR1, CBR2, and GPR55 showed higher positive reactions in the 3GTG group than in the ADEG and PETG. 8-OHdG, CD68, and MMP-9 positive reactions were significantly lower in the 3GTG group than in ADEG and PETG groups. Both the Fc  $\epsilon$  receptor and substance P showed lower positive reactions in the 3GTG compared to the ADEG and PETG.

#### Conclusion

It was confirmed that the Chijagamchosi-tang extract can reduce the inflammation of atopic dermatitis by restoring the structural damage of the skin lipid barrier through ECS activity.

**Key words:** Chijagamchosi-tang, Atopic Dermatitis, Endocannabinoid system (ECS), Inflammation

• Received: September 24, 2024 • Revised: November 17, 2024 • Accepted: November 18, 2024

\*Corresponding Author: Kibong Kim

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

피부는 인체 내부를 보호하고, 항원이나 감염원 같은 외부의 위험인자 침입에 대한 방어기능을 담당한다<sup>1,2</sup>. 표피는 각질세포, 각질세포외막, 각질세포간 지질막, 각질교소체로 구성되며, 이를 통해 보호 장벽 기능을 담당한다<sup>3</sup>. 각질세포의 단백질외막은 involucrin, loricrin, trichohyalin 같은 단백질 결합으로 형성되었으며, 물리적 방어벽의 역할을 한다<sup>4,5</sup>. 각질세포의 지질 외막은 각질세포 사이 지질이 여러겹의 층상 구조를 형성할 수 있도록 한다. 이러한 외막들이 완전한 피부 장벽을 형성한다<sup>6</sup>.

아토피피부염 (Atopic Dermatitis)은 만성 염증성 피부질환이며, 다양한 원인들이 복합적으로 작용하여 발생한다<sup>7</sup>. 아토피피부염의 80% 이상이 대부분 5세 미만의 소아에서 발병하여 소아의 유병률이 매우 높은 질환이다<sup>8</sup>. 아토피피부염은 소아 때 발병하여 알레르기 비염이나 천식 같은 알레르기 질환으로 발전되는 경향이 높다. 따라서 발병초기에 치료, 관리, 위험인자에 대한 회피 등이 중요하다.

한의학에서는 태열 (胎熱)이 제대로 제거되지 못하여 아토피피부염이 발생한다고 보았다<sup>9</sup>. 태열은 임산부의 잘못된 식사나 생활습관으로 인해 신체 내에 축적된 열이 태아에게 전달되어 생긴다. 출생 후 이 열이 체표로 뿜어져나오면서 홍반이나 발진, 가려움 같은 증상들을 일으킨다<sup>10</sup>. 따라서 아토피피부염 치료에는 청열 효과가 있는 처방이나 한약재들이 임상 현장에서 많이 사용된다<sup>11</sup>.

치자감초시탕 (Chijagamchosi-tang)은 치자 (*Gardenia jasminoides* Ellis), 감초 (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer), 두시 (*Glycine max* (L.) Merr.)로 구성되어 있다. 치자시탕에 감초를 추가한 처방이다. 치자시탕은 삼초 (三焦)의 화사 (火邪)를 청해 (淸解)하고, 양혈 (涼血), 지혈 (止血), 해독 (解毒)하는 효과가 있다. 여기에 감초를 추가하여 치자시탕 증상과 함께 소기 (少氣)를 개선한다. 치자와 두시는 청열해독하는 효과가 있어 피부의 염증 질환에 다양하게 연구되고 있다<sup>12,13</sup>.

본 연구는 치자감초시탕 추출물의 Endocannabinoid system (ECS) 조절을 확인하고자 cannabinoid receptor (CBR) 1, CBR2, G protein-coupled receptors (GPR) 55를 관찰하였다. 또한 염증 조절을 확인하고자 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OXdG), Cluster of Differentiation (CD)

68, Matrix Metalloproteinase (MMP)-9을 관찰하였고, Mast cell 활성 조절을 확인하자 Fc  $\epsilon$  Receptor, substance P를 관찰하였다. 이를 통해 치자감초시탕 추출물이 아토피피부염의 염증을 완화시킬 수 있는 가능성을 보였기에 보고하는 바이다.

## II. Materials and Methods

### 1. Materials

#### 1) 실험동물

자마이오(대한민국)에서 분양 받은 태령 4주 Nc/Nga계 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중  $15 \pm 1$  g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군 (Ctrl), 아토피 피부염 유발군 (atopic dermatitis elicited group, ADEG), 아토피 피부염 유발 후 palmitoylethanolamide (PEA) 투여군 (PEA treated group after atopic dermatitis elicitation, PETG), 아토피 피부염 유발 후 치자감초시탕 투여군 (Chijagamchosi-tang (3G) treated group after atopy dermatitis elicitation, 3GTG)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다. 동물 실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (IACUC No. smecae - 22-12-01) 후 실시되었고, 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 NIH 가이드라인에 따라 시행되었다.

#### 2) 치자감초시탕 추출물

치자감초시탕 36 g (치자 (*Gardenia jasminoides* Ellis) 12 g, 감초 (*Glycyrrhiza uralensis* Fischer) 8 g, 두시 (*Glycine max* (L.) Merr.) 16 g)을 증류수 1000 ml에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator (Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 50 ml로 감압·농축한 후 동결 건조하여 추출물 5.64 g (수득률 15.7%) 획득하였다.

3GTG는 치자감초시탕 추출물 0.94 mg/kg을 생리식염수에 녹인 후 0.2 ml씩 3GTG에 아토피피부염 유발 후 3주 동안 경구투여하였다. PETG는 대조약물로 사용된 PEA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10 mg/kg을 생리식염수에 녹인 후 0.1 ml씩 아토피피부염 유발 후 3주 동안 경구투여하였다.

## 2. Methods

### 1) 아토피 피부염 유발과 치료약물 투여

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)를 3주 동안 주 3회씩 도포하여 유발하였다.

### 2) 면역조직화학

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

피부내 Endocannabinoid system (ECS)의 변화와 기전은 항 CBR1, 항 CBR2, 항 GPR55을 이용하였으며, 산화적 스트레스 유도 손상 조절은 항 8-OHdG, 대식세포 활성화 조절은 항 CD68, 부종유발변화는 항 Matrix Metalloproteinase (MMP)-9, 비만세포 활성화는 항 Fc  $\epsilon$  Receptor, 굵기행동 조절은 항 substance P 등의 항체를 이용하여 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

우선 피부절편을 proteinase K (20  $\mu$ g /ml, Agilent Dako, Santa Clara, CA)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 1% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)이 포함된 10% normal goat serum (Vector Lab, Burlingame, CA)에서 2시간 동안 blocking 반응시켰다. 1차 항체인 mouse anti-CBR1 (1:100, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX), mouse anti-CBR2 (1:50, Santa Cruz Biotech), mouse anti-GPR 55 (1:50, Abcam, USA), mouse anti-8-OXdG (1:100, Santa Cruz Biotech), mouse anti-CD68 (1:100, Santa Cruz Biotech), mouse anti-MMP9 (1:200, Santa Cruz Biotech), mouse anti-Fc  $\epsilon$  Receptor (1:100, Santa Cruz Biotech), mouse anti-substance P (1:100, Santa Cruz Biotech)에 4  $^{\circ}$ 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.

### 3) 영상분석

면역조직화학의 결과는 image Pro 10 (Media cybernetics, Rockville, MD)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means  $\pm$  standard error) 되었다. 각 군의 피부표본 10개를 임의로 선정한 후 x200 배율에서 촬영한 다음 positive pixels (intensity 80~100) /20,000,000 pixels로 영상분석하였다.

### 4) 통계

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

## III. Results

### 1. ECS 조절

아토피 피부염내 ECS 활성 변화는 면역조직화학적으로 관찰하였다. CBR1은 아토피 피부염 유발 후 Ctrl (4,524  $\pm$  234 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG, PETG, 3GTG 모두에서 CBR1 양성반응이 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 370% 증가한 21,253  $\pm$  1,216 / 20,000,000 pixel로, PETG는 Ctrl에 비해 715% 증가한 36,892  $\pm$  1,362 / 20,000,000 pixel로, 3GTG는 Ctrl에 비해 1,048% 증가한 51,920  $\pm$  592 / 20,000,000 pixel로 측정되었다. 3GTG의 CBR1 양성반응은 ADEG에 비해 144%, PETG에 비해 41% 유의성 있게 증가하였다 (Figure 1).

CBR2은 아토피 피부염 유발 후 Ctrl (7,407  $\pm$  191 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG, PETG, 3GTG 모두에서 양성반응이 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 279% 증가한 28,072  $\pm$  1,059 / 20,000,000 pixel로, PETG는 Ctrl에 비해 476% 증가한 42,699  $\pm$  699 / 20,000,000 pixel로, 3GTG는 Ctrl에 비해 653% 증가한 55,799  $\pm$  1,329 / 20,000,000 pixel로 측정되었다. 3GTG의 CBR2 양성반응은 ADEG에 비해 99%, PETG에 비해 31% 유의성 있게 증가하였다 (Figure 1).

GPR55은 아토피 피부염 유발 후 Ctrl (5,307  $\pm$  203 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG, PETG, 3GTG 모두에서 양성반응이 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해

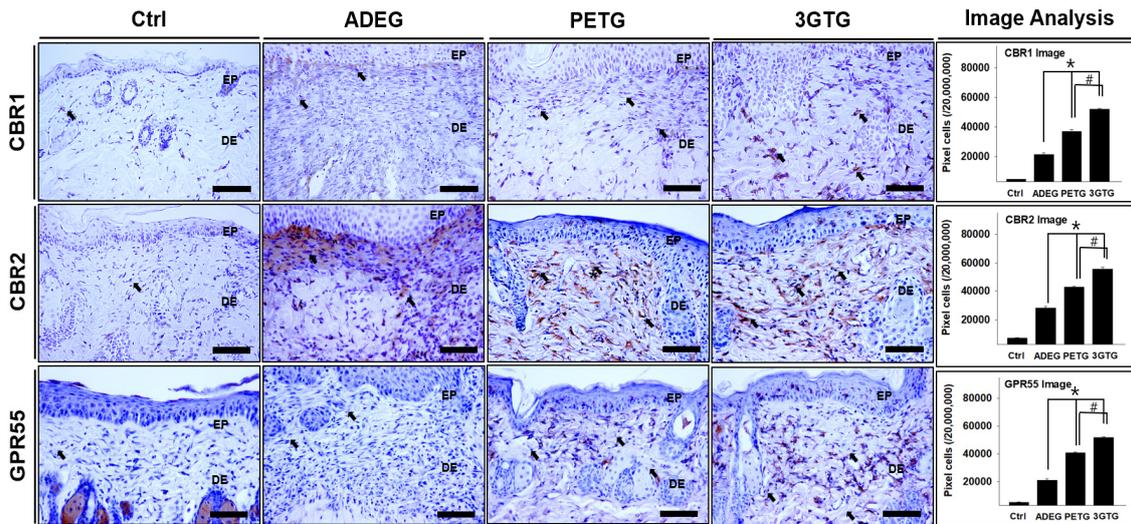


Figure 1. The activation of endocannabinoid system (ECS) in atopic dermatitis by palmitoylethanolamide (PEA) and Chijagamchosi-tang (3G).

The expression of cannabinoid receptor (CBR) 1, CBR2 and G protein-coupled receptors (GPR) (arrow indicates light brown particle) was significantly increased in PETG and 3GTG as compared with ADEG, the data of image analysis showed the same results (immunohistochemistry). *Abbreviations.* Ctrl, normal; ADEG, atopy dermatitis (AD) elicitate group; PETG, palmitoylethanolamide (PEA) treated group after AD elicitation; 3GTG, Chijagamchosi-tang (3G) treated group after AD elicitation; EP, epithelium; DE, Dermis; Bar size, 50 $\mu$ m; \*,  $p < 0.05$  compared with ADEG; #,  $p < 0.05$  compared with PETG.

295% 증가한 20,940  $\pm$  1,097 / 20,000,000 pixel로, PETG는 Ctrl에 비해 666% 증가한 40,669  $\pm$  728 / 20,000,000 pixel로, 3GTG는 Ctrl에 비해 874% 증가한 51,664  $\pm$  643 / 20,000,000 pixel로 측정되었다. 3GTG의 GPR55 양성반응은 ADEG에 비해 147%, PETG에 비해 27% 유의성 있게 증가하였다 (Figure 1).

## 2. 염증 조절

아토피 피부염내 염증 조절변화를 면역조직화학적으로 관찰하였다. 8-OXdG는 Ctrl (4,365  $\pm$  171 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG, PETG, 3GTG 모두에서 양성반응이 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 1,319% 증가한 61,942  $\pm$  1,520 / 20,000,000 pixel로, PETG는 Ctrl에 비해 908% 증가한 44,013  $\pm$  1,142 / 20,000,000 pixel로, 3GTG는 Ctrl에 비해 735% 증가한 36,449  $\pm$  1,042 / 20,000,000 pixel로 측정되었다. 3GTG의 8-OXdG 양성반응은 ADEG에 비해 41%, PETG에 비해 17% 유의성 있게 덜 증가하였다 (Figure 2).

CD68는 Ctrl (4,984  $\pm$  136 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG, PETG, 3GTG 모두에서 양성반응이 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 912% 증가한 50,423  $\pm$  854 / 20,000,000 pixel로, PETG는 Ctrl에 비해 712% 증가

한 40,480  $\pm$  618 / 20,000,000 pixel로, 3GTG는 Ctrl에 비해 473% 증가한 28,569  $\pm$  532 / 20,000,000 pixel로 측정되었다. 3GTG의 CD68 양성반응은 ADEG에 비해 43%, PETG에 비해 29% 유의하게 덜 증가하였다 (Figure 2).

MMP9는 Ctrl (7,897  $\pm$  176 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG, PETG, 3GTG 모두에서 양성반응이 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 1,047% 증가한 90,540  $\pm$  1,285 / 20,000,000 pixel로, PETG는 Ctrl에 비해 719% 증가한 64,699  $\pm$  970 / 20,000,000 pixel로, 3GTG는 Ctrl에 비해 394% 증가한 39,044  $\pm$  812 / 20,000,000 pixel로 측정되었다. 3GTG의 MMP9 양성반응은 ADEG에 비해 57%, PETG에 비해 40% 유의하게 덜 증가하였다 (Figure 2).

## 3. Mast cell 활성화 조절

아토피 피부염내 굵기 조절 변화를 Fc  $\epsilon$  Receptor와 substance P 항체를 이용한 면역조직화학적으로 관찰하였다. 비만세포 활성화 지표인 Fc  $\epsilon$  Receptor 양성반응은 Ctrl (7,053  $\pm$  220 / 20,000,000 pixel)에 비해 ADEG, PETG, 3GTG 모두에서 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 1,206% 증가한 92,132  $\pm$  1,467 / 20,000,000 pixel

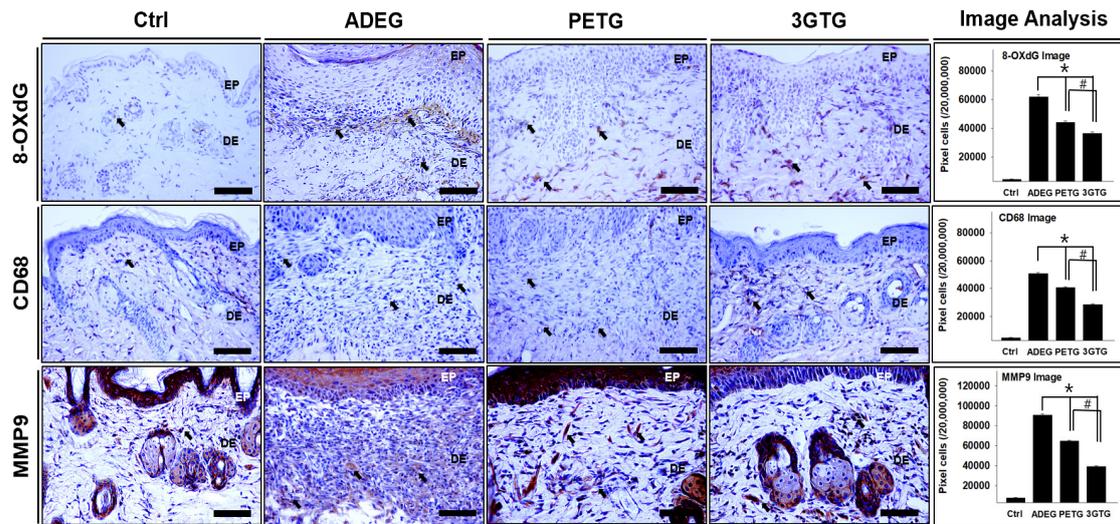


Figure 2. The activation of inflammation in atopic dermatitis by PEA and 3G.

The expression of 8-OHdG, CD68 and MMP9 (arrow indicates light brown particle) was remarkably decreased in PETG and 3GTG as compared with ADEG, the data of these image analysis showed the same results (8-OHdG, CD68 and MMP9 immunohistochemistry). Abbreviations same as Figure 1.

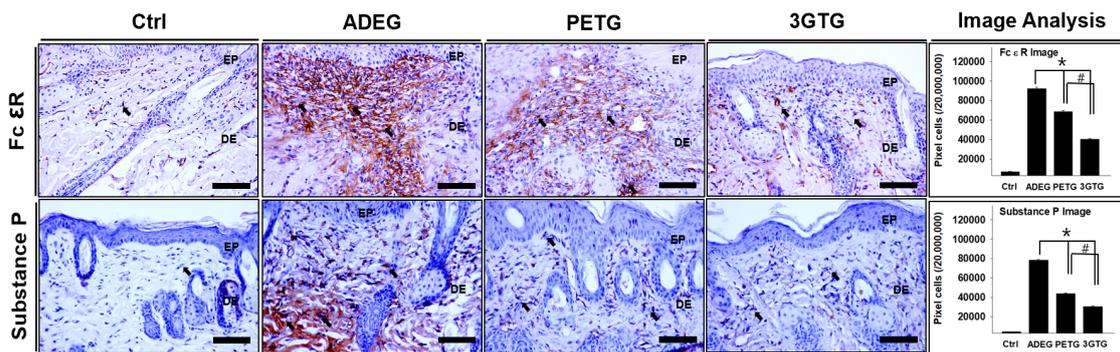


Figure 3. The activation of scratching in atopic dermatitis by PEA and 3G.

The expression of Fc ε Receptor and substance P (arrow indicates light brown particle) was remarkably decreased in PETG and 3GTG as compared with ADEG, the data of these image analysis showed the same results (Fc ε Receptor and substance P immunohistochemistry). Abbreviations same as Figure 1.

로, PETG는 Ctrl에 비해 872% 증가한  $68,588 \pm 1,108 / 20,000,000$  pixel로, 3GTG는 Ctrl에 비해 471% 증가한  $40,283 \pm 788 / 20,000,000$  pixel로 측정되었다. 3GTG의 Fc ε Receptor 양성반응은 ADEG에 비해 56%, PETG에 비해 41% 유의성 있게 덜 증가하였다 (Figure 3).

Substance P 양성반응은 Ctrl ( $4,412 \pm 151 / 20,000,000$  pixel)에 비해 ADEG, PETG, 3GTG 모두에서 증가하였다. ADEG는 Ctrl에 비해 1,676% 증가한  $78,372 \pm 1,014 / 20,000,000$  pixel로, PETG는 Ctrl에 비해 889% 증가한  $43,623 \pm 1,018 / 20,000,000$  pixel로, 3GTG는 Ctrl에 비해 588% 증가한  $30,366 \pm 915 / 20,000,000$

pixel로 측정되었다. 3GTG의 substance P 양성반응은 ADEG에 비해 61%, PETG에 비해 30% 유의성 있게 덜 증가하였다 (Figure 3).

#### IV. Discussion

치자감초시탕은 치자, 감초, 두시로 구성되어 있다. 치자는 치자나무 (*Gardenia jasminoides* Ellis) 또는 동속식물의 성숙한 과실로서, 사화제번 (瀉火除煩), 양혈해독 (涼血解毒), 청열이뇨 (清熱利尿)하는 효능이 있

어, 황달, 소변불리 등에 사용된다<sup>12)</sup>. 치자의 주요 활성 성분으로 이리도이드 배당체 (iridoid glycoside)와 crocin 등이 있으며, 대표 성분인 geniposide는 항염증, 면역조절, 항산화, 항종양 및 신경 보호 등의 약리학적 활성이 보고되었다<sup>14)</sup>. 두시는 콩과에 속한 1년생 본초인 콩 (大豆, *Glycine max* Merrill)의 성숙한 종자를 삶아서 발효시킨 것으로, 해표 (解表), 제번 (除煩), 선발열 (宣發鬱熱)한다. 콩에 함유된 isoflavone 중 하나인 genistein은 항산화, 항염증, 항세포사멸 효과가 있으며<sup>15)</sup>, 여러 연구들에서 Th2 면역 조절 효과를 통한 염증성 알러지 질환의 치료 효과를 보고하였다<sup>13,16,17)</sup>. 감초는 甘平無毒한 성미 (性味)로 율폐 (潤肺), 조화제약 (調和諸藥), 해독 (解毒), 화중완급 (和中緩急)하며, 항염증 및 항알러지 작용이 있다. 감초의 성분인 glycyrrhizin, liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin는 항균 효과가 있다<sup>18,19)</sup>.

Endocannabinoid system (ECS)은 기억, 사고, 운동, 통각, 면역 등을 조절하는 생물학적 시스템이다. Cannabinoid receptors (CBRs), CBRs의 endogenous ligands, CB의 합성 및 분해에 관여하는 효소로 구성된다<sup>20)</sup>. 주요 CBR은 CBR1과 CBR2이며, 최근 GPR55가 새로운 CBR로 추가되어졌다<sup>21)</sup>. ECS의 활성과 변화는 질환이나 장애의 진행을 지연시키거나 감소시킬 수 있다<sup>22)</sup>. 이러한 ECS의 변화는 뼈, 근육, 면역계, 위장관, 신장, 피부, 중추신경계, 심혈관계 등의 인체조직과 연결되어져 있다<sup>23)</sup>. 따라서 ECS가 제대로 작동하지 않으면 아토피피부염 같은 피부장벽 이상이라는 병리적 문제가 생긴다<sup>24)</sup>.

ECS는 피부에서 나타나는 다양한 변화에 관여한다<sup>25)</sup>. 표피의 각질세포에서 CB1, CB2, CBR55가 활성화되면 각질세포의 증식과 분화를 억제하고<sup>26)</sup>, 염증을 유발하고<sup>27)</sup>, 세포사멸 (apoptosis)를 유도한다<sup>28)</sup>. 또한 CB1와 CB2 receptor의 활성화는 염증발생과 면역세포 침투를 감소시킨다<sup>29)</sup>. 따라서 ECS는 가려움증 같은 증상을 억제시키고<sup>30,31)</sup>, 피부에서 염증 반응을 조절한다. 이러한 ECS의 작용 때문에 최근 ECS와 관련된 다양한 연구들이 진행되고 있고, 새로운 치료법으로 대두되고 있다<sup>29,32)</sup>.

본 연구에서는 3GTG의 CBR1의 양성반응은 ADEG에 비해 144%, PETG에 비해 41% 유의하게 증가하였고, CBR2의 양성반응은 ADEG에 비해 99%, PETG에 비해 31% 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 치자감초시탕 추출물이 CBR1, CBR2, GPR55와 같은 ECS 구성 요소의 생성을 증가시킨다는 것을 의미한다. 치자

감초시탕 추출물이 ECS에 관여하여 아토피피부염의 증상을 완화시킬 수 있는 가능성을 제시한다.

아토피피부염 환자는 IgE의 분비가 증가한다. IgE의 분비는 mast cell의 탈과립화 (degranulate)를 유도하여 탈과립세포의 침착을 증가시킨다. 비만세포는 세포 표면에 Fc ε receptor를 발현하고, IgE와 항원들이 이 수용체와 결합하면 비만세포가 활성화되면서 탈과립화가 진행된다. 탈과립화가 되면 활성화된 비만세포는 histamine, serotonin, substance P, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) 등의 염증성 매개물질을 분비하여 염증반응을 유도한다<sup>33)</sup>. MMP-9은 cytokines과 같은 자극에 의하여 합성되고 분비되어 세포구조를 변화시킨다<sup>34)</sup>. 또한 기저막을 파괴하여 염증과 관련된 세포들의 이주를 용이하게 한다<sup>35,36)</sup>. CD68은 대식세포 및 단핵구에서 발현되는 단백질이며, 염증질환과 면역질환에서 면역세포의 활성화와 염증 정도를 평가하는 지표이다. 아토피피부염에서 나타나는 피부 염증은 각질세포의 증식과 염증성 cytokine의 과발현으로 유발되며, 이는 CD68 활성화와 연관되어 있다<sup>37)</sup>.

8-OXdG는 피부염유발로 인한 산화적 스트레스 손상 정도를 보여주는데, 본 연구에서 8-OXdG 양성반응은 3GTG가 ADEG와 PETG에 비해 유의하게 덜 증가하였다. CD68와 MMP-9의 양성반응 역시 3GTG가 ADEG와 PETG에 비해 유의하게 덜 증가하였다. 이러한 결과들은 치자감초시탕 추출물이 ECS 조절을 통하여 비만세포의 탈과립화를 억제시키고, 염증성 매개물질의 분비를 조절하여 염증 발생을 감소시킬 수 있음을 의미한다.

가려움은 아토피피부염의 주요 증상 중 하나이며, 환자가 가장 많이 호소하는 증상이다. 이 가려움은 IgE에 의해 Mast cell의 탈과립화에서 시작된다<sup>38)</sup>. 비만세포 표면의 수용체에서 IgE와 항원이 결합하면 비만세포가 활성화된다. 이 과정에 관여하는 물질 중 하나가 Fc ε Receptor이다. 활성화된 비만세포는 염증성 매개물질을 분비하여 염증반응을 일으킨다. Substance P는 염증성 매개물질 중 하나로서, cytokine의 분비를 조절한다. 또한 Substance P는 혈관을 이완시켜 투과성을 증가시키고, histamin 분비를 유발하여 염증반응을 촉진하고, 가려움을 유발한다. 따라서 Substance P는 염증이거나 가려움의 변화를 보는 연구에서 간접적인 지표로 많이 활용된다.

본 연구에서는 치자감초시탕 추출물이 ECS 조절을 통하여 비만세포의 활성을 억제함을 확인하고자 Fc ε

Receptor의 양성반응을 관찰하였다. Fc  $\epsilon$  Receptor 양성 반응은 3GTG가 ADEG에 비해 56%, PETG에 비해 41% 유의하게 덜 증가하였다. 또한 비만세포에서 방출되는 염증 매개물질을 억제함을 확인하고자 Substance P의 양성반응을 관찰하였다. Substance P의 양성반응은 3GTG가 ADEG에 비해 61%, PETG에 비해 30% 유의하게 덜 증가하였다. 이러한 결과는 치자감초시탕 추출물이 비만세포의 탈과립화를 억제시켜서 가려움 발생을 감소시킬 수 있음을 의미한다.

결론적으로 본 연구에서 치자감초시탕 추출물은 CBR1, CBR2, GPR55와 같은 ECS의 구성 인자들을 변화시켰다. 치자감초시탕 추출물은 8-OXdG, CD68, MMP-9의 변화를 통해 염증반응을 억제시킬 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한 Fc  $\epsilon$  Receptor, Substance P의 변화를 통해 피부 가려움을 완화시킬 수 있는 가능성도 보여주었다. 이러한 결과로 볼 때, 치자감초시탕 추출물은 ECS 개입을 통해 아토피피부염 증상을 완화시킬 수 있을 것으로 기대된다. 다만 이 연구는 동물실험에서 제한적으로 진행된 연구이고, ECS 작용기전을 명확하게 밝히지 못하였다. 따라서 우리는 향후 추가적인 연구가 필요하다고 생각한다.

## V. Conclusion

본 연구는 치자감초시탕 추출물의 CB1, CB2, GPR55를 통한 ECS 조절과 8-OHDG, CD68, MMP-9 변화를 통한 염증 조절, Fc  $\epsilon$  receptor, Substance P 변화를 통한 Mast cell 활성 조절을 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CBR1의 양성반응은 3GTG는 ADEG에 비해 144%, PETG에 비해 41% 유의하게 증가하였다.
2. CBR2의 양성반응은 3GTG는 ADEG에 비해 99%, PETG에 비해 31% 유의하게 증가하였다.
3. GPR55의 양성반응은 3GTG는 ADEG에 비해 147%, PETG에 비해 27% 유의하게 증가하였다.
4. 8-OXdG 양성반응은 3GTG는 ADEG에 비해 41%, PETG에 비해 17% 유의하게 덜 증가하였다.
5. CD68의 양성반응은 3GTG는 ADEG에 비해 43%, PETG에 비해 29% 유의하게 덜 증가하였다.
6. MMP-9의 양성반응은 3GTG는 ADEG에 비해 57%,

PETG에 비해 40% 유의하게 덜 증가하였다.

7. Fc  $\epsilon$  receptor의 양성반응은 3GTG는 ADEG에 비해 56%, PETG에 비해 41% 유의하게 덜 감소하였다.
8. Substance P의 양성반응은 3GTG는 ADEG에 비해 61%, PETG에 비해 30% 유의하게 덜 감소하였다.

## VI. Acknowledgement

이 연구는 2019년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (No. NRF2019R1A2C1002443).

## VII. References

1. Kim YJ, Ahn JY, Seo SJ, Hong CK. The effect of retinoic acid on expression of human beta defensin-2 and LL-37 in keratinocyte. J Korean Invest Dermatol. 2007;14:29-35.
2. Kwon MS, Choi TB, Kim GY. The effect on the skin barrier function of ceramide. Kor J Aesthet Cosmetol. 2005;3(1):131-7.
3. Yoon YM, Yoon JY, Lim KM, Hahn HJ, Kim YR, Ahn KJ, An SK. Effects of the complex containing *Centella asiatica*-and folic acid-fermented extracts, acetyl glutamine, and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on the inhibition of senescence and elanogenesis, promotion of collagen expression, cellular regeneration, and keratinocyte differentiation, and anti-inflammation. Kor J Aesthet Cosmetol. 2013;11(4):675-84.
4. Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodi-peptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. J Biol Chem. 1995;270(30):17702-11.
5. Steven AC, Steinert PM. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. J Cell Sci. 1994;107(2):693-700.
6. Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. Adv

- Lipid Res. 1991;24:1-26.
7. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. Lancet (London, England). 2016;387(10023):1109-22.
  8. Kim JH. Current understanding of atopic dermatitis. Pediatr Allergy Respir Dis. 2004;14(1):12-23.
  9. Im GM, Kim HJ, Jeong WY, Jeong HW. Oriental medical approach on the allergic disease. J Physiol & Pathol Korean Med. 2002;16(5):831-9.
  10. Cha HY, Ahn SH, Cheon JH, Park SY, Kim KB. Hataedock treatment has preventive therapeutic effects for atopic dermatitis through skin barrier protection in *Dermatophagoides farinae*-induced NC/Nga mice. J Ethnopharmacol. 2017;206:327-36.
  11. Muluye RA, Bian Y, Alemu PN. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of heat-clearing Chinese herbs: a current review. J Tradit Complement Med. 2014;4(2): 93-8.
  12. National Korean Medical University Common Textbook Compilation Committee. Herbology. 4th ed. Seoul: Yeongnimsa. 2006:208.
  13. Zhang T, Pan W, Takebe M, Schofield B, Sampson H, Li XM. Therapeutic effects of a fermented soy product on peanut hypersensitivity is associated with modulation of T-helper type 1 and T-helper type 2 responses. Clin Exp Allergy. 2008;38(11):1808-18.
  14. Shan M, Yu S, Yan H, Guo S, Xiao W, Wang Z, Zhang L, Ding A, Wu Q, Li SFY. A review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide, a natural product. Molecules. 2017;22(10):1689.
  15. Fereshteh NK, Morteza GB. Cellular and molecular mechanisms of genistein in prevention and treatment of diseases: An overview. J Food Biochem. 2021;45(11): e13972.
  16. Aum SH, Ahn SH, Park SY, Cheon JH, Kim KB. The anti-inflammatory effects of hataedock taken douchi extracts on atopic dermatitis-like skin lesion of NC/Nga mouse. J Pediatr Korean Med. 2016;30(2):01-09.
  17. Ahn SH, Kim JK, Cheon JH, Kim KB. The effect of douchi hataedock treatment for dermatophagoides farinae-induced atopic dermatitis-like skin lesions by controlling IL-4 activity. J Pediatr Korean Med. 2017; 31(1):43-51.
  18. Kim HJ, Bae JY, Jang HN, Park SN. Comparative study on the antimicrobial activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts with various countries of origin as natural antiseptics. Korean J Microbiol Biotechnol. 2013;41(3):358-66.
  19. Kim HJ, Jang HN, Bae JY, Ha JH, Park SN. Antimicrobial activity, quantification and bactericidal activities of licorice active ingredients. Korean J Microbiol Biotechnol. 2014;42(4):386-92.
  20. Salzet M. Invertebrate molecular neuroimmune processes. Brain Res Rev. 2000;34(1):69-79.
  21. 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.
  22. 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.
  23. Pacher P, Batkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacol Rev. 2006;58(3):389-462.
  24. Kupczyk P, Reich A, Szepietowski JC. Cannabinoid system in the skin - a possible target for future therapies in dermatology. Exp Dermatol. 2009;18(8):669-79.
  25. Luger TA. Neuromediators--a crucial component of the skin immune system. J Dermatol Sci. 2002;30(2):87-93.
  26. Maccarrone M, 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.
  27. 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.
  28. 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.
  29. Piazza PV, Lafontan M, Girard J. Integrated physiology

- and pathophysiology of CB1-mediated effects of the endocannabinoid system. *Diabetes Metab.* 2007;33(2): 97-107.
30. Walker JM, Hohmann AG. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;168: 509-54.
31. 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.
32. 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.
33. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med.* 2012;106(1):9-14.
34. Woessner JF Jr. MMPs and TIMPs-an historical perspective. *Mol Biotechnol.* 2002;22(1):33-49.
35. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci.* 2006;11(1): 529-43.
36. 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.
37. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):289-301.
38. Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344(1):30-7.