

Original Article

# 건선 모사 피부 염증모델에서 대황목단피탕(大黃牧丹皮湯)의 효능 연구

노경란<sup>1#</sup>, 권빛나<sup>1,2,#</sup>, 김동욱<sup>1,2,#</sup>, 오진영<sup>1</sup>, 양갑식<sup>3\*</sup>, 조일주<sup>4\*</sup>

1. 원광대학교 한의과대학 약리학교실
2. 원광대학교 한방심신증후군연구센터
3. 우석대학교 한의과대학 임상약리연구실
4. 원광대학교 한의과대학 뇌졸중한의중점연구센터

## Effect of Daehwangmokdanpitang on psoriasis-like skin inflammation

Gyeong-Ran Noh<sup>1#</sup>, Bitna Kweon<sup>1,2,#</sup>, Dong-Uk Kim<sup>1,2,#</sup>, Jin-Young Oh<sup>1</sup>, Gabsik Yang<sup>3\*</sup>, Il-Joo Jo<sup>4\*</sup>

1. Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Wonkwang University
2. Hanbang cardiorenal syndrome research center, Wonkwang University
3. Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Woosuk University
4. Central Stroke Center of Korean medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University

**Objectives:** Psoriasis is a common chronic inflammatory skin disease characterized by keratinocyte hyperproliferation and an excessive inflammatory response. Agents that can attenuate keratinocyte hyperproliferation and excessive inflammatory responses are considered potentially useful for the treatment of psoriasis. Daehwangmokdanpitang (DHMDPT) exhibits a broad range of bioactivities, including anti-proliferative and anti-inflammatory effects. This study aims to evaluate the anti-psoriatic potential of DHMDPT in vitro.

**Methods:** HaCaT keratinocytes were stimulated with a mixture of IL-17A, IL-22, oncostatin M, IL-1 $\alpha$ , and TNF- $\alpha$  (M5) to establish an in vitro psoriatic keratinocyte model. Cell viability was measured using the MTT assay. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to measure the mRNA levels of the hyperproliferative marker gene keratin 6 (KRT6) and inflammatory factors such as IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-23A. Additionally, chemokines including CCL5, CCL2, CCL20, and CXCL1 were measured by qRT-PCR.

\*Corresponding author: Il-Joo Jo, Central Stroke Center of Korean medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksandaero 460, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea.

Tel: +82-63-850-6842, Email: joiljoo@naver.com

Gabsik Yang, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Woosuk University, Samrye-ro 443, Jeonju, Jeonbuk, Republic of Korea.

Tel : +82-63-290-9030, E-mail : yanggs@woosuk.ac.kr

# First author: Gyeong-Ran Noh, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksandaero 460, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea.

Tel: +82-63-850-6842, Email: n1995@naver.com

Bitna Kweon, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksandaero 460, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea.

Tel: +82-63-850-6842, Email: kbn306@naver.com

Dong-Uk Kim, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksandaero 460, Iksan, Jeonbuk, Republic of Korea.

Tel: +82-63-850-6842, Email: ckck202@naver.com

**Results:** DHMDPT attenuated M5-induced hyperproliferation, as indicated by a reduction in KRT6 expression in HaCaT keratinocytes. M5 stimulation significantly upregulated the mRNA levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-23A. However, DHMDPT treatment attenuated the upregulation of IL-6 but not TNF- $\alpha$  or IL-23A. Additionally, DHMDPT inhibited the expression of CCL5, CCL2, and CXCL1, but not CCL20.

**Conclusion:** DHMDPT effectively attenuated the M5-induced proliferation and inflammatory response in HaCaT keratinocytes. Therefore, DHMDPT could be an attractive candidate for future development as an anti-psoriatic agent.

**Key words :** HaCaT cell, psoriasis, keratinocytes, Daehwangmokdanpitang

## 서론

피부질환 중 하나인 건선은 전 세계 인구의 2~3%에 영향을 미치는 흔한 만성 염증성 질환이다<sup>1)</sup>. 건선은 표피와 진피에 염증 세포의 과도한 증식과 비정상적 세포 분화가 특징으로 나타난다<sup>2)</sup>. 정확한 건선의 병인은 여전히 명확하지 않지만, 일반적으로 표피세포와 면역세포 간의 비정상적인 상호작용이 건선의 병인 및 발달에 중요한 역할을 한다고 여겨진다<sup>2)</sup>. 병소에서 면역 세포가 분비하는 다양한 사이토카인에 의한 표피세포의 자극은 표피세포의 과도한 증식에 기여할 수 있으며, 과도하게 증식한 표피세포는 다시 이러한 사이토카인에 반응하여 대량의 염증성 사이토카인을 생성하여 염증 반응을 지속하거나 심화시킬 수 있다<sup>3)</sup>. 따라서 표피세포의 과도한 증식을 감소시키거나 과도한 염증을 억제하는 전략은 건선 치료에 잠재적으로 유용할 것으로 여겨진다.

건선의 영향을 받은 피부 부위에서는 케모카인, 염증성 사이토카인 및 항균 펩타이드(S100 calcium binding protein A7, S100A7), 및  $\beta$ -defensin 2의 발현 수준이 상승하며, 이는 표피세포의 과도 증식을 유발한다<sup>4)</sup>. 최근에는 이러한 사이토카인-케모카인 발현을 응용하여, IL-17A, IL-22, oncostatin M, IL-1 $\alpha$ , 그리고 TNF- $\alpha$  (M5) 사이토카인의 혼합물을 in vitro에서 건선 모사 모델로 이용하고 있다<sup>5,6)</sup>. 따라서 본 연구에서는 각질형성 세포의 비정상적인 증식과 분화를 모사한 M5모델을 이용하여 새로운 건선 조절 한의소재를 조사하였다.

대황목단피탕(大黃牡丹皮湯)은 금궤요략(金匱要略)에서 처음 수록된 처방으로 대황(大黃), 목단피(牡丹皮), 망초(芒硝), 도인(桃仁), 팔루인(栝樓仁)로 구성되어 있다<sup>7)</sup>. 본 방은 한의학적으로 사열파어(瀉熱破瘀)하여 산결소종(散結消腫)하는 효능이 있어 혈기(血氣)가 응취(凝聚)하고 어열(瘀熱)이 울결(鬱結)하여 소산(消散)되지 못하는 장옹(腸癰)을 치료할 때 사용되었다<sup>7)</sup>. 본 연구팀은 네트워크 약리학을 이용하여 대황목단피탕의 건선 조절 효능 및 작용 기전을 예측하였고, 이에 사이토카인 억제를 통하여 건선 개선 가능성이 있을 것이라 보고하였다<sup>8)</sup>. 또한 본 방의 군약(君藥)인 대황이 imiquimod로 유발한 건선

동물모델에서 건선 개선 효과를 보였고<sup>9)</sup>, 각 구성 약제인 목단피, 팔루인, 도인의 항염증 효과가 보고된 바 있어<sup>10-12)</sup>, 대황목단피탕의 실험적 모델에서도 건선 개선 효과가 있을 것으로 추측하였다.

이에 본 연구에서는 피부각질형성세포인 HaCaT 세포에서 M5 cocktail mix로 건선을 유도하고 대황목단피탕을 처리하였을 때 KRT6, 사이토카인 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23과 케모카인 CCL5, CCL2, CCL20, CXCL1의 활성 억제 효과를 확인하고자 하였다.

## 실험방법

### 1. 재료

#### 1) 약재 추출

대황목단피탕은 광명당 제약 (울산, 대한민국)에서 구입하여 정선 후 사용하였다. 대황목단피탕 추출물은 대황목단피탕 78.75 g에 증류수 1 L를 넣어 100°C에서 150분 동안 열수 추출한 후 -80°C에서 동결하였으며, 동결 추출물은 동결 건조기 (ShinBioBase, Dongducheon, Korea)를 이용하여 -50°C에서 4mTorr 압력으로 7일 동안 동결 건조하였다. 동결 건조된 대황목단피탕 추출물 파우더는 3차 증류수에 녹이고, 0.22  $\mu$ m filter를 이용하여 여과하여 사용하였다. 동결 건조 후 수득한 분말은 7.15 g으로 수율은 9.07%였다.

本草	사용량(g)
대황(大黃)	11.25
망초(芒硝)	11.25
목단피(牡丹皮)	18.75
도인(桃仁)	18.75
팔루인(栝樓仁)	18.75

2) 시약

RPMI 1640 medium, Fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, Tryple Express는 GibcoBRL (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, isopropanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Easy-Blue™ total RNA extraction kit는 iNtRON Biotechnology (Daejeon, South Korea)에서 구입하였으며, ReverTra Ace qPCR RT Kit는 Toyobo (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Power SYBR Green Master Mix, MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate는 Applied Biosystems (Waltham, MA, USA)에서 구입하였으며, chloroform은 Merck(Germany), Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 용액은 GenDEPOT (TX, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

인체 유래 피부각질형성세포인 HaCaT (Human Adult low Calcium High Temperature) 세포주를 RPMI 1640 medium에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가 후 37°C, 5% CO2 조건의 incubator에서 배양하였으며, 계대배양은 2~3일 간격으로 유지하였다.

2) 세포독성평가

HaCaT 세포에서 대황목단피탕의 세포독성평가를 위하여 MTT 분석 방법을 이용하였다. HaCaT 세포를 24 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 분주하여 37°C, 5% CO2 조건의 incubator에서 3시간 동안 안정화하였으며, 그 후 각 well에 대황목단피탕 추출물을 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 처리 후 24시간 동안 incubator에서 배양하였다. 배양 후 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 처리한 뒤 37°C, 5% CO2 조건의 incubator에서 30분간 배양하였다. 그 후, 상등액을 제거하였으며, DMSO 200 µl를 넣어 formazan 결정체를 용해시킨 후 96 well plate에 90 µl/well씩 분주하여 ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) 건선유발

M5 cocktail mix는 IL-17A 및 IL-22, oncostatin M, IL-1, TNF-α를 1:1:1:1 비율로 혼합해 제조하였고, HaCaT 세포에 M5 2.5 ng/ml의 농도로 처리하였다.

4) RNA 추출 및 Real time RT-PCR

HaCaT 세포를 6 well plate에 5 x 10<sup>5</sup> cell/ml로 분주하여 37°C, 5% CO2 조건에서 3시간 동안 incubator에서 안정화하였다. 그 후 대황목단피탕 추출물 1시간 전에 처리하고, 그 후 M5 cocktail mix 2.5 ng/ml를 처리하여 세포를 24시간 동안 자극하였다. Cold PBS로 2-3회 세척 후 세포만 남기고, 각 well당 1 ml의 Easy-Blue™ 용액을 넣어 세포막을 용해시킨 후 chloroform용액을 넣

고 잘 섞어준 뒤 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액과 isopropanol을 동일 비율로 섞은 뒤 15,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물을 80% ethanol로 씻고 건조하여 nuclease-free water를 15 µl씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다. 추출한 RNA 1 µg 과 ReverTra Ace™ qPCR RT Kit (TOYOBO, Tokyo, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였으며, SYBR Green Master Mix를 사용하여 Realtime reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 수행하였다. Housekeeping 유전자(HPRT)를 이용하여 RNA 양을 보정하였고, 실험에 사용한 유전자의 primer는 다음과 같다 (Table 1.)

Table 1. Primer sequence of SYBR Green Real-time PCR

No	Name	Direction	Sequence
1	HPRT	Forward	5' -TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3'
		Reverse	5' -GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3'
2	KRT6	Forward	5' -GGG TTT CAG TGC CAA CTC AG-3'
		Reverse	5' -CCA GGC CAT ACA GAC TGC GG-3'
3	TNF-α	Forward	5' -CCT CTC TCT AAT CAG CCC TCT G-3'
		Reverse	5' -GAG GAC CTG GGA GTA GAT GAG-3'
4	IL-6	Forward	5' -ACT CAC CTC TTC AGA ACG AAT TG-3'
		Reverse	5' -CCA TCT TTG GAA GGT TCA GGT TG-3'
5	IL-23A	Forward	5' -CTC AGG GAC AAC AGT CAG TTC-3'
		Reverse	5' -ACA GGG CTA TCA GGG AGC A-3'
6	CCL5	Forward	5' -CTA CTG CCC TCT GCG CTC C-3'
		Reverse	5' -TGG TGT CCG AGG AAT ATG GG-3'
7	CCL2	Forward	5' -CAC CAG CAG CAA GTG TCC C-3'
		Reverse	5' -CCA TGG AAT CCT GAA CCC AC-3'
8	CCL20	Forward	5' -CCA CCT CTG CGG CGA AT-3'
		Reverse	5' -AGA ATA CGG TCT GTG TAT CCA AGA CA-3'
9	CXCL1	Forward	5' -CCT CAA TCC TGC ATC CC-3'
		Reverse	5' -AGT TGG ATT TGT CAC TGT-3'

5) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하였으며, 실험 결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램 (v22.0)을 사용하여 평균값과 표준편차 (Mean ± Standard deviation (S.D.))를 계산하였고, one way ANOVA에 준하여, p-value가 0.05 미만일 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과

### 1. 대황목단피탕 추출물의 HaCaT 세포에 대한 세포독성

HaCaT 세포에서 대황목단피탕 추출물의 세포독성평가를 위하여 MTT분석법을 수행하였다. HaCaT 세포에 대황목단피탕 추출물을 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 mg/ml 농도로 처리 후, 24시간 뒤에 세포 생존율을 관찰하였다. 대황목단피탕 추출물의 세포독성 평가 결과, 2 mg/ml에서 유의성 있는 세포독성이 관찰되었으며, 0.1, 0.3, 0.5, 1 mg/ml 농도에서는 유의성 있는 세포독성이 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

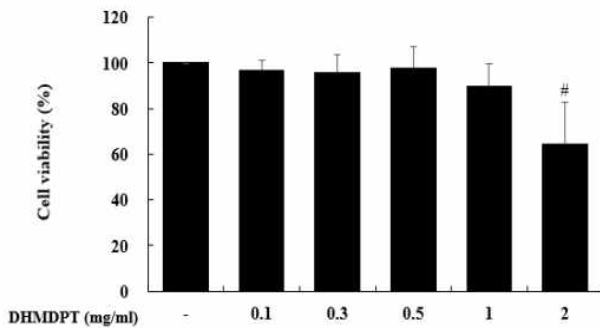


Fig. 1. Cytotoxic effects of Daehwangmokdanphee-tang(DHMDPT) in HaCaT cells. The cell viability was measured by MTT assay. HaCaT cells were incubated with or without DHMDPT as indicated doses (0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 mg/ml) for 24 h. #p < 0.05 versus normal. The values are means ± S.D. of three independent experiments.

### 2. 대황목단피탕 추출물이 KRT6 생성에 미치는 효과

피부각질형성세포의 과증식(hyperproliferation)에 대황목단피탕이 미치는 영향을 분석하기 위하여, KRT6의 발현을 조사하였다. M5 cocktail mix로 자극한 대조군에서는 정상군과 비교하여 유의성 있게 KRT6 생성이 증가하였다. 하지만 대황목단피탕 추출물 처리 시 KRT6는 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 2).

### 3. 대황목단피탕 추출물이 사이토카인 생성에 미치는 효과

본 연구에서 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23A를 측정하였다. M5 cocktail mix로 자극한 대조군의 경우 정상군과 비교하여 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23A 생성이 유의성 있게 증가하였다. 하지만 대황목단피탕 추출물 처리 시 IL-6는 유의성 있게 감소하였으며, TNF- $\alpha$ , IL-23A는 유의성 있게 감소하지 못하였다 (Fig. 3).

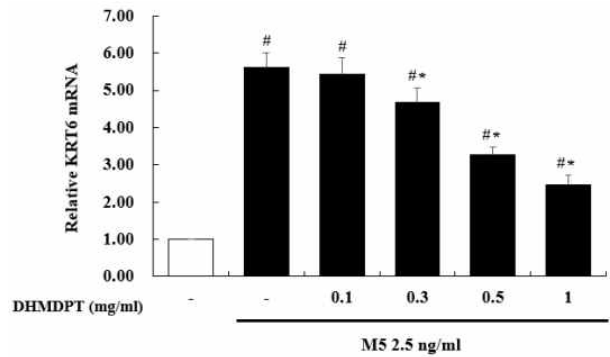


Fig. 2. Effects of DHMDPT on mRNA expression of KRT6 keratin in HaCaT cells.

HaCaT cells were pre-treated with DHMDPT (0.1, 0.3, 0.5 or 1 mg/ml) for 1 h and incubation with M5 cocktail mix (2.5 ng/ml) for 24 h. The mRNA levels of KRT6 were measured by realtime RT-PCR. #p < 0.05 versus normal. \*p < 0.05 versus M5 cocktail mix alone. The values are means ± S.D. of three independent experiments.

### 4. 대황목단피탕 추출물이 케모카인 생성에 미치는 효과

HaCaT 세포의 mRNA 수준에서 케모카인 CCL2, CCL5, CCL20, CXCL1을 측정하였다. M5 cocktail mix로 자극한 대조군의 경우 정상군과 비교하여 CCL2, CCL5, CCL20, CXCL1이 유의성 있게 증가하였다. 하지만 대황목단피탕 추출물 처리 시 CCL2, CCL5, CXCL1은 유의성 있게 감소하였으며, CCL20는 유의성 있게 감소하지 못하였다 (Fig. 4).

## 고찰

본 연구팀은 네트워크 약리학 분석 방법을 이용하여 대황목단피탕의 건선 조절 효능 및 작용 기전에 대한 multi-compound, multi-target 연구를 수행하였다<sup>8)</sup>. 대황목단피탕 구성 한약의 성분에 따른 타겟유전자 정보 데이터베이스를 기반으로 결과를 분석하였으며, 그것을 통하여 대황목단피탕은 IL-6, TNF와 같은 전염증성 사이토카인 및 ‘IL-17 signaling pathway’, ‘Toll-like receptor signaling pathway’, ‘TNF signaling pathway’ 등 면역·염증 기전에 많은 관여를 할 것을 파악하였다. 이에 본 연구에서는 네트워크 약리학 분석법에 의한 결과와 일치하는지 알아보기 위하여, 기존 문헌을 참고하여 IL-17A 및 IL-22, oncostatin M, IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  (M5) 사이토카인의 혼합물을 기반으로 건선 피부각질형성세포 모델을 사용하였다<sup>13)</sup>.

건선은 피부각질형성세포 및 T세포, 대식세포, 수지상세포 등의 매개로 인한 복잡한 염증성 피부 질환

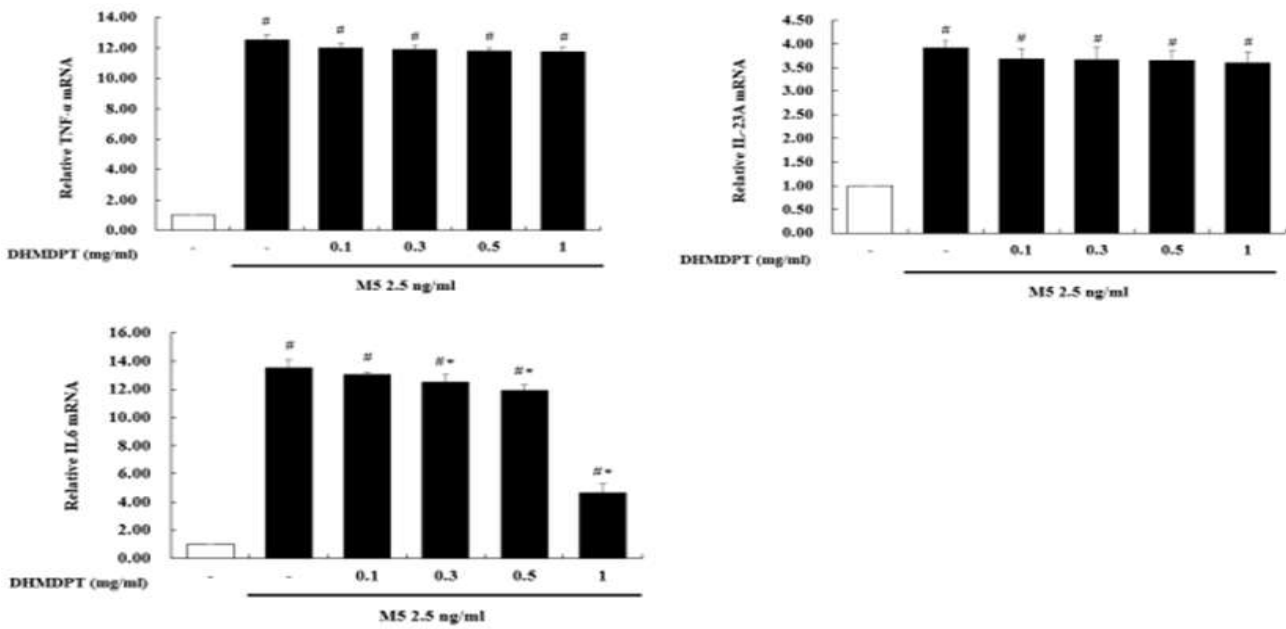


Fig. 3. Effects of DHMDPT on mRNA expression of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-23A cytokines in HaCaT cells. HaCaT cells were pre-treated with DHMDPT (0.1, 0.3, 0.5 or 1 mg/ml) for 1 h and incubation with M5 cocktail mix (2.5 ng/ml) for 24 h. The mRNA levels of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-23A were measured by realtime RT-PCR. # $p < 0.05$  versus normal. \* $p < 0.05$  versus M5 cocktail mix alone. The values are means  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

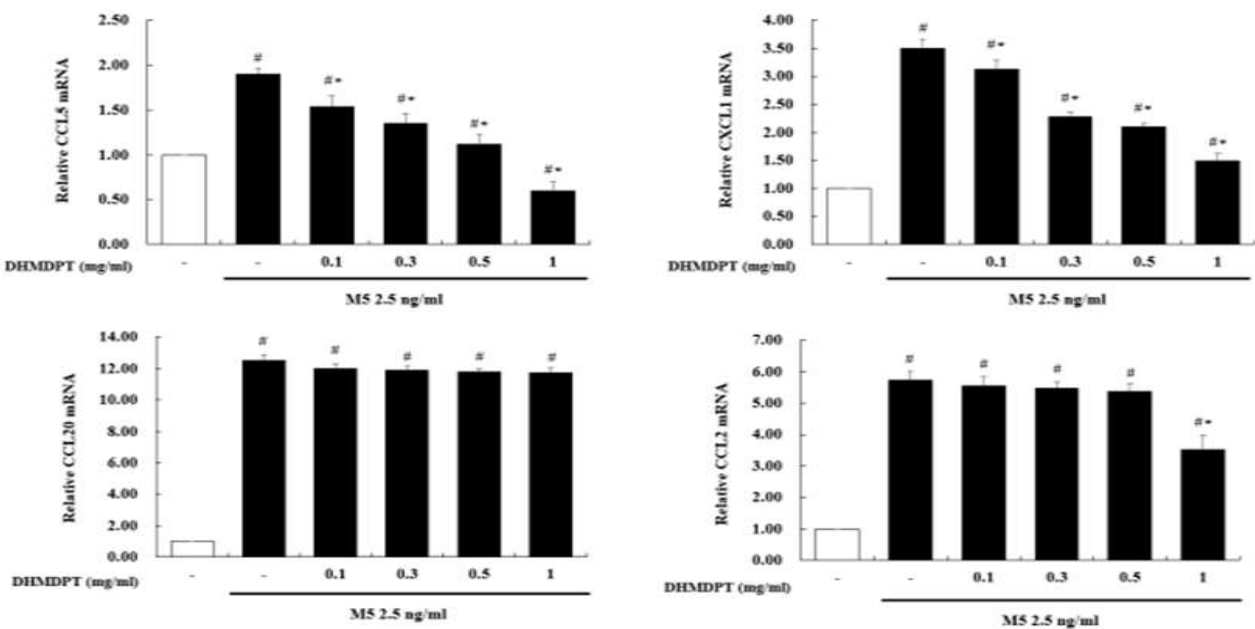


Fig. 4. Effects of DHMDPT on mRNA expression of CCL2, CCL5, CCL20, and CXCL1 chemokines in HaCaT cells. HaCaT cells were pre-treated with DHMDPT (0.1, 0.3, 0.5 or 1 mg/ml) for 1 h and incubation with M5 cocktail mix (2.5 ng/ml) for 24 h. The mRNA levels of CCL2, CCL5, CCL20, and CXCL1 were measured by realtime RT-PCR. # $p < 0.05$  versus normal. \* $p < 0.05$  versus M5 cocktail mix alone. The values are means  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

이다<sup>14</sup>). 피부각질형성세포 내에서 세포 증식과 세포 사멸 사이의 균형은 피부의 안정을 유지하는 데 중요하며, 이러한 균형이 깨지면 건선이 발생하게 된다<sup>15</sup>).

최근 연구에 따르면 각질형성세포에서 케라틴의 발현 증가는 건선 발병 과정에서 각질형성세포 증식 및 염증 반응을 조절하는데 직접적인 역할을 한다고 보고

되었다<sup>16</sup>). 따라서 KRT6는 일반적으로 각질형성세포의 과증식에 대한 건선의 바이오마커 및 잠재적인 치료 표적으로 간주된다. 본 연구에서는 HaCaT 세포에서 M5 cocktail mix로 유도된 건선 모사 피부 염증 반응에서 대황목단피탕 추출물의 효과를 확인한 결과 KRT6는 대조군에 비하여 대황목단피탕 추출물 처리군에서 유의한 감소를 보여 이는 건선으로 인한 피부과 증식을 대황목단피탕이 개선할 수 있는 가능성을 보여 주고 있으며, 대황목단피탕의 추출물이 각질세포 증식을 억제할 수 있다고 판단된다 (Fig. 2).

건선 과정 중에는 피부각질형성세포의 과다 증식 뿐만 아니라 염증 반응을 지속 및 확대하기 위해 다양한 사이토카인과 케모카인을 분비한다<sup>17</sup>). 특히, IL-6 및 TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-23 등의 사이토카인은 건선 병변에서 높은 농도로 발견되며, 염증과 각질 형성 세포의 증식을 촉진한다<sup>18</sup>). Th17 세포에서 생성되는 IL-17은 염증 반응을 지속시키고, IL-23은 Th17 세포의 분화와 생존을 지원하여 Th17 경로의 주요 인자로 작용한다<sup>19</sup>). 본 연구에서는 HaCaT 세포에서 M5 cocktail mix로 유도된 건선 모사 피부 염증 반응에서 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23A가 증가하였으며, 이 중에서 IL-6만이 대황목단피탕 추출물 처리군에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 3). IL-6는 각질 형성 세포의 증식을 촉진하고, 이들의 정상적인 분화 과정을 방해하여 건선의 특징인 두꺼운 비늘과 피부 병변을 형성하는 데 기여한다<sup>20</sup>). 그리고 건선 환자의 피부 병변과 혈청에서 IL-6 농도가 증가되어 있어<sup>21</sup>, IL-6는 건선 치료의 잠재적 표적으로 여겨지며, IL-6 경로를 차단하는 치료법이 건선의 염증과 증상을 완화하는 데 효과적일 수 있다. 이에 대황목단피탕은 IL-6 억제를 통하여 건선 개선에 효과를 보일 것으로 보인다.

케모카인은 CXC 및 CC, C, CX3C의 네 가지 하위계열로 구분되며, 다양한 조직과 침윤성 백혈구에 의해 유도적으로 분비된다<sup>22</sup>). 건선에서는 CCR2 수용체에 결합하는 CCL2가 발견되었으며, CCR5 ligand인 CCL5는 건선의 단핵세포 뿐만 아니라 케라티노사이트에서도 발현된다<sup>23</sup>). CCL20은 CCR6 수용체를 가진 세포들의 케모카인이며, 만성 염증성 질환에서 분비되고, 염증이 있는 상태에서 상피세포, 내피세포, 섬유아세포 및 단핵세포는 CCL20 생산을 돕고, 건선 피부플라크의 T세포 침윤을 조절한다<sup>24</sup>). Toll-like receptors (TLRs)는 선천 면역 시스템에서 패턴 인식 수용체 (PRR) 중 하나이며<sup>25</sup>, 건선 유발 요인에 대한 중요한 매개체이다. 피부 손상은 손상된 세포에서 dsRNA, ssRNA, DNA를 포함한 손상 관련 분자 패턴(DAMP)의 생성을 유발하여 수지상세포를 비롯한 다양한 유형의 세포에서 TLR 신호 전달을 활성화시킨다<sup>26</sup>). TLR이 병원체를 인식하고 활성화가 되면 NF- $\kappa$ B 경로를 통해 CCL2, CCL5, CXCL1과 같은 케모카인의 발현을 유도한다<sup>27</sup>). CCL20의 경우 특히 Th17 세포를 병변으로 끌어들이는 역할을 하여, IL-17을 통한 염증 반응을 증폭시키는 역할을 한다고 알려져 있다<sup>28</sup>). 본 연구에서

는 HaCaT 세포에서 M5 cocktail mix로 유도된 건선 모사 피부 염증 반응에서 케모카인인 CCL2, CCL5, CCL20, CXCL1가 증가하였으며, 이 중에서 CCL2, CCL5, CXCL1이 대황목단피탕 추출물 처리군에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 4). 이를 통해 대황목단피탕이 IL-17 signaling pathway의 조절에는 큰 관여를 하지 못하고 TLR signaling pathway를 통해 건선에 효과를 보일 것이라 사료된다.

본 연구의 실험 결과를 종합해 보았을 때, 대황목단피탕 추출물은 HaCaT 세포에서 M5 cocktail mix로 유도한 피부 염증 반응에서 KRT6, IL-6, CCL2, CCL5, CXCL1의 생성을 유의하게 억제하여 건선 개선에 잠재력이 있을 것으로 판단된다. 다만, 이 연구는 세포 모델에서만 수행되어 한계점이 있다. 추후, 마우스 등을 이용한 생체 내 연구가 추가하여 대황목단피탕의 잠재력을 심화연구 할 필요가 있다고 생각된다.

## 결론

본 연구에서는 M5 cocktail mix로 유도된 건선 모사 피부 염증 반응에서 대황목단피탕 추출물의 효과를 확인하였으며, 다음과 같은 결론을 내렸다.

1. 대황목단피탕 추출물은 HaCaT 세포에서 M5 cocktail mix로 유도된 피부에서 케라틴 KRT6를 억제하였다.
2. 대황목단피탕 추출물은 HaCaT 세포에서 M5 cocktail mix로 유도된 피부 염증 관련 사이토카인 IL-6를 유의하게 억제하였다.
3. 대황목단피탕 추출물은 HaCaT 세포에서 M5 cocktail mix로 유도된 피부 염증 관련 케모카인 CCL2, CCL5, CXCL1을 유의하게 억제하였다.

이와 같은 결과로 보아 대황목단피탕 추출물이 M5 cocktail mix로 유도된 건선 모사 피부 염증 반응에서 IL-6 및 CCL2, CCL5, CXCL1을 억제하여 건선 개선 효능을 가질 것으로 예측된다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 이공학술연구기반구축(R&D) 지역대학 우수과학자 지원사업(RS-2023-00248541)과 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료 기술연구개발사업 지원(HF22C0072)에 의하여 이루어짐.

## 이해관계

The authors declare no conflict of interest.

## 참고문헌

1. Kim DY. Anti-inflammatory Effect of Artemisiae Capillaris Herba Extracts in Psoriasis-induced Keratinocytes. *Official Journal of Korean Society for Investigative Cosmetology*. 2023;19(4):305-11.
2. Xiong H, Xu Y, Tan G, Han Y, Tang Z, Xu W, Zeng F & Guo Q. Glycyrrhizin Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Lesions in BALB/c Mice and Inhibits TNF- $\alpha$ -Induced ICAM-1 Expression via NF- $\kappa$ B/MAPK in HaCaT Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(4):1335-46.
3. Tse WP, Che CT, Liu K, Lin ZX. Evaluation of the anti-proliferative properties of selected psoriasis-treating Chinese medicines on cultured HaCaT cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;108(1):133-41.
4. Kim MY, Hwang H. Improving effect of psoriasis dermatitis by yakuchinone A in the TNF- $\alpha$  stimulated HaCaT cells. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2020;63(1):95-101.
5. Li C, Xiao L, Jia J, Li F, Wang X, Duan Q, Jing H, Yang P, Chen C, Wang Q. Cornulin is induced in psoriasis lesions and promotes keratinocyte proliferation via phosphoinositide 3-Kinase/Akt pathways. *Journal of Investigative Dermatology*. 2019;139:71-80.
6. Chen C, Wu N, Duan Q, Yang H, Wang X, Yang P, Zhang M, Liu J, Liu Z, Shao Y. Clorf99 contributes to the development of psoriasis by promoting the proliferation of keratinocytes. *Scientific Reports*. 2018;8(1):8590.
7. Kook Yb, Kim SC, Park SD, Park SK, Seo BI, Seo YB, Shin SS, Lee SI, Lee JC, Lee TH, Jung JG, Joo YS, Choi HY. Herbal Formula. seoul:Yeongnimsa. 1999:609-10.
8. Kweon BN, Kim DU, Yang GB, Jo JJ. Prediction the efficacy and mechanism of action of Daehwangmokdanpitang to treat psoriasis based on network pharmacology. *The Korea Journal of Herbology*. 2023;38(6):73-91.
9. Nguyen, LTH, Ahn SH, Shin HM, Yang JJ. Anti-Psoriatic Effect of Rheum palmatum L. and Its Underlying Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(4):16000.
10. Kim HY, Seol IC, Yoo HR, Kim YS. The Effect of Trichosanthes Kirilowii Maximowicz Extract and Trichosanthes Kirilowii Maximowicz Cheonghyeol Plus on

Anti-Inflammatory Factor Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2022; 43(4):514-28.

11. Park JH, Kim KJ. The Effect of Moutan Cortex on Pro-inflammatory Cytokines through NF- $\kappa$ B & MAPKs pathway in HMC-1. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*. 2009;22(2):1-18.

12. Joe WA, Jang MJ, Cheon SJ, Sung JY, Choi EY, Kang BY, Jung SH, Jung YS, Kim YS, An BJ, Lee CA, Lee JT. Cosmeceutical activities and Anti-inflammatory effects of Shell from Persicae semen. *The Korea Journal of Herbology*. 2006;21(2):87-93.

13. Guilloteau K, Paris I, Pedretti N, Boniface K, Juchaux F, Huguier V, Guillet G, Bernard F-X, Lecron J-C, Morel F. Skin inflammation induced by the synergistic action of IL-17A, IL-22, oncostatin M, IL-1 $\alpha$ , and TNF- $\alpha$  recapitulates some features of psoriasis. *The Journal of Immunology*. 2010;184:5263-70.

14. Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, Lebwohl MG, Gladman DD, Wu JJ, Mehta NN, Finlay AY, Gottlieb AB. Psoriasis. *Nature Review Disease Primers*. 2016;2:16082.

15. Raj D, Brash DE, Grossman D. Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(2):243-57.

16. Zhang X, Yin M, Zhang LJ. Keratin 6, 16 and 17—critical barrier alarm molecules in skin wounds and psoriasis. *Cells*. 2019;8(8):807.

17. Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML, Girolomoni G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 2005;4:329-34.

18. Cesare AD, Meglio PD, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2009;129(6):1339-50.

19. Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of Psoriasis: Recent Advances on IL-23 and Th17 Cytokines. *Current rheumatology reports*. 2007;9(6):461-67.

20. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(16):6367-71.

21. Neuner P, Urbanski A, Trautinger F, Moller A, Kirnbauer R, Kapp A, Schopf E, Schwarz T, Luger TA. Increased IL-6 production by monocytes and keratinocytes in patients with psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1991;97(1):27-33.

22. Purzycka-Bohdan D, Nedoszytko B, Zabłotna M, Gleń J, Szczerkowska-Dobosz A, Nowicki RJ. Chemokine profile in psoriasis patients in correlation with disease

severity and pruritus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13330.

23. Singh TP, Lee CH, Farber JM. Chemokine receptors in psoriasis. Expert opinion on therapeutic targets. 2013;17(12):1405-1422.

24. Li Q, Laumonnier Y, Syrovets T, Simmet T. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL20 secreted from plasmin-stimulated macrophages. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2013;45(7):593-600

25. Novoszel P, Holcman M, Stulnig G, De Sa Fernandes C, Zyulina V, Borek I, Linder M, Bogusch A, Drobits B, Bauer T, Tam-Amersdorfer C, Brunner PM, Stary G, Bakiri L, Wagner EF, Herbert Strobl, Sibilica M. Psoriatic skin inflammation is promoted by c-Jun/AP-1-dependent CCL2 and IL-23 expression in dendritic cells. *Journal of Dermatological Science*. 2021;13(4):e12409.

26. Sieminska I, Pieniawska M, Grzywa TM. The Immunology of Psoriasis—Current Concepts in Pathogenesis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2024:1-28.

27. Zdanowska N, Kasproicz-Furmańczyk M, Placek W, Owczarczyk-Saczonek A. The Role of Chemokines in Psoriasis—An Overview. *medicina*. 2021;57(8):754.

28. Li Q, Laumonnier Y, Syrovets T, Simmet T. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL20 secreted from plasmin-stimulated macrophages. 2013;45(7):593-600.