大韓本草學會誌 제34권 제2호(2019년 3월)
Kor. J. Herbol. 2019 ; 34(2) : 25-32

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2019.34.2.25.

치자추출물이 산화 반응 및 피부각질형성 세포 운동성에 미치는 영향

김지영[1], 조남준[1], 한효상[2*], 김기광[1*]

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 중부대학교 보건행정학과

Inhibitory effect of Gardeniae Fructus extracts on oxidation and motility of keratinocytes

Ji Young Kim[1#], Nam Joon Cho[1#], Hyo Sang Han[2*], Kee Kwang Kim[1*]

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
2 : Department of Health Administration, College of Social Sciences,
Joongbu University, Geumsan 312-702, Korea

ABSTRACT

Objectives : Gardeniae Fructus extract is used as a component of various cosmetics. However, the effect of the extract on the motility of keratinocytes has not been studied. The aim of this study is to investigate the inhibitory effect of ethanol extract of Gardeniae Fructus (GFET) or ethyl acetate extract of Gardeniae Fructus (GFEA) on oxidation and motility of human keratinocyte HaCaT cells.

Methods : Antioxidant activity of Gardeniae Fructus extracts were determined by the 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assay. To investigate the cytotoxicity of Gardeniae Fructus extracts, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay was performed. The mRNA expression levels of tight junction related genes were analyzed using quantitative RT-PCR analysis. Cell migration assay was employed to determine the activity of Gardeniae Fructus extracts on motility of human keratinocyte HaCaT cells.

Results : GFET and GFEA showed strong antioxidant activity. GFEA showed stronger cytotoxicity in HaCaT cells than GFET until 2.0 ㎎/㎖ concentration. Cell migration assay demonstrated that GFET and GFEA decreased the motility of HaCaT cells. In addition, the mRNA expression level of claudin 8 among tight junction genes was significantly reduced by GFET or GFEA treatment.

Conclusions : We investigated the physiological activities of the extracts of Gardeniae Fructus extracts on human keratinocytes by two different extraction methods. In addition, the mRNA expression level of claudin 8 among tight junction genes was significantly reduced by either GFET or GFEA treatment. This study provides basic information on the application of Gardeniae Fructus extract to cosmetics component.

Key words : Gardeniae Fructus, Antioxidant effect, Human keratinocyte, Tight junction, Cell motility

*Corresponding author : Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Health and Welfare, Joongbu University, Geumsan 32713, Republic of Korea.
· Tel : +82-41-750-6292. · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr
Kee Kwang Kim, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.
· Tel : +82-42-821-5485. · E-mail : kimkk@cnu.ac.kr
#First author : Ji Young Kim, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.
· Tel : +82-42-821-7525. · Fax : +82-42-822-7548. · E-mail : kjy0_0@naver.com
Sun Kyung Choi, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.
· Tel : +82-42-821-7525. · Fax : +82-42-822-7548. · E-mail : skawns119@naver.com
· Received : 09 January 2019 · Revised : 18 February 2019 · Accepted : 25 March 2019

Ⅰ. 서 론

상처의 회복은 복잡한 일련의 생물학적 과정들에 의해 나타난다[1]. 상처가 생기면 혈소판이 가장 먼저 모여 혈전을 생성한다. 그와 동시에 면역 세포는 전염증성 사이토카인을 분비하고 염증세포는 많은 양의 활성산소를 생성한다[2]. 세포 감염 후 수일 내에 면역세포와 염증성 사이토카인이 감소하는 동시에 각질형성세포와 섬유아세포, 내피세포가 이동하면서 다양한 성장 인자가 분비된다. 이후 상피세포가 이동함에 따라 섬유아세포가 상처 부위의 가장자리에 붙으면 각질형성세포의 이동과 증식이 유도되며 최종적으로 새로 만들어지는 조직에 산소와 영양분이 공급되며 섬유아세포가 콜라겐과 같은 기질 단백질을 분비하면서 조직들이 연결된다[3]. 상처의 회복이 지연될 경우 출혈, 수분 소실에 의한 세포의 사멸, 박테리아나 혹은 바이러스에 의한 감염 등 다양한 위험에 노출된다. 반대로 과도하게 빠른 상처의 회복은 콜라겐의 과도한 생성이 유도되어 흉터를 형성하는 원인이 된다. 따라서 피부에 상처가 발생될 경우에 정상적인 상처의 회복 과정을 나타내는 것은 2차적으로 발생되는 질병의 발생을 막기 위해 매우 중요하다.

치자는 ≪신농본초경≫에 처음 수재되었으며, 임상에서 瀉火除煩, 淸熱利尿, 涼血解毒의 효능이 있어 熱病心煩, 黃疸尿赤, 血淋澀痛, 血熱吐衄, 目赤腫痛, 火毒瘡瘍의 증상과 捻挫傷痛을 치료하는 데 사용되고 있다[4]. 치자는 대한민국 약전에 치자나무 *Gardenia jasminoides* Ellis (꼭두서니과 Rubiaceae)의 잘 익은 열매라고 수재되어 있다[5]. 치자의 주성분은 iridoidal glycosides로 gardenoside, geniposide, shanzhiside, gradoside 등이 함유되어 있다. 이 외 chlorogenic acid, gardenin, crocin, crocetin, β-sitosterol 및 ursolic acid 등이 함유되어 있다[6]. 치자의 약리작용으로는 항산화 및 항균활성효과[7, 8], 전자공여능과 아질산염 소거능[9], 항염증 활성[10], 산화방지, 산화질소 제거 및 암세포증식 억제 활성[11] 등의 여러 연구들이 보고되었다.

치자추출물은 B16F10 세포의 melanogenesis를 억제하는 효능이 있어 미백 원료로 개발할 수 있는 가능성이 확인되었으며, 피부에 산화적 스트레스를 유도하는 squalene monohydroperoxide의 처리 혹은 피부 노화를 유도하는 UV 조사를 실시한 hairless 마우스에 치자 열수추출물을 도포할 경우 유의하게 홍반의 생성이 억제되며 피부 유분과 수분의 감소가 억제되는 효능이 있음이 규명되었다[12, 13]. 하지만 아직까지 피부의 상처 회복을 위해 중요한 각질형성세포의 운동성에 미치는 영향은 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 치자추출물의 항산화 효능 및 세포 운동성에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 국산 치자는 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 2018년 8월에 구매 (NO; 2018-0831)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였고, brazilin은 ChemFaces (China)를 통해 개별 구매하여 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 Dulbecco's modified Eagle medium (Welgene, Korea), fetal bovine serum (Welgene, Korea), 100 U/mL penicillin, 100 ㎍/mL streptomycin (Welgene, Korea), filter paper (Advantec No. 2, Japan), PBS (Phosphate-buffered saline, Corning, USA), Trypsin-EDTA (Welgene, Korea), potassium persulfate (SIGMA, USA), ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, SIGMA, USA), MTS solution (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Promega, USA), Hybrid-R RNA purification kit (GeneAll, Korea), Qubit RNA Assay Kit (Molecular probes, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzynomics, Korea), eCube 2X Prime Q-master Mix (Genet bio, Korea), RiboEX 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 vacuum evaporator (Kyungseo, Korea), freeze dryer (Cuddon, New Zealand), water bath (HAAKE, Germany), CO_2 incubator (Thermo Fisher, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA) 등이다.

2. 방법

1) 추출물 제조

5 g 중량의 치자 약재를 환류추출기에 99.5% ethanol 혹은 99.8% ethyl acetate 200 ml와 함께 넣어준 뒤 탕액이 끓는 시점으로부터 2 h 동안 가열하였다. 추출액을 filter paper에서 감압하여 여과액 을 제작한 후, rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 제작하였다. 동결건조 추출물은 1.1 g으로 측정되었으며, 수율은 22%였다. 白首烏 중량 50 g을 정확하게 측정한 뒤, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 탕액이 끓는 시점으로부터 2 h 동안 가열하여 추출한 다음 치자 추출물과 같은 방법으로 동결건조 추출물을 얻었으며 수율 32.4%였다.

2) 세포 배양

사람 피부각질형성 세포인 HaCaT 세포 (Thermo Fisher Scientific, USA)의 배양은 37℃, 5% CO_2 환경에서 10% (v/v) FBS와 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin이 포함된 DMEM media를 사용하여 배양하였다.

3) 항산화 효능 평가

활성산소 항산화 효능은 ABTS assay를 이용해 확인하였다. Potassium persulfate 2.4 mM과 ABTS 7 mM을 1:1 부피비로 혼합한 후 24 h 동안 실온에서 차광된 상태로 반응시켜 ABTS free radical로 만들었다. 그 후 증류수로 희석하여 650 nm 흡광도가 0.7 부근이 되도록 하는 ABTS working solution을 제작하였다. 96 well plate에 ABTS working solution 80 ㎕와 시료 20 ㎕, 혹은 증류수 20 ㎕를 넣고 5 min간 반응시킨 후 650 nm 흡광도를 측정하였다. 시료의 흡광도를 보정하기 위해 증류수 80 ㎕와 시료 20 ㎕를 혼합하여 650 nm 흡광도를 측정하였다. 항산화 효능은 다음 식을 이용해 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{ASample} - \text{ASampleblank}}{\text{ABlank}}\right) \times 100$$

항산화 효능의 half maximal inhibitory concentration (IC50)은 excel software을 이용해 계산하였다.

4) 세포 생존율 평가

치자가 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTS assay를 실시하였다. 96 well plate에 HaCaT 세포를 5,000 cells/well로 분주하고 24 h 동안 배양한 후 각 치자추출물을 농도 별로 처리하고 다시 36 h 동안 배양해주었다. 그 후 MTS 용액 20 ㎕를 첨가하고 microplate reader를 이용하여 490 nm 흡광도를 측정하였으며, 치자추출물 자체의 흡광도 또한 MTS 용액 20 ㎕를 첨가한 후 490 nm 흡광도를 측정하여 보정해주었다. 이후 시료를 처리하지 않은 대조군 측정값과 시료를 처리한 실험군의 측정값의 비교를 통해 세포의 생존율을 백분율로 표시하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{\text{시료첨가군의 흡광도} - \text{시료 자체의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

5) Cell Migration Assay

치자추출물의 처리에 의한 세포의 운동성을 확인하기 위하여 cell migration assay를 실시하였다. HaCaT 세포를 6 well plate에 6×10^5 cells/well로 분주한 후, 세포가 plate에 confluent 될 때까지 배양해주었다. HaCaT 세포의 표면에 200p tip을 이용하여 wound를 만든 뒤, 각 well에 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 0.5 mg/ml 농도로 치자추출물을 처리한 다음 24 h 동안 배양하였다. 시간에 따른 healing 정도를 현미경으로 관찰하여 ImageJ software로 남아있는 wound의 면적을 측정한 후, 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료첨가군의 세포 이동 면적을 백분율로 표시하여 상대적인 closure rate를 측정하였다.

6) RNA 추출 및 quantitative real-time PCR

6 well culture dish에 1×10^5 cells/well로 HaCaT 세포를 분주하고 24 h 동안 배양하였다. 그 후 치자추출물을 0.5 mg/ml 농도로 처리한 후 다시 36 h 동안 배양하였다. 각

Table 1. Primer sequences

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (℃)
Claudin 1	F	GCA GAT CCA GTG CAA AGT CT	136	58
	R	CAT ACA CTT CAT GCC AAC GG		
Claudin 3	F	GCA TGG ACT GTG AAA CCT CA	145	58
	R	AAT ATC AAG TGC CCC TTC CA		
Claudin 4	F	CGC ATC AGG ACT GGC TTT AT	131	58
	R	AGT TGA GGA CCT GGA AGG CT		
Claudin 6	F	GGC CCT CTG AGT ACC CTA CC	136	58
	R	GCA GGA GGC AGA AAC AAA AG		
Claudin 7	F	ATG TAC AAG GGG CTG TGG AT	132	58
	R	CAC CAG GGA GAC CAC CAT TA		
Claudin 8	F	GGC TGT TTC TTG GTG GTG TT	137	58
	R	CAC GCA ATT CAT CCA CAG TC		
Occludin	F	TTT GTG GGA CAA GGA ACA CA	137	58
	R	ATG CCA TGG GAC TGT CAA CT		
JAM-A	F	TGC CTC TTC ATA TTG GCG AT	144	58
	R	TGT CAC GGA CTT GAA GGT GA		
Zo-1	F	AGA GCA CAG CAA TGG AGG AA	133	58
	R	GAC GTT TCC CCA CTC TGA AA		
Zo-2	F	AGC AGG AGC AGA AGC AGA AG	148	58
	R	CAT ATC AGC TCT TCC ATG CC		
Tricellulin	F	GGC AGC TCG GAG ACA TAG AG	147	58
	R	TTT GCT GTT CTC AGT TCC TTG A		
β-actin	F	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

시료가 첨가된 배지를 제거한 후 PBS로 세척한 뒤 Hybrid-R RNA purification kit를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 The Qubit 2.0 Fluorometer로 정량하였고, Total RNA 500 ng에 Random Hexamer (100 pmol/㎕) 1 ㎕, dNTP mix (10∨mM) 1 ㎕를 넣은 후 총 부피가 8 ㎕가 되도록 DEPC-treated water를 이용하여 조정하였다. 65℃에서 5 min간 반응시킨 후 즉시 얼음에 냉각시킨 다음 각각 DEPC-treated water 4 ㎕, 5X M-MLV RT reaction buffer 4 ㎕, M-MLV reverse transcriptase 1 ㎕, RNase inhibitor 1 ㎕를 추가로 넣어주었다. 실온에서 10 min간 반응시킨 후에 50℃에서 1 h 동안 cDNA를 합성하였다. 이렇게 합성한 cDNA는 증류수를 이용해 1/10로 희석하여 실험에 사용하였다. AriaMX를 이용한 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 실시하여 치자추출물에 따른 tight junction 관련 유전자의 mRNA 발현량을 측정해보았다. 2X Prime Q-master mix 10 ㎕, forward primer (10 pmol/㎕) 1.5 ㎕, reverse primer (10 pmol/㎕) 1.5 ㎕, nuclease free water 2 ㎕, 1/10로 희석시킨 cDNA 5 ㎕를 넣고 qRT-PCR을 수행하였다. 실험군과 대조군의 internal standard로 β-actin을 사용하였고, 실험에 사용한 primer의 염기 서열은 Table 1과 같다.

7) 자료 분석 및 통계 처리

대조군에 대한 실험군의 유의성은 Student's t-test를 이용하여 $p<0.05$ 일 때 유의한 것으로 판단하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 치자추출물의 항산화 효능 검증

활성산소는 염증반응과 피부 노화와 같은 각종 피부 질환을 야기하기 때문에 이를 예방하기 위해서는 항산화 효능이 중요하다. 치자추출물의 항산화 효능을 확인하기 위해 ABTS assay를 실시하였고, 항산화 효능이 잘 알려져 있는 resveratrol 혹은 어성초 열수추출물 (HHWT ; Water extract of Houttuyniae Herba)을 양성대조군으로 이용하여 실험의 신뢰성을 확보하였다[14, 15]. 그 결과 resveratrol과 HHWT 모두 항산화 효능이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. GFET (Ethanol extract of Gardeniae Fructus)와 GFEA (Ethyl acetate extract of Gardeniae Fructus) 또한 농도 의존적인 항산화 효능을 보였으며 특히 2 mg/ml 농도의 GFEA는 10.01%의 항산화 효능이 나타난 반면 동일한 2 mg/ml의 GFET는 94.94%로 GFEA보다 9.48배의 항산화 효능이 있음을 확인하였다. 하지만 HHWT의 IC_{50}은 0.33 mg/ml인 반면 GFET의 IC_{50}은 0.57 mg/ml, GFEA의 IC_{50}은 8.11 mg/ml로 GFET와 GFEA는 상대적으로 HHWT보다 낮은 항산화 효능을 나타내었다.

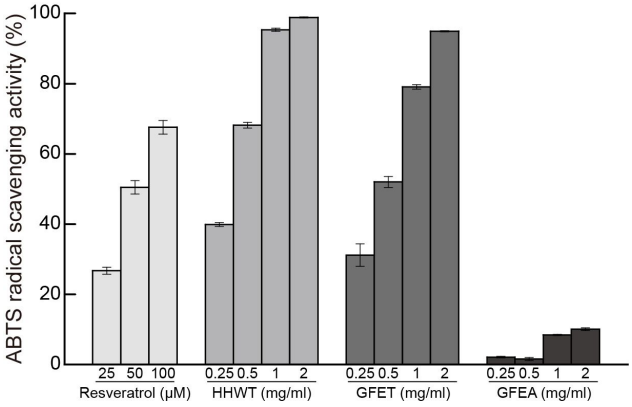

Fig 1. ABTS radical scavenging activity of resveratrol, HHWT (Water extract of Houttuyniae Herba), GFET (Ethanol extract of Gardeniae Fructus), and GFEA (Ethyl acetate extract of Gardeniae Fructus).

2. HaCaT 세포의 생존율 확인

치자추출물이 HaCaT 세포의 운동성에 미치는 영향을 알아보기 위한 GFET와 GFEA의 적정 처리 농도를 확인하기 위하여 HaCaT 세포에 GFET와 GFEA를 처리한 뒤 MTS assay를 실시하였다. 그 결과 0.5 mg/ml 농도의 GFET를 처리한 경우 106.73%로 세포 생존율의 감소가 확인되지 않았으며 0.5 mg/ml 농도의 GFEA 처리 또한 118.79%로 세포 생존율이 감소하지 않았다. 하지만 1 mg/ml의 농도에서는 GFET 처리보다 GFEA를 처리했을 때 더욱 강한 독성을 나타내었다.

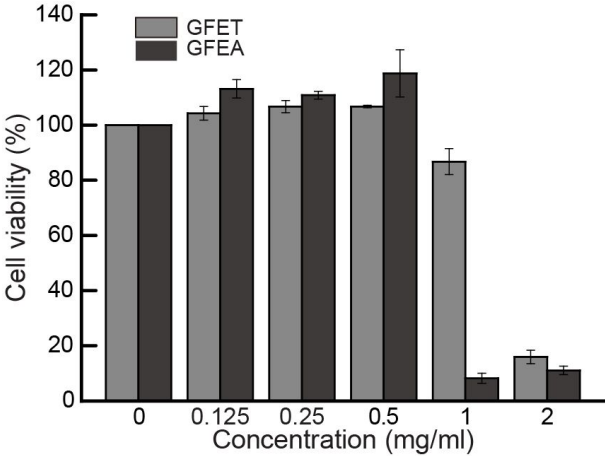

Fig 2. Effects of GFET or GFEA on HaCaT cell viability. HaCaT cells were treated with indicated concentrations of GFET and GFEA for 36 h. Cell viability was measured by MTS assay.

3. 치자추출물의 세포 운동성 저해 효과

세포의 운동성은 상처 치유에 매우 중요한 역할을 한다. 치자추출물이 피부 세포의 운동성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 독성이 없는 것으로 확인한 0.5 mg/ml 농도로 GFET와 GFEA를 각각 HaCaT 세포에 처리한 뒤 cell migration assay를 진행하였다. 그 결과 vehicle을 24 h 동안 처리하였을 때 100%의 세포 운동성을 나타내었으나 GFET를 처리할 경우 세포 운동성이 76.32%로 유의하게 저해되었다. GFEA를 처리하였을 때 또한 vehicle 처리군은 96.48%의 세포 운동을 나타내었으나 GFEA를 0.5 mg/ml 농도로 처리할 경우 82.28%로 세포 운동성이 유의하게 저해

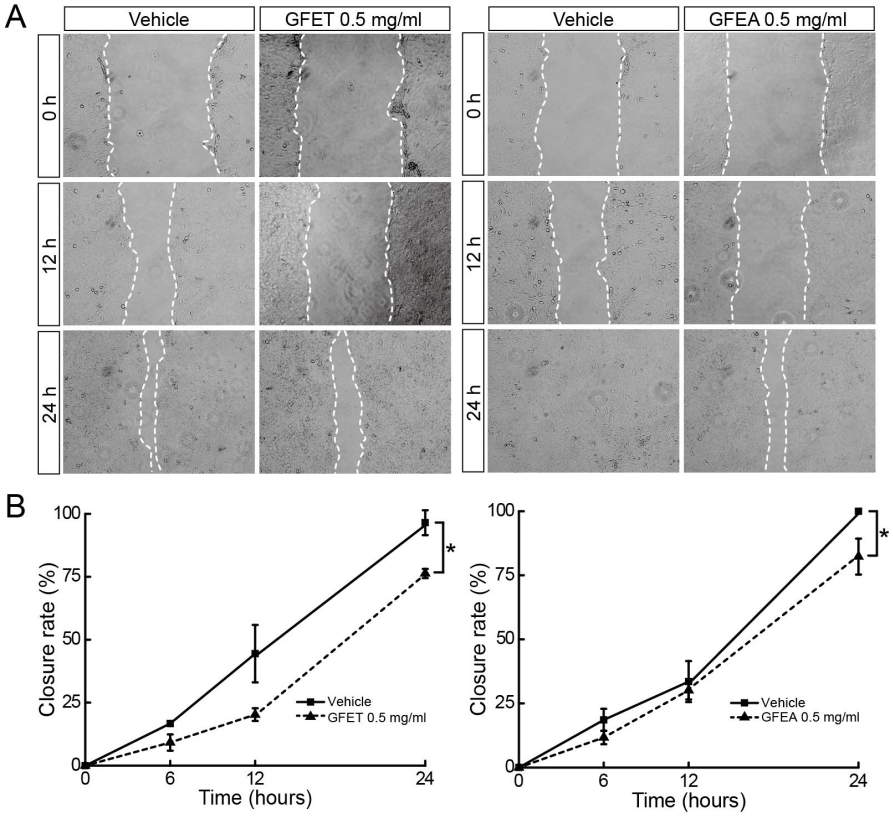

Fig 3. Cell motility was reduced by GFET or GFEA treatments. (A) Representative images of cell migration assay. (B) Images were captured by light microscopy. Closure rates were analyzed by image J software versus control. *$p < 0.05$

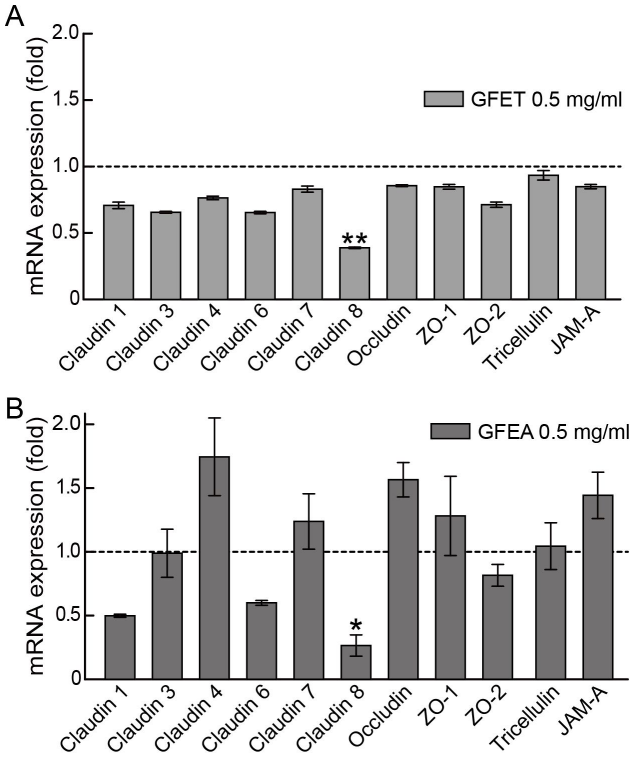

Fig 4. Effects of GFET and GFEA on mRNA expression of tight junction related genes. HaCaT cells were treated with 0.5 mg/ml GFET (A) and GFEA (B) for 24 h. mRNA expression was measured by qRT-PCR. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ versus control.

되었다.

4. Tight junction 관련 유전자의 발현 조절

Tight junction은 세포와 세포 사이의 부착을 연계하고 있으며 세포의 운동성을 조절한다. GFET와 GFEA 각각의 처리에 의하여 HaCaT 세포의 운동성이 저해된 원인을 규명하기 위해 GFET와 GFEA가 tight junction에 미치는 영향을 확인하였다. HaCaT 세포에 0.5 mg/ml 농도로 GFET와 또는 GFEA를 24 h 동안 처리한 후 qRT-PCR을 통해 tight junction 관련 유전자의 mRNA 발현을 확인해보았다. 그 결과 GFET의 처리는 HaCaT 세포의 claudin 8 mRNA 발현량을 0.39배 이하로 억제시켰으며, GFEA의 처리 또한 GFET 처리와 유사하게 HaCaT 세포의 claudin 8 mRNA 발현량을 0.25배 이하로 유의하게 억제시켰다.

Ⅳ. 고 찰

치자는 긴 난형을 이루고 길이 1~5cm, 너비 10~15mm 이며 흔히 6개 내외의 뚜렷한 능선이 세로로 뻗는다. 윗끝에는 꽃받침 또는 그 자국이 있고 아랫끝에는 과병이 붙어 있는 것도 있다. 바깥면은 황단색에서 흑갈색을 띠고 과피는 얇고 부스러지기 쉽다. 열매의 내부는 2실로 나뉘고 흑갈색에서 어두운 갈색의 태좌에 씨의 덩어리가 달려 있다. 씨는 거의 원형으로 편평하고 긴지름이 약 0.5cm이며 흑갈색 또는 황갈색

을 띠고 있다[1].

치자의 crocin이 pancreatic lipase의 활성을 차단하여 low density lipoprotein(LDL)과 very low density lipoprotein (VLDL)의 수치를 낮춰주고 대장에서 변을 통해 지방의 배설을 촉진함으로서 혈중지질의 양을 감소시키는 효과가 있고[16], crocin의 경구투여시 빠르게 흡수되어 혈액순환을 도와주고 anti-athreosclerotic 효과가 있으며[17] penta aceyl geniposide가 aflatoxin B1으로 인해 유발된 간암발병을 저해하고 DNA 손상을 감소시키는 것[18]으로도 보고되어 있다.

활성산소는 세포의 에너지 대사 과정에서 필연적으로 생성되며 이는 세포에 산화적 스트레스를 유도하여 다양한 피부 질환과 피부 노화를 유도한다[19]. 따라서 다양한 피부 질환의 치료를 위해서 활성산소를 효과적으로 제거하는 항산화 효능은 매우 중요하며 항산화 효능 물질을 이용한 매우 다양한 화장품이 개발되고 있다. 본 연구에서는 용매를 다르게 하여 추출한 두 치자추출물의 항산화 효능을 검증하기 위해 ABTS assay를 실시하였고 그 결과 GFET와 GFEA 모두 항산화 효과가 나타난 것을 확인하였다. 또한 ABTS assay를 통해 확인한 항산화 효과는 GFET가 더욱 뛰어남을 확인하였다. 이 결과를 통해 ethyl acetate보다 ethanol을 이용할 때 치자에서 항산화 효능을 나타내는 물질을 더욱 효과적으로 추출할 수 있을 것으로 생각된다.

세포의 이동은 피부의 상처를 회복하기 위해 매우 중요하다. 우리는 migration assay를 통해 치자추출물이 세포의 운동성에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 대조군과 비교하여 두 치자추출물이 모두 HaCaT 세포 운동성을 저해시킨다는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 GFET와 GFEA를 피부에 도포할 경우 항산화 효능을 기대할 수 있으나 상처의 회복에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 부작용 발생 가능성을 확인할 수 있었다.

ROS는 상처가 발생될 경우 생성량이 증가되어 secondary messenger로 기능을 나타낸다. ROS의 작용은 상처부위에 면역반응을 촉진하며 혈관의 형성을 촉진하고 외부 박테리아 혹은 바이러스를 사멸시킨다[20]. 또한 각질형성세포의 세포 운동성을 촉진하여 상처의 회복을 촉진한다. GFET와 GFEA의 항산화 효능이 HaCaT 세포의 운동성에 영향을 나타낼 가능성이 있기 때문에 이를 확인하는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Tight junction은 세포 간의 결합을 연계하는 단백질 복합체로 외부에 대해 장벽을 형성하고 수분의 증발을 막아 보습 유지에 중요한 역할을 한다[21]. 또한 tight junction 관련 단백질은 세포의 운동성에 중요한 요소로 작용한다[22]. GFET와 GFEA 처리에 따른 HaCaT 세포의 운동성이 저해된 메커니즘을 규명하기 위하여 GFET와 GFEA가 tight junction 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 두 추출물 모두 유의하게 claudin 8의 mRNA 발현을 감소시킨다는 결과를 얻었다. 최근 HaCaT 세포에 스테비올을 처리할 경우 세포의 운동성이 현저하게 감소되며 이는 claudin 8의 mRNA 발현 변화와 밀접한 관련이 있다는 연구 논문이 보고되었다[23]. 따라서 GFET와 GFEA에 의한 HaCaT 세포의 claudin 8 mRNA 발현 감소는 HaCaT 세포의 운동성에 밀접한 연관성이 있을 가능성을 말해준다. 세포의 운동성은 tight junction 유전자 발현 변화와 함께 다양한 생물학적 작용을 통해 조절되기 때문에 치자추출물에 의해 세포 운동성이 억제되는 메커니즘을 규명하는 연구를 추가적으로 진행하고 있다. GFET 혹은 GFEA를 HaCaT 세포에 처리할 경우 본 연구를 통해 확인한 다양한 tight junction 관련 유전자 중 claudin 8 mRNA 발현량을 가장 크게 변화시켰으나 그 외에도 GFET의 처리는 확인한 모든 tight junction 유전자의 mRNA 발현의 감소를 유도하였으며 GFEA의 처리는 claudin 1, 6의 mRNA 발현을 감소시켰다. Tight junction은 occludin, claudin, ZO-1, ZO-2, JAM-A 등 다양한 tight junction 관련 protein이 다중 단백질 복합체를 구성함으로써 형성된다[24]. 즉 치자추출물 처리에 의한 HaCaT 세포의 tight junction 관련 유전자 발현의 다양한 변화들은 tight junction 형성 및 기능에 영향을 나타내었을 가능성이 있으며 이를 규명하는 추가적인 연구가 필요하다.

UVB 조사 혹은 squalene monohydroperoxide 처리를 통해 피부손상을 유도한 hairless 마우스에 치자추출물을 도포할 경우 피부장벽 손상이 완화되어진다는 연구 결과가 발표되었다[25]. 치자추출물을 이용하여 화장품 소재로 개발하기 위해서는 치자추출물이 피부에 미치는 영향에 대한 다양한 연구를 통해 효능과 부작용에 대한 이해가 필요할 것으로 사료된다.

각질형성세포의 운동성은 피부의 상처 치유를 위해 매우 중요하다. 본 연구를 통해 추출법을 달리한 두 치자추출물인 GFET와 GFEA 모두 항산화 효능이 나타났지만 각질형성세포의 운동성을 저하시킨다는 결과를 확인하였으며, GFET와 GFEA를 HaCaT 세포에 처리하였을 때 세포 운동성에 매우 중요한 tight junction 관련 유전자 중 claudin 8 mRNA 발현량이 크게 억제된다는 결과를 확인할 수 있었다.

본 연구결과를 종합해보면 치자의 추출용매를 달리한 두 추출물인 GFET와 GFEA는 좋은 항산화 화장품으로서 개발이 가능할 것으로 기대할 수 있으나 claudin 8 mRNA 발현 억제와 세포 운동성 억제를 통해 부작용 발생 가능성 또한 있음을 확인하였다. 따라서 치자추출물에 의한 정확한 세포 운동성 억제 메커니즘을 규명하고 이를 억제하는 방법을 개발할 경우 매우 유용한 화장품 소재로 개발할 수 있을 것이다.

Ⅴ. 결 론

GFET와 GFEA의 항산화 효능 및 세포 운동성에 미치는 영향을 확인하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. GFET와 GFEA는 모두 항산화 효능이 있으며 GFEA는 10.01%의 항산화 효능이 나타난 반면 동일한 2 mg/ml의 GFET는 94.94%로 GFET가 더욱 강하다.

2. GFET를 처리할 경우 세포 운동성이 76.32%로 GFEA를 처리할 경우 82.28%로 세포 운동성을 억제시킨다.

3. GFET의 처리는 HaCaT 세포의 claudin 8 mRNA 발현량을 0.39배 이하로 억제시켰으며, GFEA의 처리도 HaCaT 세포의 claudin 8 mRNA 발현량을 0.25배 이하로 억제

시켰다.

이상의 실험결과는 GFET와 GFEA 모두 항산화 효능을 보유하고 있으므로 피부의 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시켜 피부의 노화 방지 효과가 있을 것으로 생각된다. 또한 claudin 8의 mRNA 발현 감소 및 세포의 운동성 억제를 통해 부작용 발생 가능성이 있음을 확인할 수 있었다. 향후 세포밀착연접 유전자 발현 조절 및 세포-세포 부착 강도의 강화를 통한 피부 장벽 강화 및 보습에 미치는 효능에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Geoffrey C. Gurtner, Sabine W, Yann B, Michael L. Wound repair and regeneration. NATURE. 2008 ; 453(15) : 314-21.
2. Christopher D, Thomas P, James B, John B, Matthew D, Jonathan C, David L, Nikolaos G. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. Int Wound J. 2017 ; 14(1) : 89-96.
3. Meilang X, Christopher J. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. Adv Wound Care. 2015 ; 4(3) : 119-136.
4. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY,. Boncho-Hak. Seoul: Young-Lim Press. 2007 : 207-9.
5. Korea food and drug administration. The Korean pharmacopoeia eleventh edition. Seoul: Korea Food and Drug Administration. 2018 : 11.
6. Kim HC. Hanbangyagli-Hak. Seoul: Jibmundang. 2001 : 125-7.
7. Kim JG, Kang YM, Eum GS, Ko YM, Kim TY. Antioxidative Avtivity and Antimicrobial Activity of Extracts from medicinal plants (Akebia quinate Decaisn, Scirusfluviatilis A. Gray, Gardenia jasminoides for. grandiflora Makino). J Agriculture & Life Sciences. 2003 ; 37(4) : 69-75.
8. Ryu EJ, Cho SH. Antimicroibal Characteristics and Safety Test of Gardenia jasminoides Extract. J Agriculture & Life Sciences. 2004 ; 38(4) : 11-9.
9. Jeong HJ, Kim SA, Kwon JH, Kim HK. Physiological Activities of Gardeniae Fructus Extracts by Microwave-Assisted Extraction as Affected by Solvents. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2008 ; 37(3) : 282-7.
10. Shon DH, Choi DW, Kim MH. Improvement of Anti-Inflammation Activity of Gardeniae fructus Extract by the Treatment of β-Glucosidase. Korean J food sci technol. 2012 ; 44(3) : 331-6.
11. Park MK, Yoon HJ, Lee HJ. Antioxidant effect and inhibitory activities of ethyl acetate fraction from Gardenia jasminoides extract on nitric oxide production and pancreatic cancer cell proliferation. Korean J food sci technol. 2018 ; 50(2) : 209-15.
12. Kwak JH, Kim YH, Chang HR, Park CW, Han YH. Inhibitory Effect of Gardenia Fruit Extracts on Tyrosinase Activity and Melanogenesis. Korean J Biotechnol Bioeng. 2004 ; 19(6) : 437-40.
13. Hyun SH, Mi KJ, Kim YC. Inhibitory effects of Gardeniae fructus water extracton skin wrinkle formation in hairless mice. The Korean Society for Aesthetics and Cosmetology. 2009 ; 7(2) : 123-36.
14. Mary N, Carol P, Hasan M, Nihal A. The Grape Antioxidant Resveratrol for Skin Disorders: Promise, Prospects, and Challenges. Arch Biochem Biophys. 2011 ; 508(2) : 164-70.
15. Jeong HR, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong CH, Heo HJ. Antioxidant and Neuronal Cell Protective Effects of an Extract of Houttuynia cordata Thunb (a Culinary Herb). Korean J. Food Preserv. 2010 : 17(5) ; 720-726.
16. Sheng L, Qian Z, Zheng S, Xi L. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rat: crocin inhibits pancreatic lipase. Eur J Pharmacol. 2006 ; 543(14) : 116-22.
17. Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A. Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugated in mice. J Agric Food Chem. 2005 ; 23(18) : 7302-6.
18. Peng CH, Huang CN, Wang CJ. The anti-tumor effect and mechanism of action of penta-acetyl geniposide. Curr Cancer Drug Targets. 2005 ; 5(4) : 299-305.
19. David R. Bickers, Mohammad A. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. Journal of Investigative Dermatology. 2006 ; 126(12) : 2565-2575.
20. Christopher D, Thomas P, James B, John B, Matthew D, Jonathan C, David L, Nikolaos T G. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the

functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. Int Wound J. 2017 ; 14(1) : 89-96.
21. Tsuruta D, Green KJ, Getsios S, Jones JC. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. Trends Cell Biol. 2002 ; 112(8) : 355-357.
22. Du D, Xu F, Yu L, Zhang C, Lu X, Yuan H, Huang Q, Zhang F, Bao H, Jia L, Wu X, Zhu X, Zhang X, Zhang Z, Chen Z. Dev Cell. 2010 ; 18(1) : 52-63.
23. Choi SK, Cho NJ, Cho MU, Shim JH, Kim KK, Hwang HS. Inhibitory Effect of Steviol and Its Derivatives on Cell Migration via Regulation of Tight Junction-related Protein Claudin 8. J. Soc. Cosmet. Sci. Korea. 2016 ; 42(4) : 403-12.
24. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex, Am J physiol Cell Physiol. 2004 ; 286(6) : 1213-28.
25. Hyung SH, Min KJ, Kim YC. Alleviating Effect of Gardeniae fructus Water Extract on Inflammation and Skin-Barrier Damage. J Cosmetological Science. 2010 ; 6(1) : 63-72.