

『청정바이오 소재 코스메틱기반 고도화사업
화장품 신뢰성 평가 결과 보고서』
- 감귤 생체수, 가지 생체수 -

2023 . 11 . 25

제주대학교 제주약학연구소

목 차

결과 보고서 요약문	2
1. 서론	3
1-1) 피부의 역할	3
1-2) 피부의 염증성 사이토카인	3
1-3) 피부 항산화	4
1-4) 피부 보습 인자	4
1-5) 피부 멜라닌 형성	4
2. 실험 목적	5
3. 실험 시료	5
3-1) 시료명	5
3-2) 시료의 성상	5
3-3) 시료의 보관 및 제조 방법	5
4. 실험 방법	5
4-1) 세포 배양	5
4-2) 세포 생존율 평가(WST-1 assay)	6
4-3) 사이토카인 생성량 평가 (Sandwich ELISA)	7
4-4) Hyaluronan Synthase 유전자 발현량 평가	7
4-5) DPPH Radical Scavenging Activity	8
4-6) Melanin contents 측정	8
4-7) Real-time PCR primer information	9
4-8) 통계처리	9
5. 실험 결과	10
5-1) 세포 생존율 평가 결과	10
5-2) 히알루론산 합성효소 유전자 발현량 평가 결과	11
5-3) Melanin contents 측정	12
5-4) DPPH Radical Scavenging Activity	13
5-5) 염증성 사이토카인 생성량 측정 결과	14
6. 결론	15
7. 참고문헌	16

결과 보고서 요약문

과제명	화장품 신뢰성 평가지원		
시험기관	제주대학교 제주약학연구소	연구관리번호	P0020992-23-03-C013
시험기간	2023년 11월 11일 ~ 2023년 11월 24일		
시험시료	감귤 생체수, 가지 생체수		
시험목적	샘플의 항산화, 미백, 보습, 항염 효능을 평가하고자 함		
실험방법	<p>1. 시험물질 처리농도 1.25 ~ 20 %</p> <p>2. 평가방법</p> <p>1) 대식세포(RAW264.7)의 염증성 사이토카인 분비 측정 (ELISA)</p> <p>2) DPPH Radical Scavenging Activity</p> <p>3) 피부각질세포 (HaCaT) 에서 세포 생존을 평가 (WST-1 assay), 히알루론산 합성효소 유전자 발현량 측정 (RT-qPCR)</p> <p>4) B16F10에서 세포 생존을 평가 (WST-1 assay), 멜라닌 생합성 저해 정도 측정</p>		
실험결과	<p>1. 피부각질세포 (HaCaT) 에서 세포 생존을 평가 및 히알루론산 합성효소 유전자 발현량 측정 (RT-qPCR) : 독성이 나타나지 않는 농도에서</p> <p>- 히알루론산 합성효소 유전자 발현량 측정 (RT-qPCR)</p> <p>2. B16F10에서 세포 생존을 평가 및 멜라닌 생합성 저해 정도 측정</p> <p>- 감귤 생체수 5% 농도에서 세포 내 멜라닌 함량이 33.9% 감소하였으며, 7.5% 농도에서 55.22% 감소, 10% 농도에서 73.54% 감소함</p> <p>- 가지 생체수의 경우 7.5% 농도에서 세포 내 멜라닌 함량이 44.55% 감소하였으며, 10% 농도에서 58.25% 감소</p> <p>3. 대식세포(RAW264.7)의 염증성 사이토카인 분비 측정 (ELISA)</p> <p>- 감귤 생체수와 가지 생체수 처리에 따른 사이토카인 감소를 보이지 않음</p> <p>4. DPPH Radical Scavenging Activity</p> <p>- 라디칼 소거능을 보이지 않음</p>		
결론	<p>시험제품인 감귤 생체수와 가지 생체수의 보습, 미백 효능을 확인 함으로써, 향후 보습과 미백 소재로서의 활용성 제고에 기여 할 것으로 판단됨.</p>		

1. 서론

1-1) 피부의 역할

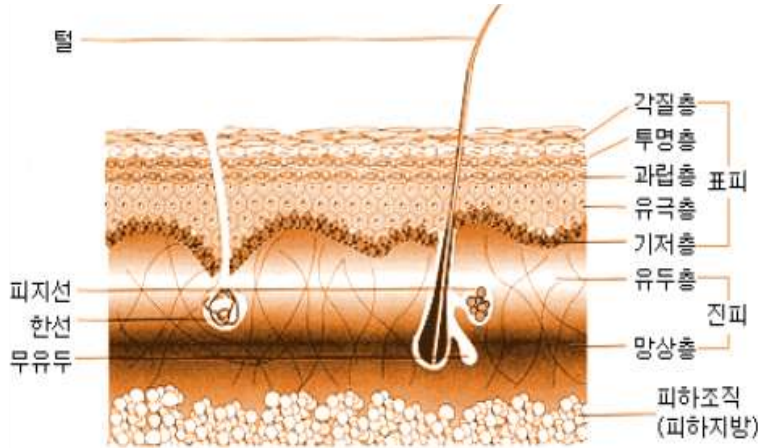


Figure 1. 피부 구조

- 표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있는 피부의 역할은 외부로부터 들어온 감염원과 항원, 바이러스나 자외선의 침입을 막고, 물리적인 요인으로부터 일차적으로 신체를 보호하며, 비타민의 합성, 체온조절 및 자극을 감지하는 역할을 함¹⁾.
- 표피는 각질층, 과립층, 유극층, 기저층으로 분류되며 다시 각질세포와 세포간 지질에 묻혀있는 형태를 보이는 “Brick and mortar” 구조를 가짐¹⁾ (Fig 1).
- 또한, 피부의 중요한 역할은 약 80%의 물로 구성되어 있는 신체의 수분을 건조한 외부환경으로부터 안전하게 지켜주는 것임. 각질층의 수분보유 능력은 건강한 피부를 유지하는데 높은 연관성을 가짐. 따라서 피부의 수분 함유량이 높으면 노화, 주름, 탄력에 긍정적인 영향을 줌¹⁾.

1-2) 피부의 염증성 사이토카인

피부 염증의 정도를 평가하는 대표 인자에는 $TNF\alpha$ 가 있음.

1) $TNF\alpha$: $TNF\alpha$ 는 세포막에 결합된 homotrimer 형태의 단백질로 발현된 후 metalloprotease의 일종인 ADAM17에 의해 절단되어 soluble form으로 존재함. soluble $TNF\alpha$ 는 TNFR1에 결합함으로써 염증 반응을 매개함. 특히 피하 혈관 내피세포 및 각질형성세포에 작용함으로써 혈관투과성을 증가시키고 추가적인 염증성 사이토카인 생성을 촉진해 염증반응을 악화시킴²⁾.

2) IL-6: IL-6는 IL-6R과 gp130으로 구성된 heterodimer 수용체에 결합함으로써 염증 반응을 매개함. 피하 혈관 내피세포 및 각질형성세포에 작용해 $TNF\alpha$ 와 유사한 효과를 촉진할 뿐 아니라 섬유아세포에 작용해 과다 증식 및 분화를 촉진함으로써 섬유증을 유발함³⁾.

1-3) 피부 항산화

생물은 호흡이라는 과정을 통해 에너지를 얻고 신진대사를 하는 과정에서 흡입된 산소의 약 2%를 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS) 로 변환시켜 지니고 있게 됨. 활성산소는 Free radical을 가진 산소를 의미함. 활성산소는 생체세포를 공격하여 지질과 단백질, 핵산 (DNA, RNA)을 파괴하고 효소기능을 저해하여 질병을 촉진함. 피부는 자외선과 같은 외부의 다양한 환경적 요인에 항상 접촉되어 있음. 피부가 외부 요인에 의해 손상을 입으면 높은 농도의 활성 산소종이 생성되어 항산화 방어가 붕괴되며, 산화적 스트레스에 의해 세포 손상이 야기되어 피부 노화가 가속화됨⁴⁾.

1-4) 피부 보습 인자

- 피부 보습의 정도를 평가하는 대표 인자는 아래와 세 가지가 있음.

- 1) Filaggrin(FLG): FLG은 과립층에서 profilaggrin의 형태로 존재하며 keratohyalin을 형성하다가, 마지막 분화과정에서 FLG monomer로 분해된 후에 keratin에 교결합함. Protease에 의해 아미노산 단위로 분해된 후 방출되어, 천연보습인자(natural moisturize factor)로써 피부의 수분 및 pH를 유지하는 역할을 함.⁵⁾
- 2) Aquaporin 3(AQP3): AQP3는 각질형성세포의 세포막 관통 단백질로 물, 글리세롤, 요소 등의 성분들의 통로 역할을 함. 피부 조직에 수분이 부족해지면, 세포 내의 물을 조직으로 내보내는 역할을 함.⁶⁾
- 3) Hyaluronan (Hyaluronic acid, HA): HA는 각질 형성세포의 세포막 단백질 hyaluronan synthase (HAS)에 의하여 생성되고 인간 세포에는 HAS1, HAS2, HAS3의 세가지 동위체(isoform)가 존재함. 이들 중 HAS2가 가장 많이 존재한다고 보고됨. HA는 D-글루크론산(D-glucuronic acid)과 N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine)이 결합으로 구성된 이당체의 중합체로 25,000개의 이당체 반복으로 이루어져, 분자량은 5~20,000kDa으로 다양함. HA는 높은 수분 유지 능력(자기무게의 약 1000배까지)을 지니고 있어 피부에서 다량의 수분을 보유할 수 있음.⁷⁾

1-5) 피부 멜라닌 형성

자외선 및 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) 등의 호르몬 자극은 피부 표피 기저층에 존재하는 멜라노사이트를 활성화하고 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)를 자극하여 tyrosinase를 함유하는 멜라노솜을 생성함. Tyrosinase는 멜라닌 합성의 속도 결정 단계로 작용하는 효소로써 tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 전사 활성을 조절하며, 아미노산의 일종인 tyrosine과 반응하여 DOPA와 DOPA-quinone으로 대사되어 5,6-dihydroxyl indole의 단일중합체인 흑갈색의 eumelanin을 형성함. 합성된 멜라닌은 피부 표피 세포로 이동하여 피부색을 결정하고 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 하지만 과발현 시, 색소침착과 노인성 흑자를 유발하고 활성산소를 발생시켜 노화를 가속한다고 보고됨.⁸⁾

2. 실험 목적

시료의 DPPH Radical Scavenging Activity를 통해 항산화 효능을 확인하고, 멜라닌 생합성 저해 정도를 측정함으로써 미백효능을 알며, Hyaluronan Synthase 유전자 발현량을 통해 보습효능을 보고, 염증성 사이토카인 저해 정도를 봄으로써 항염증 효능을 알고자 함.

3. 실험 시료

3-1) 시료 명 : 감귤 생체수, 가지 생체수 (Fig 2)

3-2) 시료의 성상 : 액체 (Fig 2)

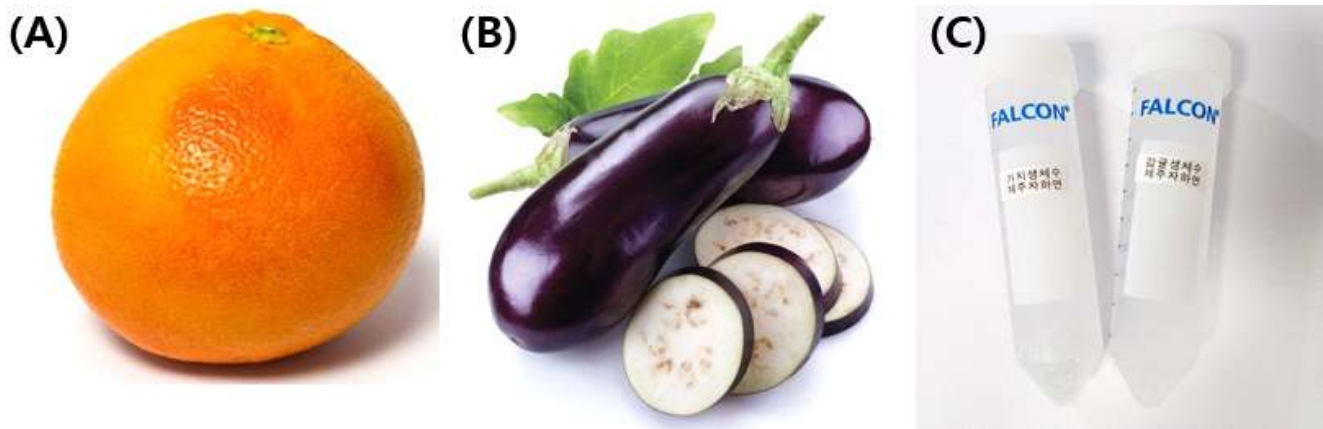


Figure 2. (A) 감귤 (*Citrus reticulata*) (B) 가지 (*Solanum melongena*) (C) 감귤 생체수 (*Citrus reticulata* Bio-water), 가지 생체수 (*Solanum melongena* Bio-water)

3-3) 시료의 보관 및 제조 방법

감귤 생체수와 가지 생체수는 제주자하연에서 제공 받아 냉장 보관하였으며, 세포에 처리 시, 배지에 희석하여 사용함.

4. 실험 방법

4-1) 세포 배양

인간 각질형성세포 (HaCaT cells)는 대봉엘에스에서 제공받아 사용함. 배양 배지로는 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)와 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Welgene)을 사용함. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2 일 간격으로 계대하며 배양함.

실험에 활용한 RAW264.7 대식세포주는 american type culture collection를 통해 확보함. 배양 배지로는 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco)와 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Welgene)을 사용함. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2 일 간격으로 계대하며 배양함.

B16F10 melanoma cell을 ATCC사 (American Type Cell Culture, USA)로부터 분양받아 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) 과 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Welgene)을 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 2일 간격으로 계대 배양함. Melanoma cell 자극에 사용한 α -MSH은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입

4-2) 세포 생존을 평가(WST-1 assay)

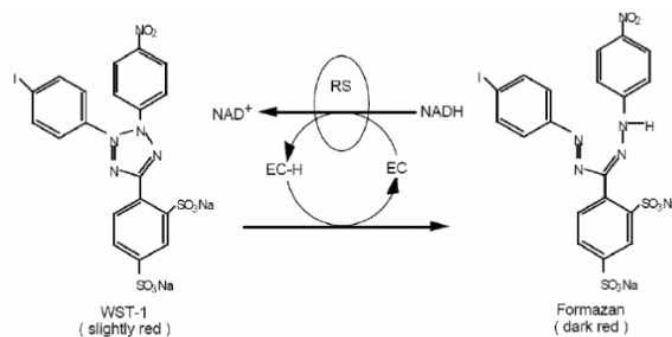


Figure 3. Principle of WST-1 assay

세포를 24 well plate에 5×10^4 cells/well (HaCaT, HDF) 또는 6 well plate에 3×10^4 cells/well (B16F10)로 분주하여 24시간 동안 전 배양한 뒤, FBS가 함유된 배지에 시료를 희석하여 농도별로 처리하고 24시간 (HaCaT, HDF, raw264.7) 또는 72시간 (B16F10) 배양한 후 WST-1 assay를 실시함 (Fig 3). WST-1은 세포의 증식능력이거나 세포생존 능력을 정량하기 위한 제품으로 세포내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 Tetrazolium Salt (WST-1)에서 Formazan이라는 발색물질이 생성되는 것을 측정함. 두젠바이오의 EZ-Cytox kit를 FBS가 함유되지 않은 배지에 25:1로 희석하여 처리하고 4시간 동안 반응 후, 시료 무처리 군을 기준으로 ELISA reader (TECAN, SPARK, US)를 이용하여 450 nm에서 측정된 흡광도 값을 비교하여 세포독성을 측정함.

4-3) 사이토카인 생성량 평가(Sandwich ELISA)

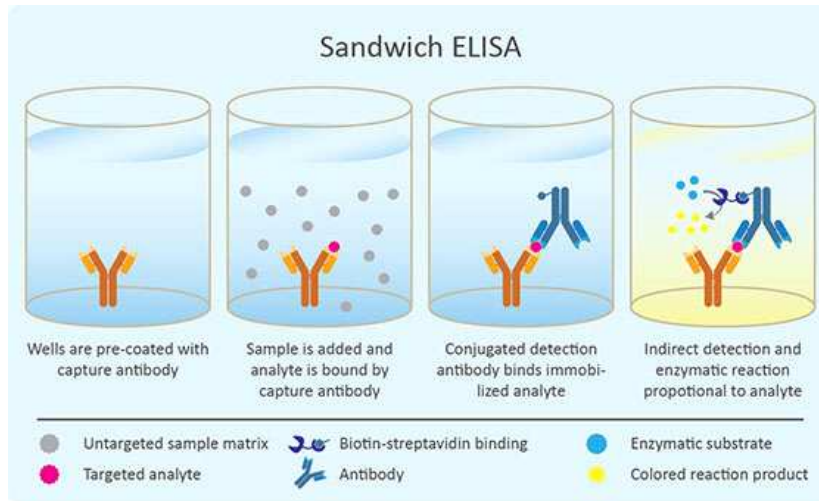


Figure 3. 사이토카인 ELISA의 원리(Enzo Life Sciences 자료)

RAW264.7 세포를 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 전 배양한 뒤에 LPS를 처리함. 이때 용매 (Veh) 또는 시료를 농도별로 처리하고 24시간 추가 배양한 후, invitrogen ELISA kit (88-7324, 88-7064)를 활용해 배양액 내 존재하는 사이토카인 양을 측정함 (Fig 3). 사이토카인 특이적 결합력을 가진 항체를 96 well plate (Nunc MaxiSorp™ flat-bottom)에 도말 후 배양액을 분주함으로써 배양액 내 특정 사이토카인이 결합되도록 유도함. 이어서 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 형태의 항체를 추가적으로 분주함으로써 사이토카인이 항체 사이에 끼어있도록 한 후, HRP의 기질인 TMB 용액을 분주함. 이는 TMB 산화를 촉진해 발색반응을 유발하는데 그 강도는 항체와 반응한 사이토카인 양에 의존적임. 충분한 반응 후 0.5N 황산 용액을 추가해 발색을 중단시키고 ELISA reader(Agilent BioTek 800 TS)를 활용해 450 nm 파장의 흡광도 값을 측정함. 이때 표준품을 활용해 검량선을 산출함으로써 배양액 내 사이토카인의 농도를 측정함.

4-4) Hyaluronan Synthase 유전자 발현량 평가

HaCaT 세포를 24 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 뒤, 배지에 시료를 희석하여 농도별로 처리하고 24시간 배양한 후, 세포독성을 확인함. 그 후에 PBS로 각 Well을 2번 세척 해준 뒤, Trizol (Ambion, USA)을 $300 \mu\text{l}$ 씩 넣고 e-tube로 옮겨 Chloroform (Sigma)을 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣고 강하게 Vortexing 함. 그 후, 15000 rpm, 10분 centrifuge를 돌려 투명한 상층부만 $100 \mu\text{l}$ 모으고 70% Ethanol을 동량을 넣어 가볍게 Inverting 한 후, RNA Extraction Kit (RNA-spin total RNA extraction kit, Intron. USA)를 이용하여 RNA를 획득함. Nanodrop (NanoDrop One, Thermo scientific. USA)을 이용해 RNA를 정량하고 각 실험군당 동량의 RNA가 있을 수 있도록 3차 증류수를 이용해 Normalization함. Reverse transcription PCR (Rocketscript™ Reverse Transcriptase, Bioneer)을 하여 cDNA 합성하고 Real-time PCR (KAPA SYBR® FAST. Kapa biosystems. USA/CFX Connect Real-time system, Biorad. USA)을 이용하여 Hyaluronan synthase 1, 2, 3와 Aquaporin3 의 발현량을 측정하였다. GAPDH를 Reference gene으로 보정함.

4-5) DPPH Radical Scavenging Activity

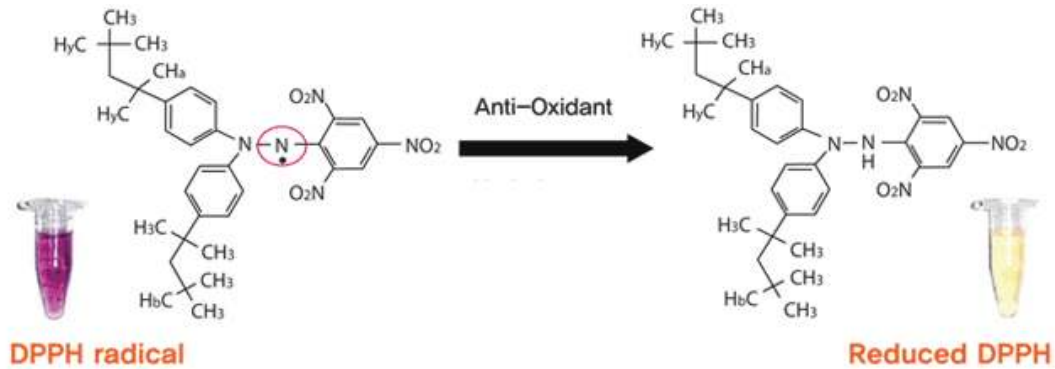


Figure 4. Principle of DPPH Radical Scavenging Assay

안정한 자유 라디칼인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) (sigma, USA)을 이용하여 일정한 시료 용액과의 반응에 의하여 DPPH 라디칼이 감소하는 정도를 분광광도계로 측정하여, 간접적으로 시료의 항산화 활성을 측정할 수 있음. 50mM로 제조한 DPPH를 농도 별로 Ethanol에 희석한 시료와 200 μ l 씩 동량으로 혼합한 후 30분 동안 암실 반응함. Microplate reader (TECAN, SPARK, US)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하고 소거능은 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율 (%)로 구하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = [1 - (A/B)] \times 100$$

A: 시료 첨가군 흡광도

B: 시료 무첨가군 흡광도

4-6) Melanin contents 측정

B16F10 melanoma cell은 12 well plate에 3×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 전 배양한 뒤, 10% FBS가 함유된 배지에 α -MSH (200 nM)와 시료를 함께 농도 별로 처리하고 72시간 배양함. 이후 세포를 PBS로 세척 후, Trypsin EDTA (Gibco)를 처리하여 회수하고 15000 rpm, 10분 원심분리함. 상층액을 버리고 남은 pellet에 1N NaOH (sigma)를 처리하여 70°C에서 한 시간 반응 시킴. 15000 rpm, 10분 centrifuge 하고 상층액을 Microplate reader (TECAN, SPARK, US)의 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 α -MSH only 처리군을 기준으로 melanin contents 억제 활성을 분석함.

4-7) Real-time PCR primer information

Table 1. Primer sequences for RT-qPCR

GAPDH	Forward	ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC
	Reverse	TCAAAGGTGGAGGAGTGGGTGTC
HAS1	Forward	ACGAACTTGCTGGGTGGTTCTC
	Reverse	AGACTGAAGAATCTTGGGCTGACC
HAS2	Forward	ATGCATTGTGAGAGGTTTCT
	Reverse	CCATGACAACCTTTAATCCCAG
HAS3	Forward	GACGACAGCCCTGCGTGT
	Reverse	TTGAGGTCAGGGAAGGAGAT

4-6) 통계처리

세 번 이상의 독립적인 실험을 통해 평균±표준오차로 나타내었고, 대조군과 실험군 사이의 통계적 유의성 검증을 위해 one-way ANOVA를 시행함. 유의성 검정은 *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 으로 실시함.

5. 실험 결과

5-1) 세포 생존을 평가 결과

감귤생체수와 가지생체수의 세포독성을 확인하기 위하여 WST-1 assay를 수행한 결과, HaCaT 세포에서 20% 까지 독성이 나타나지 않았고 (Fig 4A), Raw264.7 세포에서는 10% 까지 독성이 나타나지 않는 것을 확인함 (Fig 4B), B16F10 세포에서 감귤생체수가 무처리 군을 기준으로 72시간 처리에서 최대 10% 까지 독성이 나타나지 않았고 (Fig 4C), 가지생체수 10% 까지 독성이 나타나지 않았음 (Fig 4D).

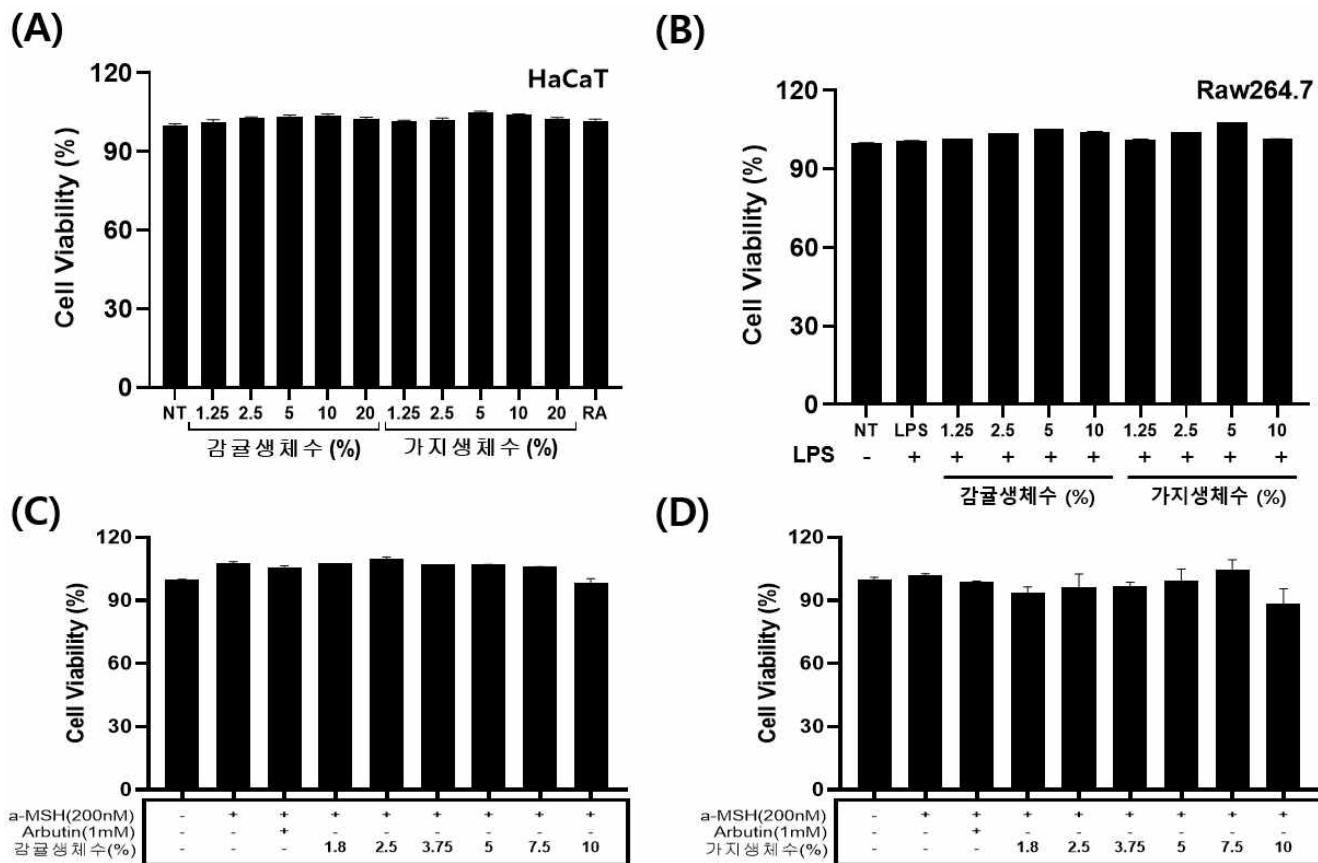


Figure 4. The cytotoxicity of Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water.

HaCaT (A) and Raw264.7 (B) cells were plated in 24-well plates (5×10^4 cells/well) and incubated for 24 h, and then treated with Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water. (1.25~20%), retinoic acid (RA $10 \mu\text{M}$) (A) and LPS 1mg/ml (B) for 24 h. B16F10 cells were plated in 12-well plates (3×10^4 cells/well) and incubated for 24 h, and then treated by Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water (1.8~10%) with α -MSH (200 nM) stimulated cell for 72h, Arbutin was used as positive control (1mM) (C,D). Cytotoxicity of sample was evaluated using WST-1 assay. The results are presented as the mean \pm SEM from four independent experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ relative to the non-treated control group.

5-2) 히알루론산 합성효소 유전자 발현량 평가 결과

감귤생체수와 가지생체수, Retinoic acid $10\ \mu\text{M}$ 를 positive control로 처리하고 24시간 배양함. 처리된 세포를 이용하여 Hyaluronian synthase 유전자 발현량을 Real time PCR을 이용해 확인 해 본 결과, HAS1이 가지생체수 20% 처리에서 무처리군 대비 2.9배 증가함 (Fig 5A). HAS2와 HAS3는 감귤과 가지 생체수 처리에 따른 증가가 보이지 않음 (Fig 5B, C).

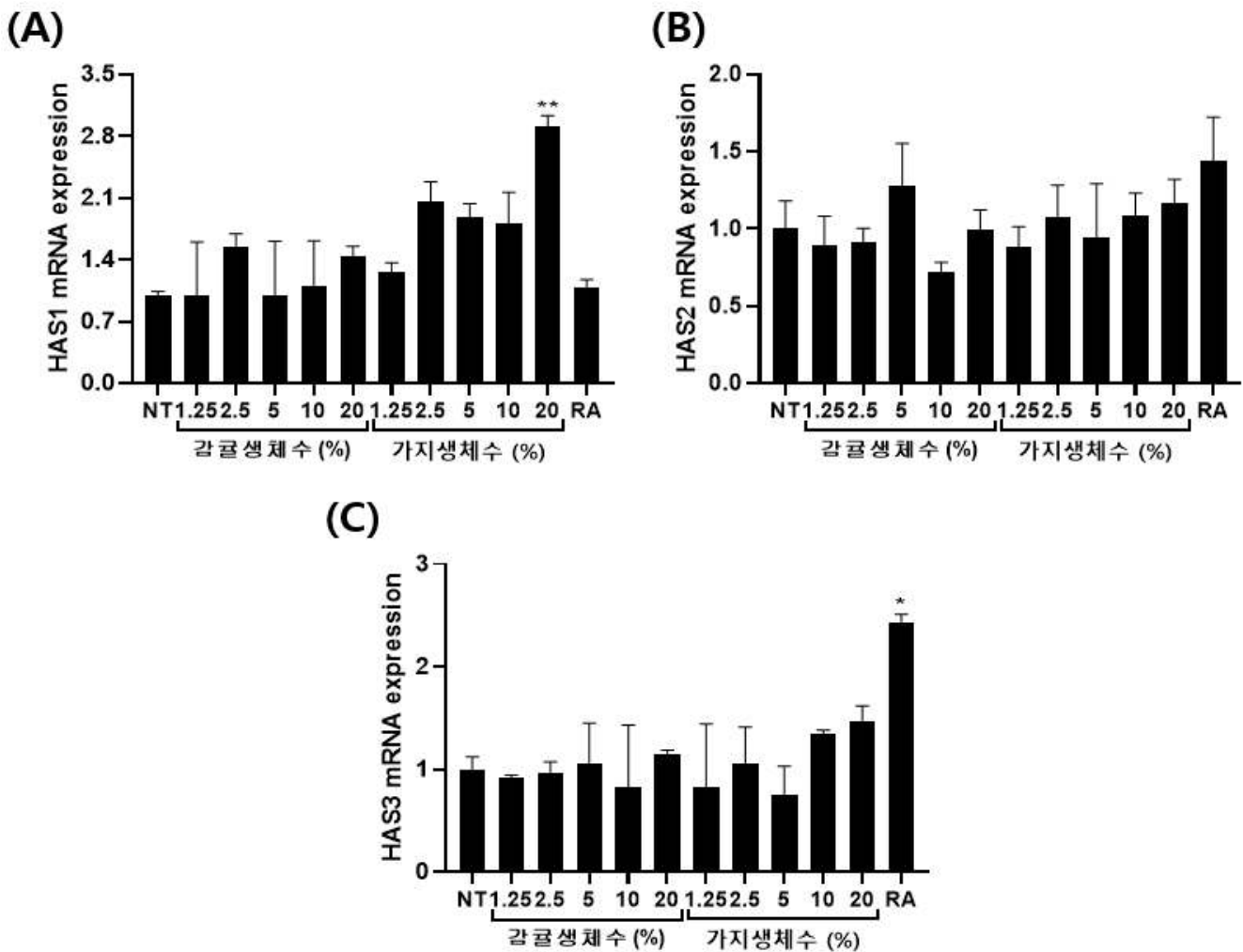


Figure 5. Aquaporin3 expression level of Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water.

HaCaT cells were plated in 24-well plates (5×10^4 cells/well) and incubated for 24 h, and then treated with Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water and retinoic acid ($10\ \mu\text{M}$) for 24 h. HAS 1, 2, 3 mRNA levels were analyzed by RT-qPCR. The results are presented as the mean \pm SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the unstimulated control group.

5-3) Melanin contents 측정

B16F10 세포를 α -MSH (200 nM)와 감귤생체수와 가지생체수 혹은 Arbutin (positive control, 1 mM)을 처리하여 72시간을 배양하였음. 세포 내 멜라닌을 1 N NaOH로 녹여 확인해 본 결과, 무처리군 대비 α -MSH 만 처리하여 멜라닌 함량이 195.31% 증가한 세포와 비교하였을 때, 감귤생체수 5% 농도에서 세포 내 멜라닌 함량이 33.9% 감소하였으며, 7.5% 농도에서 55.22% 감소, 10% 농도에서 73.54% 감소함 (Fig 6A). 가지 생체수의 경우 7.5% 농도에서 세포 내 멜라닌 함량이 44.55% 감소하였으며, 10% 농도에서 58.25% 감소 (Fig 6B).

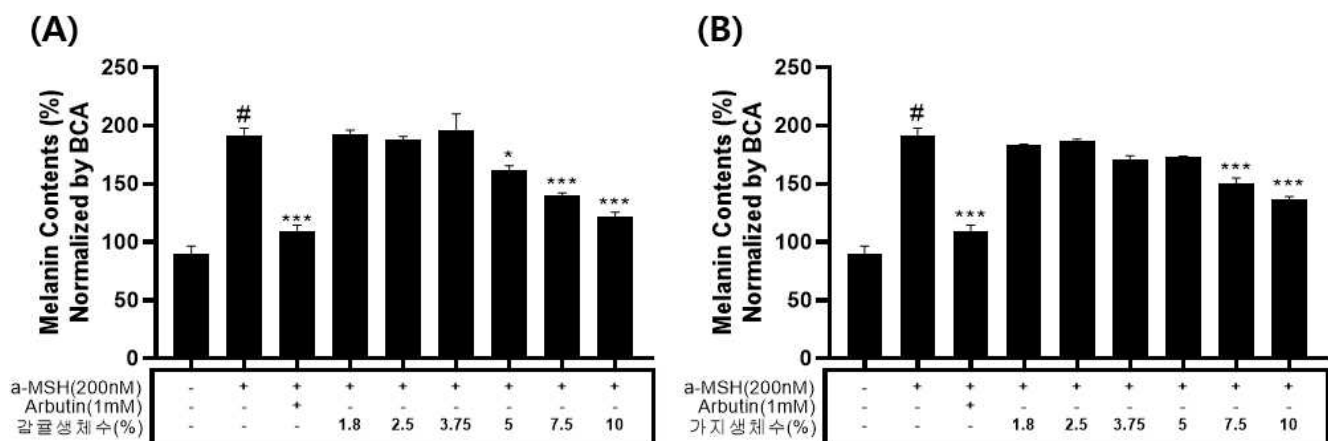


Figure 6. The Melanin synthesis inhibitory effect of Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water.

Cells were plated in 12-well plates (3×10^4 cells/well) and incubated for 24 h, and then treated by Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water (1.8 % ~ 10 %) with α -MSH (200 nM) stimulated cell for 72 h. The cell pellet was diffused by 1 N NaOH at 70°C for 1 h, and evaluated at 405 nm. The results are presented as the mean \pm SEM from four independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 relative to α -MSH treated group without extracts (#).

5-4) DPPH Radical Scavenging Activity

감귤생체수와 가지생체수, Trolox 10 μ g/ml 를 positive control로 처리하여 반응함. 시료의 농도의 증가함에 따른 라디칼 소거능을 확인 해 본 결과, 감귤생체수와 가지생체수의 항산화 소거능이 관찰 되지 않음 (Fig 7).

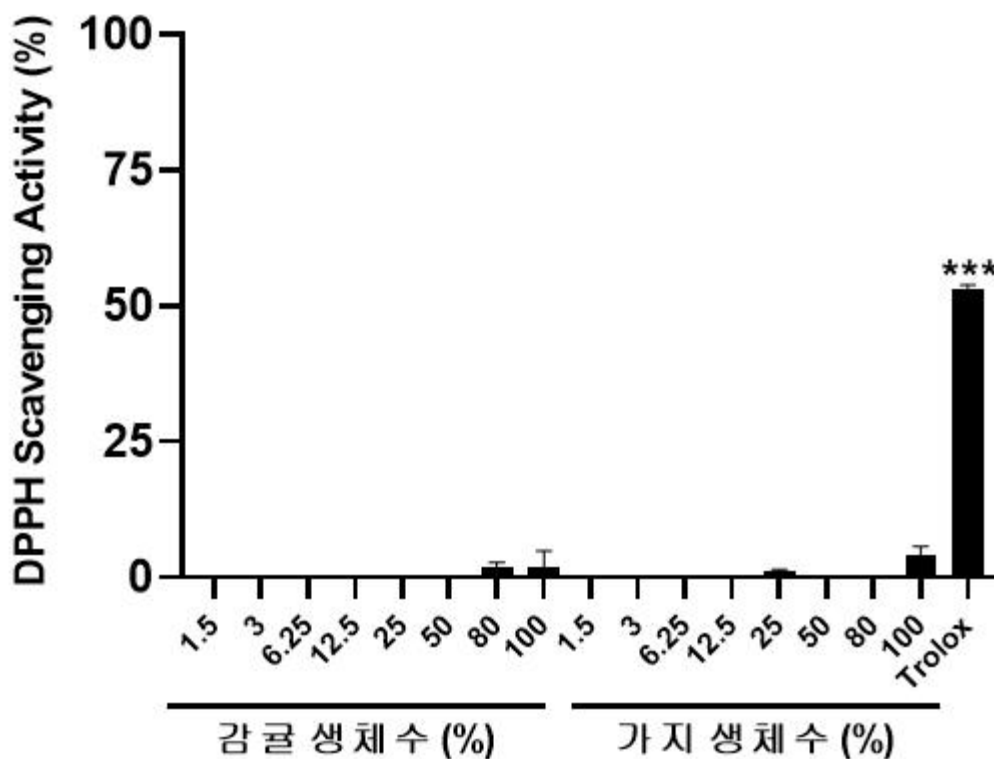


Figure 7. The antioxidant activity of *Citrus reticulata*, *Solanum melongena* Bio-water.

Citrus reticulata, *Solanum melongena* Bio-water (1.5 – 100%) and Trolox (10 μ g/ml) were tested for scavenging activities of DPPH radical. DPPH solution in ethanol were reacted with serial diluted *Citrus reticulata*, *Solanum melongena* Bio-water, and detected at 517 nm. The results are presented as the mean \pm SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the unstimulated control group.

5-5) 염증성 사이토카인 생성량 측정 결과

감귤생체수와 가지생체수의 항염증 효과를 확인하기 위하여 IL-6와 TNF- α 사이토카인 ELISA를 수행함. 무처리 (용매 단독) 군에 비해 LPS 단독 처리 군의 배양액 내 IL-6의 농도가 무처리군 대비 LPS 단독 처리에 의해 260배 증가함으로써 세포가 정상적으로 기능함을 알 수 있었으며, 가지 생체수 처리에 따른 감소는 보이지 않음 (Fig 8A). TNF- α 의 농도가 무처리군 대비 LPS 단독 처리에서 130배 증가하였으며 가지생체수 처리에 따른 감소는 없었음 (Fig 8B). LPS 단독 처리에 의해 307배 증가함으로써 세포가 정상적으로 기능함을 알 수 있었으며, 감귤 생체수 처리에 따른 감소는 보이지 않음 (Fig 8C). TNF- α 의 농도가 무처리군 대비 LPS 단독 처리에서 118.3배 증가하였으며 감귤 생체수 처리에 따른 감소는 없었음 (Fig 8D).

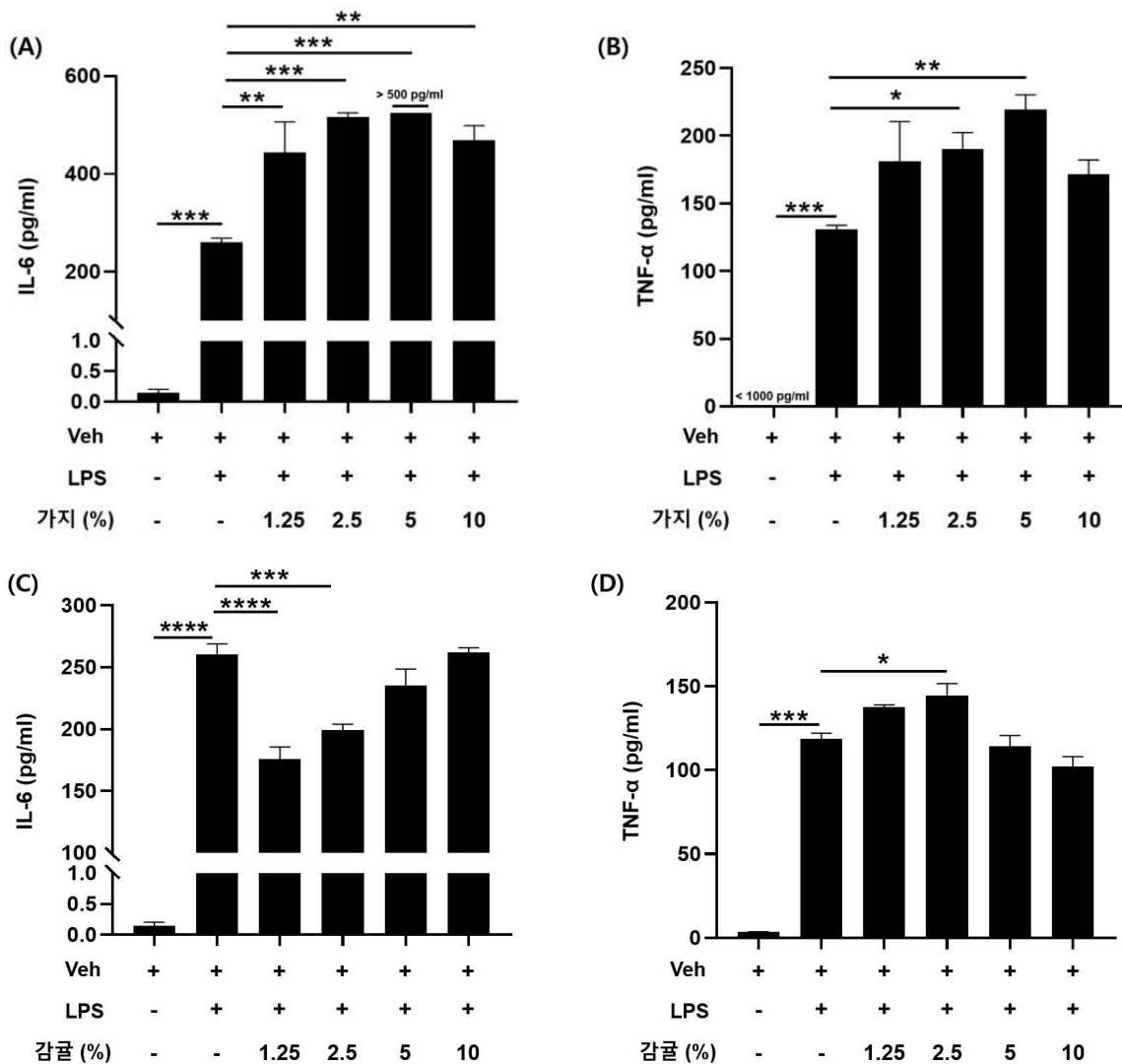


Figure 8. The effect of Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water on RAW264.7-mediated inflammatory cytokines secretion.

RAW264.7 cells were plated in 24-well plates (2×10^5 cells/well) and incubated for 24 h, followed by LPS treatment \pm diverse concentrations of Citrus reticulata, Solanum melongena Bio-water. After 24h-stimulation, the supernatant was recovered to determine TNF α production by using ELISA. The results are presented as the mean \pm SEM.

6. 결론

감귤(*Citrus reticulata*)은 기능성이나 약효성분이 많이 함유되어 있어 내한성이 강한 만다린계의 온주밀감인 감귤 생산의 주종임. 감귤류에는 Flavonoid류, carotenoid류, coumarin류, phehylpropanoid류, limonoid류 등 60여 종의 생리활성물질이 밝혀짐. 항산화, 항염증, 항알레르기, 항균, 면역 증강 작용 등의 효능이 알려짐⁹⁾. 가지(*Solanum melongena*)는 보라색의 열대 다년생 식물로 안토시아닌 때문에 보라색을 띠며. 비타민 C와 chlorogenic acid가 산화억제제로써 항산화에 효과적이라고 알려짐¹⁰⁾.

본 연구에서는 제주 자하연의 시료인 감귤생체수와 가지생체수의 보습, 미백, 항산화, 항염증 효능을 분석하기 위해 히알루론산 합성 관련 유전자 및 멜라닌 생합성 저해물, DPPH Radical scavenging Activity, 염증성 사이토카인 저해물을 평가하였음.

종합적인 평가 결과, 감귤생체수와 가지생체수의 HaCaT 세포독성이 없는 범위에서, Hyaluronian synthase 유전자 발현량을 Real time PCR을 이용해 확인 해 본 결과, HAS1이 가지생체수 20% 처리에서 무처리군 대비 2.9배 증가함 (Fig 5A). HAS2와 HAS3는 감귤과 가지 생체수 처리에 따른 증가가 보이지 않음 (Fig 5B, C). 멜라닌 생합성 저해 정도의 경우, 무처리군 대비 α -MSH 만 처리하여 멜라닌 함량이 195.31% 증가한 세포와 비교하였을 때, 감귤 생체수 5% 농도에서 세포 내 멜라닌 함량이 33.9% 감소하였으며, 7.5% 농도에서 55.22% 감소, 10% 농도에서 73.54% 감소함 (Fig 6A). 가지 생체수의 경우 7.5% 농도에서 세포 내 멜라닌 함량이 44.55% 감소하였으며, 10% 농도에서 58.25% 감소 (Fig 6B). 항산화능 평가를 위해 라디칼 소거능을 확인 해 본 결과, 감귤생체수와 가지생체수의 항산화 소거능이 관찰 되지 않음 (Fig 7). 항염증 평가에서 무처리 (용매 단독) 군에 비해 LPS 단독 처리 군의 배양액 내 IL-6 의 농도가 무처리군 대비 LPS 단독 처리에 의해 260배 증가함으로써 세포가 정상적으로 기능함을 알 수 있었으며, 가지 생체수 처리에 따른 감소는 보이지 않음 (Fig 8A). TNF- α 의 농도가 무처리군 대비 LPS 단독 처리에서 130배 증가하였으며 가지생체수 처리에 따른 감소는 없었음 (Fig 8B). LPS 단독 처리에 의해 307배 증가함으로써 세포가 정상적으로 기능함을 알 수 있었으며, 감귤 생체수 처리에 따른 감소는 보이지 않음 (Fig 8C). TNF- α 의 농도가 무처리군 대비 LPS 단독 처리에서 118.3배 증가하였으며 감귤 생체수 처리에 따른 감소는 없었음 (Fig 8D).

본 연구결과는 감귤생체수와 가지생체수의 보습과 미백효능을 확인함으로써 향후 다각도의 화장품 원료로서의 활용성 제고에 기여 할 것으로 판단됨.

7. 참고문헌

- 1) Golar Honari et al. "Skin Structure and Function" Sensitive Skin Syndrome 2nd (2017)
- 2) Jason E Hawkes, et al. "Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies" Journal of Allergy and Clinical Immunology 140(3) (2017) 645-653
- 3) Blair Z Johnson, et al. "The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing" Biomedicines 8(5) (2020) 101
- 4) Ji Hye Kim et al. "Antioxidant and Antimicrobial Effects of Lemon and Eucalyptus Essential Oils against Skin Floras" J. Soc. Cosmet. Scientists Korea Vol. 37, No. 4, 303-308 (2011)
- 5) Lee Hanil, et al. "Comparison of Clinical Features according to FLG Mutation in Korean Atopic Dermatitis Patients" Korean J Dermatol 57(7) (2019) 363-370
- 6) Yumi Nakamura, et al. "Identification of compounds in red wine that effectively upregulate aquaporin-3 as a potential mechanism of enhancement of skin moisturizing." Biochemistry and Biophysics Reports 24 (2020)
- 7) Raija H, et al. "Transcriptional and post-translational regulation of hyaluronan synthesis" FEBS JOURNAL 278(9) (2011) 1419-1428
- 8) Victoria M Virador, et al. "Influence of alpha-melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes" FASEB J. Food Preserv. Jan;16(1):105-7 (2002)
- 9) Seok-Moon Jeong, et al. "Effect of Far-Infrared Radiation on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus unshiu Peels" J Korean Soc Food Sci Nutr. 33(9), 1580 ~1583 (2004)
- 10) Yuna Jo et al. "The Skin Protecting Effects of Ethanolic Extracts of Eggplant Peels" Korean J. Food Sci. Technol. vol.44, no.1, pp. 94-99 (2012)