인체 피지선세포주(SZ95)에서 무화과 잎 추출물의 피지생성 억제 효과

박시준 · 김영목[1] · 임규상[2] · 우원홍 · 문연자*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1 : 한의과대학 병리학교실, 2 : 한의과대학 안이비인후피부과교실

Inhibitory Effect of Extract of Ficis Folium on the Sebum Synthesis in Human Sebocyte Cell Line (SZ95)

Si Jun Park, Yeong Mok Kim[1], Kyu Sang Lim[2], Won Hong Woo, Yeun Ja Mun*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine,
1 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine,
2 : Department of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Sebum is an oily substance produced by sebaceous glands in human skin. The differentiation of the sebaceous gland is remarkably species-specific and sebocytes may play crucial parts in the pathophysiologic processes and disorders of pilosebaceous unit. In this study, we investigated the inhibitory effect of Ficis folium on the lipid production using the human sebocyte cell line SZ95. Our results showed that Ficis folium significantly inhibits synthesis of sebaceous lipids such as cholesterol esters, triglycerides, and total lipid. And Ficis folium supressed cytoplasmic lipid droplets. On the other hand, Ficis folium didn't effect on cell proliferation. These results suggest treatment with Ficis folium resulted in a lower lipid synthesis in SZ95 cells without cytotoxicity.

Key words : sebaceous lipids, Ficis folium, cholesterol, triglycerides

서 론

무화과(Ficus carica L.)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 아열대성 반교목성 낙엽활엽수로 세계적으로 600여 종이 분포한다. 무기질과 폴리페놀(polyphenol), 식이섬유, 단백질 분해효소인 ficin 함량이 높고, 콜레스테롤을 저하시키는 피토스테롤(phytosterol)인 라노스테롤(lanosterol)과 스티그마스테롤(stigmasterol) 등을 함유하고 있다[1-3]. 또한 무화과는 건과로 健胃清腸, 消腫, 解毒의 효능이 있으며, 腸炎, 痢疾, 便秘, 痔疾, 喉痛, 癰瘡, 疥癬을 치료하고, 무화과 잎은 痔疾, 腫毒, 心痛을 치료하는 것으로 알려져 있다[1,4,5].

피부표면의 지질(skin surface lipid)은 진피(dermis) 내에 있는 피지선(sebaceous gland)의 피지선세포(sebocyte)와 표피(epidermis)의 각질화세포(keratinocyte)에서 대부분 형성되며, 수분증발 억제, 살균, 유화, 알칼리 중화, 배설작용 등 피부를 외부로부터 보호하는데, 그 구성성분과 양의 변화에 따라 아토피피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염(contact dermatitis), 어린선(ichthyosis), 여드름이나 지루성피부염(seborretic dermatitis)과 같은 각종 피부질환을 유발시키는 중요한 요소가 된다[6-8].

피지선에서 피지(sebum)의 생성과 억제는 주로 안드로젠(androgen)에 의해서 조절되는데, 테스토스테론(testostrone)과 dihydrotestostrone(DHT) 등은 피지의 생성을 증가시키고, 반면 에스트로젠(estrogen)과 항안드로젠은 이를 억제한다[9-11]. 따라서 피지선세포는 피부의 모피지선 단위(pilosebaceous unit)의 이상과 병태생리적 과정에 중요한 역할을 하고 있다[7,12]. 그러나 피지선의 분화와 기능, 약리적인 분석을 하기 위한 long-lasting culture model이 없어 간접적으로 피부표면지질 분석을 통하여 피지선의 활동을 측정하였다[13-16]. 또한 안드로젠의 대사는 세포의 형태에 따라, 분포 위치에 따라 다르게 나타나며, 피지선의 분화도 종 특이적으로 일어난다[10,17].

그러므로 본 연구에서는 인체 정상 피지선세포의 특징을 지닌 SZ95세포를 이용하여 무화과 잎 추출물의 피지생성 억제효과를 조사하였다.

* 교신저자 : 문연자, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원
· E-mail : yjmun@wku.ac.kr, · Tel : 063-859-6942
· 접수 : 2006/06/13 · 수정 : 2006/07/15 · 채택 : 2006/08/04

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용한 약재는 무화과 잎(Ficis folium)으로 시중 건재약국에서 구입하여 정선하여 사용하였으며, 원광대학교 한의학전문대학원 약재보관 냉동고에 보관하여 사용하였다.

2. 시료의 추출

무화과 잎 100g에 에탄올(EtOH) 1ℓ를 첨가하고 실온에서 6시간 동안 sonication하여 추출하였고, 추출액을 여과하여 Rotary evaporator로 감압 농축하고 동결 건조하여 무화과 잎 에탄올 추출물 14.78g(수득율 : 14.78%)을 얻었다. 무화과 잎 에탄올 추출물 시료는 DMSO에 녹인 후 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

사람의 피지선세포주(human immortalized sebocytes)인 SZ95세포는 CO_2 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL Co.)이 첨가된 sebocyte basal medium(Biochrom Ag Co. Germany) 배지에 배양하였고 72시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다.

4. 세포생존율(cell viability) 측정

세포생존율은 Mosmann의 방법[18]으로 측정하였다. SZ95세포를 24well plate에 3×10^4 개씩 분주하고 48시간동안 배양하여 부착시킨 후 무화과 잎 에탄올추출물을 농도별로 처리하고 3일 또는 5일 배양하였다. 배양이 끝난 후 2시간동안(37℃) 0.05% MTT용액으로 처리하고 상층액을 제거하였다. Formazan 침전물은 1㎖ DMSO에 약 15분간 실온에서 녹인 후 540nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

5. Oil Red 염색

SZ95세포를 chamber slide(Nunc Co.)에 분주하고 48시간 후 무화과 잎의 에탄올추출물을 농도별로 처리하고 5일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.5% Oil red 용액(Sigma Co.)으로 염색하고 85% propylene glycol 용액을 처리하였다. 3차 증류수로 2회 씻은 후 Harris hematoxylin 염색하고 glycerin jelly로 봉입하여 광학현미경으로 SZ95 세포 내 지방소적(Lipid droplet)을 관찰하였다.

6. 지질(lipid)의 정량 측정

SZ95세포를 10 cm dish(Nunc Co.)에 1×10^5개씩 분주하고 48시간 안정화 시킨 후 시료를 처리하여 5일 동안 배양하였다. SZ95세포의 지질(lipid)은 Folch-Lees 추출법에 따라 추출하였다. 배양이 끝난 SZ95세포를 수집하여 초음파로 분쇄하고 Cholroform:Methanol(2:1) 용액을 첨가하여 지질을 용해시킨 후 원심분리(2000rpm, 15분)하였다. 지질이 용해된 하층액을 취하여 질소(N_2 gas)로 농축하고 -20℃에 보관하였다. Protein assay kit로 단백질을 정량하고 용매에 녹인 후 실험에 사용하였다. 총지질(total lipid)은 sulfo-phospho-vanillin 발색법을 이용한 총지질 측정용시약(국제시약, 일본)으로 측정하였다. 먼저 H_2SO_4로 산화처리하여 keton body를 형성하고 이를 phospho-vanillin 시약으로 발색시켜 540 nm에서 측정하였다. Cholesterol은 total cholesterol kit(AM 202-K, 아산시약주식회사)를 사용하여 500 nm에서 측정하였고, triglyceride은 triglycerides kit(GPO-PAP, 영동제약주식회사)를 이용하여 546 nm에서 측정하였다.

결 과

1. 세포생존율(cell viability)

SZ95세포에 대한 무화과 잎 에탄올 추출물의 세포독성 효과를 알아보기 위하여 시료를 100, 200 ㎍/㎖ 농도로 처리하고 3일, 5일 배양한 후 MTT 방법으로 세포생존율을 조사하였다. 무화과 잎 에탄올 추출물 5일 처리군의 경우 100, 200 ㎍/㎖ 농도에서 각각 대조군의 107.4(±5.1)%, 103.3(±3.2)%로 SZ95세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 1).

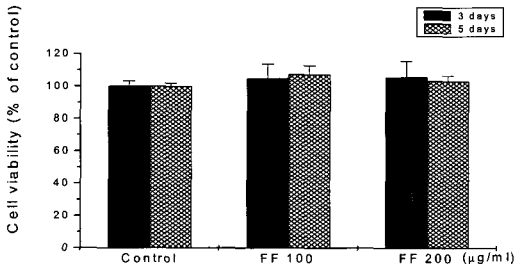

Fig. 1. Effect of FF on the cell viability of SZ95 cell. Cells were plated at 3×10^4 cells/well and incubated in media containing 100 ㎍/㎖ to 200 ㎍/㎖ of FF for 3, 5 days. The cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are mean ± SD of three experiments performed in triplicate.

또한 무화과 잎에 의한 세포사멸 현상이 일어나는지 형태학적 변화를 관찰한 결과 100, 200 ㎍/㎖ 처리군에서 SZ95세포의 밀도와 형태가 대조군과 유사하였다(Fig. 2).

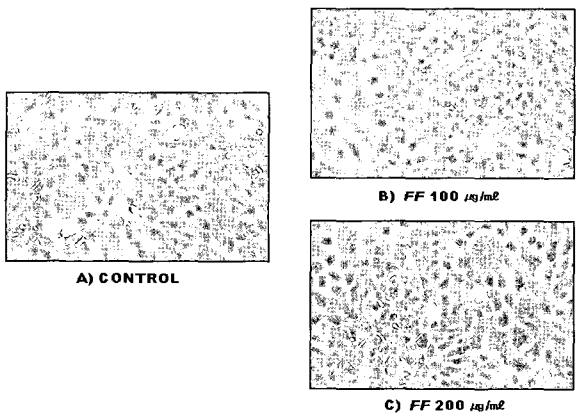

Fig. 2. Light micrographical observation of SZ95 cells after treatment with FF. Cells were incubated with FF for 5 days and photographed with phase contrast inverted microscope. A) Control, B) FF 100 ㎍/㎖, C) FF 200 ㎍/㎖ (×100)

2. 지질(lipid) 합성에 미치는 영향

SZ95세포의 지질합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 무화과 잎 추출물을 5일 동안 처리한 후 총지질의 양을 측정하였다. SZ95세포는 총지질이 25.5(±0.2) ㎎/㎖이었으며, 무화과 잎 추출물 100, 200 ㎍/㎖ 처리군은 각각 23.1(±0.1) ㎎/㎖, 21.3(±0.3) ㎎/㎖로 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

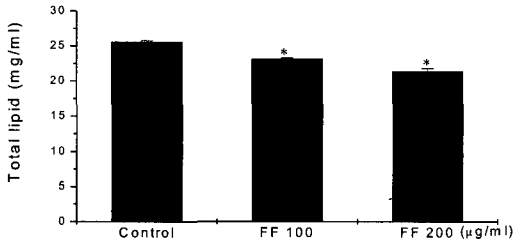

Fig. 3. Effect of FF on the total lipid content of SZ95 cell. Cells were plated at 1×10^5 cells/well and incubated in media containing 100 ㎍/㎖ or 200 ㎍/㎖ of FF for 5 days. Total lipid was measured by total lipid kit as described in Materials and Methods. Data are mean ± SD of three experiments performed in triplicate. * P<0.05 compared with control.

한편 Oil red 염색으로 세포내 지방소적(lipid droplets)의 변화를 관찰한 결과, SZ95세포는 세포질 내에 다수의 지방소적이 관찰되어 전형적인 피지선세포주의 특징을 나타냈으며, 모낭의 각질화세포주인 HaCaT세포에서는 지방소적이 관찰되지 않았다(Fig. 4). 그러나 무화과 잎 추출물 처리군은 정상 SZ95세포에 비해 지방소적이 감소하였으며, 200 ㎍/㎖ 처리군에서 현저히 감소하였다(Fig. 5).

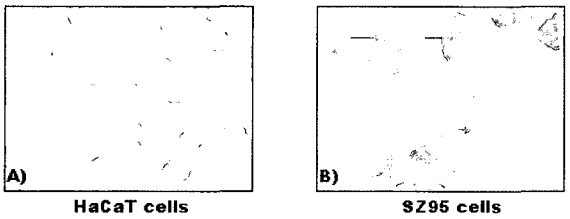

Fig. 4. Observation of cytoplasmic lipid droplets in SZ95 cells. Cytoplasmic lipid droplets (arrows) were stained with Oil Red dye as described in Materials and Methods. A) HaCaT cells negatively labeled with Oil Red dye. B) SZ95 cells positively with Oil Red dye identifying lipids. (×400)

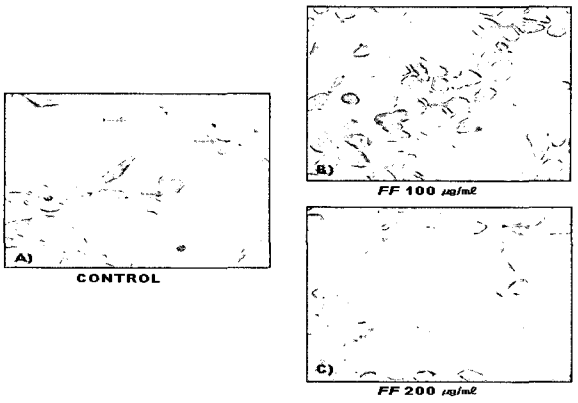

Fig. 5. Effect of FF on cytoplasmic lipid droplets formation. SZ95 cells were treated with FF for 5 days. Cytoplasmic lipid droplets (arrows) were stained with Oil Red dye as described in Materials and Methods. A) Control, B) FF 100 ㎍/㎖, C) FF 200 ㎍/㎖ (×400)

3. Cholesterol 생성에 미치는 영향

무화과 잎 추출물이 SZ95세포에서 생성되고 있는 지질의 pattern에 미치는 영향을 분석하기 위하여 cholesterol의 변화를 조사하였다. SZ95세포의 cholesterol 양은 0.91(±0.03) ㎎/㎖였으며, 무화과 잎 추출물 100, 200 ㎍/㎖ 처리군은 각각 0.74(±0.01) ㎎/㎖, 0.70(±0.02) ㎎/㎖로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 6).

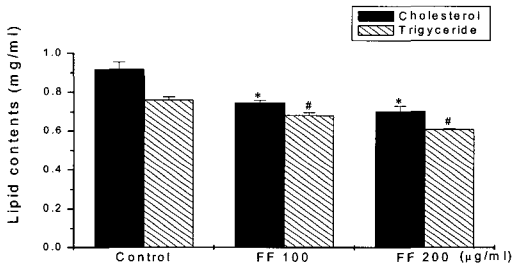

Fig. 6. Effects of FF on the cholesterol and triglycerides content of SZ95 cell. Cells were plated at 1×10^5 cells/well and incubated in media containing 100 ㎍/㎖ or 200 ㎍/㎖ of FF for 5 days. Cholesterol and triglycerides were measured by cholesterol and triglycerides kit respectively as described in Materials and Methods. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate. * and # P<0.05 compared with controls.

4. Triglyceride 생성에 미치는 영향

무화과 잎 추출물이 SZ95세포에서 생성되고 있는 지질의 pattern에 미치는 영향을 분석하기 위하여 triglyceride의 변화를 조사하였다. SZ95세포의 triglyceride은 0.75(±0.01) ㎎/㎖였으며, 무화과 잎 추출물 100, 200 ㎍/㎖ 처리군은 각각 0.68(±0.01) ㎎/㎖, 0.6(±0.01) ㎎/㎖로 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 6).

고 찰

무화과(Ficus carica L.)는 아열대성 반교목성 낙엽활엽수로 뽕나무과(Moraxeae)에 속하는 식물로 세계적으로 600여종 이상의 품종이 분포하고, 원산지는 소아시아의 카리카(Carica)지방으로 비교적 비가 많으며 배수가 잘되는 지역에서 재배되고 있다[1-3]. 민간에서 발진 및 궤양, 치질 등에 무화과 유액을 사용하여 왔으며, 소화촉진, 변비완화, 주독이나 어독 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 한의학에서는 건과로 하여 청열해독(淸熱解毒) 치료제로 사용되고 있다[1,4].

여드름은 주로 사춘기와 젊은 연령층에 발생하는 모피지선의 만성 염증성 질환으로 면포, 구진, 농포, 낭종 및 결절을 특징으로 하는 피부질환이다[8,9]. 여드름의 정확한 원인은 알려져 있지 않으나 여러 인자의 상호작용에 의해 임상증상이 나타나며, 주요 인자로는 첫째 남성호르몬에 의한 피지 분비항진, 둘째 모낭개구부의 각화와 피지의 배출지연, 셋째 세균성 리파아제에 의한 피지성분 중의 중성지방의 가수 분해로 생긴 유리지방산의 모낭벽 자극, 넷째 세균에서 분비되는 화학성 물질에 의한 모낭주위 염증, 세포침착, 다섯째 유전적 소인을 들 수 있다[8,9]. 최근에는 화장품 성분, 부신피질 호르몬제, 직업으로 인한 기름왁스의 사용, 과도한 세제나 비누의 사용, 강한 자외선 등 환경요인과 호르

몬 이상으로 androgen 분비항진 또는 모낭 내에 상주하는 균에 의해 발생한다고 알려져 있다[8,9,19]. 현재 여드름 치료에 부작용 없이 효과적인 단일 치료 방법은 없으며 주로 병원성 인자를 억제하는 것으로 국소 도포제 사용에서부터 항생제 혹은 retinoids, azelaic acid, 및 각질 용해제 등이 사용되고 있다[20-22]. 따라서 과분비 혹은 과억제된 피지를 조절할 수 있는 한약제나 천연물이 개발된다면 피지분비에 관련된 피부질환을 개선하고 치료하는데 도움이 될 것이다.

피부표면의 지질(skin surface lipid)은 피부에 심한 건조를 막고, 외부로부터 유해물질의 경피흡수를 차단하며, 여러 가지 미생물의 성장을 억제하고, 자외선을 차단하여 피부를 보호하는 등 중요한 역할을 하고 있다[6,16].

따라서 피지선세포는 피부의 모피지선 단위(pilosebaceous unit)의 이상과 병태생리적 과정에 중요한 역할을 하고 있으나, 적절한 long-lasting culture model이 없어 주로 피부표면지질 분석을 통하여 간접적으로 피지선의 활동을 측정하였다[13-16].

Downing 등은 피지선이 전분비선(holocrine gland)으로서 피지선세포의 세포질에 존재하는 wax ester 뿐만 아니라 세포막에 존재하는 cholesterol, cholesterol ester등을 분비하기 때문에 피지선세포가 활성화되면 WE/[C+CE]비가 증가한다고 하였다. 결과적으로 피부표면의 지질성분 중 WE/[C+CE]의 비율이 피지선의 활동을 간접적으로 나타낸다고 하였다[13].

그러나 피지선의 활성을 피부표면지질의 분석을 통해서 알아보는 데는 첫째 각질형성세포의 지질이 포함되어 있는 점, 둘째 표면지질채취의 어려움, 셋째 세균에 의한 지방성분의 분해 등의 여러 가지 문제점을 안고 있다. 따라서 본 실험에서 사람의 정상 피지선세포의 특징을 지닌 SZ95세포에서 피지선의 활성을 조사하였다.

본 실험에서 표피를 주로 구성하고 있는 각질형성세포주인 HaCaT세포는 세포 내 지방소적이 관찰되지 않았으나, SZ95세포는 피지선의 일차적인 특징인 지방소적을 많이 함유하고 있었으며(Fig. 3 & 4), 이전의 연구결과에서 SZ95세포의 총지질 함유량은 HaCaT세포의 약 4배에 달하였다[23].

사람에서 피지선에 대한 안드로젠의 영향에 대한 연구로는 1962년 Strauss 등이 경구로 methyltestosterone 투여 후 피지분비가 증가하고 피지선의 크기가 커지는 것을 보고하였고[24], 1963년 Pochi 등은 DHEA을 투여한 결과 피지분비율이 증가되는 것을 보고한 바 있으며[25], De Raeve 등은 사춘기 전에 초발한 조발성 여드름 환자에 있어 부신 분비성 남성호르몬의 과다를 중요한 병인이라고 제시하였다[26]. 또한 Thiboutot 등은 사람에서 피지의 성분은 triglyceride, cholesterol, free fatty acid, wax esters, squalene 등으로 이루어져있음을 보고하였다[7].

본 실험에서 지질생성에 미치는 무화과 잎 추출물의 영향을 조사한 결과, SZ95세포의 증식을 억제하지 않는 농도에서 지질의 생성을 억제한 것으로 나타났으며(Fig. 1 & 3), 지질의 구성성분 중 cholesterol과 triglyceride의 생성도 억제하였으며, 특히 triglyceride가 cholesterol보다 현저히 감소하였다.

이상의 결과, 무화과 잎 추출물은 SZ95세포의 지질 합성을 억제하였으므로 향후 여드름 등 피지의 과잉 분비에 의한 질환에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

무화과 잎 추출물이 피지생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 인체 정상 피지선세포의 특징을 지닌 SZ95세포에서 지질생성 억제효과를 조사하였다.

무화과 잎 추출물은 SZ95세포의 증식을 억제하지 않았으며, 형태적 관찰 결과 대조군과 유사하게 나타났다. SZ95세포는 세포 내 지방소적(lipid droplets)을 다수 함유하고 있었으나, 무화과 잎 추출물 처리군에서는 세포 내 지방소적이 현저히 감소되었다. 또한 무화과 잎 추출물 처리군은 대조군에 비하여 총지질 합성이 현저히 감소되었으며, cholesterol과 triglyceride의 합성도 유의하게 감소되었다.

이상의 결과 무화과 잎 추출물은 SZ95세포의 지질생성을 억제하였고, 세포증식을 억제하거나 세포독성은 없었으며 향후 피지의 과잉 분비에 따른 여드름 개선에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 金昌玟 外, 中藥大辭典, 鼎談, 서울, pp 1426-1428, 1999.
2. Vinson, J.A. The functional food properties of figs. Cereal Food Word 44(2):82-87, 1999.
3. Williams, D.C., Sgarbieri, V.C., Whitaker, J.R. Proteolytic activity in the genus Ficus. Planta Physiol 43:1083-1088, 1968.
4. 신민교. 임상본초학. 영림사, 서울, p 419-420, 1997.
5. 임계택, 이세중, 고정현, 오필선. 무화과 당단백질의 혈중지질 저하 효과. 한국식품과학회지 73(4):624-630, 2005.
6. Pappas, A., Anthonavage, M., Gordan, J. Metabolic fate and selective utilization of major fatty acid in human sebaceous gland. J Invest Dermatol 118(1):164-171, 2001.
7. Thiboutot, D. Regulation of Human Sebaceous Glands. Dermatology Foundation J Invest Dermatol 123:1-12, 2004.
8. Webster, G.F. Inflammation in acne vulgaris, J Am Acad Dermatol 33:247-253, 1995.
9. Sansone, G., Reisner, R.M. Differential rates of conversion of testosterone to dihydrotestosterone in acne and in normal human skin-A possible pathogenic factor in acne, J Invest Dermatol 56:366-372, 1971.
10. Schmidt, J.B., Spona, J. Hormone receptors in normal skin and acne. Endocrinol Exp 17:137-144, 1983.
11. Sperling, L.C., Heimer, W.L. Androgen biology as a basis for the diagnosis and treatment of androgenic disorders in women. I, J Am Acad Dermatol 28(5 Pt 1):669-683, 1993.
12. Gollnick, H., Zouboulis, C.C., Akamatsu, H., Kurokawa, I., Schulte, A. Pathogenesis and pathogenesis related

treatment of acne, J. Dermatol 18:489-499, 1991.
13. Downing, D.T., Strauss, J.S., Pochi, P.E. Variability on the chemical composition of human skin surface lipids. J Invest Dermatol 53:322-325, 1969.
14. Greene, R.S., Downing, D.T., Pochi, P.E. et al. Anatomical variation in the amount and composition of human skin suface lipid. J Invest Dermatol 54:240-247, 1970.
15. Kligman, A.M. The uses of sebum, in Montagna W, Ells RA, Silver AF(eds): The Sebaceus glands, Advances in Biology of Skin. Vol. 4, Pergamon Press, London, pp 110-124, 1963.
16. Nicolaides, N. Human skin surface lipids-orgin, composition and possible function, in Montagna W, Ellis RA, Silver AF(eds) : The Sebaceous glands, Advances in Biology of Skin. Vol. 4, Pergamon Press, London, pp 167-187, 1963.
17. Lucky, A.W. Hormonal correlates of acne and hirsutism, Am J Med 98:89-94, 1995.
18. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. J Immunol Methods 65:55-63, 1983.
19. 李惟信. 임상피부과학, 서울, 여문각, pp 217-224, 1987.
20. Leyden, J.J., Shalita, A. Rational therapy for acne vularis. an update on topical treatment. J Am Acad Dermatol 15:907-915, 1986.
21. Kligman, A.M. Fulton, J.E., Plewig, G. Topical vitamin A acid in acne vularis. Arch Dermatol 99:469-476, 1969.
22. Thomsen, R.J., Stranieri, A., Knuson, D. et al. Topical clindamycin treatment of acne. Arch Dermatol 116:1031-1034, 1980.
23. 문연자, 김윤석, 권강주, 이희섭, 노성택, 김양진, 이장천, 우원홍 : 피지선세포에서 Retinoic Acid의 피지생성억제효과, 동의생리병리학회지 18(5):1317-1321, 2004.
24. Strauss, J.S., Kligman, A.M., Pochi, P.E. The effect of androgens and estrogen on human sebaceous glands. J Invest Dermatol 39:139-155, 1962.
25. Pochi, P.E., Strauss, J.S., Mescon, H. The role of adrenocortical steroids in the control of human sebaceous gland activity. J Invest Dermatol 41:391-399, 1963.
26. De Raeve, L., De Schepper, J., Smitz, J. Prepubertal acne : A cutaneous marker of androgen excess? J Am Acad Dermatol 32:181-184, 1995.