



Study on skin anti-inflammatory activity of fig (*Ficus carica L.*) fruit extract fractions

Hee Joon Kwon¹ · Geun soo Lee² · Jin Hwa Kim² · Soon Woo Kwon² · Hyung seo Hwang¹

무화과(*Ficus carica L.*) 열매 추출 분획의 피부 항염증 활성 연구

권희준¹ · 이근수² · 김진화² · 권순우² · 황형서¹

Received: 16 September 2023 / Accepted: 13 October 2023 / Published Online: 27 October 2023

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Figs has known to have antioxidant, whitening, anti-inflammatory, and antibacterial effects in their leaves, roots, stems, latex, and fruits. In order to develop cosmetic materials based on natural products, we have studied on the skin activity of the ficin in latex as well as the whitening function of the fruit extract with 70% ethanol, and used it as a raw material for released cosmetic product. However, there is little research on the demand for the development of new eutectic solvent extraction methods and its ability to control skin inflammation and psoriasis regulation. Thus, in this study, we evaluated the effectiveness of fig fruit extracts and fractions using eutectic solvent extraction for skin inflammation control and psoriasis. First, fig fruits were extracted under optimal eutectic solvent conditions and fractionated with n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and butanol. First, the antioxidant activity and inhibition of nitric oxide (NO) production were confirmed in mouse macrophage RAW264.7 cells. In addition, as a result of observing the mRNA expression through RT-PCR, pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β were suppressed significantly in the hexane,

dichloromethane, and ethyl acetate fractions. In addition, it was confirmed in TNF- α stimulated HaCaT keratinocyte model. Finally, chemokine CC motif ligand 20 (CCL20), marker gene of human psoriasis skin disease, was significantly suppressed in the hexane, dichloromethane, and ethyl acetate fractions. These results suggested its anti-inflammatory and skin soothing effect and the possibility of development as an excellent skin soothing natural cosmetic material in the future through future clinical trials.

Keywords Anti-inflammation · Deep eutectic solvent · Fig fruit extract · Keratinocyte · Psoriasis

서 론

식물은 동물과 달리 항상 한 곳에서 이동없이 자라기 때문에 외부 환경 변화로부터 자기 자신을 보호하는 방어 기작이 매우 발달되어 있다[1]. 특히, 식물의 잎이나 줄기, 열매에는 폴리페놀 화합물이 다량 축적되어 있어 진균, 세균들의 성장과 병원체 감염으로부터 식물을 보호한다[2,3]. 뿐만 아니라 잎, 줄기, 뿌리 등에는 항산화 및 항염증, 피부 노화 방지 등 피부건강 유지 등에 필요한 유효성분들이 많이 함유되어 있어 이를 이용한 화장품, 식품, 의약품 개발 연구도 활발히 진행되고 있다[4,5]. 식물성 원료를 추출하는 방법으로는 가장 간단한 방식인 열수 추출법이 널리 사용되어 왔다. 이는 식물성 원료내 다양한 수용성 성분들을 뜨거운 물로만 추출하기 때문에 잔류 유기용매에 대한 독성 우려는 고려하지 않아도 된다. 그러나 열수 추출법은 소수성 유기 유효성분을 확보하기 매우 어렵고, 80-100 °C의 높은 온도 조건에서 추출하기 때문에 폴리페놀과 같은 유효

Hyung seo Hwang (✉)
E-mail: hshwang@semyung.ac.kr

¹School of cosmetic science and beauty biotechnology, Semyung University, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Republic of Korea

²R&D Center, IT'S HANBUL, 62, Daeseong-ro 547beon-gil, Samseong-myeon, Eumseong-gun, Chungcheongbuk-do, 27651, Republic of Korea

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.

성분들이 쉽게 파괴될 수 있는 단점이 있다[6,7]. 또한 장기간 추출 과정에서의 미생물 오염 가능성이 높고, 변성의 우려가 크기 때문에 동결 건조 방식으로 보관해야 한다. 그러나 비극성 유기용매를 이용한 추출법에서는 식물성 원료의 소수성 성분 추출에는 유용하지만, 필히 사용한 유기용매를 완벽히 제거해야 하는 불편함이 있다[8]. 왜냐하면 천연물 내 잔류 용매는 피부 자극, 세포독성, 유화 방해 등을 유발할 수 있기 때문이다[9]. 따라서, 이러한 두 추출법들의 단점을 보완하고자 공용용매 추출법(DES, deep eutectic solvent)이 개발되었다[10]. DES는 용점이 높은 두 가지 이상 물질 사이 수소결합을 통해 상온에서 액화되는 이온성 용매로 수소결합주개(hydrogen bond donor, HBD)와 수소결합받개(hydrogen bond acceptor, HBA)로 구성된다. DES는 재생 가능한 생분해성 용매로 제조가 매우 용이하고 경제성이 높으며 무독성 등의 장점이 보고된다. 또한, 구성 성분의 조절을 통해 다양한 물리 화학적 성상을 가지기 때문에 ‘designer solvent’로서의 활용이 기대된다[11,12]. 그러나 DES는 산업계에서 주목받는 기술임은 분명하나 주로 제지, 환경, 정유 산업군에 기술의 초점이 맞추어져 있으며, 피부에 사용하기 어려운 물질이 대부분이다. 따라서, 본 연구에서는 유기산 및 당을 활용한 피부 적용 가능한 최적의 DES 조건을 확립하여 추후 연구에 적용하고자 하였다.

무화과(*Ficus carica*, L)는 뽕나무과 무화과 나무 속에 속하는 과일로 유럽 지중해 지역과 중동 지역에서 많이 자라는 식물이다[13]. 무화과의 약리학적 효능으로 해열, 항염증, 간보호, 항암, 항바이러스, 면역조절 등이 알려졌다[14]. 무화과 열매에 포함되어 있는 물질은 phyosterols, anthocyanin, limonene, bergapten, ferulic acid, luteolin, rutin 같은 폴리페놀 화합물이다[15-17]. 이 중 rutin은 quercetin 배당체로 항염증, 항산화, 항암, 항노화, 보습 효능이 보고되었고 아토피 피부염 증상 완화에 효능이 보고되었다[18-23]. 또한 무화과 latex 부위 유액 성분으로 알려진 ficin 분해효소는 단백질 분해효소 기능 외에 항산화 및 항염증 뿐 아니라 멜라닌 생성 조절 기능이 보고되었다[24]. 그러나 무화과 잎 추출물의 염증 조절 기능 결과를 제외하면 최근까지 피부 각질형성세포(HaCaT) 모델에서 무화과 열매 추출물의 항염증 효과 및 건선, 아토피 같은 난치성 피부 질환 조절 연구는 거의 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 무화과 열매를 기존 유기용매가 아닌 최적의 공용용매(DES) 추출 조건을 확보하고, n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol 등 다양한 용매로 이를 분획하여 인간 각질형성세포 모델에서 이들 분획물 간 항염증 활성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에 사용한 무화과 열매는 전라남도 영암에서 재배한 유기농 무화과(무화과농장, 영암, Korea)를 구매한 후 수세 및 분쇄과정을 거쳐 최종 동결건조(Freeze dryer FD8508, ilshin lab, Seoul, Korea)시킨 후 분말형태로 제조하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 citric acid (Sigma, St. Louis, MO, USA), betaine (Sigma), n-hexane (Sigma), dichloromethane (Sigma),

ethyl acetate (Sigma), butanol (Sigma)이다.

공용용매를 이용한 무화과 열매 추출 및 용매분획

본 연구에 사용된 친환경 공용용매 무화과 열매 분획물은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 실험에 사용한 친환경 공용용매 무화과 열매 추출물은 citric acid : betaine : water를 1:1:0.15 비율로 섞은 뒤 70-110 °C에서 60 rpm 조건으로 교반하여 액체 상태의 친환경 공용용매를 제조하고, 이를 이용하여 분말형태의 무화과 열매 건조물을 10 wt%의 농도로 6시간 동안 환류추출기(Combination Multi Heating Mantles, Fine Therm, Global lab, Siheung-si, Korea)에 넣어 총 2회 추출하고 400 mesh로 여과하여 그 여액을 받아냈다. 이후, 극성에 따라 순차적으로 n-hexane (n-HEX), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA), butanol (BuOH)을 사용하여 친환경 공용용매 무화과 열매 용매 분획 시료를 제조하였고, 감압농축(Rotary evaporator, N-1001S-W, EYELA, Tokyo, Japan) 및 동결건조(Freeze dryer FD8508, ilshin lab)를 통하여 최종 용매분획 시료를 확보하였다.

세포 배양

RAW264.7 마우스 대식세포와 HaCaT 피부각질형성세포는 American Type Culture Collection와 Cell Line Service GmbH에서 각각 분양 받아 사용하였다. 연구에서 사용한 2종류의 세포들은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Kyungsan, Korea)에서 배양하였고, 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Kyungsan, Korea)과 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL Penicillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 포함하였다. 세포의 배양 조건은 37 °C, 5% CO₂ 조건이며, 동물세포 배양기에서 피부세포를 안전하게 계대 배양하였다.

세포독성 평가

무화과 열매 추출물 및 분획물들의 세포독성 평가는 cell counting kit-8 assay (CCK-8 assay, DoGen bio, Seoul, Korea)로 진행하였다. 24 well-plate에 RAW264.7 세포를 1.5×10⁵ cell/well, HaCaT 세포는 5.0×10⁴ cell/well 로 각각 분주한 후 24시간 동안 안정화시켰다. 안정화 된 세포에 무화과 분획물을 농도별로 약 24시간 동안 반응시켰다. 이후 배양 상층액을 제거하고 CCK-8 reagent와 phenol red 없는 DMEM을 1:10 비율로 희석한 후 각 well당 500 µL씩 분주하고 30분간 반응시켰다. 이후 ELISA reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 평가하였다.

NO assay

세포 내 생성되는 NO 생성량을 비교 분석하기 위해 NO assay를 수행하였다. 먼저 24 well-plate에 RAW264.7 세포를 1.5×10⁵ cell/well로 분주한 후 24시간 동안 세포를 안정화시켰다. 이후 0.5 µg/mL lipopolysaccharide (LPS, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)와 무화과 분획물들을 농도별로 동시 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 이후 1.5 mL ep-tube로 분비된 NO가 포함된 세포배양액을 각 200 µL씩 분주하고 Griess 용액(G4410, Sigma-aldrich)과 1:1 비율로 섞은 후 30분 동안 반응시켰다. 이후 96well plate로 옮긴 후 540 nm 조건에서 흡광도를 측정하였고, 이후 측정값을 계산하여 NO 생성량을 산출하였다.

Table 1 Gene name and assay ID number in real-time PCR analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
IL-1 α	Interleukin 1 alpha	Hs00174092_m1
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Hs01555410_m1
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	Hs01011368_m1
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Mm00434228_m2
TNF α	Tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1

Table 2 Total phenolic content of five fig fractions

Name	Determined by Folin-ciocalteu (%)			Total phenol (%)
	1	2	3	
Hexane	9.92	9.62	11.23	10.3 \pm 0.858
Dichloromethane	13.0	13.46	14.31	13.6 \pm 0.663
Ethyl acetate	9.15	5.77	8.15	7.7 \pm 1.739
Butanol	-	-	-	-
Water	-	-	-	-

RNA 추출 및 RT-PCR

6 well-plate에 RAW264.7와 HaCaT 세포를 각각 5.0×10^5 cell/well로 배양한 후 37 °C 조건에서 24시간 세포 배양하여 plate 위에 안정화 시켰다. 이후 무화과 분획물에 의한 항염증 활성을 확인하기 위해 RAW264.7 세포에 LPS (0.5 μ g/mL)와 각 농도별 무화과 분획물을 HaCaT 세포에 TNF- α (20 ng/mL)와 각 농도별 무화과 분획물을 동시에 처리하여 2 시간 배양한 후 TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA는 1.5 μ g을 정량한 후 Revertra Ace- α -Kit (Toyobo, Osaka, Japan)을 이용 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 이 과정으로 합성된 cDNA와 여러 유전자들의 Taqman probe를 혼합한 후 StepOnePlus real time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기기에서 유전자들의 mRNA 발현량을 비교 분석하였다. 연구에서 사용한 모든 종류의 Taqman probe들은 Table 1에 별도 표기하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 Folin-ciocalteu 법을 사용하였다. 무화과 분획물을 100 μ g/mL 농도로 희석하여 200 μ L 용량으로 만든 후 Folin-ciocalteu's phenol reagent (F9252, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약 200 μ L 균등하게 섞어 10 분 동안 반응시켰다. 그리고 10% Na₂CO₃ 용액을 2 mL 추가로 넣은 후 다시 1시간 반응시켰다. 그 후 발색이 완료된 용액을 96well plate에 옮겨 765 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin (Q4951, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 표준 검량 곡선을 그린 뒤 총 페놀 함량을 산출하여 Table 2에 %로 표기하였다.

통계처리

본 실험에서 적용한 모든 통계처리는 Student's *t*-test 방법을 주

로 수행하였으며, 분석에서 *p* 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하고 세밀한 유의성 차이는 표식으로 보다 자세히 설명하였다.

결 과

무화과 열매 분획물의 세포독성

무화과 열매를 공용용매 추출법을 이용한 최적의 조건을 확립한 후 추출물(FIG NADES extract)을 DPPH assay를 통해 확인한 결과 항산화 활성이 확인되었다. 이후 순차적으로 n-HEX, DCM, ethyl acetate (EA), butanol (BuOH) 등 유기용매로 추가 분획하여 5종의 분획물을 확보하였다(Fig. 1A). CCK-8 assay를 수행하여 피부 각질형성세포 HaCaT 세포주에 미치는 세포독성을 평가하였다. 그 결과 5종 분획물 모두 100 μ g/mL 농도까지는 전혀 독성이 관찰되지 않았지만, 200 μ g/mL 농도 조건에서는 DCM 분획물에서 81.0 \pm 0.349% 수준으로 생존율이 감소하여 동일한 조건에서 비교하기 위해 최대 농도를 100 μ g/mL로 설정한 후 이후 모든 실험에 적용하였다(Fig. 1B).

무화과 열매 분획물의 항산화 활성

무화과 열매 분획물들에 대한 항산화 활성을 비교하기 위해 DPPH assay를 수행하였다(Fig. 1C). 양성 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였고, 모든 시료의 농도는 100 μ g/mL 조건으로 동일하였다. 항산화 효능이 확인되는 추출물이 어떤 분획물에서 나타나는지 확인하기 위해 무화과 5종 분획물에서 DPPH 라디칼 소거능을 실험한 결과 HEX, DCM, EA 분획물에서 70.4 \pm 0.221, 72.7 \pm 0.445, 77.0 \pm 0.717% 등 70% 이상의 높은 라디칼 소거능을 보였고, 이중 EA 분획이 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 1C). 또한 ABTS assay를 통해 항산화 활성을 검증한 결과 57.5 \pm 1.607, 63.5 \pm 1.122, 77.6 \pm 0.681% 등

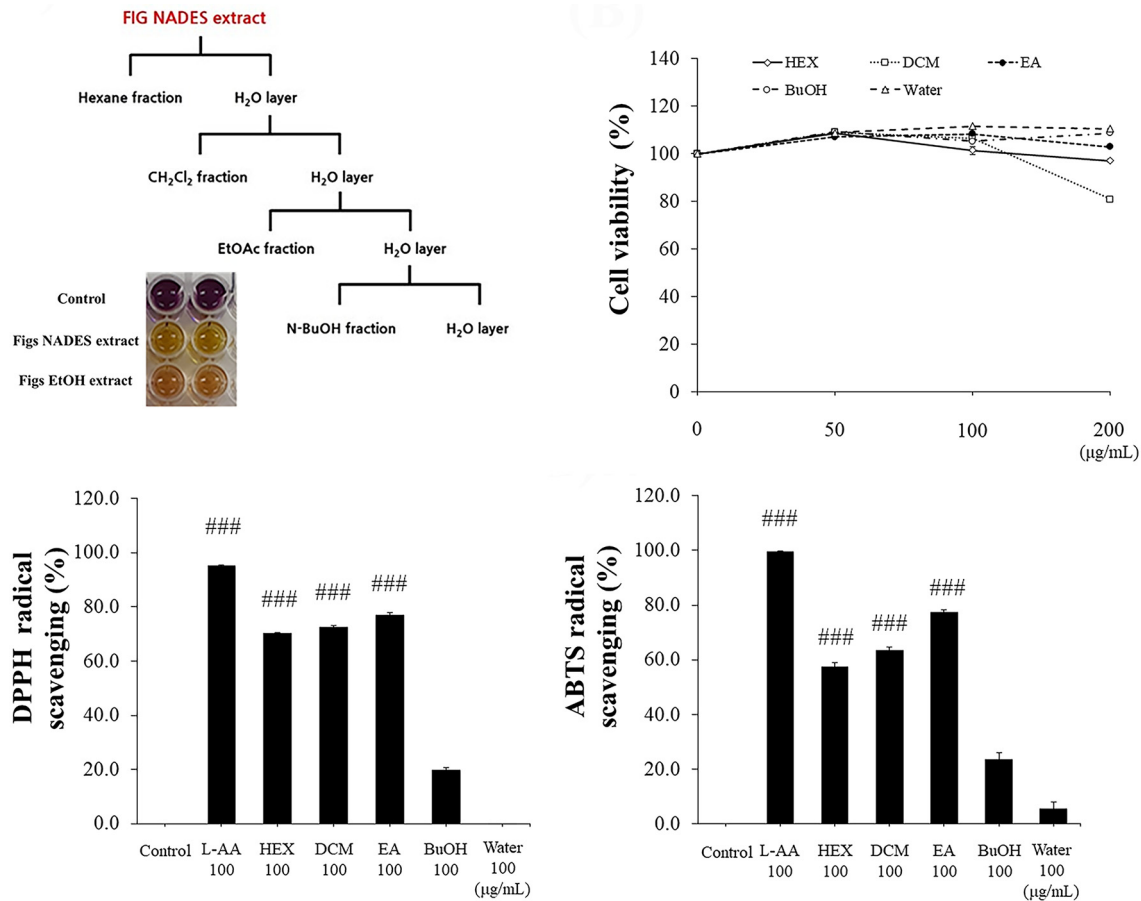


Fig. 1 (A) Schematic diagram of the fractionation process of fig extract using eutectic solvent (B) CCK-8 assay of five figs fruit fraction in HaCaT keratinocyte (C, D) DPPH and ABTS radical scavenging activity tests were conducted on five types of fig fractions, and HEX, DCM, and EA fractions showed significant efficacy. ###*p* < 0.001 compared to control

DPPH 소거능 결과와 거의 유사하게 활성이 측정되었다. DPPH/ABTS 라디칼 소거능은 모두 동일하게 EA 분획이 가장 높은 항산화 활성을 보였다(Fig. 1D).

무화과 열매 분획물의 NO 억제 및 항염증 활성

무화과 열매 분획물의 항염증 활성을 비교하기 위해 Griess assay를 통해 NO 생성량을 확인하였다. LPS 단독 처리군에서 세포독성이 제한적으로 관찰되었으나 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서도 무화과 분획물을 최대 100 μg/mL 조건으로 동시 처리한 결과에서는 세포독성이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 2A). RAW264.7 세포주에 LPS (0.5 μg/mL)를 처리한 후 NO 생성량은 측정된 결과 606.0±5.9%로 무처리군 대비 약 6배 이상 증가했다. 양성대조군인 quercetin 처리군에서는 367.7±1.52%로 유의성 있게 NO 생성이 억제되었다. LPS와 5종의 무화과 열매 분획물을 동시 처리한 후 NO 생성을 비교한 결과, 각각 117.4±2.0, 134.7±1.4, 283.8±0.2, 376.6±3.6, 470.1±3.5%로 LPS 처리군 대비 NO 생성량이 모두 감소하였고, 특히, n-HEX, DCM 분획물에서 가장 높은 NO 감소 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 이와 동일한 조건에서 염증성 사이토카인들의 mRNA 발현량 변화를 비교하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. RAW264.7

세포에 LPS 단독 처리 시 TNF-α는 103.3±12.5배 증가하였다. 양성대조군으로 사용된 quercetin (10 μg/mL) 처리군에서는 약 89.2±6.9배로 감소하였다. 반면 5종의 무화과 분획물 동시 처리군에서는 HEX, DCM, EA 처리군에서 각각 31.0±4.0, 33.94±3.4, 48.39±5.8배 수준으로 감소하여 유의성 있는 발현 억제가 관찰되었다. 그러나 BuOH 분획물과 그 외 수층은 각각 95.73±4.1, 85.4±6.7배로 유의성 있는 감소가 없었다(Fig. 2C). 동일한 조건에서 염증성 사이토카인인 IL-1β의 mRNA 발현을 확인한 결과, LPS 단독 처리 군에서 8,033.4±1,036.5배로 무처리군 대비 약 8,000배 이상 증가하였고, 양성대조군인 quercetin 처리군에서는 1,209.3±100.3배로 유의성 있게 감소하였다. 동일한 조건에서 무화과 분획물을 동시 처리한 결과 HEX, DCM, EA 동시 처리군에서 각각 191.52±10.1, 124.0±11.6, 677.9±152.7배로 매우 유의성 있게 감소하였다. 무화과 BuOH 분획물과 그 외 수층은 TNF-α와 마찬가지로 IL-1β의 mRNA 발현 또한 억제하지 못했다(Fig. 2D). 위 결과는 항산화 및 항염증 또한 HEX, DCM, EA 분획물에서 유의미한 활성 결과를 보여준다.

무화과 분획물의 건선 조절 기능

건선은 인간 면역 체계와 관련된 대표적 난치성 만성 피부 질

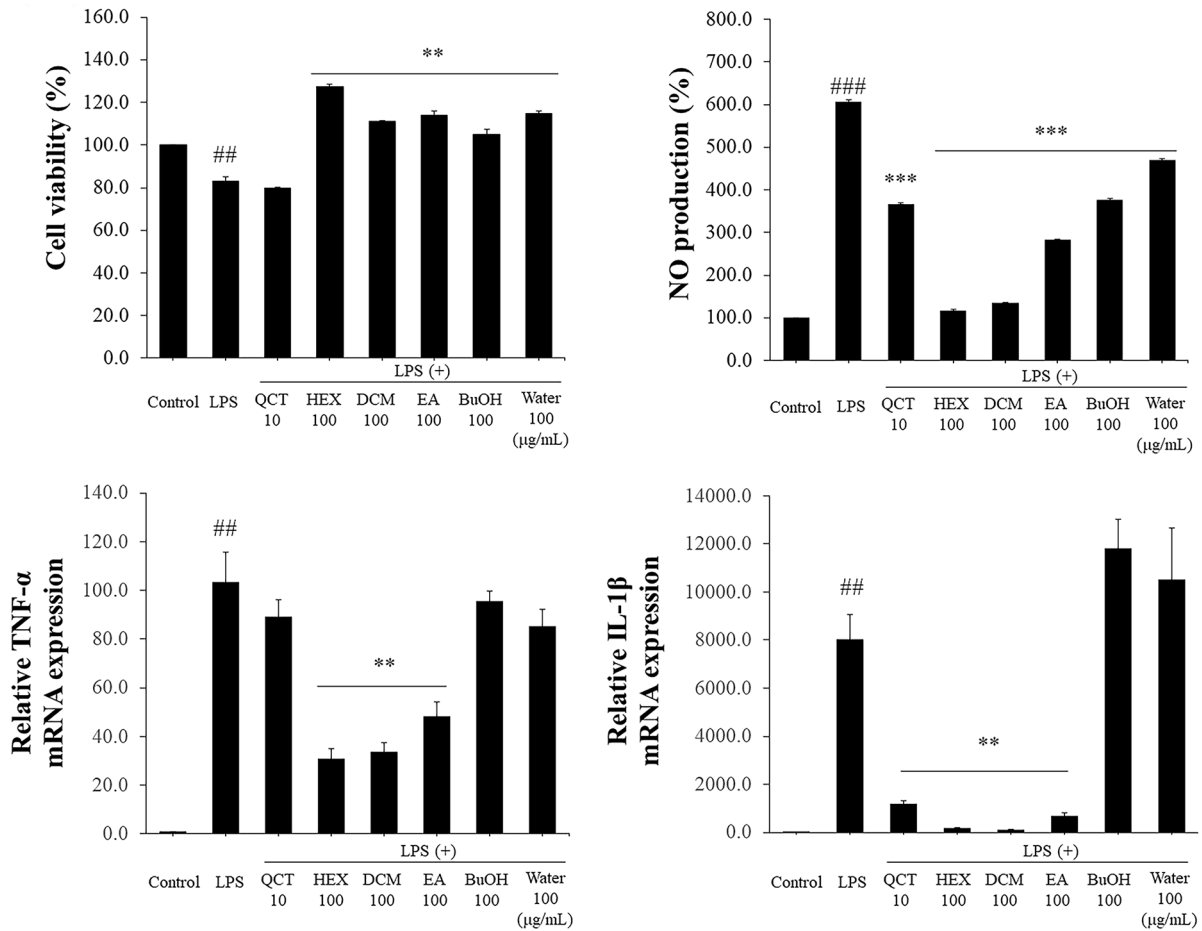


Fig. 2 Anti-inflammatory activity of five fig fractions in RAW264.7 mouse macrophage cells. (A) Cell viability of five fig fractions was determined in RAW264.7 mouse macrophages. No cytotoxicity was observed in RAW264.7 cells for all five fig fractions up to a concentration of 100 µg/mL. (B) Changes in NO production in fig fractions (100 µg/mL) were observed in the LPS-induced RAW264.7 cell model. Compared to the group treated with quercetin alone, NO production was suppressed in HEX, DCM, and EA fractions. (C) As a result of observing changes in mRNA expression of the TNF-α gene by performing RT-PCR assay, it was confirmed that the expression level was suppressed in the HEX, DCM, and EA co-treatment group compared to the LPS only. (D) HEX, DCM, and EA fractions also significantly downregulated IL-1β mRNA expression. Through this, it was confirmed that the two representative inflammatory cytokines were commonly suppressed only in three fractions (HEX, DCM, and EA). ###*p* < 0.01, ###*p* < 0.001 compared to control group, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared to LPS

환으로 흉반과 함께 표피 과증식에 의한 피부장벽 손상, 과도한 염증 반응이 주요 특징으로 보고된다[25]. 특히 표피의 각질 세포에 영향을 미치는 대표적인 사이토카인으로 TNF-α, IL-17A, IFN-γ 등이 알려져 있다. 이들은 Th1, Th17 세포에서 분비되는데, 먼저 인간각질형성세포(HaCaT)를 TNF-α로 자극하여 염증성 사이토카인 분비를 촉진시킨 후 무화과 열매 분획물에 의한 조절 가능성을 확인하였다. 이전 실험과 동일하게 세포독성은 동일하게 100 µg/mL 농도에서 관찰되지 않았다(Fig. 3A). 따라서 HaCaT 세포주를 TNF-α로 자극한 후 무화과 분획물을 동시 처리한 결과 IL-1α의 mRNA 발현량은 약 2.3±0.8배 증가하였고 양성대조군인 brazilin (3 µg/mL)은 약 1.82±0.6 수준으로 감소하였다. 동일한 조건에서 무화과 분획물 중 HEX, DCM, EA는 0.77±0.1, 0.86±0.3, 1.09±0.3배로 감소하였다(Fig. 3B). 동일한 조건에서 IL-1β의 mRNA 발현량 변화 또한 IL-1α와 거의 유사한 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 3C). 마지막으로 *in*

vitro 건선 피부세포 모델인 TNF-α, IL-17A, IFN-γ 유도 HaCaT 세포주에서 chemokine CC motif ligand 20 (CCL20) mRNA 발현량을 관찰하였다. 건선 유발 사이토카인 3종을 동시 처리하여 HaCaT 세포를 자극하면 전염증성 사이토카인과 함께 중요한 건선 지표 유전자인 CCL20 케모카인 발현이 매우 증가한다[26,27]. 먼저 3종 유도물질을 분획물과 동시 처리했을 때 각 분획물은 100 µg/mL 농도에서 세포 생존율에 영향을 주지 않았다(Fig. 3D). DCM 분획물을 25, 50, 100 µg/mL 농도로 동시처리한 후 CCL20 mRNA 발현량을 비교한 결과 25 µg/mL부터 양성대조군인 brazilin 처리군과 유사하게 억제됨을 확인하였다(Fig. 3E). 또한 동일한 조건에서 EA 분획물을 처리한 결과 농도의존적 방식으로 유의성 있게 억제됨을 알 수 있었다(Fig. 3F). 또한 Hex 분획물에서도 다른 분획물과 거의 유사한 결과를 확인하였다(Fig. S1). 위 결과들을 종합해 볼 때 무화과 공용용매 추출물을 유기용매로 추출한 5종의 분획물 중

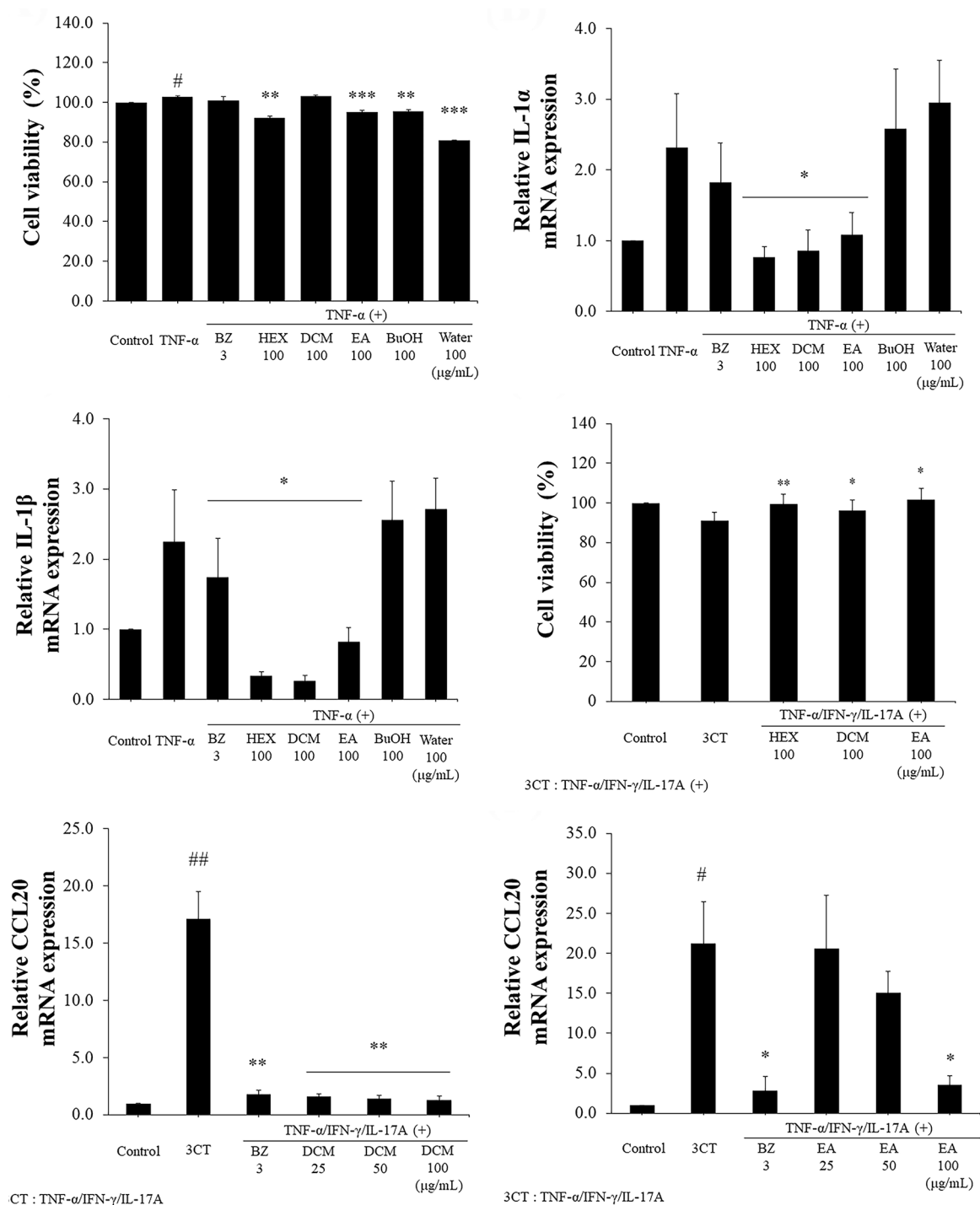


Fig. 3 Regulation of inflammatory cytokines and chemokines by fig fraction in human HaCaT keratinocytes. (A) Cell viability of fig fraction was measured in HaCaT cells induced by TNF- α . As a result of confirming the cytotoxicity of the fig fraction through CCK-8 analysis, it was confirmed to be safe up to 100 $\mu\text{g/mL}$ and was set as the experimental concentration. (B) When HaCaT cells were simultaneously treated with TNF- α and fig fractions, the mRNA expression level of IL-1 α was confirmed. The mRNA expression level, which was increased approximately 2.5-fold by TNF- α , was significantly decreased in HEX, DCM, and EA fractions. (C) Changes in IL-1 β mRNA expression levels were also significantly reduced. (D) Cell viability of HEX, DCM, and EA was determined in TNF- α /IFN- γ /IL-17A costimulated HaCaT cells, an in vitro psoriasis cell model. (E) After treating the DCM fraction from TNF- α /IFN- γ /IL-17A co-stimulated HaCaT cells, an in vitro psoriasis cell model, the mRNA expression level of CCL20, a psoriasis marker chemokine, was observed and found to be significantly suppressed in a concentration-dependent manner. (F) EA fractions were treated under the same conditions and CCL20 mRNA expression level was decreased in a concentration-dependent manner. [#] $p < 0.01$, ^{##} $p < 0.01$, compared to control, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$, compared to TNF- α or TNF- α /IFN- γ /IL-17A

HEX, DCM, EA 분획물에서 가장 뛰어난 항산화, 항염증 활성을 함께 건선 조절 가능성도 기대할 수 있다. 또한 분획물에 대한 폴리페놀 함량 분석 결과와도 일치하는 것으로 확인됨에 따라 분획물 내 폴리페놀 계열 화합물에 의한 활성 결과임을 예상할 수 있다(Table 2).

고찰

피부는 크게 표피와 진피, 피하지방으로 구성되어 있으며 외부로부터 병원체의 침투를 막고 인체를 보호하는 기능을 한다. 외부 미생물과 같은 병원체의 침투를 방어하는 피부 면역 작용은 인체 보호에서 매우 중요하지만 면역반응 중 하나인 염증반응이 과하게 진행되는 경우 오히려 피부질환 유발을 일으키기 때문에 피부 염증 반응은 적절한 조절과 균형이 매우 중요하다. 식물의 잎, 줄기, 열매에는 다양한 종류의 폴리페놀 화합물들이 존재하는데, 항산화 및 항염증 활성이 매우 뛰어나다. 무화과(Figs) 잎에는 apigenin, hesperetin, quercetin, rutin, luteolin, morin, catechin, antocyanin 같은 폴리페놀 화합물들이 다량 존재한다[15]. 따라서 무화과 잎 추출물의 항산화 및 항염증 활성은 여러 연구결과들에서 이미 보고되었다. 그러나 무화과 열매의 피부 항염증 및 건선 조절에 대한 연구결과는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 무화과 열매로부터 유효성분을 추출 분리하기 위해 기존 추출법이 아닌 새로운 공용용매법을 적용하였고, n-HEX, dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EA), butanol (BuOH)을 사용해 5가지 종류의 추출 분획물을 확보하였다. 그 결과 무화과 열매 뿐 아니라 추출 분획물에서도 DPPH radical 소거능이 뛰어난 것을 확인할 수 있었고, 특히 Ethyl acetate 분획물이 약 87.2%로 가장 높은 radical 소거능을 보였다. 또한, 마우스 대식세포 RAW264.7 세포와 인간 각질형성세포 HaCaT 세포 모델을 이용해 세포독성이 없는 최대농도를 100 µg/mL로 결정하였다. LPS로 유도된 RAW264.7 마우스 대식세포에 무화과 분획물을 처리한 후 NO 생성량을 확인한 결과 Hex, DCM, EA 분획물에서 농도의존적 감소를 보였으며 최대 농도인 100 µg/mL에서 TNF-α와 IL-1β의 mRNA를 발현량을 비교한 결과 HEX, DCM, EA 분획물에서 LPS 단독 처리 군 대비 유의적으로 감소하였다. 또한 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포에 TNF-α로 활성화시킨 후 무화과 분획물에 의한 염증성 사이토카인 조절을 확인한 결과, IL-1α과 IL-1β 같은 염증성 사이토카인들의 mRNA 발현이 유의미한 감소를 보였다. 마지막으로 난치성 피부질환인 건선 완화 및 조절 가능성을 확인하기 위해 TNF-α, IL-17A, IFN-γ로 자극한 HaCaT 세포 모델에서 CCL20 케모카인 발현을 유의적으로 억제함을 확인하였다. 이러한 항산화 및 항염증 활성이 HEX, DCM, EA 분획에서 높게 확인된 것은 폴리페놀 함량 분석결과와 일치했다(Table 2). 따라서 향후 연구에서는 HPLC 및 LC-Mass 분석을 통해 무화과 열매 내 존재하는 폴리페놀 화합물 중 유효 분획에서의 항염증 활성 및 건선 조절 기능을 갖는 지표 물질 또는 단일 화합물을 분리하고, 이들의 세포 및 분자 수준에서 작용기전을 규명해야 하며, 화장품 소재화를 위한 보습, 미백, 주름개선에 대한 인체적용시험도 필요하다고 사료된다.

초록

무화과는 잎, 뿌리, 줄기, 라텍스 외에 열매 자체에서도 각각 항산화, 미백, 항염증, 항균 효능이 보고된다. 본 연구팀에서는 천연물 기반 화장품 소재 개발을 위해 무화과 열매 latex에 존재하는 ficin 효소의 피부 활성 뿐만 아니라 열매를 70% 에탄올로 추출한 추출물의 미백 기능에 대해 연구 결과를 도출하여 화장품 원료로 직접 사용하고 있다. 그러나 새로운 공용용매 추출법 개발 수율과 이를 활용한 피부 염증 완화 및 건선 조절 기능에 대한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 공용용매 추출법을 적용한 무화과 열매 추출 및 분획물들에 피부 염증 조절 및 건선에 대한 유효성 평가를 수행하였다. 먼저, 무화과 열매를 최적의 공용용매 조건으로 추출한 후 n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol로 분획한 분획물의 피부 염증 조절 기능을 비교하였다. 먼저, 분획물의 항산화 활성과 RAW264.7 세포주에서 nitric oxide 생성 억제력을 확인하였다. 또한 RT-PCR을 이용해 전염증성 사이토카인 mRNA 발현 조절을 관찰한 결과, 여러 분획물 중 hexane, dichloromethane, ethyl acetate와 같은 비극성 용매에서 TNF-α, IL-1α, IL-1β 등 염증성 사이토카인 mRNA 발현이 억제되었다. 뿐만 아니라 HaCaT 각질형성세포 모델에서 TNF-α로 염증반응을 유도한 후 분획물의 항염증 활성을 비교한 결과 hexane, dichloromethane, ethyl acetate 분획에서 높은 활성을 확인하였다. 마지막으로 in vitro 인간 건선 세포모델에서 chemokine CC motif ligand 20 (CCL20) 발현을 확인한 결과 유의성 있게 mRNA 발현이 억제되었다. 따라서, 공용용매 추출 후 무화과 열매 분획물 중 hexane, dichloromethane, ethyl acetate 분획에서 높은 항염증 활성 및 CCL20 케모카인 조절 기능이 확인되었다. 이런 결과들은 무화과 열매 추출물의 항염증 활성과 함께 인체적용시험을 통해 피부진정 효과가 검증된다면 향후 뛰어난 피부 진정 천연 화장품 소재로 개발될 가능성이 높다고 사료된다.

Keywords 각질형성세포 · 건선 · 공용용매 · 무화과 열매 추출물 · 항염증

감사의 글 본 과제(결과물)는 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다. (2021RIS-001). 또한 항산화 및 폴리페놀 함량 분석등 배경 실험에 도움을 준 정희수, 이정현, 한예주 학생에게 감사함을 전합니다.

References

1. Chukwuebuka E, Jonathan CI, Toskë IK, Minakshi M, Hameed S, GM Narasimha R, Laurence JFJG, Habibu T (2018) Phytochemistry. In: Chukwuebuka E Introduction to phytochemistry, 1st Edition, Apple Academic Press, New York, pp 34
2. Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. Phytochemistry: Advances in Research 66:1: 23–67
3. Ramawat KG, Merillon JM (2013) Natural products. In: Lattanzio V Phenolic Compounds: Introduction. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 1543–1580
4. Choi DH, Hwang HS (2019) Anti-inflammation activity of brazilin in

- TNF- α induced human psoriasis dermatitis skin model. *Appl Biol Chem* 62: 46. doi: 10.1186/s13765-019-0455-z
5. Aburjai T, Natsheh, FM (2003) Plants used in cosmetics. *Phytother Res* 17: 987–1000. doi: 10.1002/ptr.1363
 6. Ortwin B (1994) Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog Polym Sci* 19: 797–841. doi: 10.1016/0079-6700(94)90033-7
 7. Kaufmann B, Christen P (2002) Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem Anal* 13: 105–113. doi: 10.1002/pca.631
 8. Zheng L, Kathryn HS, Geoffrey WS (2016) The use of environmentally sustainable bio-derived solvents in solvent extraction applications—A review. *Chin J Chem Eng* 24: 215–220. doi: 10.1016/j.cjche.2015.07.021
 9. Zhong Z, Li G (2017) Current trends in sample preparation for cosmetic analysis. *J Sep Sci* 40: 152–169. doi: 10.1002/jssc.201600367
 10. Son SH, Lee SH (2022) Storage stability of spirulina extract extracted with natural eutectic solvent. *J Kor Soc Cosmetol* 28: 107–116
 11. Qinghua Z, Karine DOV, Sebastien R, Francois J (2012) Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev* 41: 7108–7146
 12. Sin JB, Choi WY, Kang DH, Lee HY (2014) Comparison of anti-inflammatory activity of spirulina maxima extract by ultrasonication and water extraction process. *J Korean Soc of Food Sci Nutr* 43: 1852–1857. doi: 10.3746/jkfn.2014.43.12.1852
 13. Anat S, Sara G, Zeev Y, Shlomo G, Margalit B, Hugo EG, Arie A, Zohar K, Moshe AF (2006) Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica L.*). *J Agric Food Chem* 54: 7717–7723. doi: 10.1021/jf060497h
 14. Shamkant BB, Vainav VP, Atmaram HB, Raghunath T M (2014) Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of ficus carica: A review. *Pharm Biol* 52(11): 1487–1503. doi: 10.3109/13880209.2014.892515
 15. Rezagholizadeh L, Aghamohammadian M, Oloumi M, Banaei S, Mazani M, Ojarudi M (2022) Inhibitory effects of ficus carica and olea europaea on pro-inflammatory cytokines: A review. *Iran J Basic Med Sci* 25: 268–275. doi: 10.22038/IJBMS.2022.60954.13494
 16. Senem K, Esra C (2015) Polyphenol content in figs (*Ficus carica L.*): effect of sun-drying. *Int J Food Prop* 18: 521–535
 17. Olga SA, Yiannis S, Georgia G, Nikolaos ST, Athanasios SS (2019) Review on fresh and dried figs: Chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects. *Food Res Int* 119: 244–267. doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.055
 18. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Food Res Int* 56: 683–687. doi: 10.1016/S0014-827X(01)01111-9
 19. Chow JM, Shen SC, Steven K. Huan, Lin HY, Chen YC (2005) Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol* 69: 1839–1851. doi: 10.1016/j.bcp.2005.03.017
 20. Karki R, Park CH, Kim DW (2013) Extract of buckwheat sprouts scavenges oxidation and inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages (RAW264.7). *J Integr Med* 11: 246–252. doi: 10.3736/jintegrmed2013036
 21. Yang J, Guo J, Yuan J (2008) In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT* 41: 1060–1066. doi: 10.1016/j.lwt.2007.06.010
 22. Sun L, Guo Y, Zhang Y, Zhuang Y (2017) Antioxidant and anti-tyrosinase activities of phenolic extracts from rape bee pollen and inhibitory melanogenesis by cAMP/MITF/TYR pathway in B16 Mouse melanoma cells. *Front Pharmacol* 8. doi: 10.3389/fphar.2017.00104
 23. Choi JK, Kim SH. (2013) Rutin suppresses atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Exp Biol Med* (Maywood) 238: 410–417. doi: 10.1177/1535370213477975
 24. Cho UM, Choi DH, Yoo DS, Park SJ, Hwang HS (2019) Inhibitory effect of ficin derived from fig latex on inflammation and melanin production in skin cells. *Biotechnol Bioproc E* 24: 288–297. doi: 10.1007/s12257-019-0010-0
 25. Nancy W, Sarah M (2013) Psoriasis. *Am Fam Physician* 87: 626–633
 26. Youssef AE, Michael SG, Michael T, Tessa JB, Edward AF, Kristen LS, Andrea LN, Jose US, James K, Jeffrey SB (2021) CCL20 in psoriasis: A potential biomarker of disease severity, inflammation, and impaired vascular health. *J Am Acad Dermatol* 84: 913–920. doi: 10.1016/j.jaad.2020.10.094
 27. Erin GH, Changsheng G, Heather R, Joseph VL, Stephen EK, Iliyana S, David P, Erin F, Mihail I, Andrew B (2009) Th17 Cytokines Stimulate CCL20 Expression in Keratinocytes In Vitro and In Vivo: Implications for Psoriasis Pathogenesis. *J Invest Dermatol* 129: 2175–2183. doi: 10.1038/jid.2009.65