

## *Syzygium claviflorum* 추출물의 항산화 활성 및 각질형성세포 분화유도 효과

서 가 연<sup>\*,†</sup> · 문 지 연<sup>\*,†</sup> · 박 유 경<sup>\*</sup> · 김 주 영<sup>\*\*</sup> · 현 호 용<sup>\*\*</sup> · 정 범 수<sup>\*\*</sup> · Thet Thet Mar Win<sup>\*\*\*</sup> ·  
Thant Zaw Win<sup>\*\*\*\*</sup> · 최 상 호<sup>\*\*\*\*\*</sup> · 엄 상 미<sup>\*\*\*\*\*</sup> · 김 동 원<sup>\*\*\*\*\*,††</sup>

\*부산 동서대학교 일반대학원 에너지/생명공학과, 석사과정 대학원생  
\*\*부산 동서대학교 바이오헬스융합대학 바이오제약공학과, 학부생  
\*\*\*부산 동서대학교 일반대학원 에너지/생명공학과, 박사과정 대학원생  
\*\*\*\*미얀마 양곤대학교 식물학과, 교수  
\*\*\*\*\*미얀마 힌타다대학교 식물학과, 교수  
\*\*\*\*\*한국생명공학연구원 해외생물소재센터  
\*\*\*\*\*부산 동서대학교 바이오헬스융합대학 바이오제약공학과, 조교수  
(2023년 1월 27일 접수, 2023년 3월 3일 수정, 2023년 3월 10일 채택)

### Identification of Antioxidant Activities and Stimulation of Human Keratinocytes Differentiation Effects of *Syzygium claviflorum* Extract

Gayeon Seo<sup>1,†</sup>, Jiyeon Moon<sup>2,†</sup>, Yukyung Park<sup>1</sup>, Juyeong Kim<sup>1</sup>, Hoyong Hyun<sup>2</sup>, Beomsu Jeong<sup>2</sup>,  
Thet Thet Mar Win<sup>3</sup>, Thant Zaw Win<sup>4</sup>, Sangho Choi<sup>5</sup>, Sangmi Eum<sup>5</sup>, and Dongwon Kim<sup>1,2,††</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Energy/Biotechnology, Dongseo University, 47 Jurye-ro, Sasang-gu, Busan 47011, Korea

<sup>2</sup>Department of Bio-Pharmaceutical Engineering, College of Bio-Health Convergence, Dongseo University

<sup>3</sup>Department of Botany, University of Yangon, Myanmar

<sup>4</sup>Department of Botany, Hinthada University, Myanmar

<sup>5</sup>International Biological Material Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

(Received January 27, 2023; Revised March 3, 2023; Accepted March 10, 2023)

**요 약:** 사이자이지움 클레비플로룸(*Syzygium claviflorum* (Roxb.) Wall. ex A.M. Cowan & Cowan, *S. claviflorum*)의 추출물 (잎, 줄기, 열매, 꽃)의 화장품 소재로서 활용되기 위한 생리활성 능력을 검증하였다. 첫번째로, *S. claviflorum* 추출물은 DPPH와 ABTS assay법을 이용한 항산화 실험에서 다양한 농도로 처리한 결과, 약 80% 이상의 자유 라디칼을 제거하였다. 사람 피부 표피 각질형성세포(human epidermal keratinocytes)를 이용한 세포독성 실험에서는 *S. claviflorum* 추출물은 낮은 세포독성을 보였다. 또한, *S. claviflorum* 추출물은 각질형성세포의 분화인자 (keratin (KRT)1, KRT2, KRT9, KRT10)와 피부장벽의 기능 유지에 중요한 involucrin (IVL), loricrin (LOR), filaggrin (FLG)과 claudin1 (CLDN1) 유전자의 발현을 현저히 증가시켰다. 특히, *in vitro* 아토피 피부염 실험에서 interleukin (IL)-4/IL-13에 의해 억제된 FLG 단백질 발현이 *S. claviflorum* 추출물에 의해 회복되었다. 따라서, 뛰어난 항산화 효과와 피부장벽 개선 기능을 보유한 *S. claviflorum* 추출물은 향후 아토피 피부염 치료제 및 화장품 개발에 유용한 소재가 될 것이다.

† 주 저자 (e-mail: sgy0527@gmail.com and wldus7131@naver.com)  
call: 051-320-1972

†† 교신저자 (e-mail: dwkim@dongseo.ac.kr)  
call: 051-320-1972

**Abstract:** We validated the physiological activity of *Syzygium claviflorum* (Roxb.) Wall. ex A.M. Cowan & Cowan (*S. claviflorum*) extracts (leaves, stems, fruits, and flowers) as a cosmetic ingredient. Firstly, *S. claviflorum* extracts removed over 80% of free radicals at various concentrations in antioxidant experiments using the DPPH and ABTS assay. In cytotoxicity experiments using human epidermal keratinocytes, *S. claviflorum* extracts showed low cytotoxicity. In addition, *S. claviflorum* extracts significantly increased the expression of keratin (KRT)1, KRT2, KRT9, KRT10, which are differentiation markers of keratinocytes, as well as genes involved in the maintenance of skin barrier function, including involucrin (IVL), loricrin (LOR), filaggrin (FLG), and claudin1 (CLDN1). In particular, the expression of FLG protein, inhibited by interleukin (IL)-4/IL-13 in atopic dermatitis, was restored by *S. claviflorum* extracts in *in vitro* experiments. Therefore, *S. claviflorum* extracts with excellent antioxidant efficacy and skin barrier improvement function will be useful materials for the development of future atopic dermatitis treatments and cosmetics.

**Keywords:** *Syzygium claviflorum*, antioxidant, keratinocytes, filaggrin, atopic dermatitis

## 1. 서 론

사람의 피부는 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하지방(subcutaneous tissue)으로 크게 3 층으로 이루어져 있다. 피부의 최 외각에 있는 표피는 신체 구성 요소의 유출 혹은 외부 유해 물질의 유입을 막는 물리적인 장벽의 역할과 가수분해 효소, 대식세포 등에 의한 면역 기능을 한다[1]. 표피를 구성하는 여러가지 세포 중 가장 중요한 각질형성세포(keratinocyte)는 기저층(basal layer)에 존재하며 성장과 분화를 반복하면서 가시층(spinosum layer), 과립층(granular layer), 각질층(cornified layer)을 유지한다. 기저층에 있는 각질형성세포에서는 keratin (KRT)5와 KRT14이 발현되지만, 분화 초기 가시층에서는 KRT1과 KRT10이 발현되고 분화 말기 과립층에는 loricrin (LOR), involucrin (IVL), filaggrin (FLG)이 발현된다[2]. 이러한 분화 의존성 단백질들이 각막 외피(cornified envelope)에 통합되어, 각질층의 수분 함량을 유지함으로써 피부장벽 강화에 기여한다.

아토피 피부염(atopic dermatitis)은 피부에 염증이 생기는 만성적인 피부 질환으로 복잡한 병리학적 혹은 임상학적 특징을 가지고 있는 질병이다[3]. 아토피 피부염의 원인은 명확히 알려져 있지 않으나, 면역 기능의 불균형과 피부장벽의 붕괴 등이 핵심적인 원인으로 밝혀졌다. 아토피 피부염의 병리생리학적인 특징으로는 표피 장벽과 미생물 기능 결함, 변형된 2형 면역 반응 사이의 복잡한 상호작용 등이 알려져 있다[4,5]. 또한, 만성 가려움증도 아토피 피부염 환자들에게서 나타나는 주요 증상 중 하나로 알려져 있으며, 특히 비히스타민성 가려움증 신호 전달 경로를 통해 약물 치료에도 불구하고 개선되지 않는 경우가 많다[6]. 최근 많은 연구결과들이 외부 및 내부 자극에 의해 표피 장

벽 단백질에서 유전적 결함과 피부 장벽 기능 장애의 중요성을 강조하고 있다[7]. 아토피 피부염에서 표피 장벽 기능 장애의 주요 원인은 표피 구조 단백질의 발현 감소, 세포 간 지질 조성의 변화, 프로테아제-프로테아제 억제제 상호작용의 불균형 및 무질서한 tight junction을 포함한다. 따라서, 피부장벽 관련 단백질인 FLG, LOR 및 IVL 등의 발현 감소는 아토피 피부염 환자에서 입증된 주요한 병리학적 특징이다[8]. 특히 아토피 피부염 환자의 피부에서 관찰되는 Th2-연관(interleukin (IL)-14, IL-13) 및 Th22-연관(IL-22) 사이토카인 등이 FLG 감소에 직접적으로 관련이 있는 것으로 알려져 있다[9]. IL-4/IL-13에 의해 signal transducer and activator of transcription (STAT)6 및 STAT3 인산화는 FLG의 발현을 억제하고, 피부 장벽 기능을 방해하며, IL-25, IL-33 및 흉선간질 림포포이에틴(thymic stromal lymphopoietin; TSLP)과 같은 알라민(alarmin)의 생성을 증가시킨다[10]. 따라서, 사이토카인에 의한 FLG 억제 메커니즘을 차단하거나 FLG 발현을 강화하는 것이 아토피 피부염 개선에 도움이 될 수 있다.

본 연구에서 사용된 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)은 도금양과(Myrtaceae)에 속하며, 주요 서식지로는 호주 북부 지역과 열대 및 아열대 아시아 지역으로 알려져 있다[11]. 현재까지 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*)으로부터 분리한 화합물을 인간면역결핍바이러스(HIV)에 대한 항바이러스제는 적용된 연구는 있으나, 아토피 피부염에 대한 효과를 검증하기 위해 사용된 적은 없다[12]. 따라서, 본 연구에서는 *S. claviflorum*의 추출물을 사람 각질형성세포에 처리하여, 분화인자의 유도 및 피부장벽유지를 위해 중요한 유전자의 발현 정도를 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 추출물 준비 및 실험 재료

본 실험에서 사용한 시료인 *Syzygium claviflorum* (Roxb.) Wall. ex A.M. Cowan & Cowan 식물은 미안마 양곤 대학교 식물학과의 Thet Thet Mar Win 박사님 실험실에서 수집되었다. 수집된 식물은 한국생명공학연구원(Korea)에 기탁되었고, *S. claviflorum* 잎, 가지, 꽃 및 과일이 포함된 전체 67 g을 99.9% 메탄올 (HPLC grade)(대정화금, Korea) 1 L와 혼합하고 실온에서 초음파 추출기(SDN-900H, SD-ULTRA SONIC Co., LTD, Korea)를 이용하여 30 회 반복(40 KHz, 1500W, 15 min)을 통해 추출되었다. 이후 감압조건에서 건조한 후, 최종 15.57 g의 추출물(23.24% 추출효율)을 획득하였다. 한국생명공학연구원(Korea) 해외생물소재센터에서 분양 받은 추출물 분말은 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)에 25 mg/mL의 농도로 희석하고 -20 °C에서 보관하였다. 실험에 사용된 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)와 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구매하였다. Potassium persulfate는 대정화금(Korea)에서 공급받았다.

### 2.2. 세포 배양

Normal human epidermal keratinocyte (NHEK) 세포는 Lonza Bioscience (Switzerland)에서 구매하여 사용하였다. 세포는 keratinocyte basal medium (KBM) 에 KGM SingleQuot™ supplement를 섞은 배지로 배양하고 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C로 incubator (ARA P150, (주)한일과학, Korea)에서 배양하였다. 본 연구에서는 passage 4 ~ 7까지 세포를 사용하였으며, 2 일마다 배지를 교체하였고 세포가 표면적의 70 ~ 80%에 도달하면 계대배양 및 연구를 위해 분주하였다.

### 2.3. DPPH 자유 라디칼 소거 활성

각 농도별(1, 5, 10, 50 µg) 시료에 95% 에탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 200 µL씩 넣고 실온에서 30 min 동안 방치한 다음 517 nm에서 microplate spectrophotometer (INNO-M, LTEK, Korea)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 각 농도에서의 DPPH 자유 라디칼 소거 활성은 아래의 식(1)을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Radical Scavenging Effect (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.4. ABTS 자유 라디칼 소거 활성

7 mM ABTS 용액을 2.45 mM potassium persulfate solution과 1 : 1로 교반하고 16 h 동안 실온에 보관하여 반응시켰다. ABTS<sup>+</sup> solution의 흡광도 값이 0.7 ± 0.05 가 되도록 10% ethanol에 희석하였다. 각 농도별(1, 5, 10, 50 µg) 시료에 희석된 ABTS<sup>+</sup> solution 200 µL씩 넣고 실온에서 5 min 동안 방치한 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도에서의 ABTS 자유 라디칼 소거 활성은 위의 식 (1)을 이용하여 계산하였다.

### 2.5. 세포독성 평가

시료에 대한 세포의 독성은 cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo, Japan) assay를 사용하여 실험하였다. 96 well plate 에 NHEK 세포를 1 × 10<sup>4</sup> cells/well로 분주한 다음 24 h 동안 배양하였다. 새로운 배지로 교환한 후 다양한 농도 (1, 2, 5, 10 µg/mL)의 *S. claviflorum* 추출물을 처리하고 48 h 동안 배양하였다. 이후 CCK-8 용액에 배지를 1 : 10 비율로 혼합한 용액으로 교환한 후 CO<sub>2</sub> incubator 에 넣어 3 h 동안 반응시켰다. 3 h 반응 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도에서의 세포 생존도는 아래의 식 (2)를 이용하여 계산하였다.

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

### 2.6. 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통한 mRNA 발현 확인

세포를 12 well plate에서 7 × 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 분주한 다음 24 h 동안 배양하였다. 이후 *S. claviflorum* 추출물을 1 µg/mL이 되도록 처리한 다음 72 h 동안 배양하였다. 72 h 후 RNA를 추출하기 위해 Quick-RNA Micro Prep Kit (ZYMO Research, USA)를 이용하였다. 분리된 RNA의 농도는 Genova Nano spectrophotometer (JENWAY, UK)를 이용하여 측정하였다. 총 RNA 2 µg으로 High-capacity cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)와 Taqman Probe (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용해 제조사의 지침에 따라 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR) 기기(QuantStudio 3, Applied Biosystems, CA)에 적용하였다. PCR에 사용하는 유전자는 KRT1 (Hs00196158\_m1), KRT2 (Hs00166294\_m1), KRT9 (Hs00413861\_m1), KRT10 (Hs00166289\_m1), LOR

(Hs01894962\_s1), IVL (Hs00846307\_s1), FLG (Hs00856927\_g1), CLDN1 (Hs00221623\_ml)을 사용하였으며 housekeeping gene인 ribosomal protein large P0 (RPLP0) (Hs00420895)를 사용해 정규화 하였다. 발현양상을 확인하기 위하여 실시간 중합 효소 연쇄반응 조건은 50 °C에서 5 min, 95 °C에서 20 s, 95 °C에서 3 s, 60 °C에서 20 s로 하여 총 40 cycle을 반복하였다. 증폭된 유전자의 정량분석은 QuantStudio™ Design & Analysis Software를 이용하여 ddCt method로 target을 정량 하였다.

## 2.7. Western Blot 분석

세포를 6 well plate에서  $1 \times 10^5$  cells/well 농도로 분주한 다음 24 h 동안 배양하였다. 이후 1 µg/mL의 *S. claviflorum* 추출물과 10 ng/mL의 IL-4 (PeproTech, USA), IL-13 (PeproTech, USA) 처리한 다음 96 h 동안 배양하였다. 세포는 scraper를 사용하여 수확하고 protease inhibitor (Gen-Depot, USA)와 phosphatase inhibitor (Gen-Depot, USA)가 첨가된 RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)로 단백질을 용해하여 BCA assay (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 단백질을 정량 하였다. 이후 단백질 20 µg을 8% SDS-PAGE gel에서 전기영동 하였다. 분류된 단백질은 30 V, 300 mA, 40 w에서 1 h 동안 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Cytiva Life Science, USA)에 transfer 하였다. Transfer가 끝난 membrane은 Tris-Buffered Saline (TBS) (Gen-Depot, USA) with 0.1% Tween (SAMCHUN, Korea) (TBS-T)가 첨가된 5% Non-Fat Dried Milk (NFDML) (Cellconic, USA)에 1 h 동안 blocking 하였다. 그 후, 4 °C

에서 하룻밤 동안 1 차 항체 (Filaggrin and  $\beta$ -actin, Santa Cruz, USA)에 반응시켰다. TBS-T로 씻어낸 이후에 2 차 항체 (goat anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen, USA)에 1 h 동안 반응시켰다. 단백질은 WestGlow Fento ECL chemiluminescent substrates (Biomax, Korea)를 사용해 imaging 기기(iBright CL 750, Invitrogen, USA)를 이용해 관찰하였다. 확인된 이미지는 iBright analysis software를 사용하여 분석되었다.

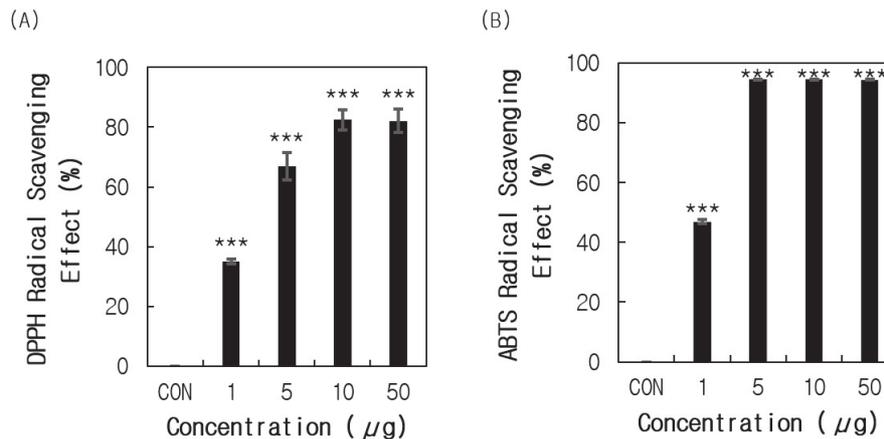
## 2.8. 통계 분석

모든 실험은 독립적 실험횟수 최소 3회 이상(independent 3 experiments) 수행하였으며 결과는 평균  $\pm$  SEM으로 표기 하였다. Student-*t* test를 이용하여 통계적 유의성은 *p*값이 0.05 이하로 것들만 결과에 반영하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물의 라디칼 소거능 측정

*S. claviflorum*추출물의 농도별 DPPH와 ABTS 자유 라디칼 소거능은 분광광도계로 측정하여 백분율로 나타내었다. 1 µg에서 약 35%, 5 µg에서 약 67%로 나타냈으며, 10 µg 이상의 농도에서 80% 이상의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었으며(Figure 1A), half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) 계산 결과  $2.44 \pm 0.15$  µg으로 나타났다(Table 1). DPPH 라디칼 소거능 결과와 달리 ABTS 라디칼 소거능은 1 µg 에서도 약 46.9%로 높은 라디칼 소거능을 보이고, 5 µg



**Figure 1.** Radical scavenging effect of *S. claviflorum* extract by (A) DPPH assay and (B) ABTS assay. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (N = 3). Asterisk mark means statistically significant from control (CON: vehicle treatment) (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ).

**Table 1.** IC<sub>50</sub> of *S. claviflorum* extract in DPPH and ABTS assay

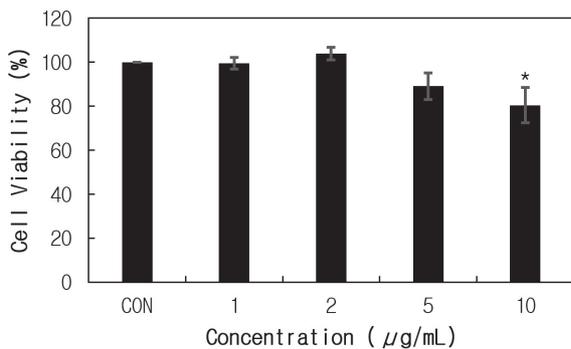
<i>S. claviflorum</i>	Half-maximal inhibitory concentration	
	DPPH radical scavenging	ABTS radical scavenging
IC <sub>50</sub> (μg) ± SEM	2.44 ± 0.18	2.05 ± 0.03

The values are expressed as the means ± SEM (N = 3).

이상의 농도에서부터 94% 이상의 높은 라디칼 소거능을 보였으며(Figure 1B) IC<sub>50</sub> 값은 2.05 ± 0.03 μg으로 확인되었다(Table 1). DPPH 방법은 안정한 자유라디칼로 항산화제에 의해 환원될 경우 눈으로 확인할 수 있어 간단하지만, DPPH 라디칼이 유기용매에만 녹을 수 있어서 친수성 항산화제의 라디칼 소거능 평가에 한계가 있다. 반면에 ABTS 양이온 라디칼은 수용액과 유기용매에 모두 용해되므로 친수성, 유기성 항산화제의 라디칼 소거능 평가에 이점이 있다. 이를 통해, 알려진 연구가 없는 *S. claviflorum* 추출물은 친수성 항산화제를 함유하고 있다고 추측할 수 있다.

**3.2. *S. claviflorum* 추출물의 세포독성 측정**

NHEK 세포를 이용하여 *S. claviflorum* 추출물이 각질형성 세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 전에, CCK-8 assay를 통해 세포에 대한 *S. claviflorum* 추출물의 영향을 확인하였다(Figure 2). 각질형성세포에 *S. claviflorum* 추출물을 농도별로 처리하고 48 h 배양하여 세포의 생존율을 확인하였으며, 시료를 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하였다. 그 결과 1, 2, 5 μg/mL 농도에서 각각 99.5%, 104%, 89.1%의 생존율로 이 농도에서 세포에 거의 영향을 주지 않



**Figure 2.** Viability of NHEK cells treated with different concentrations of *S. claviflorum* extract by CCK-8 assay. Values are expressed as mean ± SEM (N = 4). Asterisk mark means statistically significant from the control (CON: vehicle treatment) (\*p < 0.05).

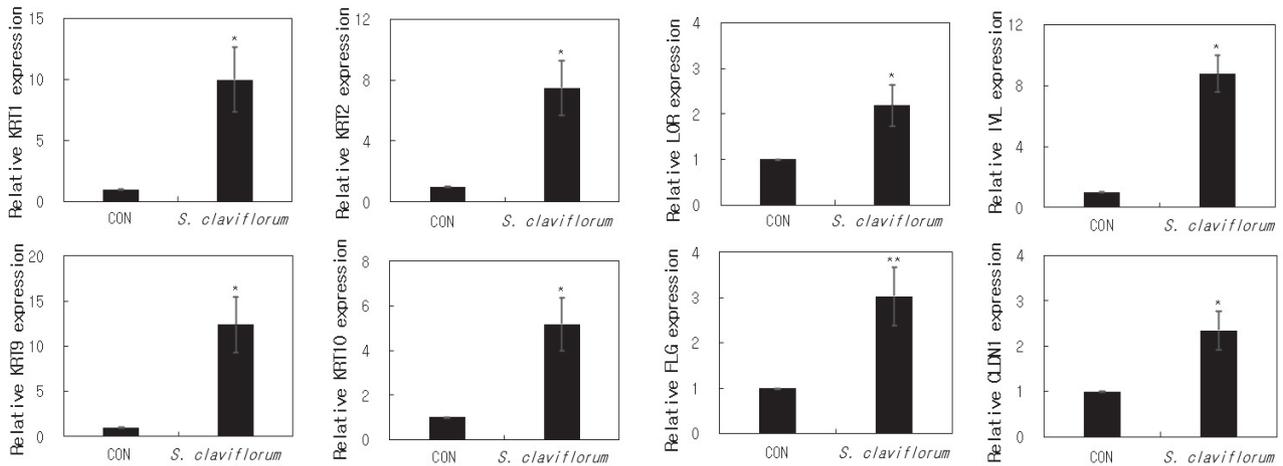
만, 10 μg/mL 농도에서 80%의 생존율로 *S. claviflorum* 추출물이 세포에 독성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 추출물의 농도를 세포의 생존율에 크게 영향을 미치지 않는 5 μg/mL 이하로 설정하여 실험을 수행하였다.

**3.3. *S. claviflorum* 추출물에 의한 각질형성세포 분화 유전자 발현 측정**

qRT-PCR을 통해 *S. claviflorum* 추출물에 의한 각질형성 세포의 분화 지표 물질 발현을 측정하였다. 각질형성세포에 추출물 1 μg/mL로 처리하고 72 h 배양하였으며, 시료를 처리하지 않은 세포를 대조군으로 하였다. 그 결과 분화 초기 지표 물질인 KRT1, KRT10의 발현과 가시층 상단 부에서 많이 발현되는 KRT2의 발현도 증가하는 것을 확인하였다(Figure 3). 추가로 손바닥, 발바닥의 말단 분화 표피에서 발현되는 KRT9의 발현이 증가하였다. 구조적 단백질인 LOR, IVL, FLG의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있다(Figure 3). 또한 상피의 투과성을 조절하는 tight junction의 주요 요소인 CLDN1의 발현율이 증가하는 것을 볼 수 있다(Figure 3). 이를 통해, *S. claviflorum* 추출물이 각질형성세포 분화를 촉진시키는 활성을 가지고 있다는 것을 확인하였다.

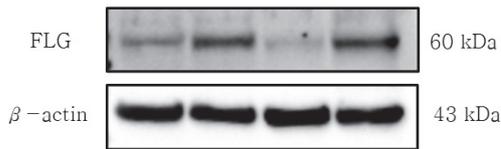
**3.4. In Vitro 아토피 모델에서 *S. claviflorum* 추출물의 Filaggrin 발현 유도**

Western blot을 통해 아토피 피부염 환자에게 많이 발현되는 사이토카인 IL-4/IL-13에 의해 감소된 filaggrin 단백질 발현이 *S. claviflorum* 추출물에 의해 회복되는지를 확인하였다. 각질형성세포에 추출물 1 μg/mL과 각각 10 ng/mL의 IL-4, IL-13을 처리하고 96 h 배양하고, 시료를 처리하지 않은 세포를 음성대조군으로 하였다. 그 결과 음성대조군에 비해 *S. claviflorum* 추출물이 처리된 세포는 filaggrin 단백질 발현이 크게 증가하였고(약 7배), IL-4와 IL-13이 처리된 세포는 filaggrin 단백질 발현이 감소(약 46%)한 것을 확



**Figure 3.** Relative mRNA expression of NHEK cells treated with *S. claviflorum* extract. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (N = 4). Asterisk mark means statistically significant from the control (CON: vehicle treatment) (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

(A)

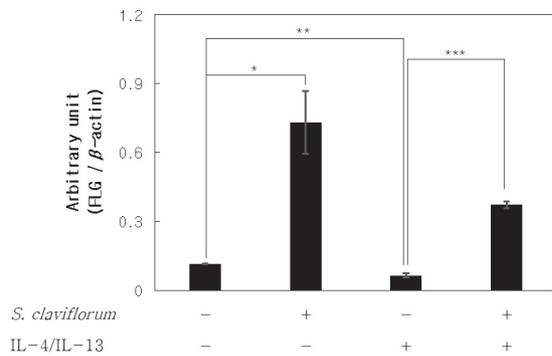
*S. claviflorum*

- + - +

IL-4/IL-13

- - + +

(B)

*S. claviflorum*

- + - +

IL-4/IL-13

- - + +

**Figure 4.** Filaggrin protein expression of NHEK cells treated with *S. claviflorum* extract. *S. claviflorum* extract restores FLG protein expression in NHEK treated with IL-4/IL-13. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (N = 3). Asterisk mark means statistically significant from the control (vehicle treatment) (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ).

인할 수 있다(Figure 4). 그리고 IL-4, IL-13, *S. claviflorum* 추출물이 같이 처리된 세포에서는 IL-4와 IL-13에 의해 억제된 filaggrin 단백질 발현이 다시 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4). 이를 통해, *S. claviflorum* 추출물은 IL-4/IL-13에 의해 감소된 filaggrin 단백질 발현을 다시 회복시킨다는 것을 확인하였다.

#### 4. 결론

사이자이지움 클래비플로룸(*S. claviflorum*) 추출물을 다양한 농도에서 DPPH와 ABTS법을 이용한 항산화 실험에서 높은 라디칼 소거능을 보여주었다. 추출물이 처리된 사람 각질형성세포는 성장 보다는 분화가 진행되었으며, 특히 피부장벽 기능과 tight junction을 유지하는데 중요한 유전자의 발현을 증가시켰다. *In vitro* 아토피 모델에서 IL-4/IL-13에 의해 억제된 filaggrin의 합성이 추출물에 의해 회복되는 것을 확인하였다. 따라서, *S. claviflorum*은 각질형성세포의 분화를 유도하여 피부장벽기능을 효과적으로 유지할 수 있는 효능을 나타내고 있음을 확인하였다. 향후, *S. claviflorum* 추출물의 주요 물질을 분석하고, 세포에서 발생하는 유전체, 단백질체 및 대사체 분석을 통하여 새로운 메커니즘 연구도 가능할 것으로 기대한다. 본 연구를 통해 *S. claviflorum* 추출물이 향후 아토피 피부염을 예방 및 개선할 수 있는 천연물 소재로 개발이 가능할 것으로 예상된다.

## Acknowledgement

이 연구는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2020R1C1C1005206)과 부산광역시 및 (재)부산인재평생교육진흥원의 BB21플러스 사업(2022-0123)으로 지원된 연구임. 또한, 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 대학 혁신지원사업의 연구결과임.

## References

1. E. Proksch, J. M. Brandner, and J. McJensen, The skin: an indispensable barrier, *Exp. Dermatol.*, **17**(12), 1063 (2008).
2. M. Furue, Regulation of skin barrier function via competition between AHR axis versus IL-13/IL-4-JAK-STAT6/STAT3 axis: pathogenic and therapeutic implications in atopic dermatitis, *J. Clin. Med.*, **9**(11), 3741 (2020).
3. T. Werfel, J. P. Allam, T. Biedermann, K. Eyerich, S. Gilles, E. Guttman-Yassky, W. Hoetzenecker, E. Knol, H. U. Simon, A. Wollenberg, T. Bieber, R. Lauener, P. Schmid-Grendelmeier, C. Traidl-Hoffmann, and C. A. Akdis, Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **138**(2), 336 (2016).
4. P.M. Elias and M. Steinhoff, “Outside-to-inside”(and now back to “outside”) pathogenic mechanisms in atopic dermatitis, *J. Invest. Dermatol.*, **128**(5), 1067 (2008).
5. A. Chiricozzi, M. Maurelli, K. Peris, and G. Girolomoni, Targeting IL-4 for the treatment of atopic dermatitis, *Immunotargets Ther.*, **9**, 151 (2020).
6. T. Nakahara, M. Kido-Nakahara, G. Tsuji, and M. Furue, Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis, *J. Dermatol.*, **48**(2), 130 (2021).
7. N. Novak and D. Y. Leung, Advances in atopic dermatitis, *Curr. Opin. Immunol.*, **23**(6), 778 (2011).
8. M. C. Zaniboni, L.P. Samorano, R. L.Orfali, and V. Aoki, Skin barrier in atopic dermatitis: beyond filaggrin, *An Bras Dermatol.*, **91**(4), 472 (2016).
9. M. Furue, T. Chiba, G. Tsuji, D. Ulzii, M. Kido-Nakahara, T. Nakahara, and T. Kadono, Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies, *Allergol. Int.*, **66**(3), 398 (2017).
10. H. Hammad and B. N. Lambrecht, Barrier epithelial cells and the control of type 2 immunity, *Immunity*, **43**(1), 29 (2015).
11. S. Shareef, M. P. Geetha Kumary, S. Kumar. E. S., and T. Shaju, *Syzygium claviflorum* (Myrtaceae)—a new record for South India, *Rheedea*, **20**(1), 53 (2010).
12. T. Fujioka, Y. Kashiwada, R. E. Kilkuskie, L. M. Cosentino, L. M. Ballas, J. B. Jiang, W. P. Janzea, I. S. Chen, and K. H. Lee, Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids, *J. Nat. Prod.*, **57**(2), 243 (1994).