

## 꾸지뽕 열매 추출물이 인간 유래 각질 형성 세포의 밀착연접에 미치는 영향

이상수<sup>1#</sup>, 최선경<sup>1#</sup>, 김재환<sup>1</sup>, 한효상<sup>2\*</sup>, 김기광<sup>1\*</sup>

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 중부대학교 보건행정학과

### Investigation of the effect of water extract from *Cudrania tricuspidata* fruit on tight junction in human keratinocyte

Sang Soo Lee<sup>1#</sup>, Sun Kyung Choi<sup>1#</sup>, Jae Whan Kim<sup>1</sup>, Hyo Sang Han<sup>2\*</sup>, Kee Kwang Kim<sup>1\*</sup>

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

2 : Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : *Cudrania tricuspidata* (*C. tricuspidata*) is well-known traditional herbal remedy and its root, leaf and fruit were used for treatment of inflammation, tumor and painkilling. However, effect of *C. tricuspidata* fruit on tight junction is still unknown. The aim of this research was to determine the effect of *C. tricuspidata* fruit extract on human keratinocyte HaCaT cells.

**Methods** : The antioxidant effects of water extract of *C. tricuspidata* (WECT) and ethanol extract of *C. tricuspidata* (EECT) were analyzed by using an ABTS assay. To confirm the cytotoxicity of WECT and EECT, MTS assay was performed. The mRNA expression levels of tight junction related genes were analyzed using quantitative RT-PCR analysis. Furthermore, dispase assay was used to investigate the alteration of cell-cell adhesion strength of EECT treated HaCaT cells.

**Results** : WECT and EECT showed strong antioxidant activity. No obvious cytotoxicity was observed in both WECT and EECT until 2.0 mg/ml concentration. The mRNA expression level of Claudin 6 were significantly increased by EECT treatment, whereas the WECT did not affect the expression of Claudin 6. Furthermore, EECT treatment enhances cell-cell adhesion strength.

**Conclusions** : In this study, we investigated the physiological activities of the extracts of *Cudrania tricuspidata* fruit extracts on human keratinocytes by two different extraction methods. EECT might have an anti-aging activity on the skin by reducing oxidative stress. Moreover, it may be a useful ingredient in atopic dermatitis and skin-moisturizing, given its effects of altering Claudin 6 gene expression and enhancing cell-cell adhesion strength.

**Key words** : *Cudrania tricuspidata* fruit, Human keratinocyte, Tight junction, Claudin 6

\*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 : Sang Soo Lee, 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 : agnazio@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 : eoslight@cnu.ac.kr

· Received : 10 December 2018 · Revised : 09 January 2019 · Accepted : 25 January 2019

## I. 서론

세포 간 결합을 이루는 구조에는 간극 연결(gap junction), 부착 연결(anchoring junction) 등 다양한 종류가 있으며, 이중 세포밀착연접(tight junction, TJ)은 세포 간에 결합과 세포 간 물질 교환을 조절하는 다중 단백질 복합체(multiprotein complexes)을 지칭한다<sup>1)</sup>. TJ는 피부가 외부장벽으로서 개체를 외부의 물리적, 화학적 자극으로부터 보호할 수 있도록 해주며, 상피조직에서 전해질, 수분 등의 이동과 세포 내 신호 전달을 조절하는 기능의 기초가 된다<sup>2)</sup>.

세포밀착연접 복합체를 구성하는 단백질은 대표적으로 세포막에 존재하며 transmembrane domain을 포함하는 Occludin과 Claudin family 외에도 ZO-1, ZO-2 등 40여 가지 단백질로 구성되어 있다<sup>3-5)</sup>. 이를 통해 개체의 피부는 약산성 (pH 5.5)이 유지되며, 바이러스나 병원균에 의한 감염을 방지하고 피부를 구성하는 각질 세포의 분열 또한 조절한다. 이 중 Claudin family는 세포막에 존재하며, 세포 사이를 직접 연결해 세포밀착연접을 구성하여 세포 간 연결의 강도와 물질 교환에 직접 관여한다.

Claudin family중 하나인 Claudin 1 단백질의 발현을 억제시킨 쥐가 심각한 탈수 증세를 보이며 생후 1일내로 사망한 연구 결과를 통해 Claudin family가 개체의 피부에 미치는 중요성을 알 수 있다<sup>6)</sup>. 이러한 이유로 세포밀착연접 단백질(tight junction protein)을 중점으로 아토피의 치료나, 피부 보습 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

근래 화장품에 포함되어 있는 화학적 성분에 의한 부작용 때문에 이러한 부작용을 최소화하기 위한 천연물질에 대한 필요가 대두되고 있다. 이 때문에 현재 자연에 존재하는 식물 중에서 추출물을 활용하여 항산화, 항염증, 미백, 항균 등의 효과를 얻을 수 있는 소재들을 탐색하며, 이를 실용화할 수 있는지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

中華本草에 따르면 꾸지뽕나무 *Cudrania tricuspidata* Bureau (뽕나무과 Moraceae)는 本草拾遺에 柘木이라는 이름으로 처음 수재되었으며, 柘樹果實은 清熱涼血, 舒筋活血, 柘樹莖葉은 清熱解毒, 舒筋活絡의 효능이 있다고 하였다<sup>7)</sup>.

꾸지뽕 열매의 일반성분은 수분함량 76.51%, 조단백질 2.17%, 조지방 1.09%, 조회분 3.54%로 구성되어 있었고, pH는  $6.05 \pm 0.02$ , 총산은  $0.31 \pm 0.04\%$ , 가용성 고형분 함량은  $17.73 \pm 0.06^\circ\text{Brix}$  로 나타났다. 색도는 L값이  $19.48 \pm 0.05$ , a값이  $23.31 \pm 0.04$ , b값이  $10.41 \pm 0.03$ 으로 밝은 색을 나타내었다. 유기산은 citric acid, malic acid, succinic acid, acetic acid가 검출되었으며 citric acid가 가장 높은 함량을 나타내었고, 꾸지뽕에 함유되어 있는 주요 무기질은 Na, Mg, K, Ca 등으로 나타났으며 꾸지뽕의 유리아미노산은 alanine이 나타내었다<sup>8)</sup>.

꾸지뽕나무 열매의 생리활성 연구를 보면 뇌에서 monoamine 산화를 억제 효능, 항산화 활성 및 아질산염 소거능, 식품 매개 병원성 세균에 대한 억제효과, 면역 증강 효과를 보고하였다<sup>9-13)</sup>.

꾸지뽕은 글루탐산염에 의한 골다공증의 완화, 항산화 성분(모르틴, 가바, 루틴)과 aspartic acid, 비타민 C에 의한 위염과 장 출혈, 위궤양을 예방하며 소화 기능 개선하는 효능

이 알려졌으며 이외에도 부인과 질병의 개선 등에도 사용된다<sup>14-16)</sup>. 꾸지뽕나무의 잎, 열매, 뿌리, 껍질을 진통제, 소화제, 항염제를 목적으로 하여 사용하였으며<sup>17)</sup>, 폐결핵이나 아토피를 치료하기 위한 목적으로도 사용되었다<sup>18)</sup>. 또한 꾸지뽕 줄기 추출물 처리한 쥐에서 아토피 발병이 억제되었다는 연구가 소개된 바 있다<sup>19)</sup>. 이런 꾸지뽕의 성질은 피부 개선 효과 등에 이용할 가능성을 시사하므로 꾸지뽕의 항산화, 항균, 미백효과는 화장품, 건강식품으로 사용하기 위한 연구가 진행되고 있다. 하지만 꾸지뽕의 다양한 추출물 중 꾸지뽕 열매 추출물이 피부장벽에 중요한 세포밀착연접유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향과 그에 따른 세포 간 부착 강도의 변화에 대한 연구는 잘 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 추출방법에 따라 꾸지뽕 열매가 세포의 세포밀착연접 단백질에 미치는 영향을 확인하기 위해 꾸지뽕 열매의 열수 추출물(Water Extract *Cudrania tricuspidata*, WECT)과 에탄올 추출물(Ethanol Extract *Cudrania tricuspidata*, EECT)의 항산화 효능을 확인하고, 인간 유래 각질 형성 세포 (human keratinocyte cells line)인 HaCaT 세포에 처리하여 세포밀착연접 유전자인 Claudin 6의 mRNA 발현이 증가 및 세포 간 부착 강도 효과를 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 꾸지뽕 열매는 충청남도 공주시 일대에 자생하는 것을 2017년 8월에 채취하였으며, 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과 대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 ultrasonic cleaner를 이용하여 불순물을 제거하고 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin (WELGENE, Korea), filter paper (Advantec No.2, Japan), DPBS (Corning, USA), Trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), potassium persulfate (Sigma, USA), ABTS (Sigma, USA), MTS solution (Promega, USA), eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea), 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzynomics, Korea), 2X Prime Q-mater Mix (GENET BIO, Korea), RiboEX, 2X Taq PCR Master Mix (Bioneer, Korea) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 CO<sub>2</sub> incubator (Thermo, USA), water bath (HAAKE, Germany), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), ultrasonic cleaner (Branson, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA), The Qubit 2.0

Fluorometer (Invitrogen, USA), AriaMx (Agilent, USA), AriaMx (Agilent, USA), SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA) 등이다.

## 2. 방법

### 1) 꾸지뽕 열매 추출물 제조

꾸지뽕 열매 50 g을 이물질을 제거한 후 동결건조기로 건조하여 분말화하였다. 꾸지뽕 열매 건조 분말을 10 g을 증류수 30 ml에 60℃에서 30 분 간 섞은 뒤에 초음파 발생기를 이용하여 추출하였다. 4,000 x g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 동결 건조해 WECT를 제작하였다. 꾸지뽕 열매 건조 분말 10 g을 에탄올 90 ml에 60℃에서 30 분간 섞은 뒤에 초음파 발생기를 이용하여 추출하였고, vacuum evaporator를 이용하여 55℃에서 에탄올이 완전히 증발할 때까지 건조하여 EECT를 제작하였다. 동결건조 추출물은 각각 13.5 g, 13.95 g으로 측정되었으며, 수율은 각각 27%, 27.9%였다.

### 2) 세포 배양

실험에 사용된 세포주는 인간 유래 각질형성 세포 (human keratinocyte cell line)인 HaCaT으로, 고려대학교 생명공학부에서 분양 받아 사용하였다. HaCaT 세포는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Welgene, Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Korea)과 1% 항생제 (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, Welgene, Korea)를 첨가하여 표준 세포 배양법인 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### 3) 항산화 효능 평가

WECT와 EECT의 항산화능은 ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay를 이용하여 측정하였다. Potassium persulfate (sigma, USA) 2.4 mM과 ABTS (sigam, USA) 7 mM을 1:1 부피비로 맞추어 혼합해주고 24 시간 동안 실온에서 차광된 상태로 반응시켜 주어 ABTS free radical을 만들어주었다. 그 후 ABTS free radical을 D.W로 희석하여 650 nm 흡광도가 0.7 부근이 되도록 ABTS working solution을 만들었다. 96 well plate의 각 well에 ABTS working solution 80 µl와 sample 20 µl를 혼합하고, 4 min 동안 차광된 상태로 반응시킨 후 microplate reader로 650 nm의 흡광도를 측정하였다. 항산화 효능은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{sampleblank}}}{A_{\text{blank}}}\right) \times 100$$

### 4) 세포 생존율 평가

WECT와 EECT의 HaCaT 세포 세포 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) assay를 수행하였다. 96-well

plate에 HaCaT 세포를 5,000 cells/well로 분주한 뒤 24 h 동안 배양한 뒤 각각의 well을 시료가 농도 별로 처리된 배지로 교환해 준 뒤 다시 24 h 동안 배양해 주었다. 그 후 MTS 시약 (Promega, USA)을 첨가하고 microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 시료를 처리한 세포의 활성도를 백분율로 표시하여 상대적인 독성을 측정하였다.

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \left(\frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100 (\%)$$

### 5) RNA 추출 및 quantitative real-time PCR

6-well culture dish에 HaCaT 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 WECT와 EECT를 2 mg/ml 농도까지 처리하여 다시 48 시간 동안 배양하였다. 시료가 첨가된 배지를 제거한 후 PBS로 세척한 뒤 RiboEx (Geneall, Korea) 1 ml로 세포를 lysis 한 다음, hybrid-R RNA purification kit (Geneall, Korea)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, USA)로 정량하였고, 이렇게 추출하여 정량한 total RNA로 cDNA를 합성하기 위하여 total RNA 2 µg, dNTP mix (10 mM) 2 µL, random hexamer (100 pmol/µL) 2 µL를 넣은 후 DEPC-treated water로 총 부피 20 µL가 되도록 하였다. 65℃에서 5 min간 반응시킨 후 즉시 얼음에 냉각시킨 다음, 각각 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA) 8 µL, M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) 2 µL, RNase inhibitor (Enzymomics, Korea) 2 µL, DEPC-treated water 8 µL를 추가적으로 첨가해 주었다. 그 뒤 실온에서 10 min간 둔 후에 50℃에서 1 h 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 추후 실험에는 이렇게 합성한 cDNA를 1/5로 희석시켜 사용하였다. WECT와 EECT 처리에 의해 HaCaT 세포에서의 tight junction 관련 유전자의 mRNA 발현량을 비교해 보기 위하여 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 실시하였다. 2X Prime Q-master mix (Genet Bio, Korea) 10 µL, 10 pmol/µL의 forward primer와 reverse primer를 각각 1.5 µL, nuclease free water 2 µL, 합성한 후 1/5로 희석시킨 cDNA 5 µL를 넣은 뒤 95℃에서 denaturation 20 s, 58℃에서 annealing 20 s, 72℃에서 elongation 20 s를 40 cycle 실시하는 조건 하에서 AriaMx (Agilent, USA)를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 실험군과 대조군의 internal standard로 β-actin을 사용하였고, 각 primer는 1.5% agarose gel을 통한 전기영동과 melting curve analysis를 통해 specificity확인하였다. 또한 합성한 cDNA를 2X Taq PCR Master Mix 10 µl, forward primer와 reverse primer를 각각 1.5 µl, nuclease free water 5 µl, 합성한 후 1/5로 희석시킨 cDNA 2µl를 혼합한 뒤, SimpliAmp™ Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 진행하였다. 각 product는 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동을 통해 비교하였으며 실험에 사용한 primer의 염기 서열은 Table 1과 같다.

Table 1. Primers used for quantitative analysis of gene expression

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
Claudin 1	F	GCA GAT CCA GTG CAA AGT CT	136	58
	R	CAT ACA CTT CAT GCC AAC GG		
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 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		
ZO-1	F	AGA GCA CAG CAA TGG AGG AA	133	58
	R	GAC GTT TCC CCA CTC TGA AA		
$\beta$ -actin	F	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

### 6) Dispase 기반 해리 분석

12-well culture dish에  $5 \times 10^4$  cells/well 로 분주하고 24 시간 동안 배양한 후 각각의 well에 WECT와 EECT를 농도별로 처리하였다. 24 시간 후 시료가 첨가된 배지를 2.4 U/ml의 dispase II(Roche, Switzerland) 배지로 교환하고, 37°C에서 20 분간 배양하여 비 접착 세포 단층을 얻었다. 이후 dispase II가 포함된 배지를 제거하고, 남은 세포 단층을 PBS로 조심스럽게 세척 한 후 Pipet aid를 이용하여 12-well culture dish에 물리적인 충격을 주어 단편을 얻고 이를 디지털 카메라를 사용하여 사진을 촬영하였다. 각각의 well에서 얻은 단편의 개수를 센 후 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 WECT와 EECT를 처리한 단편의 수를 백분율로 표시하여 상대적인 단편의 수를 확인하였다.

### 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. 꾸지뽕 열매의 추출방법에 따른 항산화 효능 측정

WECT와 EECT가 가지는 항산화 효능을 확인하기 위해 항산화 효능이 입증된 resveratrol과 함께 ABTS assay를 수행하였고 이러한 검증과정에서 양성대조군으로서 뛰어난 항산화 효능이 잘 알려진 레즈베라트롤(resveratrol)을 이용하여 실험의 신뢰성을 확보하였다. 실험 시에는 동일 부피의 시료가 첨가되도록 용매의 양을 보정하였으며, 유효 물질이 필터링 과정에서 제거되는 것을 우려하여 필터링은 실시하지 않았다. 실험 결과, resveratrol의 항산화 효능이 농도가 두 배씩 증가함에 따라 증가하여 100  $\mu$ M에서  $73.1 \pm 1.63\%$ 로 뛰어난 radical 소거능을 나타냈다. WECT와 EECT 역시 농도가

두 배씩 증가함에 따라 항산화 효능이 증가하였다. WECT와 EECT가 0.5 mg/ml에서 각각  $41.55 \pm 2.22\%$ ,  $34.28 \pm 0.82\%$ 의 항산화 효능을 보였으며 WECT와 EECT가 1.0 mg/ml일 때 각각  $82.7 \pm 0.99\%$ ,  $64.7 \pm 0.93\%$ 의 항산화 효능을 보여 두 추출물 모두 매우 뛰어난 radical 소거능을 확인하였으며, 그 중 WECT가 더 뛰어난 radical 소거능을 보였다.

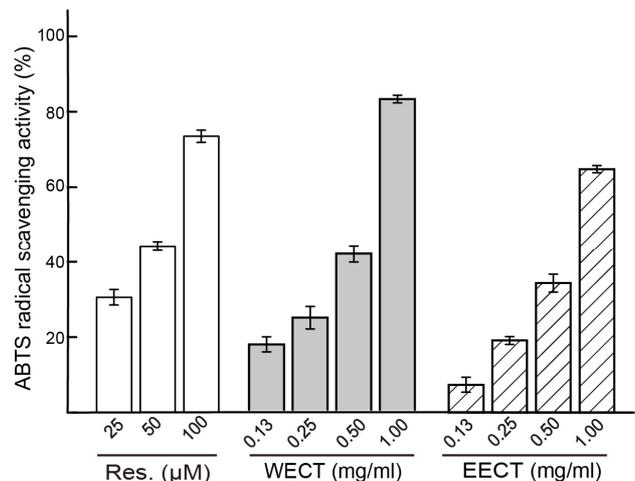


Fig. 1. Radical scavenging activity of WECT and EECT measured by ABTS assay. Resveratrol was a positive control. Average  $\pm$  S.E.M

### 2. 꾸지뽕 열매 추출물의 인간 유래 각질 형성 세포에 대한 세포독성

항산화 효능이 확인된 두 추출물을 HaCaT 세포의 세포밀착연접 유전자의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 전에 실험을 진행함에 앞서 다양한 농도의 꾸지뽕 열매 추출물을 처리했을 때 세포의 생존율을 확인하였다. 이를 위해서 NAD, NADP를 기반으로 하는 세포 내 산화효소의 활성을 기준으로 세포의 생존율을 측정하는 MTS assay를 진행하였다.

실험에 사용한 꾸지뽕 열매 추출물의 초기 농도를 바탕으로 HaCaT 세포에 WECT, EECT를 0.5 mg/ml부터 2.0 mg/ml까지 농도로 36 시간 동안 처리하는 것으로 실험조건을 설정하였다. 실험 결과, 대조군인 시료를 처리하지 않은 세포의 생존율과 비교하였을 때, 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 경미하게 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 가장 높은 농도인 2.0 mg/ml의 WECT와 EECT를 처리한 HaCaT 세포가 각각 75.3±5.59%, 84.1±2.40% 만큼 생존율을 보여주었다. 이후 더 높은 농도는 시료의 세포독성과 무관하게 꾸지뽕 열매 추출물 초기 농도가 과량으로 포함되어 나타나는 삼투압 등의 영향으로 세포의 생존에 영향을 주기 때문에 진행하지 않았다. 이러한 이유로 HaCaT 세포에 추출물을 처리하는 농도 설정을 2.0 mg/ml까지 설정하여 추후 실험을 진행하였다.

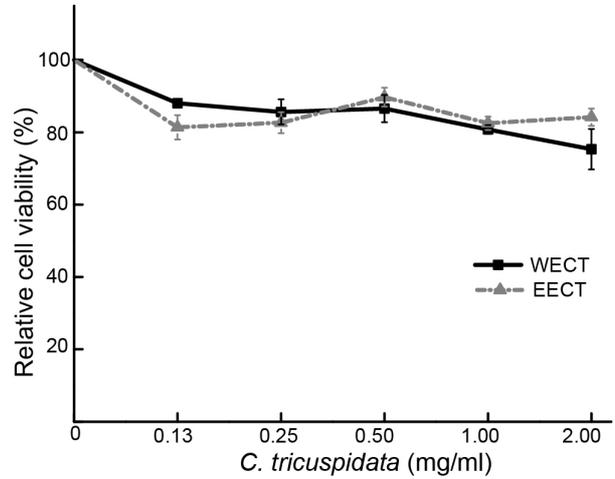


Fig. 2. Cytotoxicity of WECT and EECT on HaCat cells. HaCaT cells were treated with WECT and EECT for 36 h with indicated concentrations and cell viability was measured by MTS assay, n=3 (biological replicates). Average±S.E.M

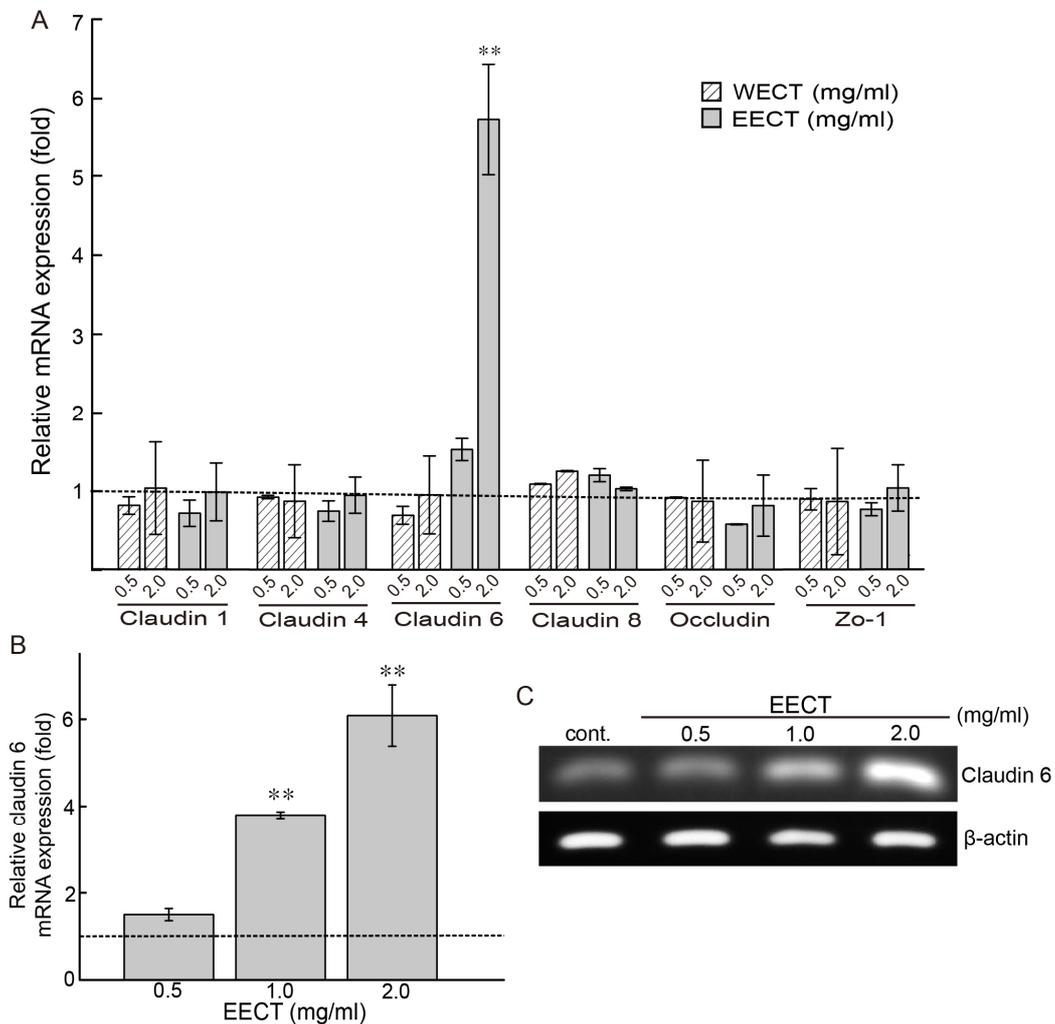


Fig. 3. EECT enhances mRNA expression level of Claudin 6. (A) Regulation of tight junction related genes by WECT and EECT. HaCaT cells were treated with WECT and EECT for 36 h with indicated concentrations. Relative mRNA expression level was measured by qRT-PCR. Claudin 6 mRNA expression level was measured by RT-qPCR (B) and the PCR product was shown by agarose gel electrophoresis (C). Data was normalized by  $\beta$ -actin mRNA expression, n=3 (biological replicates). Average±S.E.M. \*\*,  $p < 0.01$  (two-sided t-test, versus control)

### 3. 꾸지뽕 열매 추출물에 의한 세포밀착연접 유전자 발현도의 변화

HaCaT 세포에 WECT와 EECT 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml 농도 조건으로 처리한 후 세포밀착연접 관련 유전자의 발현량 변화를 qRT-PCR을 통하여 확인하였다. 이 때, 세포밀착연접에 관련된 유전자로서 Claudin family인 Claudin 1,4,6,8, Occludin, ZO-1을 설정하였다. 실험 결과, WECT를 처리한 HaCaT 세포는 Claudin family를 비롯한 세포밀착연접 유전자의 발현에 큰 영향을 미치지 않았다. 이에 반해 EECT를 처리한 HaCaT 세포에서는 관련 유전자 중 Claudin 6의 발현량이 0.5 mg/ml 농도에서 1.41배 증가하며, 2.0 mg/ml 농도에서 6.23배 증가해 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 두 농도 사이의 mRNA 발현량 증가 변화 폭이 크므로, 추가로 EECT 1.0 mg/ml 농도를 추가하여 Claudin 6의 발현량을 비교한 결과, Claudin 6의 발현량이 농도 기승기에 따라 증가함을 알 수 있었다. 또한 PCR 후 전기영동을 통해 band intensity를 비교하여도 같은 결과를 확인할 수 있었다. 이를 통해 EECT를 처리하는 것이 세포밀착연접 관련 유전자중 Claudin 6의 mRNA 발현량에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

### 4. 꾸지뽕 열매 에탄올 추출물에 의한 HaCaT 세포의 세포 간 부착 강도에 미치는 영향

EECT를 HaCaT 세포에 처리함으로써 증가한 세포밀착연

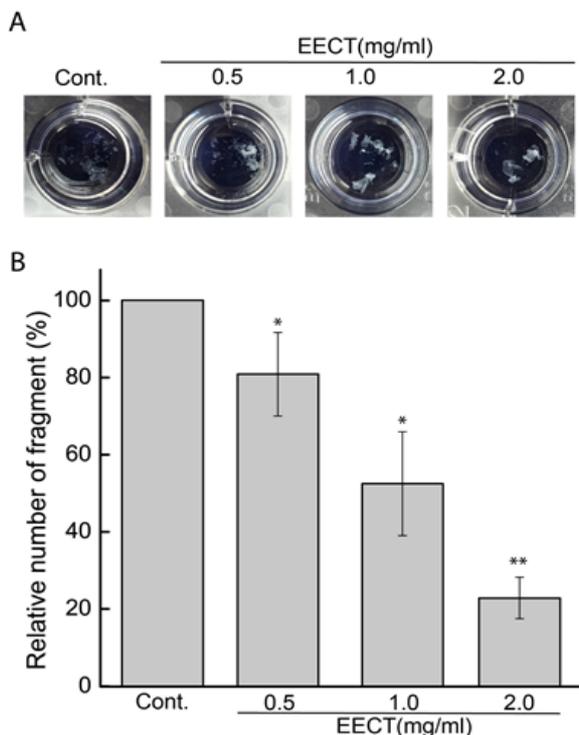


Fig. 4. Tight junction capacity is increased by EECT. (A) Dispase assay showing that EECT enhances mechanical cell-cell adhesion. HaCaT cells were treated with EECT, followed by treatment with dispase for 1 h. Number of fragments were counted. Average  $\pm$  S.E.M. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  (two-sided t-test, versus control)

접 유전자인 Claudin 6의 mRNA 발현량 증가가 세포 간 부착 강도에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 dispase 기반 해리 실험을 진행하였다. WECT는 TJ 관련 유전자의 mRNA 발현량에 영향을 주지 않았으므로 추가적인 실험을 진행하지 않았다. EECT를 농도별로 처리하여 배양한 HaCaT 세포에 dispase를 처리하여 동일한 충격을 가하여 얻어진 단편의 수를 측정하였다. 실험 결과 처리한 꾸지뽕 열매 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 단편 수가 감소하는 경향성을 보였으며, 2.0 mg/ml에서의 단편 수는 시료를 처리하지 않는 대조군의 단편 수에 비하여 22.9%로 감소하였다. 이를 통해 HaCaT 세포에 EECT를 처리시 세포 간 부착 강도가 매우 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

## IV. 고찰

꾸지뽕나무 *Cudrania tricuspidata* Bureau (뽕나무과 Moraceae)는 황해도 이남에서 자라는 落葉小喬木 또는 灌木으로서 가지에 가시가 있으며 小枝에 털이 있다. 聚果는 둥글며 지름 2~3cm로서 肉質이고 9월에 적색으로 익으며 瘦果는 길이 5mm 정도로서 흑색이다<sup>20)</sup>.

꾸지뽕나무 열매의 일반성분을 보면 수분은 76.0~80.1%, 조단백질 2.2~3.5%, 조지방 1.7~2.9%, 회분 0.8~1.2%, 탄수화물 14.5~16.4%이었다. 유리당은 glucose, fructose가 검출되었으며 적숙과와 과숙과에서 fructose가 glucose보다 많이 함유되어 있었다. 유기산은 oxalic acid, citric acid, tartaric acid, malic acid, succinic acid가 검출되었으며 malic acid와 succinic acid가 성숙시기에 관계없이 가장 많이 함유되어 있었다. 무기성분은 Ca, Fe, K, Mg, Na, P 등이 검출되었고 K 함량이 836~1207 mg%로 가장 높았다. 비타민 C함량은 127.5~149.2 mg%이었으며 총 식이섬유함량은 22.7~38.7%이었으며 불용성 식이섬유가 수용성 식이섬유보다 월등히 많았다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 18.9~19.7%와 40.9~48.2%이었다<sup>21)</sup>.

화학적·물리적 자극 및 손상에 의한 피부 상처 부위에는 다양한 케모카인(chemokine)과 사이토카인(cytokine) 및 증식인자(growth factor)들이 분비되기 시작하며, 이러한 인자들에 의해 각질형성세포는 상처부위로 이주(migration)하기 시작하고, 동시에 세포의 증식(proliferation)이 유도된다<sup>22)</sup>. 세포밀착연접(tight junction)은 사람의 표피에서 관찰되는 세포간이음(intercellular junction) 중 하나로서, 표피 과립세포층의 세포간격에 위치하여 인접한 세포들을 접합시키고 전해질과 수분의 이동을 조절하는 장벽기능을 비롯한 다양한 생물학적 기능을 수행한다<sup>23)</sup>.

Free radical 등의 원인에 의해서 세포 내에 ROS가 증가하면 산화적 스트레스로 작용하여 염증성 질환을 유발하고 세포 내 단백질을 산화시키며<sup>24)</sup>, 여러 단백질의 복합체를 이루어진 세포밀착연접 역시 손상시킨다<sup>25, 26)</sup>. 그 때문에 뛰어난 radical 소거능을 띠는 물질을 세포에 처리할 경우 세포밀착연접에 긍정적인 영향을 미칠 수 있으며, 쥐에게 항산화물질을 먹임으로써 radical에 의한 세포밀착연접 손상이 경감되었다는 연구 결과가 보고된 바 있다<sup>27)</sup>. 따라서 본 연구에서는

이미 소염작용으로 잘 알려진 꾸지뽕 열매의 추출 방법에 따른 radical 소거능을 측정하여, WECT와 EECT 두 추출방법 모두 농도 의존적으로 뛰어난 radical 소거능을 나타내는 것을 확인하였으며 그 중 WECT가 더욱 뛰어난 항산화 효능을 보였다<sup>9-11</sup>). 이러한 사실은 기존에 알려진 꾸지뽕 열매 추출물의 항산화 효능과 일치하는 결과이며, 이번 연구에 사용된 추출법 역시 항산화 효능을 가지는 성분들이 효과적으로 추출되었음을 알 수 있었다<sup>28, 29</sup>). ROS가 세포밀착연접에 미치는 영향 외에도 피부조직에서 ROS가 증가하면 조직 세포에 작용하여 콜라겐의 합성을 억제하고 MMPs를 통한 콜라겐 분해를 촉진하여 피부 노화의 주범으로도 잘 알려진 만큼 이러한 꾸지뽕 열매 추출물의 효능을 이용한다면, 유용한 기능성 소재 물질로 개발할 수 있을 것이다<sup>30</sup>).

세포에 처리하기 이전에 MTS assay를 진행하여 세포 독성을 측정해 HaCaT 세포에 처리하는 추출물의 농도를 2.0 mg/ml까지 설정하여 실험을 진행하였다. 이후 세포에 두 추출물을 처리하여 mRNA의 발현량을 비교한 결과 WECT를 처리한 HaCaT 세포에서는 유의미한 발현량의 증가가 확인되지 않았지만, EECT를 처리한 세포에서 Claudin 6의 발현량이 0.5 mg/ml 농도에서 1.41배, 1.0 mg/ml 농도에서 4.91배, 2.0 mg/ml 농도에서 6.23배 증가함을 확인하였다. WECT와 EECT와의 비교를 통해 WECT에서는 추출되지 않고 EECT에서는 추출된 유효성분이 무엇인지 동정할 필요가 있으며, 생체 내로 적용 시 본 연구에서 실험한 EECT의 농도인 1 mg/ml은 고농도이므로, TJ에 영향을 미친 EECT의 유효성분을 저농도로 적용할 필요가 있을 것으로 생각된다. 또한 EECT를 처리하여 증가한 Claudin 6는 세포밀착연접에 관여하는 대표적인 단백질 중 하나인 Claudin family의 일종이다. 아토피환자의 경우 Claudin 1의 발현량이 현저히 감소되며, Claudin 1의 발현량을 증가시키는 물질을 통해 쥐의 아토피성 피부염이 완화되는 등 세포밀착연접을 구성하는 Claudin family가 개체의 피부 장벽 강화에 중요하게 작용하는 영향은 잘 알려져 있다<sup>31</sup>).

EECT가 처리된 HaCaT세포의 세포 간 부착 강도를 측정하기 위하여 dispase 기반 해리 실험을 진행하였다. 그 결과 농도 의존적으로 HaCaT 세포의 단편 수가 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 곧 EECT를 처리한 세포에서 세포 간 부착 강도가 증가하였음을 의미한다. 피부 장벽의 강화는 외부의 유해물질로부터 1차적으로 물리적 외벽 역할을 하여 개체를 보호할 수 있게 해주며, 미용 분야에서 피부 수분이 외부로 빼앗기지 않게 유지시켜주는 등의 역할을 한다. 따라서 이러한 EECT를 화장품 개발 분야나 아토피 치료 분야 등에서 이용할 수 있는 소재 물질로서의 개발을 기대할 수 있다. 다만 부착 강도의 증가가 세포밀착연접 외 다른 junction이 강화되어 증가하였는지에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다. 이번 연구에서 꾸지뽕 열매 추출물이 기존에 알려진 다양한 효능 이외에 피부 장벽 강화에도 긍정적인 영향을 미치는 것을 밝혔으며, 이를 통해 꾸지뽕 열매 추출물이 생리활성 물질로서의 새로운 가치를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

## V. 결 론

본 연구에서 꾸지뽕 열매의 열수 추출물(Water Extract *Cudrania tricuspidata*, WECT)과 에탄올 추출물(Ethanol Extract *Cudrania tricuspidata*, EECT)을 인간 유래 각질 형성 세포 (human keratinocyte cells line)인 HaCaT 세포에 처리하여 세포밀착연접 유전자인 Claudin 6의 mRNA 발현이 증가 및 세포 간 부착 강도 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. WECT와 EECT의 항산화 효능을 확인한 결과 WECT와 EECT가 0.5 mg/ml에서 각각  $41.55 \pm 2.22\%$ ,  $34.28 \pm 0.82\%$ 의 항산화 효능이 있고 1.0 mg/ml일 때 각각  $82.7 \pm 0.99\%$ ,  $64.7 \pm 0.93\%$ 의 항산화 효능이 있어, WECT가 더 뛰어난 radical 소거능을 보였다.
2. WECT와 EECT가 HaCaT 세포의 세포밀착연접 유전자 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 WECT는 유의미한 변화가 없는 반면, EECT 처리에 의해 관련 유전자 중 Claudin 6의 발현량이 0.5 mg/ml 농도에서 1.41배, 2.0 mg/ml 농도에서 6.23배 증가해 농도 의존적으로 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
3. HaCaT 세포에 Claudin 6 발현량이 증가한 EECT를 처리한 후 dispase를 처리하여 얻은 비 접착 세포 단층을 얻고, 물리적인 충격을 가하여 얻은 단편의 수를 측정한 결과 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 EECT를 처리한 시료의 세포 단편이 22.97%로 감소하며 세포-세포 부착 강도 강화 효과를 확인하였다.

이상의 실험결과는 WECT와 EECT 모두 항산화 효능을 보유하고 있으며, 그 중 WECT가 더욱 뛰어난 항산화 효능을 가지고 있어 피부의 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시켜 피부의 노화 방지 효과가 있을 것으로 생각된다. 또한 EECT가 Claudin 6 유전자의 mRNA 발현량 증가에 영향을 주었다. 향후 세포밀착연접 유전자 발현 조절 및 세포-세포 부착 강도의 강화를 통한 피부 장벽 강화 및 보습에 미치는 EECT의 효능에 대한 보다 깊은 연구가 필요한 것으로 생각되는 바이다.

## 감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

1. Anderson JM, Molecular Structure of Tight Junctions and Their Role in Epithelial Transport, *News Physiol Sci*, 2001 ; 16 : 126-30.
2. Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM, Transmembrane Proteins in the Tight Junction Barrier, *J Am Soc*

- Nephrol. 1999 ; 10(6) : 1337-45.
3. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 ; 2(4) : 285-93.
  4. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *J Cell Biol*. 1998 ; 141(7) : 1539-50.
  5. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993 ; 123(6 Pt 2) : 1777-88.
  6. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*. 2002 ; 156(6) : 1099-111.
  7. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. *Zhonghuabencao*. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1999 : 518-20.
  8. Lee HK, Kim YS. Comparison of Proximate Composition of *Cudrania tricuspidata* Bureau Fruit. *Journal of Agriculture & Life Sciences*. 2015 ; 46(1) : 22-6.
  9. Han XH, Hong SS, Hwang JS, Jeong SH, Hwang JH, Lee MH, Lee MK, Lee DH, Ro JS, Hwang BY. Monoamine oxidase inhibitory constituents from the fruits of *Cudrania tricuspidata*. *Archives of Pharmacal Research*. *Archives of Pharmacal Research*. 2005 ; 28(12) : 1324-7.
  10. Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* bureau according to harvesting parts and time. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 2009 ; 17(2) : 115-20.
  11. Youn KS, Kim JW. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activities of extracts from mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit subjected to different drying methods. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2012 ; 41(10) : 1388-94.
  12. Bajpai VK, Sharma A, Baek KH. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*. 2013 ; 32(2) : 582-90.
  13. Seo MJ, Kang BW, Park JU, Kim MJ, Lee HH, Kim NH, Kim KH, Rhu EJ, Jeong YK. Effect of fermented *Cudrania tricuspidata* fruit extracts on the generation of the cytokines in mouse spleen cells. *Journal of Life Science*. 2013 ; 23(5) : 682-8.
  14. Lee HY, Kim YS. Comparison of Proximate Composition of *Cudrania tricuspidata* Bureau Fruit. *Journal of Agriculture & Life Sciences*. 2015 ; 46(1) : 22-6.
  15. Lee BW, Lee JH, Lee ST, Lee HS, Lee WS, Jeong TS, Park KH. Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005 ; 15(24) : 5548-52.
  16. Jeong GS, Lee DS, Kim YC. *Cudraticusxanthone A* from *Cudrania tricuspidata* suppresses pro-inflammatory mediators through expression of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in RAW 264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2009 ; 9(2) : 241-6.
  17. Park KH, Park YD, Han JM, Im KR, Lee BW, Jeong IY, Jeong TS, Lee WS. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006 ; 16(21) : 5580-3.
  18. Lee H, Ha H, Lee JK, Seo CS, Lee NH, Jung DY, Park SJ, Shin HK. The fruits of *Cudrania tricuspidata* suppress development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Phytother Res*. 2012 ; 26(4) : 594-9.
  19. Park YS, Kim SH, Kim SY, Koh GM, Suh JH, Kang JS. Topical Application of *Cudrania tricuspidata* Stem Extract Inhibits Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in an NC/Nga Mouse Model: An Experimental Animal Study. *Pharmacology & Pharmacy*. 2016 ; 7(8) : 358-67.
  20. Lee CB. *Daehansigmuldogam*. Seoul : Hyangmunsa. 1982 : 285.
  21. Jung GT, Ju IO, Choi SR, You DH, Noh JJ. Food nutritional characteristics of fruit of *Cudrania tricuspidata* in its various maturation stages. *The Korean Society of Food Preservation*. 2013 ; 20(3) : 330-5.
  22. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res*. 2005 ; 304(1) : 274-86.
  23. Kim JS, Jang HS. The Expression Pattern of the Tight Junction Protein Occludin in the Epidermal Context When Comparing Various Physical Samples. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. 2015 ; 47(4) : 267-72.
  24. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*. 2002 ; 265(1-2) : 49-72.
  25. Rao R. Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Front*

- Biosci 2008 ; 13 : 7210–26.
26. Kim KA, Jung JH, Kang IG, Choi YS, Kim ST. ROS Is Involved in Disruption of Tight Junctions of Human Nasal Epithelial Cells Induced by HRV 16. *Laryngoscope* 2018 ; 10 : 1002.
  27. Shukla PK, Gangwar R, Manda B, Meena AS, Yadav N, Szabo E, Balogh A, Lee SC, Tigyi G, Rao R. Rapid disruption of intestinal epithelial tight junction and barrier dysfunction by ionizing radiation in mouse colon in vivo: protection by N-acetyl-L-cysteine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 ; 310(9) : G705–15.
  28. Kang DH, Kim JW, Youn KS. Antioxidant Activities of Extracts from Fermented Mulberry (*Cudrania tricuspidata*) Fruit, and Inhibitory Actions on Elastase and Tyrosinase. *Korean J Food Preserv*. 2011 ; 18(2) : 236–243
  29. Kim OK, Ho JN, Nam DE, Jun W, Hwang KT, Kang JE, Chae OS, Lee J. Hepatoprotective Effect of *Cudrania tricuspidata* Extracts against Oxidative Damage. *J Korean Soc Food Sci Nu*. 2014 ; 41(1) : 7–13
  30. Chiang HM, Chen HC, Chiu HH, Chen CW, Wang SM, Wen KC. *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr Stimulates Skin Regeneration after UVB Exposure via ROS Scavenging and Modulation of the MAPK/MMPs/Collagen Pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013 ; 2013(7) : 324864.
  31. Kim YE, Cho N, Cheon S, Kim KK. Bortezomib, a proteasome inhibitor, alleviates atopic dermatitis by increasing claudin 1 protein expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 ; 493(1) : 744–50.