

鼻皮 증류액의 항균, 소염, 항산화 작용에 대한 연구

김호선[#], 이영종^{*}

가천대학교 한의과대학 본초학교실

Studies on the Anti-bacterial, Anti-inflammatory and Anti-oxidant Effect of BPH

Ho-Seon Kim[#], Young-Jong Lee^{*}

Dept. of Herbology, College of Korean Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of the study is to test the antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant effects of BPH, which is composed of Pini Densiflorae Nodi Lignum and Querci Acutissimae Fructus, Angelicae Gigantis Radix, Cnidii Rhizoma, Angelicae Dahuricae Radix, Angelicae Tenuissimae Radix.

Method : Antibacterial and anti-inflammatory effects of BPH on *Propionibacterium acnes*, one of anaerobic bacteria species were evaluated by measuring the levels of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) elimination and lipid peroxidation.

Result : When BPH was applied to CCD-986sk (Human normal fibroblast) to confirm the level of cytokine(tumor necrosis factor- α , interleukin-8), its level increased in proportion to that of BPH's concentration, which indicated dose-dependent relationship. Using the Disk diffusion to measure the bacterial growth inhibition zone varying BPH concentration, it was found that the antibacterial effect of BPH was less than that of erythromycin, the control group, but was higher than that of saline, and it increased with higher concentrations. In a liquid culture medium containing BPH, the growth rate of *Propionibacterium acnes* was decreased by more than 10% at 25% BPH. After adding *P. acnes* to THP-1 monocyte, and treated it with BPH, and measuring the concentration of TNF- α and IL-8, it was observed that the amount of TNF- α and IL-8 significantly decreased depending on the level of BPH concentration. The ability to eliminate DPPH increased with higher BPH concentration. The inhibition of lipid peroxidation was increased by BHT treatment in a dose-dependent manner.

Conclusion : Using *Propionibacterium acnes*, an anaerobic bacteria, we confirmed that BPH has antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant effects.

Key words : BPH, THP-1, CCD-986sk, anti-bacteria, anti-inflammation, anti-oxidation

서론

鼻皮 증류액(BPH)은 松節과 橡實이 주 재료이고, 여기에 當歸, 川芎, 白芷, 藁本이 배합된 민간 경험방으로, 여드름 등 화농성 피부질환과 비염에 사용되고 있는 외용 처방이다.

鼻皮 증류액의 주 재료인 松節은 名醫別錄¹⁾에 "松節, 溫. 主治百節久風, 風虛, 脚痺, 疼痛."이라고 처음으로 기재된 이후, 祛風燥濕, 舒筋通絡, 活血止痛의 효능이 있어 風寒濕痺와

歷節風痛, 脚痺痿軟, 跌打傷痛 등의 증상에 사용되고 있다²⁾. 橡實은 新修本草³⁾에 "橡實, 味苦, 微溫, 無毒. 主下痢, 厚腸胃, 肥健人. 其殼爲散及煮汁服, 亦主痢, 竝堪染用. 一名杼斗, 榭櫟皆有斗, 以櫟爲勝. 所在山谷中皆有."라고 처음 기재된 이후, 收斂固澁, 止血, 解毒의 효능이 있어, 主治泄瀉痢疾, 便血, 痔血, 脫肛, 小兒疝氣, 瘡癰久潰不斂, 乳腺炎, 睪丸炎, 面黦 등의 증상에 사용되고 있다²⁾.

松節의 기원은 中華本草²⁾와 中藥大辭典⁴⁾에 "소나무과 식물

*Corresponding author : Young-Jong Lee, Dept. of Herbology, College of Korean Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

· Tel : +82-31-750-5415 · E-mail : garak@gachon.ac.kr

#First author : Ho-Seon Kim, Dept. of Herbology, College of Korean Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

· Tel : +82-10-3417-8075 · E-mail : dasanomc@naver.com

· Received : 5 August 2014 · Revised : 17 September 2014 · Accepted : 18 September 2014

인 만주흑송(油松) *Pinus tabulaeformis* Carr., 馬尾松 *P. massoniana* Lamb., 소나무(赤松) *P. densiflora* Sieb. et Zucc. 및 雲南松 *P. yunnanensis* Franch. 등의 枝幹에 있는 結節."이라고 하였는데, 結節은 소나무의 송진이 엉긴 가지나 옹이를 말한다.

松節의 성분으로는 섬유소와 lignin 및 소량의 정유(松節油)와 수지(松香)를 함유하고 있으며⁵⁾, 정유에는 α -pinene과 β -pinene 이 90% 이상 함유되어 있으며, 이밖에 소량의 camphene, dipentene이 함유되어 있으며⁶⁾, ursolic acid와 isopimaric acid 가 함유되어 있다²⁾. 松節의 약리작용으로는 鎮痛消炎作用²⁾이 보고되었다.

또한 橡實의 기원은 中華本草²⁾에 "참나무과 식물인 상수리나무(麻櫟) *Quercus acutissima* Carr., 혹은 遼東櫟 *Quercus liaotungensis* Koidz., 의 과실"이라고 하였다.

橡實의 성분으로는 전분 50.4%, 지방유 5-20%와 탄닌을 다량 함유하고 있으며²⁾, 탄닌은 橡實의 껍질에 19-29%, 상수리나무 잎에 5-10% 함유되어 있다⁴⁾. 상수리나무 화분에는 friedelin, β -amyrone, lupenone, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, stearic acid, palmitic acid, oleic acid와 구연산, 사과산 등이 함유되어 있다^{2,7)}.

증류 한약은 한약재를 전탕 증류시켜 정유와 같은 휘발 성분을 취하여 임상에 응용하는 약으로, 한약의 새로운 수요를 창출하고 고부가 가치의 새로운 한약제품을 개발할 수 있다는 데 그 의의를 두고 있다. 특히 松節과 같이 정유 성분이 많은 약재는 증류 방법을 이용하면 임상적 의의가 높을 것으로 사료된다.

인체 내에서 다양한 경로에 의하여 유발되는 산화적 스트레스는 생체 안에 존재하는 항산화계에 의해 제거되지만 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 생체막의 손상, 고분자 단백질 및 DNA의 변형과 기능상실 등으로 인한 다양한 퇴행성 질환이 유발될 수 있다^{8,9)}. 松節과 橡實이 주재료인 鼻皮 증류액이 민간에서 여드름과 같은 화농성 피부염과 비염 등에 응용되는 점에 비추어 항산화 효과와 항균, 소염 작용이 있을 것으로 사료되나, 이에 대한 연구는 보고되지 않았다.

이에 저자는 鼻皮 증류액(BPH)의 효능을 실험적으로 구명하기 위하여, 鼻皮 증류액을 혐기성 세균인 *Propionibacterium acnes*를 이용하여 항균 및 소염 작용을 평가하였으며, DPPH 소거능 측정과 지질과산화물질 억제능 측정을 하여 항산화 효능을 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 鼻皮 증류액의 처방 구성은 다음과 같으며, 松節과 橡實은 2007년 10월 경기도 광주시 일원에서 채취하였으며, 當歸, 川芎, 白芷, 藁本은 대연제약(인천, 한국)에서 구입하였다. 모든 약재는 실험 전에 초음파 세척기(Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다

(Table 1).

Table 1. The Prescription of BPH

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
松節	Pini Densiflorae Nodi Lignum	1,500
橡實	Querci Acutissimae Fructus	900
當歸	Angelicae Gigantis Radix	180
川芎	Cnidii Rhizoma	180
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	120
藁本	Angelicae Tenuissimae Radix	60
Total		2,940

2) 세포 및 세균

(1) 세포배양

Human monocyte인 THP-1와 human normal skin fibroblast 세포인 CCD-986sk는 세포주은행(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다. THP-1 세포는 RPMI 1640 배양액에 10% FBS와 항생제 penicillin(100 U/ml)과 streptomycin(100 μ g/ml)을 첨가하여 배양하였다. CCD-986sk 세포는 DME 배양액에 10% FBS와 항생제 penicillin(100 U/ml)과 streptomycin (100 μ g/ml)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

(2) 세균배양

혐기성 세균인 *Propionibacterium acnes*는 생물자원센터(대전, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 분양받은 *P. acnes*는 오염 및 세균의 활성을 확인하기 위해 reinforced clostridial medium(RCM)의 평판배지에서 colony를 확인하였다. 혐기성 세균의 배양 조건을 만들기 위하여 CO₂ gas pack (O₂→CO₂)을 넣은 incubation container에 *P. acnes*를 보관하고, incubation container는 세균배양 전용 incubator에 보관하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해서 RPMI1640 (Samchun Chemical, Korea), DME (Samchun Chemical, Korea), FBS (Samchun Chemical, Korea), penicillin (Samchun Chemical, Korea), streptomycin (Samchun Chemical, Korea), tryptose (BD, USA), beef extract (BD, USA), yeast extract (BD, USA), dextrose (BD, USA), soluble starch (BD, USA), bacto agar (BD, USA), brain heart infusion (BD, USA), erythromycin disk (BD, USA), filter paper disk (BD, USA), pancreatic digest of gelatin (ACUMEDIA, USA), TNF- α ELISA Kit (eBioscience R&D, USA), IL-8 ELISA Kit (eBioscience R&D, USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (Sigma, USA), trypan blue (Sigma, USA), DMSO (Sigma, USA), sodium chloride (Sigma, USA), cysteine hydrochloride (Sigma, USA), sodium acetate (Sigma, USA), disodium phosphate (Sigma, USA) 등이 사용되었다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 Gas PakTMEZ GAs generating container systems (BD, USA), ELISA reader (TECAN, Canada), spectrophotometer (GENOVA, UK), scale (MunHaw, Korea), rotary evaporator (Eyela, Japan) 등이다.

2. 방법

1) 약물의 제조

鼻皮 증류액(BPH) 원처방(총 2,940g)의 한약재를 광목으로 만든 주머니에 담아 30 L 들이의 대형 전탕용기에 넣고, 물 20 L를 넣고 3 시간 전탕한 후, 3 시간 이후부터 20 시간 동안 전탕용기에서 방출되는 증기를 냉각하여 증류액 12 L를 수거하였으며, 증류액을 BPH라고 하였다. BPH 약물은 각각 멸균 증류수를 이용하여 10%, 15%, 20%, 25%, 50%로 희석하거나, 둥근 flask에 넣고 rotary evaporator를 이용하여 150%, 200%, 300%로 농축하여 사용하였다.

2) 세포독성 측정

Human normal skin fibroblast인 CCD-986sk를 5×10^5 cell/well으로 분주하고, 25%, 50%, 100%, 150%의 BPH를 처리하였다. 24 시간 배양한 후, MTT assay를 이용하여, 세포 생존율을 측정하였다.

(1) Skin fibroblast 배양

분양 받은 human normal fibroblast 인 CCD-986sk를 DME 배양액에 10% FBS와 항생제 penicillin(100 U/ml)과 streptomycin(100 μ g/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

(2) MTT assay

안정화된 CCD-986sk의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 24 well plate에 5×10^5 cells/well로 세포를 분주하고, DME 배양액에 10% FBS와 항생제 penicillin(100 U/ml)과 streptomycin(100 μ g/ml)과 BPH를 농도별로 처리하고, 24 시간 동안 세포를 배양하였다. 24 시간 후에, MTT solution (1 mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20 μ l씩 분주하고 3 시간 동안 37°C에서 배양하였다. 3 시간 후, 각 well에 있는 medium을 100 μ l씩 버리고, DMSO(dimethylsulfoxide)를 100 μ l씩 분주한 뒤 pipetting을 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 optical density로 확인하였다.

3) 항균력 평가

(1) 세균 배양

분양받은 혐기성 세균 *P. acnes*는 사용하기 전, 4°C에서 보관하였다. 실험에 사용하기 위하여 멸균증류수 200 μ l를 첨가하여 세균을 녹이고, 녹인 세균은 RCM 평판배지에 3 분도말법으로 접종시켰다. Incubation container에 CO₂ gas pack을 넣고, 세균이 도말된 배지를 넣고, 24 시간 후, colony를 확인하였다. 접종된 세균의 colony를 약간 긁어, brain

heart infusion broth 액상배지에 접종하고, 액상배지에서 활성화된 세균을 얻을 수 있도록, 혐기 조건으로 배양하였다.

(2) Growth inhibition zone 측정

혐기성 세균 *P. acnes*를 이용하여 filter paper disc diffusion method로 확인하였다⁹⁾. Brain heart infusion broth 액상배지에 혐기성 조건에서 증식이 정지기에 도달할 때까지 *P. acnes*를 배양하였다. 우선, 약 10⁶ 개의 세균을 RCM 평판배지에 도말한 후, 지름 10 mm의 filter paper disc를 여러 농도의 BPH에 각각 적시고, 적혀진 filter paper disc를 세균이 도말된 평판배지에 밀착시켰으며, disc 밀착 후 혐기성 조건의 incubation container에 보관하여 37 °C에서 24 시간 배양하였다. 세균이 배양된 영역의 직경을 측정하였다.

(3) 최소 저해 농도 측정

혐기성 세균 *P. acnes*를 이용하여, 세균의 증식을 발생시키지 않는 BPH의 최소 농도(minimum inhibitory concentration; MIC)를 확인하였다. Brain heart infusion broth 액상배지 10 ml에 혐기성 조건에서 *P. acnes*를 24 시간 pre-culture 하였다. 새로운 brain heart infusion broth 액상배지 3 ml에 배양된 세균 약 10⁵을 접종시킨 후, 10%, 15%, 20%, 25%, 50%의 BPH 3 ml을 각각 첨가하였으며, BPH가 첨가된 세균을 혐기성 조건의 incubation container에 보관하여 37 °C에서 24 시간 배양하였다. 배양이 끝난 세균은 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. BPH의 *P. acnes* 최소 저해 농도는 BPH를 첨가하지 않은 대조군에서의 흡광도를 기준으로 하였을 때 이 흡광도의 10%이상의 감소를 일으키는 BPH의 최소저해농도로 정하였다.

(4) 최소 살균 농도 측정

NCCLS guidelines(National Committee for clinical Laboratory Standards, 1987) 혹은 FDA (food and Drug administratuin)에서 권고하는 항균력을 확인하고자, BPH의 최소 저해 농도 이상에서 *P. acnes*의 사멸을 발생시키는 BPH의 최소 농도(minimum bactericidal concentration; MBC)를 확인하였다. GAM agar 반고체 액상배지(containing 0.8% phytoagar)에 BPH를 첨가하여 각각 총 용량 5 ml의 25%, 50%, 75%, 100%, 150%의 BPH 배양액을 만들어 *P. acnes* 10⁵을 3 시간 동안 pre-culture하였다. 각기 다른 농도의 BPH 배양액에서 배양된 세균은 균일하게 약 10⁶개씩 새로운 GAM agar 반고체 액상배지(containing 0.8% phytoagar)에 10⁻⁴으로 희석하고, RCM 평판배지에 붓고, 반고체의 GAM agar 배지가 굳을 때까지 실온에서 보관하였다. Colony의 생성정도를 일정시간동안 시간별로 관찰 확인하여 계수하였으며, 생성된 colony의 수는 log로 환원하여 나타내었고, BPH의 최소 살균 농도 기준은 colony 수의 log 값이 저하하기 시작하는 농도로 하였다.

4) 소염작용 평가

(1) human monocyte 배양

배양 받은 human normal monocyte인 THP-1을 RPMI 1640 배양액에 10% FBS와 항생제 penicillin(100 U/ml)과 streptomycin(100 µg/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

(2) cytokine 측정

배양을 실시한 THP-1 세포를 96 well plate에 1×10⁶ cells/well로 분주하고, 95°C에서 5 분간 열처리를 실시한 혐기성 세균 *P. acnes*를 50 µg/well로 첨가한 후 25%, 50%, 100%, 150%의 BPH를 각각 처리하였다. 48 시간 동안 세포를 배양시킨 후, 배양액을 이용하여 염증성 cytokine TNF-α와 IL-8의 함량을 mouse anti-TNF-α kit와 mouse anti-IL-8 ELISA kit을 이용하여 ELISA reader로 측정하였다.

5) 항산화작용 평가

(1) DPPH radical 소거능 측정

에탄올 50ml에 멸균 증류수 50 ml을 첨가하여 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH, Sigma, USA) 80 mg을 녹인 후, 96 well에 180 µl씩 분주하고, 25%, 50%, 100%, 150%, 200%, 300%의 BPH를 각각 첨가하여 30 분 동안 실온에서 방치하였다. 그 후에 517 nm로 optical density를 측정하고, scavenging activity로 환산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample O.D.}}{\text{control O.D.}}\right) \times 100$$

(2) TBA법에 의한 지질과산화물질 억제능 측정

Linoleic acid 0.052 ml에 99%의 ethanol 4 ml와 50 mM phosphate buffer(pH7.0) 4 ml를 혼합한 후, 각각 1%, 10%, 100%, 500%, 1,000%의 BPH를 1 ml씩 첨가하였다. 여기에 증류수 0.948 ml를 가하여 최종 volume이 10 ml이 되도록 하고 40°C에서 7 일간 자동산화반응을 유도하였다. 이렇게 제조한 반응액 200 µl를 clean test tube에 넣고, 8.1% sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225 µl를 가하여 5초 동안 vortex mixer로 혼합하였다. 여기에 20% acetic acid 1.5 ml를 가하고 증류수 75 µl를 더한 후 5 초 동안 vortex mixer로 혼합하였다. 1.2% thiobarbiture acid solution 1 ml을 가하고 clean dry marble로 덮은 후 water bath에서 30 분간 가열하였다. 이 후 실온에서 30 분간 방치하고 3,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하고, lipid peroxidation inhibitory로 환산하였다.

$$\text{Lipid peroxidation inhibitory (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample O.D.}}{\text{control O.D.}}\right) \times 100$$

6) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과값은 평균 ± 표준편차(M ± SD)로 나타내었다. SPSS 통계프로그램(14.0 KO)의 일원배치 분산 분석(one-way ANOVA)을 사용하여 군간 비교를 하였으며, 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다. 각 실험군의 결과값을 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성

Human normal fibroblast인 CCD-986sk를 이용하여 BPH의 세포독성을 확인하였다. 세포 생존율은 25% 농도에서 85.23 ± 11.22%, 50% 농도에서 74.94 ± 0.81%, 100% 농도에서 56.87 ± 3.10%, 150% 농도에서 40.35 ± 2.17%로 BPH의 농도가 높을수록 높은 세포독성을 나타내었다(Fig. 1).

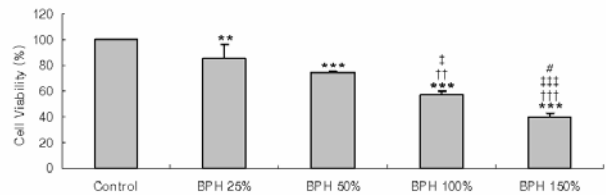


Fig. 1. Cytotoxicity of BPH against human normal fibroblast Human normal fibroblast cells were cultured for 24h in DME medium with or without various concentrations of BPH. The cell viability were measured by MTT assay. Values represent the means ± SD of 3 independent experiments.

Control : culture medium without BPH

BPH 150% : culture medium with 150% BPH

BPH 100% : culture medium with 100% BPH

BPH 50% : culture medium with 50% BPH

BPH 25% : culture medium with 25% BPH

*** : p<0.001, ** : p<0.01 compared to control group by ANOVA test
††† : p<0.001, †† : p<0.01 compared to BPH 25% group by ANOVA test.

‡‡‡ : p<0.001, † : p<0.05 compared to BPH 50% group by ANOVA test.

: p<0.05 compared to BPH 100% group by ANOVA test.

2. 항균력

1) Growth inhibition zone

Disk diffusion 방법을 이용하여, BPH의 농도별 세균 성장 저해능을 측정하였다. Saline 에서는 10 mm이었으나, 양성 대조군인 erythromycin에서는 66.25 ± 20.97 mm 이었다. 50% BPH에서는 20.50 ± 4.20 mm, 100% BPH에서는 30.00 ± 4.08 mm, 150% BPH에서는 31.25 ± 2.50 mm, 200% BPH에서는 38.75 ± 8.54mm, 300% BPH에서는 51.25 ± 6.29 mm로 erythromycin에 비해 낮았으나, saline에 비하여 유의하게 높았으며, 고농도일수록 항균력이 증가하였다 (Fig. 2).

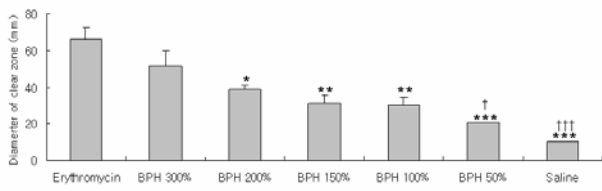


Fig. 2. Antibacterial activity of BPH against *P. acnes* by disk diffusion method

Bacterial cells were inoculated into brain heart infusion broth medium and cultured at 37°C under anaerobic conditions. The brain heart infusion broth medium containing 10⁶ bacterial cells was spread onto the RCM agar plate. After that, filter-paper disk of uniform size was impregnated with specified concentration of BPH and then placed on the surface of an RCM agar plate that has been seeded with the organism to be tested. The plates were then incubated at 37°C for 24h under anaerobic conditions. Antibacterial activity was defined by measuring the diameter of the growth inhibition zone. Erythromycin was employed as the positive control. Values represent the means ± SD of 3 independent experiments.

Erythromycin : filter-paper disk of erythromycin (15µg/disk) seeded RCM agar plate

BPH 300% : filter-paper disk of BPH (300%/disk) seeded RCM agar plate

BPH 200% : filter-paper disk of BPH (300%/disk) seeded RCM agar plate

BPH 150% : filter-paper disk of BPH (300%/disk) seeded RCM agar plate

BPH 100% : filter-paper disk of BPH (300%/disk) seeded RCM agar plate

BPH 50% : filter-paper disk of BPH (300%/disk) seeded RCM agar plate

Saline : filter-paper disk of saline (20µl/disk) seeded RCM agar plate

*** : p<0.001, ** : p<0.01, * : p<0.05 compared to erythromycin by ANOVA test

† † † : p<0.001, † : p<0.05 compared to BPH 300% by ANOVA test.

2) 최소 저해 농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)

10%, 15%, 20%, 25% 및 50% 농도의 BPH를 처리한 액상배지에서 *P. acnes*를 배양한 뒤 BPH에 의한 *P. acnes*의 성장 억제 정도를 관찰하였다. 25% BPH에서 세균의 성장이 대조군에 비하여 91.5%, 50% BPH에서 81.2%로 감소하였다 (Table 2).

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of BPH against *P. acnes*

	MIC of Concentration		Optical Density
	MIC	Concentration	
Brain heart infusion broth medium containing <i>P. acnes</i>	control		1,048 ± 0,015
	with 10% BPH		1,044 ± 0,033 99,6%
	with 15% BPH		1,029 ± 0,022 98,1%
	with 20% BPH		1,039 ± 0,023 99,1%
	with 25% BPH		0,959 ± 0,039 91,5%
	with 50% BPH		0,852 ± 0,054 81,2%

Bacterial cells were inoculated into brain heart infusion broth medium and pre-cultured at 37°C under anaerobic conditions. And then, 10%, 15%, 20%, 25% 50% of BPH was added into brain heart infusion broth medium containing the bacteria, and cultured for 24h at 37°C under anaerobic conditions. Minimal inhibitory concentration (MIC) of BPH was defined as the lowest concentration that decreases more than 10% of bacterial cell growth.

3) 최소 살균 농도 (minimum bactericidal concentration; MBC)

25%, 50%, 75%, 100% 및 150% 농도의 BPH를 처리한 액상배지에서 *P. acnes*를 배양한 뒤, *P. acnes*의 colony 수를 log로 환원하여 나타내었다. 50% BPH에서 colony 수의 log값이 저하하기 시작하였다(Fig. 3).

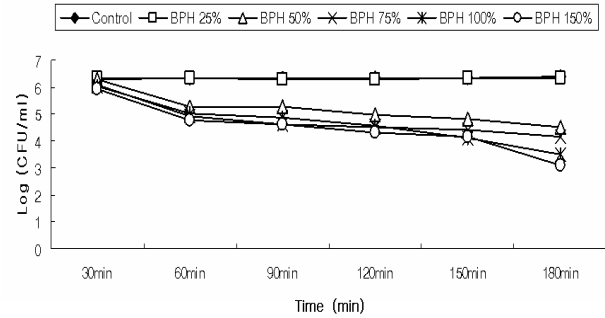


Fig. 3. Bactericidal activity of BPH against *P. acnes*

Bacterial cells were incubated into GAM agar medium with various concentration of BPH and cultured for 3h at 37°C under anaerobic conditions. The bacterial cells were collected and mixed with molten GAM agar medium for the preparation of RCM pour plates. The number of colony forming unit (CFU) in individual plate was obtained at different time points.

3. 소염작용

Human normal monocyte인 THP-1에 *P. acnes*를 첨가하고, 25%, 50%, 100% 및 150% 농도의 BPH를 처리한 후 TNF-α와 IL-8의 함량을 측정하였다(Table 3).

Table 3. Effect of Anti-inflammation on Cytokine Level with or without BPH against THP-1

BPH of Concentration	TNF-α(O.D.)	IL-8(pg/ml)
0% without <i>P. acnes</i> (N.C.)	0,139 ± 0,017	0
0% with <i>P. acnes</i> (P.C.)	0,474 ± 0,015	992,000 ± 33,530
25% with <i>P. acnes</i>	0,238 ± 0,044	879,179 ± 42,366
50% with <i>P. acnes</i>	0,162 ± 0,006	612,513 ± 4,441
100% with <i>P. acnes</i>	0,146 ± 0,019	502,256 ± 49,455
150% with <i>P. acnes</i>	0,143 ± 0,019	202,256 ± 71,474

Human normal monocyte cells were cultured in RPMI1640 medium with or without BPH. Human normal monocyte cells were stimulated with *P. acnes* and the supernatants were harvested after 48h for TNF-α or IL-8 measurement. Values represent the means ± SD of 3 independent experiments.

1) TNF-α

THP-1에 *P. acnes*를 첨가하고 여러 농도의 BPH를 처리한 후 TNF-α의 함량을 측정하였다. *P. acnes*를 첨가한 positive control midium은 0,474 ± 0,015 (O.D.)로 *P. acnes*를 첨가하지 않은 negative control midium 0,139 ± 0,017 (O.D.)에 비하여 현저하게 높은 TNF-α 함량을 나타내었다. BPH를 처리한 경우 25% BPH에서 0,238 ± 0,044 (O.D.)이었고, 150% BPH에서 0,143 ± 0,019 (O.D.)로, BPH의 농도에 의존적으로 TNF-α의 함량이 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

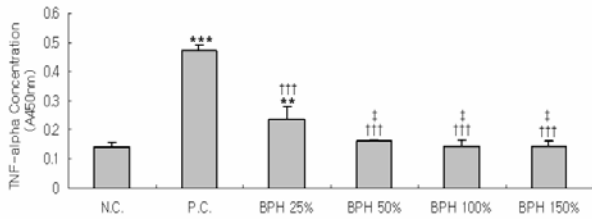


Fig. 4. Effect of various concentrations of BPH on TNF- α secretion from THP-1 induced by *P. acnes*

Human normal monocytes (THP-1) were cultured in RPMI1640 medium and stimulated with *P. acnes*. The supernatants were harvested for 48h and the level of TNF- α was measured. Values represent the means \pm SD of 3 independent experiments.

N.C. : culture medium without *P. acnes*

P.C. : culture medium with *P. acnes*

BPH 25% : culture medium with *P. acnes* and 25% BPH

BPH 50% : culture medium with *P. acnes* and 50% BPH

BPH 100% : culture medium with *P. acnes* and 100% BPH

BPH 150% : culture medium with *P. acnes* and 150% BPH

*** : p<0.001, ** : p<0.01 compared to N.C by ANOVA test

† † † : p<0.001 compared to P.C. by ANOVA test.

‡ : p<0.05 compared to 25% BPH by ANOVA test.

2) IL-8

THP-1에 *P. acnes*를 첨가하고 여러 농도의 BPH를 처리한 후 IL-8의 함량을 측정하였다. *P. acnes*를 첨가하지 않은 negative control medium은 0 (pg/ml)이었으나, *P. acnes*를 첨가한 positive control medium은 992,000 \pm 33,530 (pg/ml)으로 현저하게 높은 IL-8함량을 나타내었다. BPH를 처리한 경우 25% BPH에서 879,179 \pm 42,366 (pg/ml)이었고, 150% BPH에서 202,256 \pm 71,474 (pg/ml)로, BPH의 농도에 의존적으로 IL-8의 함량이 감소하였다(Fig. 5).

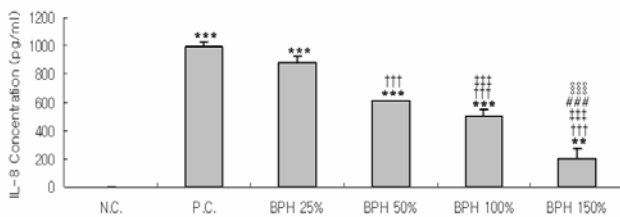


Fig. 5. Effect of various concentrations of BPH on IL-8 secretion from THP-1 induced by *P. acnes*

Human normal monocytes (THP-1) were cultured in RPMI1640 medium and stimulated with *P. acnes*. The supernatants were harvested for 48h and the level of IL-8 was measured. Values represent the means \pm SD of 3 independent experiments.

N.C. : culture medium without *P. acnes*

P.C. : culture medium with *P. acnes*

BPH 25% : culture medium with *P. acnes* and 25% BPH

BPH 50% : culture medium with *P. acnes* and 50% BPH

BPH 100% : culture medium with *P. acnes* and 100% BPH

BPH 150% : culture medium with *P. acnes* and 150% BPH

*** : p<0.001, ** : p<0.01 compared to N.C. group by ANOVA test

† † † : p<0.001 compared to P.C. group by ANOVA test.

‡ ‡ ‡ : p<0.001 compared to BPH 25% group by ANOVA test.

: p<0.001 compared to BPH 50% group by ANOVA test.

§ § § : p<0.001 compared to BPH 100% group by ANOVA test.

4. 항산화작용

1) DPPH 소거능

BPH를 25%, 50%, 100%, 150%, 200% 및 300%의 농도에서 DPPH 소거능을 관찰하였다. 25% BPH에서 16.98 \pm 1.95%, 50% BPH에서 18.87 \pm 0.95%, 100% BPH에서 31.75 \pm 9.88%로 BPH의 농도가 높을수록 높은 DPPH 소거능을 나타내었으며, 150% BPH에서 41.65 \pm 2.01%, 200% BPH에서 37.14 \pm 1.69%이었으며, 300% BPH에서 41.06 \pm 0.62%로, BPH의 농도가 150% 이상에서 높은 DPPH 소거능을 나타내었다(Fig. 6).

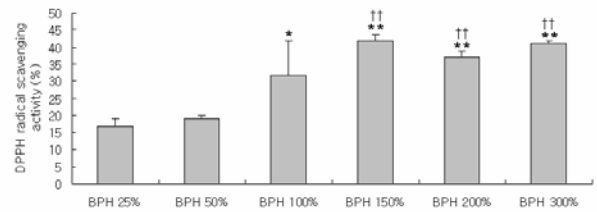


Fig. 6. DPPH radical scavenging activity of various concentrations of BPH

The antioxidative activity of various concentrations of BPH was measured by DPPH radical scavenging assay. Values represent the means \pm SD of 3 independent experiments.

** : p<0.01, * : p<0.05 compared to 25% BPH by ANOVA test

† † : p<0.01 compared to 50% BPH by ANOVA test.

2) 지질과산화 억제능

BPH를 1%, 10%, 100%, 500% 및 1,000%의 농도에서 지질과산화의 생성을 억제하는 정도를 관찰하였다. 1% BPH에서 12.48 \pm 1.20%, 10% BPH에서 19.84 \pm 2.68%, 100% BPH에서 32.72 \pm 0.39%, 500% BPH에서 45.99 \pm 12.07%로 BPH의 농도가 증가할수록 지질과산화의 생성 억제 정도가 증가하였다(Fig. 7).

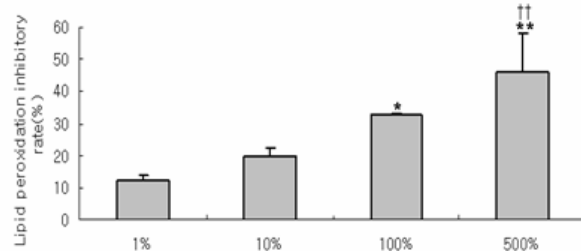


Fig. 7. Inhibitory Effect of various concentrations of BPH against lipid acid peroxidation

The antioxidative activity of various concentrations of BPH was measured by lipid acid peroxidation inhibitory assay. Values represent the means \pm SD of 3 independent experiments.

** : p<0.01, * : p<0.05 compared to 1% BPH by ANOVA test

† † : p<0.01 compared to 10% BPH by ANOVA test.

고찰

松節은 名醫別錄¹⁾에 처음으로 수재되었으며, 新修本草³⁾에 "脚弱人, 釀松節酒"라 하였고, 李時珍¹⁰⁾은 "治風蛙牙痛, 煎水含漱, 或燒灰日搗, 有效"라 하였는데, "祛風燥濕, 舒筋通絡, 活血止痛의 효능이 있어 風寒濕痺와 歷節風痛, 脚痺痿軟, 跌

打傷痛 등의 증상에 사용되고 있다²⁾.

松節은 韓國植物名考¹¹⁾에 의하면 油松 *P. tabulaeformis* Carr.은 만주흑송으로 우리나라 평남과 함북 지역, 만주 등지에 분포하고, 赤松 *P. densiflora* Sieb. et Zucc.은 소나무로 한국 전역과 일본, 만주, 우수리 등지에 분포하며, 馬尾松 *P. massoniana* Lamb.은 해송(곰솔) *P. thunbergii* Parl.과 같으며 우리나라 중부 이남지역과 일본에 분포한다고 하였다.

소나무는 松節 이외에, 잎은 松葉 혹은 松針이라 하는데, 祛風燥濕, 殺蟲止痒, 活血安神的 효능이 있어서 風濕痺痛, 脚氣, 濕瘡, 風疹瘙痒, 跌打損傷, 神經衰弱, 慢性腎臟炎, 高血壓 등에 사용되고, 수피는 松木皮라 하는데, 祛風除濕, 活血止血, 斂瘡生肌의 효능이 있어 風濕骨痛, 跌打扭傷, 金刀傷, 腸風下血, 久痢, 濕疹, 湯火傷과 癰疽가 오랫동안 아물지 않는 경우에 사용되고 있다²⁾. 또한 꽃가루를 松花 혹은 松花粉이라 하는데, 祛風益氣, 收濕, 止血的 효능이 있어서 頭痛眩暈, 泄瀉下痢, 濕疹濕瘡, 創傷出血 등에 사용하고 있으며, 나무에서 삼출된 수지는 松香 혹은 松脂라 하는데, 祛風燥濕, 排膿拔毒, 生肌止痛의 효능이 있어서 癰疽惡瘡, 癩癧, 癭症, 疥癬, 白禿, 痺症, 金瘡, 扭傷, 여인 白帶, 혈전 폐색성 맥관염 등에 사용되고 있다²⁾.

橡實은 新修本草³⁾에 "橡實, 味苦, 微溫, 無毒, 主下痢, 厚腸胃, 肥健人. 其殼爲散及煮汁服, 亦主痢, 竝堪染用. 一名杼斗, 榭櫟皆有斗, 以櫟爲勝. 所在山谷中皆有."라고 처음 기재되었으며, 日華子本草¹²⁾에 "橡斗子, 澁腸止瀉. 煮食, 可止飢, 御歉歲, 殼止腸風, 崩中帶下, 冷熱瀉痢, 竝染鬚髮, 入藥竝搗, 炒焦用."이라 하였고, 孫思邈¹⁰⁾은 "橡實은 과일도 곡식도 아니지만 사람에게 매우 이로우며, 사람을 強健하게 함이 끝이 없다."고 하였다.

橡實의 기원은 中華本草²⁾에 "참나무과 식물인 상수리나무(麻櫟) *Quercus acutissima* Carr., 혹은 遼東櫟 *Q. liautungensis* Koidz., 의 과실"이라고 하였는데, 동속의 떡갈나무 *Q. dentata* Thunb.의 과실은 榭實이라 하여 구별하고 있으며, 榭實 역시 澁腸止瀉의 효능이 있어 설사와 痢疾을 치료한다고 하였다. 또한 상수리나무 *Q. acutissima* Carr.의 殼斗를 橡實殼이라 하는데, 澁腸止瀉, 止帶, 止血, 斂瘡의 효능이 있어서 赤白下痢, 腸風下血, 脫肛, 帶下, 崩中, 牙疳, 瘡瘍 등을 치료하고, 뿌리껍질 혹은 줄기껍질을 橡木皮라 하는데, 解毒利濕, 澁腸止瀉의 효능이 있어서 설사, 이질, 瘡瘍, 癩癧를 치료한다.

이처럼 소나무 *P. densiflora* Sieb. et Zucc.의 관솔(옹이) 뿐만 아니라 잎, 수피, 수지, 꽃가루 등은 공통적으로 祛風燥濕, 斂瘡生肌 등의 효능이 있고, 상수리나무 *Q. acutissima* Carr.의 과실, 과실껍질, 뿌리와 줄기 껍질 등은 모두 수렴작용이 있어 澁腸止瀉, 斂瘡 등의 효능이 있고, friedelin, β -amyrenone, lupenone 등은 소염 작용이 있고, β -sitosterol, stigmasterol, compesterol 등은 소염, 항산화 작용이 있어¹³⁾, 松節과 橡實은 모두 피부의 염증을 치료할 수 있음을 알 수 있다.

鼻皮 증류액(BPH)은 松節과 橡實이 주 재료이고, 여기에 當歸, 川芎, 白芷, 藁本이 배합된 민간 경험방으로, 여드름 등 화농성 피부질환과 비염에 사용되고 있는 외용 처방이다.

當歸는 산형과(Umbelliferae)에 속하는 참당귀 *Angelica gigas* Nakai 의 뿌리이다¹⁴⁾. 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의

효능이 있다¹⁵⁾. 川芎은 산형과(Umbelliferae)에 속하는 천궁 *Cnidium officinale* Makino 또는 중국천궁(中國川芎) *Ligusticum chuanxiong* Hort.의 뿌리줄기이다¹⁴⁾. 活血祛瘀, 行氣開鬱, 祛風止痛의 효능이 있다²⁾. 白芷는 산형과(Umbelliferae)에 속하는 구릿대 *Angelica dahurica* Bentham et Hooker f. 또는 항백지(杭白芷) *Angelica dahurica* Bentham et Hooker f. var. *formosana* Shan et Yuan 의 뿌리이다¹⁴⁾. 祛風除濕, 通竅止痛, 消腫排膿의 효능이 있다²⁾. 藁本은 산형과(Umbelliferae)에 속하는 고본 *Angelica tenuissima* Nakai (= *Ligusticum tenuissimum* Kitagawa), 중국고본(中國藁本) *Ligusticum sinense* Oliv. 또는 요고본(遼藁本) *Ligusticum jeholense* Nakai et Kitagawa 의 뿌리줄기 및 뿌리이다¹⁶⁾. 祛風勝濕, 散寒止痛의 효능이 있다²⁾.

이처럼 當歸, 川芎, 白芷, 藁本은 癰疽瘡瘍이나 鼻塞 등을 치료하는데 사용되고 있으므로, 松節과 橡實의 처방에 배합되어 消炎과 抗菌 등의 작용을 하여 민간에서 피부질환이나 비염 등에 사용하는 것은 타당하다고 사료된다.

또한 鼻皮 증류액을 구성하고 있는 약물인 松節, 當歸, 川芎, 白芷, 藁本 등은 모두 정유성분을 다량 함유하고 있으므로, 鼻皮 증류액은 임상적 의의가 높을 것으로 사료된다.

이에 저자는 鼻皮 증류액(BPH)의 효능을 실험적으로 구명하기 위하여, BPH를 혐기성 세균인 *Propionibacterium acnes*를 이용하여 항균 및 소염 작용을 평가하였으며, DPPH 소거능 측정과 지질과산화물질 억제능 측정을 하여 항산화 효능을 평가하였다.

MTT assay를 이용하여 사람 피부의 fibroblast에 대하여 BPH의 세포독성을 관찰한 결과 BPH 원액이나 농축액에서는 높은 세포독성을 나타내었으나 BPH의 50%와 25% 희석액에서는 세포독성이 점차로 감소하였다.

*P. acnes*는 피부표면의 모공이나 피지선에 염증을 유발하는 주요 미생물의 하나이다^{17,18)}. *P. acnes*는 lipase를 분비하여 sebum oil을 유리지방산으로 변화시키는데, 이 유리지방산이 여드름의 주요 자극요인으로, 모낭을 자극하여 여드름을 형성하게 하고 염증을 유발시킨다¹⁹⁾. *P. acnes*는 또한 백혈구에 대한 주화성 인자를 분비하여 모낭에 백혈구가 모여들게 하고 모낭벽을 파괴한다²⁰⁾.

본 실험에서는 여드름에 대한 BPH의 효과를 관찰하기 위하여, *P. acnes*에 대한 성장억제능과 살균능을 확인하였다. Erythromycin은 β -lactam 항생제에 대한 알리지가 있는 사람에게 penicillin 대용약으로써 그리고 일차 선택약으로서 임상적 적용을 찾는 첫째 약물이었다. 이 그룹 중 새로운 제제인 clarithromycin[kla rith roe MYE sin](erythromycin의 메틸화된 형태) 및 azithromacin[az ith roe MYE sin](거대 락토환을 가짐)은 erythromycin과 공통적인 특징이 있으며, 개선된 형태이다. 최근에는 erythromycin 유도체(ketolie)인 telithromycin[tel ith roe MYE sin]이 공인된 바 있다. Erythromycin은 대부분 대사되며, Cytochrome P-450계와 상호작용을 함으로써 많은 약물의 산화를 억제한다²¹⁾. 본 실험에서는 BPH의 항균효과를 비교하기 위한 positive control로 사용되었다.

BPH의 항균효과는 Disk diffusion 방법을 사용하여 확인하였다²²⁾. BPH 300% 농축액은 거의 erythromycin에 가까운 *P. acnes* 성장억제능을 나타내었다. *P. acnes*의 성장

약 10% 이상 저해하는 최소농도를 최소 저해 농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)라 하였을 때, BPH의 MIC는 25%로 나타났다. 세균의 성장을 저해할 뿐만 아니라 멸균 효과를 나타내는 최소농도(최소살균농도; minimum bactericidal concentration; MBC)는 50%로 나타났다.

*P. acnes*는 monocyte로 하여금 TNF- α , IL-1 β , IL-8 등의 염증성 사이토카인을 분비하도록 함으로써 여드름의 염증을 유발하게 된다. TNF- α (tumor necrosis factor- α)는 활성화된 대식세포에 의하여 주로 생성되며, 세균감염이나 악성종양 발생 시 숙주의 반응에 있어서 중요한 역할을 한다^{23,24}. 특히 IL-8은 pilosebaceous unit에 중성구를 끌어들이는 데 중요한 역할을 한다^{18,25,26}. 본 실험에서는 human normal monocyte인 THP-1에 *P. acnes*를 첨가한 후 배양하여 TNF- α 와 IL-8의 분비량을 측정하였다. TNF- α 는 BPH 25% 이상에서, IL-8은 BPH 50% 이상에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.

이상의 실험결과, BPH는 *P. acnes*의 성장억제 및 살균의 효능이 있으며, *P. acnes*에 의한 monocyte의 TNF- α 및 IL-8의 과다분비를 억제하는 것으로 나타났다. *P. acnes*의 성장억제 및 monocyte의 TNF- α 분비 억제 최소 농도는 25%로 나타났으며, *P. acnes*에 대한 살균효과 및 monocyte의 IL-8 분비 억제는 50%이상에서부터 가능한 것으로 나타났다. 또한 BPH를 300% 이상 농축할 경우 erythromycin에 가까운 *P. acnes* 성장억제 효과를 나타내었다.

산화는 호기성 호흡을 하는 생명체가 생명유지에 필요한 에너지를 만들 때, 또는 방사선이나 외부 항원 등에 의해 발생하는 활성 산소종들에 의해 일어나는 반응으로, 생체 내에서 분자, 단백질, DNA등을 공격하여 세포의 노화, 변형을 초래하고 여러 가지 질병을 야기하며, 더 나아가서는 암을 유발시키기도 한다. 산화반응을 설명하는 이론중의 하나인 자유라디칼이론(free radical theory)에 의하면, 생체가 외부로부터 물리화학적 또는 정신적 자극을 받게 되면 생화학적 반응에 의해 superoxide(O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂), hydroxy radical(-OH) 등과 같은 free radical이 생성되고 이 free radical에 의하여 세포나 조직이 산화적 손상을 받거나 혹은 과산화지질 등의 생성으로 인하여 성인병과 노화가 초래된다고 한다²⁷⁻³².

DPPH는 안정한 자유 라디칼(free radical)로서, 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성을 기대할 수 있다. TBA법은 지질 과산화를 측정하는 대표적인 방법으로, 지질과산화는 산화적 스트레스의 지표로 널리 사용되고 있다³². 본 실험에서는 BPH의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH 소거능과 지질과산화 억제능을 확인하였다.

BPH 원액은 32%의 DPPH 소거능을 나타내었고, BPH를 150%로 농축하였을 때에는 42%의 DPPH 소거능을 나타내었다.

BPH 원액은 33%의 지질과산화 억제능을 나타내었고, 농도의존적으로 지질과산화 억제능이 증감하였다.

이상의 결과를 종합하면, BPH는 여드름균인 *P. acnes*에 대한 살균 효능이 있으며, *P. acnes*에 의한 염증을 억제 및 항산화 효과가 있는 것으로 사료되므로, 임상에서 활용할 의의 있다고 사료된다.

결론

鼻皮 증류액(BPH)의 효능을 실험적으로 구명하기 위하여, 혐기성 세균인 *Propionibacterium acnes*를 이용하여 항균 및 소염 작용을 평가하였으며, DPPH 소거능 측정과 지질과산화물질 억제능 측정을 하여 항산화 효능을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다

1. Human normal fibroblast인 CCD-986sk를 이용하여 BPH의 세포독성을 확인한 결과 BPH의 농도가 높을수록 높은 세포독성을 나타내었다.
2. Disk diffusion 방법을 이용하여, BPH의 농도별 세균 성장 저해능을 측정한 결과, BPH의 항균력은 control로 사용한 항생제 erythromycin에 비해 낮았으나, saline에 비하여 유의하게 높았으며, 농도가 높을수록 항균력이 증가하였다.
3. BPH를 처리한 액상배지에서 *Propionibacterium acnes*를 배양한 뒤 *P. acnes*의 성장 억제 정도를 관찰한 결과, 25% BPH에서 세균의 성장이 대조군에 비하여 10% 이상 감소하였다.
4. THP-1에 *P. acnes*를 첨가하고 BPH를 처리한 후 TNF- α 와 IL-8의 함량을 측정한 결과, BPH의 농도에 의존적으로 TNF- α 와 IL-8의 함량이 모두 유의하게 감소하였다.
5. BPH의 농도가 높을수록 높은 DPPH 소거능을 나타내었다.
6. BPH의 농도가 증가할수록 지질과산화의 생성 억제 정도가 증가하였다.

이상의 결과에서, BPH가 항균, 소염, 항산화 작용이 있음을 확인하였다.

References

1. Tao HJ. Mingyibieli. Beijing : Renminweishengchubanshe, 1986 : 18.
2. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China. Zhonghuabencao. Vol. 4. Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : (2) 293-308, 431-6, (5) 883-8, 976-83, 986-990.
3. Shang ZJ. Xinxubencao. Anhui : Kexuejishuchubanshe, 1981 : 301-2, 360.
4. Jiangsuxinyixueyuan. Zhongyaodacidian. Shanghai : Shanghai Kexuejishuchubanshe, 1979 : 1252, 2591-2.
5. Zhongguoyixuekexueyuan. Zhongyaozhi. Beijing : Renminweishengchubanshe, 1994 : 626-32.

6. Nanjingyaoxueyuan, Yaocaixue, Beijing : Renminweishengchubanshe, 1960 : 307.
7. Quanguozhongcaoyaohui bianbianxiezhu, Quanguozhongcaoyaohui bian, Beijing : Renminweishengchubanshe, 1983 : 625-6.
8. Evance CR, Halliwell B, Lunt GG. Free radicals and oxidative stress : environment, drugs and food additives. London : Portland Press, 1995 : 1-31.
9. Sözmen EY, Tanyalçin T, Onat T, Kutay F, Erlaçin S. Ethanol induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1994 ; 32(10) : 741-4.
10. Chen GT. Bencaogangmutongshi. Beijing : xueyuanchubanshe, 1992 : 1567-71.
11. Lee WC. Hankuksikmulmyungko. Seoul : Academyseojeok, 1996 : 120-1.
12. Wu Y. Rihua zibencao. Hefei : Anhui kexue jishu chubanshe, 2005 : 146.
13. PMSLite. Phytonutrient Profile of Tribulus (Tribulus Terrestris), India Herbs - Ancient Remedies For Modern Times, Available from: http://www.pmslite.com/plant_phytochemistry.htm?plantid=2053, Accessed 27 Dec, 2008.
14. Korea Food & Drug Administration. The Korean Pharmacopoeia, 10th Edition, Chungwon : KFDA, 2014 : 1122, 1142, 1203.
15. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY, Boncho-Hak. Seoul : Young-Lim Press, 2007 : 629-31.
16. Korea Food & Drug Administration. The Korean herbal pharmacopoeia 4th. Chungwon : KFDA, 2013 : 31.
17. Webster GF, Leyden JJ, Norman ME, Nilsson UR. Complement activation in acne vulgaris: in vitro studies with *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum*. Infect Immun, 1978 ; 22(2) : 523-9.
18. Kim J. Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. Dermatology, 2005 ; 211(3) : 193-8.
19. Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Strauss JS. Essential fatty acids and acne. J Am Acad Dermatol, 1986 ; 14 : 221-5.
20. Webster GF, Leyden JJ, Tsai CC, Baehni P, McArthur WP. Polymorphonuclear leukocyte lysosomal release in response to *Propionibacterium acnes* in vitro and its enhancement by sera from inflammatory acne patients. J Invest Dermatol, 1980 ; 74(6) : 398-401.
21. Im DY. Yakrihak. Seoul : Shinilbukseu, 2006 : 373-4.
22. Park J, Lee J, Jung E, Park Y, Kim K, Park B, Jung K, Park E, Kim J, Park D. In vitro antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp. Eur J Pharmacol, 2004 ; 496 : 189-95.
23. Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. Ann N Y Acad Sci, 1990 ; 587 : 325-31.
24. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. Crit Care Med, 1993 ; 21 : S423-35.
25. Vowels BR, Yang S, Leyden JJ. Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes*: implications for chronic inflammatory acne. Infect Immun, 1995 ; 63(8) : 3158-65.
26. Hurtado-Nedelec M, Chollet-Martin S, Nicaise-Roland P, Grootenboer-Mignot S, Ruimy R, Meyer O, Hayem G. Characterization of the immune response in the synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteitis (SAPHO) syndrome. Rheumatology (Oxford), 2008 ; 47(8) : 1160-7.
27. Harman D. The free radical theory of aging : In free radicals in Biology . Vol 5. New York : Academic Press, 1982 : 255-75.
28. Feher J, Csomos G, Vereckei A. The free radical theory of aging. Free radicals reactions in medicine. Berlin: Springer-Verlag, 1987 : 57-9.
29. Heicklen J, Brown E. Increase in life expectancy for mice fed diethylhydroxylamine(DEHA). J Gerontol, 1987 ; 42(6) : 674-80.
30. Oyanagui Y. SOD and active oxygen modulator. Tokyo : Nihon Jgakukan, 1989 : 17-36.
31. Kellogg EW 3rd, Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. J Biol Chem, 1977 ; 252(19) : 6721-8.
32. Halliwell B, Gutteridge JCM. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford : Clarendon Press, 1989 : 228-33.