

# 용담초 추출물의 화장품 소재로서 약리활성에 관한 연구

최형욱<sup>1</sup> · 인명희<sup>1</sup> · 문연자<sup>1,2</sup> · 임규상<sup>1,3</sup> · 우원홍<sup>3,4\*</sup>

1: 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 2: 원광대학교 한의학전문대학원 BK21-plus팀, 3: 한국전통의학연구소, 4: 한의과대학 해부학교실

## Study on Pharmacological Activation as Cosmetic Material of *Gentianae scabrae bunge* Extract

Hyung Wook Choi<sup>1</sup>, Myung Hee In<sup>1</sup>, Yeun Ja Mun<sup>1,2</sup>, Kyu Sang Lim<sup>1,3</sup>, Won Hong Woo<sup>3,4\*</sup>

1: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University,

2: BK21-plus Team, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University,

3: Research Center of Traditional Korean Medicine,

4: Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang University

In this study, we investigated the effect of ethanol extracts from *Gentianae scabrae bunge* (GSB) on the activities of antioxidant, whitening and anti-inflammation. Viability of cells was measured by neutral red (NR) assay, and inhibitory effects of GSB on melanin synthesis was determined the melanin production in B16F10 cells. The expression level of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in media was analyzed by ELISA kit, and nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells was monitored by measuring the nitrite content in culture medium. GSB showed highly efficacy in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, and significantly reduced melanin synthesis in B16F10 cells. MMP-1 production in UVB-stimulated human dermal fibroblast (HDF) cells was inhibited by GSB treatments. NO production was suppressed by the treatment of GSB in LPS-stimulated RAW264.7 cells. From this results, it was indicated that GSB could be utilized as anti-aging and whitening cosmetic ingredients.

keywords : *Gentianae scabrae bunge*, antioxidant, melanin, MMP-1, nitric oxide

### 서 론

건강하고 아름다운 피부에 대한 관심이 증가함에 따라 각종 생약과 식물성 추출물 등에서 보다 안전하고 효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위해 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>1,2)</sup>. 피부는 표피, 진피, 피하지방으로 구성되어 있으며 표피층에는 각질 형성세포, 멜라닌세포, 랑게한스세포, 머켈세포 등이 존재한다. 이 중 멜라닌세포는 표피의 기저층에 존재하여 멜라닌을 생성하며 피부색과 연관되어 있다<sup>3)</sup>. 멜라닌은 외부 환경으로부터 피부세포를 보호해 주는 역할을 하지만 자외선 노출 및 피부노화로 인해 생리 기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나 피부표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 형성하고 심하게는 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>.

피부의 진피층에는 collagen과 elastin 섬유가 그물망 구조를 형성하고 있는데, elastin과 collagen이 elastase와 collagenase에 의해 분해되면 피부가 처지고 주름이 생겨 피부 노화가 발생한다<sup>5)</sup>.

이러한 피부 노화와 색소 병변의 주요 원인이 지속적인 자외선 노출로 생성된 과잉 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 스트레스로 밝혀짐에 따라 피부노화를 지연시키고 억제하기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서의 과잉 활성 산소종을 억제하고 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있는 항산화 방어 시스템이 필요하다<sup>6)</sup>.

용담초(*Gentiana scabra* Bunge)는 다년생 초본으로 초용담(草龍膽), 지담초(地膽草) 등 여러 가지 이름으로 불리고 있으며 맛은 쓰고 성질은 차다. 간경, 담경, 위경에 작용하며 한방에서 사용되는 뿌리의 성미(性味)는 고한(苦寒)으로 간담의 열과 위열을 내리고 하초의 습열을 없앤다<sup>7)</sup>. 용담초의 성분은 gentiopicrin으로 이는 secoiridoidal glycosides에 속하며 기타 고미 배당체로는 sweroside, swertiamarin, amarogentin, amaroswerin 등이 있다. 또한 용담초는 gentianine을 비롯한 여러 종류의 알칼로이드를 함유하고 있으며 약리작용으로는 항균, 항기생충 작용, 소염 작용, 면역증강 작용, 간기능 보호 작용, 이담 작용 등이 있다<sup>7-9)</sup>.

\* Corresponding author

Won Hong Woo, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-dong, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : whwoo@wku.ac.kr Tel : +82-63-850-6845

Received : 2015/03/16 Revised : 2015/04/15 Accepted : 2015/04/23

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.06.29.3.223>

Available online at [http://society.kisti.re.kr/sv/SV\\_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13](http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13)

용담초에 대한 연구에서 서<sup>9)</sup>는 용담초 추출물의 항산화 효과를 입증하였고, 김<sup>10)</sup>은 용담초 메탄올 추출물이 염증질환, 면역질환의 조절에 효과가 있다고 하였다. 또한 한<sup>11)</sup>은 CCl<sub>4</sub>흰쥐의 손상된 간에 용담초 약침을 처치하여 회복시키는 효과를 입증하였고, 문<sup>12)</sup>은 용담초 약침을 담석의 치료에 응용할 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 RAW264.7 세포, B16/F10 멜라닌세포주 및 사람피부섬유아세포 (human dermal fibroblast, HDF)를 이용하여 용담초 추출물이 독성실험, 항산화, 항염, 멜라닌 및 콜라겐 생성에 미치는 영향을 비교 분석하여 천연화장품으로서 용담초의 사용 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 추출

용담초는 시료 중량에 10배의 95% 에탄올을 가하여 상온에서 72시간 방치하고 그 추출액을 9,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 여과지 (Whatman No. 2)로 여과한 후 필터링한 다음 감압농축하여 3일 동결 건조한 후 그 분말을 본 실험에 사용하였다.

### 2. 세포배양

한국 세포주 은행 (Korea)에서 분양받은 RAW264.7 macrophage 세포, B16/F10 mouse melanoma 세포, human dermal fibroblast (HDF) 세포는 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 3. 항산화 활성 측정

(1) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼은 매우 안정한 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)이며, 이 라디칼을 소거하는 정도를 항산화 작용을 평가할 수 있으며 라디칼 소거활성은 Blois의 방법으로 측정하였다<sup>13)</sup>. 용담초 메탄올 추출물을 10 ~ 50 µg/mL의 농도로 용해시킨 후 96 well plate에 0.2 mM로 용해시킨 DPPH 용액 180 µL와 시료액 20 µL 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준물질은 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성(\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{\text{시료첨가군흡광도}}{\text{시료무첨가군흡광도}} \right) \times 100 \right]$$

### (2) Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정

SOD 유사 활성은 Marklund와 Marklund의 방법<sup>14)</sup>에 따라 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 전환반응을 촉매시키는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사 활성으로 나타내었다. 일정 농도의 시료 0.2 mL에 pH 8.5 Tris-HCl buffer (50 mM tris-hydroxymethyl amino methane + 10 mM EDTA) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 첨가하고 실온에서 20분간 반응시킨 후 1 N HCl 0.1 mL를

가하여 반응을 정지시켰다. 반응액이 중화된 pyrogallol 양은 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가군과 무첨가군 간의 흡광도 차이를 백분율로 표시하였다.

$$\text{SOD 유사활성(\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{\text{시료첨가군흡광도}}{\text{시료무첨가군흡광도}} \right) \times 100 \right]$$

### 4. 세포 생존율 측정

실험에서 사용된 시료의 세포 독성을 나타내는 농도 범위는 neutral red (NR) assay를 이용하여 확인하였다<sup>15)</sup>. 연구에 사용한 세포주는 RAW264.7, B16/F10, HDF 세포를 사용하였으며, 96 well plate에 well 당 3×10<sup>4</sup>세포로 분주하여 24시간 동안 전 배양하였다. 세포에 용담초를 농도별로 첨가하고 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포는 배양액을 NR solution이 1% 포함된 무혈청 배지로 교환하여 3시간 배양한 다음 현미경으로 NR의 결정화 유무를 확인하였다. Formaldehyde 용액 10%가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100 µL로 20분 처리하여 세포를 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 µL 분주하여 세포내의 NR을 추출하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료첨가군흡광도}}{\text{시료무첨가군흡광도}} \times 100$$

### 5. Melanin 생성 억제능 측정

B16/F10 melanoma 세포를 이용하여 용담초의 멜라닌 생성 억제능을 측정하였다<sup>16)</sup>. 96 well plate에 B16/F10 세포를 2×10<sup>5</sup>/well로 분주하고, 세포가 바닥에 부착할 수 있도록 24시간 동안 전 배양하였다. 세포 부착 확인 후 melanin 생성을 촉진하기 위하여 혈청 5%와 α-MSH 10 nM이 포함된 배지로 교환 후, 시료를 각 농도별로 처리하였다. 양성 대조군 arbutin을 배양용 배지에 용해하여 사용하였으며, 분비된 멜라닌의 양은 405 nm에서 측정하였고 멜라닌 생성량을 α-MSH 무처리군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

### 6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

용담초 추출물이 HDF 세포에서 MMP-1 생성에 미치는 영향을 확인하고자 ELISA 방법을 이용하였다. 먼저 HDF 세포를 96 well plate에 2×10<sup>5</sup>/well로 부착한 후 UVB 25 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사한 다음 용담초 추출물을 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/mL로 처리하였다. 24시간 후 배양 상층액을 제거한 후 washing buffer (Tween 20 in PBS)로 3번 세척하였다. Blocking buffer (0.1% BSA in PBS) 100 µL로 처리한 후 37°C에서 1시간 배양시킨 다음 상층액을 제거하고 washing buffer (Tween 20 in PBS)로 3번 세척하였다. 1:1000으로 희석한 일차항체 (anti-MMP-1 mouse antibody in 0.1% BSA/well) 50 µL로 처리한 후 37°C에서 1시간 배양시킨 다음 상층액을 제거한 후 washing buffer (Tween 20 in PBS)로 3번 세척하였다. 1:4000으로 희석한 이차항체 (anti-mouse IgG antibody in

0.1 % BSA/well) 50  $\mu$ L로 처리한 후 37°C에서 1시간 배양시킨 다음 상층액을 제거한 후 washing buffer (Tween 20 in PBS)로 5번 세척하였다. 1 mg/mL의 농도로 녹인 para-nitrophenylphosphate (pNPP) 100  $\mu$ L를 각 well당 처리한 후 37°C 암실에서 1시간 배양시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Nitric oxide (NO) 생성 저해능 측정

용담초 추출물이 RAW264.7 세포 배양에서 NO 생성에 미치는 영향을 측정하기 위해 Green 등의 방법<sup>17)</sup>에 따라 세포배양액 내 NO 양을 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)와 nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 형태로 측정하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 5×10<sup>4</sup>/well로 분주하고 24시간 동안 전배양 후 배지를 제거하고 LPS가 1  $\mu$ g/mL이 포함된 무혈청 배지에 용담초를 각 농도별로 가하여 48시간 동안 후배양하였다. 새로운 96 well plate에 배양된 세포 배양 상층액 100  $\mu$ L와 Griess reagent 100  $\mu$ L를 첨가하여 차광된 상태에서 10분간 반응시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 LPS 처리군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

$$\text{NO 생성 저해능(\%)} = 100 - \frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540nm}} \times 100$$

8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 분석 수치는 Mean  $\pm$  S.D로 표시하였고 SPSS (Statistical Package for the Social Science) WIN 17.0 프로그램을 이용하였으며 통계분석은 ANOVA Test에 의해 분석하였다. 통계적 유의성은 \*p<0.01, \*\*(#)#p<0.001로 표기하여 유의성의 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 항산화 활성

1) DPPH radical 소거능

항산화제는 보라빛의 DPPH 라디칼 (DPPH<sup>-</sup>)을 무색(DPPH-H)의 형태로 전환시키는데 용담초 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH라디칼 소거능을 측정하였다. 본 실험에서 DPPH를 이용한 free-radical 소거 활성을 측정한 결과 10 $\mu$ g의 농도로 용담초 추출물을 처리 하였을 때는 크게 변화가 보이지 않았으나 50 $\mu$ g 농도에서는 55%의 높은 DPPH radical 소거능을 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 따라서 본 실험에서는 고농도 용담초 추출물을 처리하였을 경우 DPPH radical 소거능이 높게 나오는 것을 확인할 수 있었다.

2) SOD 유사 활성

SOD는 생체에 매우 유해한 peroxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 반응하여 hydrogen peroxide (2O<sub>2</sub><sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 생성하는 효소로써 산소를 운반하는 모든 생물 종에 존재하며, 생체 내에서 활성산소 장애에 대한 방어작용을 하는 대표적인 활성 산소 저해제이다<sup>18)</sup>. SOD에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 peroxidase나 catalase에 의해 무해한 물 분자와 산소분자로 전환 된다<sup>19)</sup>. 이러한 SOD와 유사한 역할을 하는 superoxide anion의 활성화 억제능을 알아보기 위하여 실험

한 결과 SOD 유사 활성 변화는 용담초 추출물의 농도가 올라 갈수록 농도 의존적으로 활성이 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 2).

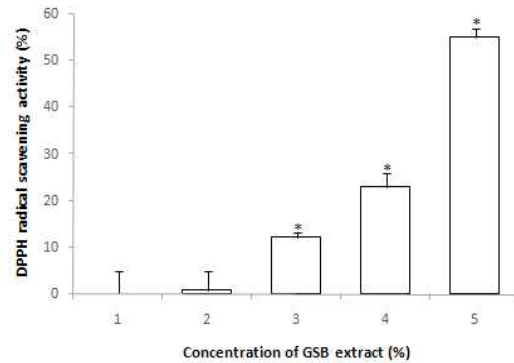


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of GSB extract. DPPH radical scavenging activity was measured as described in materials and methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*p<0.01 compared with ascorbic acid.

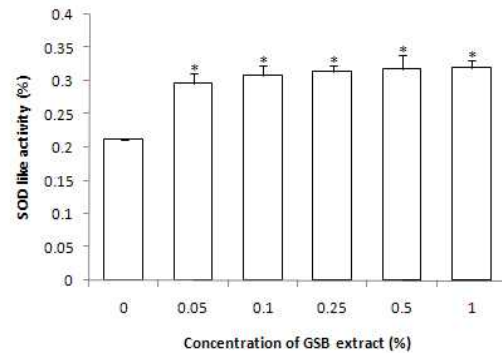


Fig. 2. SOD-like activity of GSB extract. SOD-like activity was measured as described in materials and methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. \*p<0.01 compared with control.

2. 멜라닌 생성 억제 효과

피부색은 표피에 존재하는 색소 세포인 멜라닌세포에서 생성하는 멜라닌 색소의 양, 분포, 혈류의 흐름에 영향을 받게 된다. 피부에서 색소 침착의 정도는 멜라닌 지수로 평가될 수 있으며, 피부 표면의 멜라닌 수치는 안면피부의 색소 침착 형태, 자외선에 대한 민감도 등을 파악하는데 주요한 평가 지표가 된다. 본 실험에서는 용담초 추출물의 멜라닌 형성에 미치는 영향을 평가하기 위한 전 단계로 B16/F10 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 B16/F10 세포에 용담초 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 NR assay를 수행하였다. 실험 결과 거의 모든 농도에서 세포 생존율이 100% 이상 나타나 세포 독성이 없는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 3A).

용담초 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 B16/F10 세포에 멜라닌세포 자극호르몬( $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone,  $\alpha$ -MSH) 10 nM을 처리하여 멜라닌생성을 유도하고 동시에 용담초 추출물 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ g/mL의 농도로 처리한 후 멜라닌 생성량을 비교하였다. 실험 결과  $\alpha$ -MSH 단독 처리 한 경우 멜라닌 함량이 대조군에 비하여 뚜렷하게 증가하

는 것을 확인 할 수 있었으며, 용담초 추출물을 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 멜라닌 생성이 62% 억제되었다(Fig. 3B).

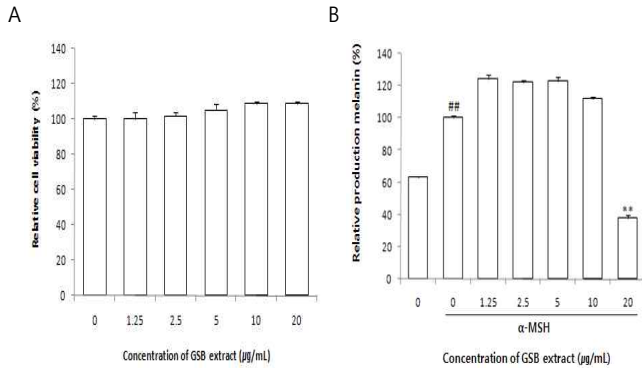


Fig. 3. Effect of GSB extract on melanin production in B16/F10 cells stimulated with  $\alpha$ -MSH. B16/F10 cells were plated at  $3 \times 10^4$  cells/well and incubated in media containing from 1.25 to 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay (a). Effect on melanin production was tested with various doses of GSB extract and  $\alpha$ -MSH (b). The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ## $p < 0.001$  compared with control, and \*\* $p < 0.001$  compared with  $\alpha$ -MSH treated group.

### 3. MMP-1 발현 억제능

MMP-1은 세포외 기질을 분해시키는 단백질이며, 과도하게 활성화되면 MMP의 생성을 억제하는 tissue inhibitor of MMPs (TIMP)가 발현되어 서로 상호작용에 의해 조절되고 있다<sup>20</sup>). 이러한 MMPs의 발현과 활성이 증가하게 되면 collagen 분해를 촉진시켜 피부노화를 일으키는 중요한 원인이 된다. 본 실험에서는 용담초 추출물이 MMP-1의 생성 변화에 미치는 영향을 알아보기 위한 전 단계로 HDF 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 HDF 세포에 용담초 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 NR assay를 수행하였다. 실험 결과 모든 농도에서 세포생존율이 95% 이상으로 나타났다(Fig. 4A).

용담초 추출물이 MMP-1의 생성 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 용담초 추출물을 HDF세포에 24시간 동안 처리한 후 배양 상층액을 취하여 ELISA 방법으로 MMP-1 함량을 측정하였다. UVB 25  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ 를 조사한 HDF 세포에 용담초 추출물을 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 결과, 용담초 추출물 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 농도 의존적으로 MMP-1 발현을 억제하였다(Fig. 4B).

### 4. NO 생성 억제 효과

용담초 추출물의 NO 생성에 미치는 영향을 평가하기 위한 전 단계로 RAW264.7 세포에 대한 독성을 확인하기 위해 RAW264.7 세포에 용담초 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 NR assay를 수행하였다. 실험 결과 용담초 추출물을 5-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하였을 때, 대체로 90% 이상의 생존율을 유지하였다. 그러나 농도가 50-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 세포의 생존율이 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 따라서 향후 실험은 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이내에서 실시하였다(Fig. 5A).

용담초 추출물을 이용하여 RAW264.7 cell에서 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는지의 여부를 평가 한 결과 용담초

추출물 1.25, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때, LPS 처리군에 비해 농도 의존적으로 NO 생성이 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 5B).

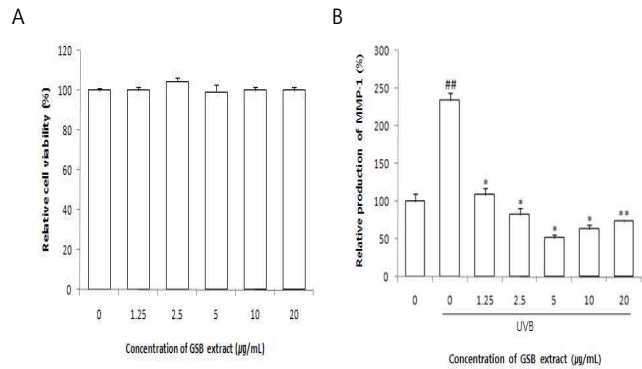


Fig. 4. Effect of GSB extract on MMP-1 production in UVB-irradiated HDF cells. HDF cells were plated at  $3 \times 10^4$  cells/well and incubated in media containing from 1.25 to 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay (a). HDF cells were pretreated with GSB followed by UVB irradiation (25  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ). MMP-1 production was measured by ELISA assay as described in materials and methods (b). The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ## $p < 0.001$  compared with control, and \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  compared with the UVB-irradiated group.

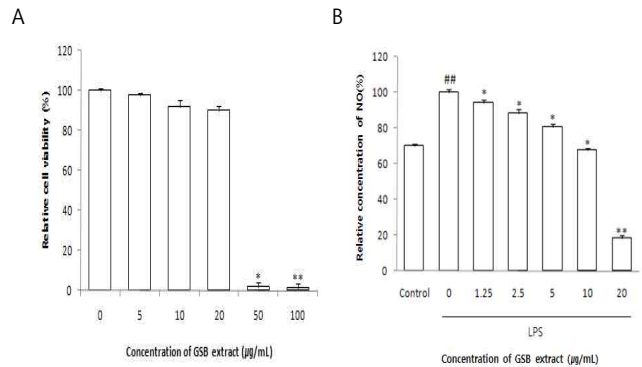


Fig. 5. Effect of GSB extract on NO production in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were plated at  $3 \times 10^4$  cells/well and incubated in media containing from 5 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 48 hours. Cell viability was measured by MTT assay (a). RAW264.7 cells were treated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and combined with GSB for 48h. Nitrite was measured by Griess reagent (b). The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ## $p < 0.001$  compared with control, and \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  compared with LPS treated group.

## 고 찰

피부는 신체의 생리적 시스템과 환경 사이의 장벽을 구성하는 기관으로 끊임없이 환경적 스트레스에 노출되고, 이로 인해 피부 건조, 주름, 어두운 피부톤 등이 나타날 수 있으며, 대표적 환경 자극인 자외선의 유해한 영향으로 인한 화학적 노화가 자연적 노화와 함께 피부의 노화를 촉진 시킨다<sup>21</sup>). 피부가 노화되면 여러 가지 대사 활성이 저하되고 세포활성도 떨어지게 되는데 이로 인해 피부가 건조해지고 진피내의 기질 단백질이 결핍되어 피부가 얇아지며 탄력이 떨어져 주름이 생기게 된다. 주름의 생성은 여러 가지 원인이 있으나 나이의 증가와 환경적 요인 외에 근육의 분포와 움직임 등

결합조직 섬유의 손상과도 연관성이 있으며 그밖에 유전적 요인과 estrogen 등의 호르몬에 의해 영향을 받는다<sup>22)</sup>.

항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 해로운 활성 산소를 과산화수소수로 전환시키는 촉매작용을 하는 효소로<sup>23)</sup>, 생체 내에서 생성된 활성 산소는 체내에서 산화적 장애를 초래하게 된다. SOD 유사활성 물질은 주로 phytochemical에 속하는 저분자 물질이 SOD와 유사한 역할을 하여 superoxide의 반응성을 억제하여 superoxide로부터 생체를 보호한다고 보고되어 있다. 따라서 SOD 유사활성을 갖는 물질은 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 노화 억제와 더불어 산화적 장애를 방어할 수 있다<sup>24)</sup>.

본 실험에서 용담초 추출물이 항산화 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 항산화 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며 DPPH radical 소거능에서는 10 µg/ml의 용담초 추출물을 처리 하였을 때는 크게 변화가 보이지 않았으나 50 µg/ml 농도에서는 55%의 높은 DPPH radical 소거능을 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

멜라닌은 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌세포내의 melanosome에서 다양한 효소에 의해 생성된다. 색소 세포인 멜라닌은 외부 환경으로부터 피부세포를 보호해 주는 역할을 하지만 자외선 노출 및 피부노화로 인해 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나 피부표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 형성하고 심하게는 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. 본 실험에서 용담초 에탄올 추출물이 melanin 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 용담초 추출물 20 µg/mL 농도에서 멜라닌 생성이 62% 억제된 것으로 나타났다.

피부의 결합조직은 collagen과 elastin에 의해 이루어지며 노화로 인해 피부가 약해지거나 반복적인 자외선의 노출은 어두운 피부톤과 피부에 metalloproteinases (MMPS)를 증가시키고 MMPs는 피부의 collagen을 분해하며 이런 현상의 반복으로 인해 피부주름이 가속화 된다<sup>22)</sup>. MMP-1은 세포의 기질을 분해시키는 중요한 단백질이며, 과도하게 활성화되면 MMP의 활성을 억제하는 tissue inhibitor of MMPs (TIMP)가 발현되어 서로 상호작용에 의해 조절된다<sup>20)</sup>. 이러한 MMPs의 발현과 활성이 증가하게 되면 collagen 분해를 촉진시켜 피부노화를 일으키는 중요한 원인이 되며<sup>26)</sup> 이러한 단백질 가수분해물로부터 얻어진 펩타이드가 주름 개선, 보습 증진, 탄력 증가와 특정 피부 효능 소재로 활용되고 있으며, 대표적인 것이 콜라겐 가수분해물이다<sup>27,28)</sup>. 본 실험에서 MMP-1 활성 변화에 미치는 영향을 조사한 결과 HDF세포에 UVB를 조사하면 MMP-1 활성이 크게 증가하였고 용담초 추출물을 첨가하면 이들의 활성이 감소하는 것으로 나타났다.

용담은 secoroid 배당체를 함유하고 있는 식물로서, 용담이 가지는 항염증 효과에 관한 것으로는 *Gentiana scabra* Bunge에서 분리된 5-(hydroxymethyl)-2-furfural 가 LPS로 활성화시킨 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로 NO생성을 저하시킨다는 것을 확인하였으며 gentiopicoside가 carrageenin으로 유발시킨 흰쥐 족적 부종시험에 있어서 항염증 효과가 있고<sup>29,30)</sup> 한방에서는 용담이 가지는 차가운 성질로 인하여 열을 내리고 염증을 억제하는 작용이 있으며, 위와 장의 운동기능을 향진시키고 소화액의 분비를 촉진하는 성질이 있는 것<sup>31)</sup>으로 보고되었다.

염증반응이란 체내에 외부로부터 물리적, 화학적 자극이나 세균 감염에 대해 면역세포가 이를 인지하여 다양한 염증 매개 물질을 분비함으로써 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다<sup>32)</sup>. 그러나 지속적으로 또는 과도하게 발생된 만성 염증반응은 조직의 손상을 유발하며 이와 관련한 ROS와 염증성 cytokine은 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 매개체로써 중요한 역할을 한다<sup>33)</sup>. Nitric oxide (NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈액응고, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 여러 조직과 세포에서 Larginine으로부터 Nitric Oxide Synthase (NOS)에 의해 생성된다<sup>34)</sup>. 또한 NO가 혈관 투과성 증가, 부종 등 염증반응을 야기하거나 cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜 prostaglandin 등의 생합성을 촉진하여 염증반응을 심화시키는 것으로 나타난다<sup>35-38)</sup>. NO는 신경계, 면역계, 심장혈관계에 있어서 중요한 전달물질로 신경독성 및 신경보호성의 기능을 동시에 나타내며 쇼크와 다른 신경 퇴행성 질병의 발생에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>39,40)</sup>.

본 실험에서 용담초 추출물이 RAW264.7 cell에서 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는지의 여부를 평가 한 결과 용담초 추출물 20 µg/mL의 농도에서 NO 생성이 80% 이상 억제되는 것으로 나타나 항염 작용이 매우 우수한 것으로 나타났다.

## 결 론

용담초 에탄올 추출물의 항산화, 항염증, 멜라닌 및 콜라겐 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW264.7 세포, B16/F10 세포, HDF 세포들을 활용하여 세포독성과 세포내 NO (Nitric Oxide) 생성량을 측정하였고, 세포내 멜라닌 생성 억제 실험과 MMP-1 발현 변화 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

용담초 에탄올 추출물은 DPPH radical 소거능과 SOD 유사 활성이 농도 의존적으로 높게 나타났으며 20 µg/mL 농도에서 RAW264.7 세포, B16/F10 세포와 HDF 세포의 생존율은 90% 이상 나타나 세포 독성이 없는 것을 확인하였다. 용담초 에탄올 추출물은 B16/F10 세포의 melanin 생성을 유의하게 감소시켰으며 HDF 세포에서 MMP-1 발현을 억제하였고 RAW264.7 세포에서 NO 생성을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과 용담초 추출물은 본 실험에서 다양한 세포에 대해 독성을 나타내지 않았으며 항산화, 멜라닌 및 콜라겐 생성 효능 및 항염 효능을 가지고 있는 것으로 보아 기능성 소재로서의 활용성이 있을 것이라 사료된다.

## References

1. Lim, D.K., Choi, U., Shin, D.H. Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28(1):83-89, 1996.
2. Kim, H.K., Kim, Y.E., Do, J.R., Lee, Y.C., Lee, B.Y. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27(1):80-85, 1995.

3. Kang, T.C., Go, J.S., Kwon, O.Y., Gi, Y.G., Kim, K.Y. Human histology. Seoul. Ko Moon Sa. 7: 263, 2012.
4. Kubo, M., Matsuda, H. Development studies of cuticle and medicinal drug from natural sources on melanin biosynthesis. *Fragrance J.* 8: 48-55, 1995.
5. Do, J.R., Baek, S.Y., Im, S.D., Kim, Y.M., Kim, I.H., Han, D.S., Kim, B.S. Selection of beauty material from Fruits and Vegetables. *J Kor Soc Food Sci. Nutr.* 10: 248-248, 2008.
6. Ryu, I.S., Lee, S.J., Lee, S.W., Mun, Y.J., Woo, W.H., Kim, Y.M., Lee, J.C., Lim, K.S. Dermal Bioactive Properties of the Ethanol Extract from Flowers of *Lespedeza bicolor*. *J Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology.* 20(2):1-9, 2007.
7. Kim, H.C. Pharmacology for Herbal Medicine. *Jipmoondang.* pp 140-141, 2008.
8. Lee, H.J., Jang, M.Y., Kim, M.R., Bae, K.H., Sok, D.E. Screening of Inhibitor of Thyroid Peroxidase, and Oxidative Coupling Enzyme from Natural Products. *43(3):334-341, 1999.*
9. Seo, J.W. The anti-oxidative activities and separation of the *Gentiana scabra* var. *buergeri* extracts. Wonkwang University. 2008.
10. Kim, M.S., Kim, S.C., Jee, S.Y., Hwang, S.Y., Cho, W.J., Lee, J.R., Park, S.J. Inhibitory effect of *Gentianae Radix* MeOH extract on pro-inflammatory mediator production in lipopolysaccharide activated Raw264.7 cells. *J Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology.* 21(1):28-38, 2008.
11. Han, S.W. Effects of Aqua - acupuncture with *Gentianae scabrae Radix* and *Bupleuri Radix* Extract on Serum Activities of GOT, GPT, LDH, ALP and r-GTP in Damaged Rat Liver induced by the Carbon Tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). *The Acupuncture.* 10(1):297-313, 1993.
12. Moon, S.H., Park, D.S., An, B.C. Effects of G.S.R. Aqua - acupuncture by Density Gallstone Formation in Mice. *J Kor Acupuncture & Moxibustion Soc.* 8(1):141-156, 1991.
13. Blois, M.S. Anti oxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature.* 18: 1199-1120, 1958.
14. Marklund, S., Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 47(3):469-474, 1974.
15. Borenfreund, E., Puerner, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 24(2-3):119-124, 1984.
16. Lim, H.W., Yoon, M.Y., Cha, S.B., Kim, K.W., Park, Y.K., Lee, J.Y. Effects of citrus essential oils melanin production in B16 melanoma cell. *J Yakhak Hoeji.* 47: 15-30, 2003.
17. Green strok, C.L. Radiation and aging free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med Hypotheses.* 41(5):473-482, 1993.
18. Kim, K.H. A Study on the Application of Cosmetic Materials using Antioxidant Activity of the Extracts from *Castanea crenata* Leaf. Daegu Haany University. 2011.
19. Pryor, W.A. Oxy-radicals and related species their formation life-time and reactions. *Annu Rev Physiol.* 48: 657-667, 1986.
20. Homebeck, W. Downregulation of tissue inhibitor of matrix metallo protease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *J Pathol Biol.* 51(10):569, 2003.
21. Papa, S., Skulachev, V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biol.* 17(1-2):305-319, 1997.
22. W. laschej, M., Brivib, K., Stricjlin, G.P., Sies, H., Scharffetter-Kochanek K. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J.Invest.Dermatol.* 104(2):194-198, 1995.
23. Jang, M.J. Studies on anti-oxidant of *Pinus rigida* inner bark for the development of functional cosmetics. Daegu Haany University, 2007.
24. Kitani, K., Minami, C., Yamamoto, T., Kanai, S., Ivy, G.O., Carrillo, M.C. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: potentials of propargylamines for human use. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 959: 295-307, 2002.
25. Kubo, M., Matsuda, H. Development studies of cuticle and medicinal drug from natural sources on melanin biosynthesis. *Fragrance J.* 8: 48-55, 1995.
26. Do, J.R., Baek, S.Y., Im, S.D., Kim, Y.M., Kim, I.H., Han, D.S., Kim, B.S. Selection of beauty material from Fruits and Vegetables. *J Kor Soc Food Sci. Nutr.* 10: 248-248, 2008.
27. Lee, S.J. Novel natural products as active material for beauty food. *Food Sci Ind.* 40: 10-18, 2008.
28. Zague, V. A new view concerning the effects of collagen hydroly- sate intake on skin properties. *Arch Dermatol Res.* 300: 479-483, 2008.
29. Kim, N.Y., Kang, T.H., Kim, D.H., Kim, Y.C. Anitric oxide synthesis inhibitor from the roots of *Gentiana scabra* in RAW 264.7 cells. *J Kor Pharmacogn.* 30(2):173-176, 1999.

30. Zhu, Y.P. Harwood academic publishers. Amsterdam, Chin. Mat. Med. pp 146-149, 1998.
31. Huh, H., Kim, H.K., Lee, H.K. PAF antagonistic activity of 2-hydroxy -3-methoxybenzoic acid glucose ester from *Genyiana scabra*. Arch Pharm. 21(4):436-439, 1988.
32. Willoughby, D.A. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. Ann Rheum Dis. 34: 471-478, 1975.
33. Chung, E.K., Seo, E.H., Park, J.H., Shim, J.H., Kim, K.H., Lee, B.R. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. Korean J Organic Agric. 2: 245-253, 2011.
34. Garthwaite, J. New insight into the functioning of nitric oxidereceptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. Mol. Cell Biochem. 334: 221-232, 2010.
35. Förstermann, U., Sessa, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur. Heart J. 33: 829-837, 2012.
36. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J. 357: 593-615, 2001.
37. Andrew, P.J., Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovasc. Res. 43: 521-531, 1999.
38. De Cruz, S.J., Kenyon, N.J., Sandrock, C.E. Bench-to-bedside review: the role of nitric oxide in sepsis. Expert Rev. Respir. Med. 3: 511-521, 2009.
39. Nathan, C.F., Hibbs, H.B. Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol. 3(1):65-70, 1991.
40. Lee, B.H., Baik, D.S., Yun, S.U., Shin, J.M., Kim, J.H., Yun, S.Y., Kim, B.H., Kim, S.B., Shin, J.E., Song, I.H. Peripheral nitric oxide activity in patients with Liver cirrhosis. The Korean Journal of Medicine. 73(3):251-257, 2007.