

한약재 복합 추출물의 항산화, 항균 및 항염 효과

이인철[#], 김미경^{*}

서원대학교 화장품과학과

Antioxidant, Antimicrobial and Anti-inflammatory of Mixed Medicinal Herb Extract

In-Chul Lee[#], Mee-Kyung Kim^{*}

Department of Cosmetic Science & Technology, Seowon University

ABSTRACT

Objectives : This paper aimed to verify the applicability of mixed extract of *Angelica gigas* Nakai, *Cnidium officinale* Makino, *Paeonia officinalis* Pall, *Rehmannia glutinosa* Libosch, *Scutellaria baicalensis* Georgi, which were prescribed for improving inflammation in Donguibogam, as the materials for beauty food and functional medicinal herb cosmetics by manufacturing such mixed extract and evaluating the biological activity of the extract.

Methods : The mixed medicinal herb water extract(MMW) and ethanol extract(MME) were freeze-dried to be used as the specimen. We performed electron donating ability, lipid acidification inhibitory activity, anti-inflammatory activity against skin flora, MTT assay, NO inhibitory activity and the protein expression inhibitory activity of iNOS and COX-2.

Results : For anti-oxidation experimentation, the electron donating abilities of MMW and MME were above 60.0% and 90.0% at 500 µg/ml, respectively. In the inhibition rate of lipid peroxidation, MMW and MME showed 43.1% and 52.1% at 1,000 µg/ml, respectively. As a result of antimicrobial activity, both the MMW and MME showed significant clear zones for *Propionibacterium acnes* at 4 mg/disc, but did not indicated the clearzones for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. Anti-inflammatory activity by NO assay showed LPS-induced NO was significantly inhibited in a concentration-dependent manner. Also, the expression of iNOS and COX-2 proteins were significantly inhibited following treatment with MMW and MME of 50 µg/ml.

Conclusions : Accordingly, it can be concluded that mixed medicinal herb extract has the potential to be used as a functional food and cosmetic material.

Key words : Electron donating ability, Antimicrobial activity, Anti-inflammatory, nitric oxide, iNOS, COX-2

서론

현대인들은 다양한 환경오염물질에 지속적으로 노출되어 있어 각종 활성산소종의 체내 축적과 생체내의 대사과정중에 발생하는 활성산소종에 의해 생체 조직의 노화 및 노화관련 각종 질환을 비롯한 각종 성인병 발병률이 높아지고 있다¹⁾. 또한 건강 염려증 증대와 고령화 등으로 인하여 다양한 질병의 치료 보조제로서 약 효능을 향상시키는 시너지 효과를 낼

과 동시에 질환을 예방 및 개선시킴에 있어 독성과 부작용이 적은 고기능성 제품의 개발에 대한 소비자의 요구가 절실한 상황이다. 특히, 한약재는 예로부터 약용으로 많이 사용되어 왔기 때문에 생물공학 기술을 이용한 기능성 제품 개발은 경쟁력 있는 산업으로 발전하고 있으며, 이를 이용한 의약품, 건강보조식품, 향균 및 향료 등의 제품개발이 활발히 수행되고 있다. 최근 천연물을 대상으로 현대인들의 건강과 밀접한 관계가 있는 활성산소를 억제시키기 위해 항산화제에 대한 연

*Corresponding author : Mee-Kyung Kim, Department of Cosmetic Science & Technology, Seowon University
· Tel : +82-43-299-8492 · Fax : +82-43-299-8490 · E-mail : kmk@seowon.ac.kr

#First author : In-Chul Lee, Department of Cosmetic Science & Technology, Seowon University
· Tel : +82-43-299-8491 · Fax : +82-43-299-8490 · E-mail : lic9418@seowon.ac.kr
· Received : 24 August 2015 · Revised : 23 September 2015 · Accepted : 25 September 2015

구가 다양하게 진행되고 있으며, 동양의학에 대한 관심이 높아지면서 우수한 항산화활성과 안전성이 확보된 천연물 유래의 항산화제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다²⁾. 또한 식물에서 유래된 페놀화합물 및 비타민 등의 천연항산화제가 산화손상에 대한 화학적 예방 촉매기능이 알려짐에 따라 한약재로 쓰이는 약초나 민간약초에서 추출한 물질을 이용한 항산화, 항균, 미백 등에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다³⁻⁶⁾.

본 연구에서는 사용된 한약재는 동의보감에 수록되어 있는 온청음 처방에 사용되는 한약재로서 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)은 꿀풀과의 여러해살이풀로서 주성분이 flavonoid계 30여종의 화합물과 14종의 아미노산, 정유, stigmasterol로 항균, 항바이러스, 소염, 항알러지, 진정, 세포면역촉진, 항암 및 항산화작용이 있다⁷⁾. 천궁(*Cnidium officinale* Makino)은 산형과에 속한 다년생 초본이며, 9~11월에 채취한 뿌리와 줄기를 건조하여 약재로 사용하였다. 이 약재는 수면작용, 혈압강화작용, 혈관확장작용, 항균작용, 항진균작용, 그리고 비타민 E 결핍증 치료 등의 약리 작용이 있고 보혈 및 진정 소염, 진통작용이 뛰어난 것으로 전해지고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 산형과 속한 다년생 초본인 식물로 늦가을에 채취하여 수염 뿌리를 제거하고 수분이 약간 증발할 때를 기다렸다가 천천히 연기로 훈증하면서 건조한다. 당귀는 부인병에 약으로 쓰이며, 진통, 진정, 항부정맥, 항혈전, 화혈, 정혈, 강장, 강기능 보호작용과 염증반응을 억제하는 소염작용, 항암 및 항진균작용이 있다¹¹⁻¹³⁾. 작약(*Paeonia lactiflora* Pall)은 미나리아재비과에 속한 다년생 초본인 적작약 또는 동속근연식물의 뿌리를 건조한 것이며, 진정, 진통, 두통, 항균, 및 항혈전 작용이 있어 치료 약재로 사용되었다. 주성분인 peoniflorin과 안식향산, 정유, 지방산, tannin, 당, triterpenoid, β -sitosterol 등이 함유되어 있다¹⁴⁻¹⁶⁾. 지황(*Rehmannia glutinosa* Libosch)은 현삼과에 속하는 다년생 식물로 보약, 지혈약, 토혈, 변비, 성욕하진 당뇨병 등의 면역에 대한 작용 및 항노화에 효능이 높은 것으로 알려져 있다^{17,18)}.

이에 본 연구에서는 한방소재인 당귀, 천궁, 적작약, 지황, 황금 복합 추출물을 이용하여 항산화, 항균 및 항염증 효능을 평가하여 미용식품 및 기능성 한방화장품 소재로서의 사용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 약재 및 추출

본 실험에 사용한 당귀(국산), 천궁(국산), 작약(국산), 지황(중국산), 황금(국산) 약재는 경북 영천 소재의 옴니허브(주)에서 구입하여 물로 세척하여 음건 후 사용하였다. 시료의 생약명과 학명은 Table 1과 같으며 약재의 구성비는 항산화 실험에서 효능이 우수한 것을 기준으로 비율을 선정한 것이다. 시료의 추출은 Fig. 1과 같이 추출하였다. 즉, 물 추출물은 당귀, 천궁, 적작약, 지황, 황금을 Table 1의 구성비로 개량한 다음 시료 중량 대비 10배 양의 증류수를 가하여 85℃에서 3시간 환류냉각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하였으

며, 동일 조작을 3회 반복 추출하였다. 에탄올 추출물은 시료 중량대비 70% 에탄올 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 shaking하여 추출하고, 추출 후 상등액과 침전물을 분리하였으며, 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 추출물을 원심분리 및 여과, 농축하여 동결건조 후 냉동실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

Table 1. Composition of mixed medicinal herb

Oriental herb name	Botanical name	Weight(g)
Angelicae Gigantis Radix (당귀, 當歸)	<i>Angelica gigas</i> Nakai	23.6
Cnidii Rhizoma (천궁, 川芎)	<i>Cnidium officinale</i> Makino	17.6
Paeoniae Radix (작약, 芍藥)	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall	17.6
Rehmanniae Recens Radix (지황, 地黃)	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch	23.6
Scutellariae Radix (황금, 黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	17.6
Total		100.0

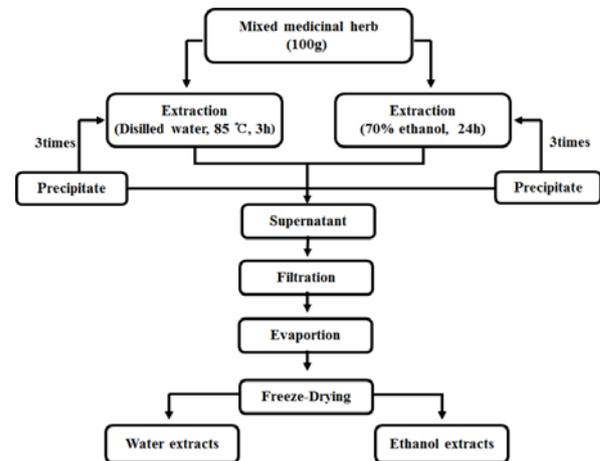


Fig. 1. The procedure for extraction from mixed medicinal herb.

2) 시약

실험에 사용된 시약 중 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), griess reagent, TRI-zol, LPS는 Sigma(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 세포 배양용 시약 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin은 Gibco BRL(Grand Island, USA)사에서 구입하였으며, 일차 항체 iNOS와 COX-2는 Cell Signaling(Boston, USA)사에서, 이차 항체 mouse anti-rabbit IgG HRP와 bovine anti-goat IgG HRP는 Santacruz(CA, USA)사에서 구입하였다. 그 외 실험에 사용된 시약들은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 실험 균주 및 세포주 배양

항균력 검색 실험에 사용한 공시균주인 *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917(*S. epidermidis*), *Staphylococcus aureus* KCTC 1621(*S. aureus*), *Escherichia coli* KCTC 1039(*E. coli*) 및 *Propionibacterium acnes* KCTC 3314(*P. acnes*)는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양받아 사

용하였다. *S. epidermidis*, *S. aureus* 및 *E. coli*는 37°C, nutrient broth에서 배양하였고, *P. acnes*는 37°C, GasPak EZ Anaerobic Container System(BD, USA)을 이용한 혐기성 환경, Difco™ Reinforced Clostridial Medium에서 배양하였다.

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7은 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, 25 mM HEPES가 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다.

2. 방법

1) 전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities)은 Blois의 방법¹⁹⁾에 따라 측정하였다. 각 시료용액 2 ml에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 1 ml 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid(Vit. C)를 사용하였고 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 대조군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2) 지방산패 억제능 측정

(1) Fish oil emulsion 조제

지방산패 억제능 실험에 사용하는 oil emulsion은 실험직전에 만들어 사용하였다. 즉 0.1 M maleic acid buffer(pH 6.5) 8 ml에 Tween-20 0.05 ml과 fish oil 0.05 ml을 넣고 15분간 교반하고, 교반 후 KOH 2 g을 넣고 150 ml까지 증류수를 가한 후 교반하면서 2 N HCl로 pH 6.5가 되도록 조제하였다.

(2) 지방 산패 억제능 측정

Fish oil의 산패촉진을 위해서는 50 µg/ml의 Fe²⁺ 이온용액을 사용하였으며, 지방 산패억제능 측정에는 Buege와 Aust의 방법²⁰⁾에 따라 측정하였다. Oil emulsion 0.5 ml과 추출물 0.1 ml 및 50 µg/ml의 Fe²⁺ 이온용액 0.1 ml 혼합액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 2 ml의 trichloroacetic acid(TCA)/2-thiobarbituric acid(TBA) 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 끓인 다음 5,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 상정액을 흡광도 531 nm에서 측정하였다. 지방 산패 억제능은 시료용액의 첨가군과 대조군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

3) 항균 효과 측정

항균력 측정은 paper disc법²¹⁾으로 측정하였다. 즉, 평판배지에 배양된 각 균주를 1 백금이량 취해서 액체 배지 10 ml에서 18~24시간 배양하여 활성화시킨 후 다시 액체 배지 10 ml에 균액을 0.1 ml 접종하여 3~6시간 본 배양한 후 평판배지 1개당 균수를 약 10⁷ cells되게 접종하여 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc(8 mm, Tokyo, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 0.05 ml/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜 37°C에서 18~24시간 배양하여 disc 주위의 clear zone(mm)의 직경을 측정하였다.

4) 세포 생존율 측정

세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포(5×10⁴ cells/well)를 96-well culture plate에 100 µl의 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지와 함께 하룻밤 배양한 후 당귀, 천궁, 적작약, 지황, 황금 혼합추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 50 µl 씩 넣은 후 4시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 100 µl의 DMSO 용액을 첨가하여 보라색의 formazan 결정을 완전히 용해시킨다. 발색정도를 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포 생존율은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

5) Nitric oxide 저해활성 측정

Nitric oxide(NO) 측정은 cell의 supernatant에서의 NO의 양을 nitrite와 nitrate로서 측정하였다. Nitrite에 대한 nitrate로 환원된 후의 안전한 형태인 griess reagent를 사용하였으며, 6 well plate(2×10⁶ cells/well)에 RAW264.7 세포의 confluence가 80%일 때, PBS로 2번 washing한 후에 무혈청 배지를 사용하여 12시간 이상 배양시킨 후에 시료를 농도별로 처리하여 1시간동안 배양한 다음 lipopolysacchride(LPS) 1 µg/ml 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액의 상층액을 취하여 griess 시약과 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성율을 백분율로 표시하였다.

6) Western blot을 이용한 iNOS, COX-2 활성 측정

iNOS protein 활성 측정을 확인하기 위하여 대식세포주인 Raw 264.7 세포를 각 well당 2×10⁴ cells/ml로 가한 후 24 시간 동안 배양하고 당귀, 천궁, 적작약, 지황, 황금 혼합추출물을 농도별로 처리하여 1시간동안 배양한 후 LPS 1 µg/ml을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 세포를 PBS로 2~3회 세척한 후 1 ml의 lysis buffer(50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1M DTT)를 첨가하여 30분간 lysis한 다음 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 상등액을 총단백질 추출액으로 사용하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20 µl의 단백질을 10%의 SDS-PAGE로 변성 분리하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane과 transfer buffer를 사용하여 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 단백질이 이동된 membrane은 fast green solution으로 transfer의 유무를 확인한 후 blocking buffer(5% skim milk in TBST)로 blocking하였다. 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 iNOS(1:1000), COX-2(1:1000) 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night 한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 mouse anti-rabbit IgG HRP, bovine anti-goat IgG HRP(1:1000)의 각각의 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 3회 세척한 뒤 암실에서 ECL 용액으로 2분간 반응시키고 Kodac 필름에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

7) 통계처리

결과 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA : analysis of variance)을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법(DMRT : Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결 과

1. 항산화 효과

1) DPPH 라디칼에 대한 전자공여능

당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합 추출물의 항산화 효과를 측정된 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 추출물의 농도가 증가할수록 전자공여능이 증가하는 경향을 나타내었으며, 물 추출물은 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 60.0% 이상의 효과를 나타내었고, 에탄올 추출물에서는 90.0% 이상의 높은 효과를 나타내었다. 또한 추출물간의 항산화능을 비교하기 위하여 시료 첨가 양에 따른 전자공여능이 50%에 이르는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀, 50% inhibition concentration)를 측정된 결과 물 추출물은 187.17 $\mu\text{g/ml}$, 에탄올 추출물은 33.40 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 이상의 결과에서 70% 에탄올로 당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합추출물이 물 혼합추출물보다 전자공여능이 높음을 알 수 있었다.

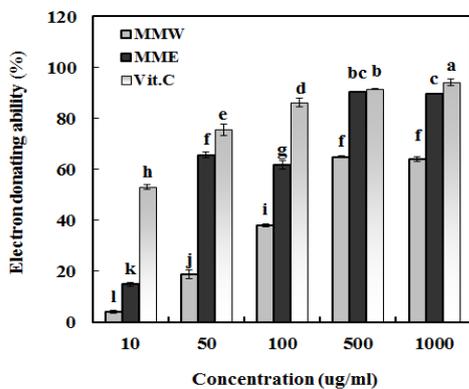


Fig. 2. Electron donating ability of mixed medicinal herb extracts, MMW, water extracts of mixed medicinal herb; MME, ethanol extracts of mixed medicinal herb; Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

2) 지방 산패 억제능 확인

당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합추출물이 산화촉진제인 Fe²⁺이온 첨가에 의해 산패가 촉진된 fish oil emulsion의 산패억제효과를 측정된 결과 Fig. 3과 같이 농도의존적으로 억제효과가 높아지는 경향을 나타내었으며 에탄올 추출물 농도 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 첨가군에서 43.1%, 52.1%의 억제효과로 에탄올 추출물이 높은 지방산패 억제능을 나타내었다.

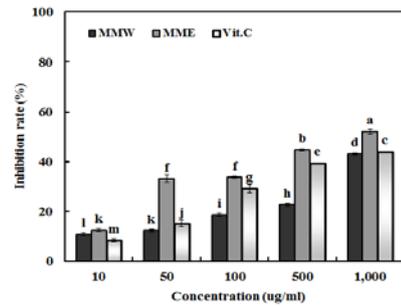


Fig. 3. Effect of mixed medicinal herb extracts on liquid oxidation in the presence of ferrous ion(Fe²⁺). MMW, water extracts of mixed medicinal herb; MME, ethanol extracts of mixed medicinal herb; Vit. C, ascorbic acid. Values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

2. 항균 효과 측정

당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합추출물의 항균 효과를 검토하기 위하여 피부 상재균인 *S. aureus*, *E. coli* 및 *S. epidermidis*와 여드름 원인균인 *P. acnes* 대한 clear zone 형성을 관찰한 결과 Table 2 및 Fig. 4, 5와 같이 나타내었다. 물과 에탄올 추출물 모두 피부 상재균인 *S. aureus*, *E. coli* 및 *S. epidermidis*는 항균효과를 나타내지 않았으나, 여드름 원인균인 *P. acnes*에 대해서는 항균 효과를 나타내었다. 물 추출물에서는 4 mg/disc에서 19 mm, 에탄올 추출물에서는 2 mg/disc에서 15 mm, 4 mg/disc에서 19 mm를 나타내었다. 이는 물 추출물에 비하여 에탄올 추출물의 항균효과가 높게 나타내었으며 특히, 각종 습진 및 여드름 유발에 관여하는 *P. acnes*에 대한 항균력이 뛰어났음을 확인할 수 있었다.

Table 2. Antimicrobial activity of mixed medicinal herb extracts on several microorganisms

Strains	Water extracts (mg/disc)			Ethanol extracts (mg/disc)		
	1	2	4	1	2	4
<i>Staphylococcus pidermidis</i>	- ^a	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	19±0.14 ^b	-	15±0.12	19±0.07

a: no inhibition, b: inhibition zone diameter (mm).

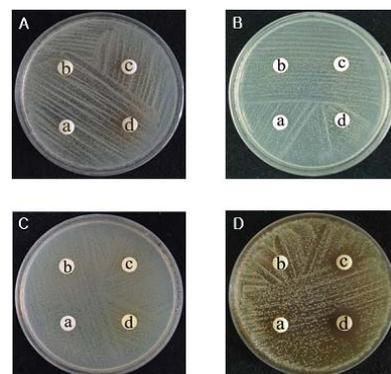


Fig. 4. Antimicrobial activity of water extracts from mixed medicinal herb on several microorganisms. A, *Staphylococcus aureus*; B, *Staphylococcus epidermidis*; C, *Escherichia coli*; D, *Propionibacterium acnes*. a, 0 mg/disc; b, 1 mg/disc; c, 2 mg/disc; d, 4 mg/disc.

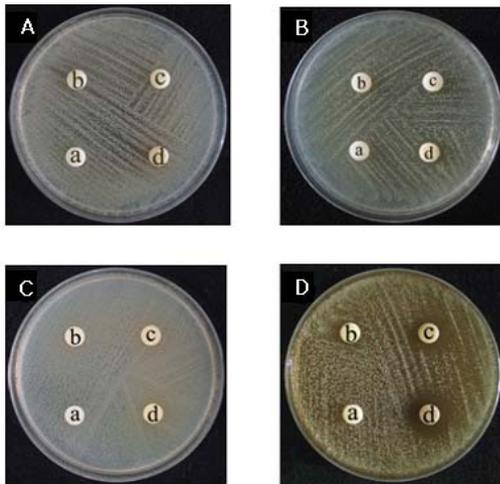


Fig. 5. Antimicrobial activity of ethanol extracts from mixed medicinal herb on several microorganisms. A, *Staphylococcus aureus*; B, *Staphylococcus epidermidis*; C, *Escherichia coli*; D, *Propionibacterium acnes*. a, 0 mg/disc; b, 1 mg/disc; c, 2 mg/disc; d, 4 mg/disc.

3. 항염증 효과

1) 세포 독성 평가

당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합추출물의 물 및 에탄올 추출물에 대한 세포 생존율을 알아보기 위하여 대식세포인 RAW264.7에 추출물을 5~100 µg/ml 농도로 첨가하여 MTT assay하여 세포생존율을 조사하였으며 그 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 대식세포에 대한 세포독성은 세포만 배양한 대조구의 세포생존율을 100%로 보았을 때 50 µg/ml의 농도까지는 세포의 생존율이 90%이상을 나타내었지만 100 µg/ml의 농도에서는 세포의 생존율이 80%이하의 생존율을 나타내었다. 이상의 결과에서 당귀, 천궁, 적작약, 지황, 황금 혼합물 및 에탄올 추출물은 50 µg/ml 이하의 농도에서는 세포독성이 낮아 세포의 생존율에 크게 영향을 주지 않는다는 사실을 알 수 있었다. 따라서 본 결과를 바탕으로 RAW264.7를 이용한 효능평가에서는 당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합추출물의 최대 농도를 50 µg/ml로 설정하여 실시하였다.

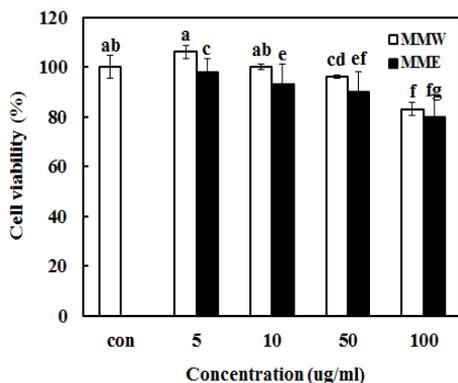


Fig. 6. Effects of mixed medicinal herb extracts on the cell viability in RAW264.7 cells. MMW, water extracts of mixed medicinal herb; MME, ethanol extracts of mixed medicinal herb. The values are means of triplicate experiments.

2) Nitric oxide (NO) 생성 억제 효과

항염증 효과를 평가하기 위하여 LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포 배양액에 당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합추출물의 NO 생성저해 효과를 조사한 결과 Fig. 7에서와 같이 LPS 처리 후 NO 생성량은 대조구에 비하여 약 2배 이상 증가되었으며 당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합추출물의 처리농도가 높을수록 생성량이 감소하는 경향을 나타내었다. 농도 50 µg/ml에서 물 및 에탄올 추출물은 각각 52.7%, 56.7%의 NO 생성 저해를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

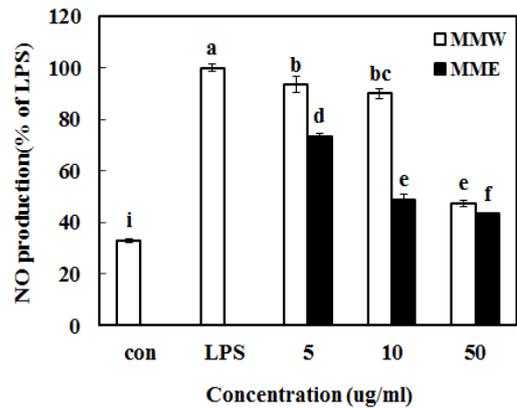


Fig. 7. Effects of mixed medicinal herb extracts on NO production in LPS-stimulated of RAW264.7 cell. Cells were treated with different concentration of mixed medicinal herb extracts for 1 h, and stimulated with or without LPS(1 µg/ml) for 24 h. The values are means of triplicate experiments.

3) iNOS와 COX-2의 단백질 발현 저해 효과

NO 생성에 영향을 미치는 iNOS와 COX-2의 세포내 단백질 발현억제에 관한 활성을 western blot으로 분석한 결과 Fig. 8에서와 같이 RAW 264.7 세포를 LPS로 처리하여 자극을 주었을 때 iNOS와 COX-2 단백질이 강하게 유도되었으며, 당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합추출물 50 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 iNOS와 COX-2의 발현은 물과 에탄올 추출물 모두에서 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

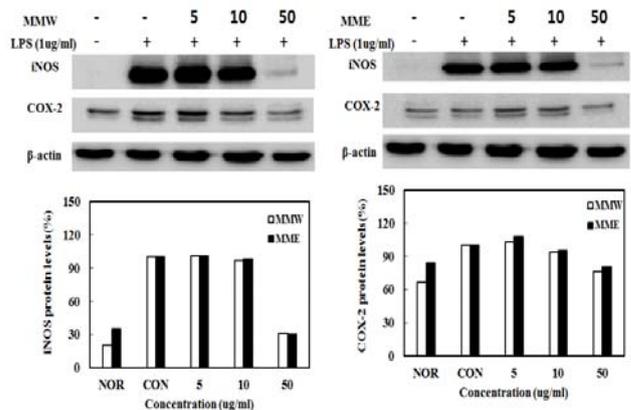


Fig. 8. Inhibitory effects of mixed medicinal herb extracts on the protein levels of iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells, RAW264.7 cells were pre-incubated for 24 h, and the cells were stimulated with LPS(1 µg/ml) in the presence of mixed extracts sample(5, 10, 50 µg/ml) for 24 h.

고찰

여로부터 약용으로 사용되고 있는 한약재는 최근 동양의학에 대한 관심이 높아지면서 이를 이용한 의약품, 건강보조식품, 향균 및 향료 등의 제품개발이 활발히 진행되고 있다. 또한 약초나 민간약초에 생물공학 기술을 적용한 기능성 제품 개발이 경쟁력 있는 산업으로 발전하고 있다. 이에 본 연구에서는 온청음 구성약재인 황금(*Scutellaria baicalens* Georgi), 천궁(*Cnidium officinale* Makino), 당귀(*Angelica gigas* Nakai), 작약(*Paeonia lactiflora* Pall), 지황(*Rehmannia glutinosa* Libosch)를 혼합하여 물과 에탄올로 추출하여 그 추출물로 항산화, 항균 및 항염증 효능을 평가하여 미용식품 및 기능성 한방화장품 소재로서의 사용 가능성을 확인하고자 하였다.

피부는 산소로부터 생성된 짝을 이루지 못한 전자를 가진 활성산소에 의해 세포조직에 손상을 줄 뿐만 아니라 염증을 유발하는 원인이 된다. 따라서 본 연구에서는 황금, 천궁, 당귀, 작약, 지황 혼합 물 추출물과 에탄올 추출물의 활성산소의 제거능을 측정하기 위하여 전자공여능과 지질산패 억제능을 측정하였다. 전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 자체가 매우 안정한 free radical로서 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되면서 DPPH 고유의 청남색이 떨어져 육안적으로 항산화 활성을 관찰할 수 있다. 체내의 과산화물은 glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase, Vit C, Vit E, glutathione의 항산화물질에 의해 조절되며 Vit C는 지질과산화물을 막아 주고 세포막내 비타민 E 라디칼을 재생시켜 준다²²⁾. DPPH는 phenol, flavonoid 등의 폐쇄성 물질에 대한 항산화작용의 지표로서 유리 라디칼에 전자를 공여하여 지방산화 억제와 노화를 억제시키는 작용을 하여 인체의 질병과 노화를 방지하는 척도로 이용할 수 있다²³⁻²⁵⁾. 지방산패 억제능을 측정하기 위해 사용하는 2-thiobarbuturic acid reactive substance(TBARS)는 불포화 지방산이 자동산화하는 과정 중 지방산화의 2차 산물인 malonaldehyde(MA)가 발생하며, 이는 높은 반응성을 가지고 있다. 이러한 MA는 2-thio-barbuturic acid(TBA) 시약과 반응하는 주된 물질이며, 531 nm에서 형광을 갖는 물질을 만든다. 생체내에서 세포막에 존재하는 인지질 및 당지질과 혈관에 존재하는 지질은 산소와 결합하여 과산화물을 만들고 이들의 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성하여 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발하기도 하며, 세포의 노화와도 관련이 있는 것으로 알려져 있다^{26,27)}. 이에 전자공여능과 지질산패 억제능을 측정할 결과 당귀, 천궁, 적작약, 지황, 황금 혼합 추출물은 물 추출물의 결과에서보다 에탄올 추출물에서 더 높은 효과를 나타내었다.

피부의 여드름과 같은 염증성 질환에 관여하는 대표적인 피부상재균주로는 그람양성균(Gram positive bacteria)에 속하는 *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes* 등이 있고, 그람음성균(Gram negative bacteria)에 속하는 *E. coli* 등이 있다²⁸⁾. *S. aureus*는 황색 포도상 구균으로 아토피 피부염의 요인으로서 피부 모공 감염, 상처에 화농을 유발시키며 아토피 환자에서 주로 발견되고 있다²⁹⁾. *S. epidermidis*는 표피 포도상 구균으로서 원발성 피부질환과 여드름, 중상의 속발성을

악화시키는 원인균이다³⁰⁾. *P. acnes*는 여드름균으로서 혐기성 세균(anaerobic bacteria)이며, 리파아제(lipase)를 분비하여 많은 양의 글리세롤과 지방산을 생성하여 염증을 유발한다³¹⁾. 한약재 복합 물과 에탄올 추출물 둘다 피부 상재균인 *S. aureus*, *E. coli* 및 *S. epidermidis*는 항균효과를 나타내지 않았으나, 여드름 원인균인 *P. acnes*에 대해서는 항균 효과를 나타내었다. 특히 물 추출물보다 에탄올 추출물이 각종 습진 및 여드름 유발에 관여하는 *P. acnes*에 대한 항균력이 뛰어났음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 당귀, 천궁, 작약, 지황, 황금 혼합 에탄올추출물은 여드름과 같은 염증성 피부질환을 개선하는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

염증(inflammation)은 감염, 면역반응과 같은 다양한 자극에 의하여 매개될 수 있는 인체 조직의 손상에 대한 자연적인 생물학적 반응 중에 하나이다³²⁾. 염증이 일어나면 NO가 생성되고 이는 면역반응, 세포독성, 신경전달계 및 혈관이완 등에 관여하고 있으며 과량 존재하게 되면 세포의 손상 및 염증을 유발하여 세포독성을 일으키기도 한다³³⁾. iNOS는 평소에는 세포내에 존재하지 않으나 LPS와 cytokine 등에 의해 유도되면 장시간 동안 과량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 염증반응 촉진 및 염증매개체의 생합성을 증가시켜 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있고³⁴⁾ COX-2는 급성염증반응에서 염증 관련 매개물인 prostaglandins의 합성에 관여한다³⁵⁾. 이런 염증반응에서 중요한 역할을 하는 대식세포(macrophage)는 그들의 식세포 작용(phagocytosis), 세포 독성(cytotoxicity), 세포살해능력을 활용하여 숙주의 방어 기작에 중요한 역할을 수행한다³⁶⁾. 대식세포인 RAW264.7에 대한 당귀, 천궁, 적작약, 지황, 황금 혼합추출물의 세포독성은 50 µg/ml의 농도까지는 세포의 생존율이 90%이상을 나타내었다. 이에 농도 50 µg/ml 이하로 물과 에탄올 추출물을 처리하였을 때 NO 생성 억제와 iNOS와 COX-2의 발현은 모든 추출물에서 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 당귀, 천궁, 적작약, 지황, 황금을 혼합하여 물과 에탄올로 추출한 추출물로 전자공여능, 지방산패 억제능, 피부 염증관련 3균주에 대한 항균활성, NO 생성 억제 및 iNOS와 COX-2의 발현 억제에 대한 효능평가를 실시한 결과 전체적으로 두 추출물 모두 활성을 나타내었으며 특히, 에탄올 추출물이 물 추출물보다 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 당귀, 작약, 황금, 지황, 천궁의 복합 에탄올 추출물은 미용식품 및 한방화장품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

결론

최근엔 동의보감의 처방전을 활용한 기능성 한방화장품 개발을 위한 연구가 증가하는 추세이다. 따라서 본 연구에서는 온청음 구성약재인 당귀, 작약, 황금, 지황, 천궁의 복합추출물이 미용식품 및 한방화장품의 소재로 활용하기 위하여 항산화, 항균, 항염증 등의 생리활성 효과를 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 전자공여능, 지방산패 억제능을 이용하여 항산화 효과를

측정한 결과 전자공여능은 농도 500 µg/ml에서 물 추출물은 60.0%, 에탄올 추출물은 90.0%이상의 높은 효과를 나타내었으며, 지방산패 억제능은 1,000 µg/ml에서 물 추출물은 40%, 에탄올 추출물은 50% 이상의 억제능을 나타내었다. 물 추출물과 에탄올 추출물과 비교하였을 때 에탄올 추출물이 항산화 효과가 높게 나타났다.

2. 피부 상재균과 여드름균에 대한 항균활성을 생육저해환으로 측정한 결과 피부 상재균에 대한 항균효과는 물과 에탄올 추출물 둘 다에서 나타나지 않았으나 여드름 균에 대한 항균효과는 물 추출물 4 mg/disc에서 19 mm, 에탄올 추출물 2 mg/disc에서 15 mm, 4 mg/disc에서 19 mm를 나타내었다.
3. RAW 264.7 마우스 대식세포에 대한 추출물의 세포독성을 측정한 결과 농도 50 µg/ml에서는 90%이상의 세포 생존율을 나타내었지만 100 µg/ml에서는 80%이하의 세포 생존율을 나타내었다.
4. RAW 264.7 세포를 LPS로 자극하였을 때 추출물의 항염증 효과를 NO 및 iNOS와 COX-2 단백질 발현 저해 효과를 조사한 결과 농도 의존적으로 저해활성이 높게 나타났다.

이상의 생리활성 검증 결과 당귀, 작약, 황금, 지황, 천궁의 복합 추출물이 대부분 높은 생리활성을 나타내어 미용식품 및 한방화장품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

References

1. Wiseman H, Dietary influences on membrane function: Important in protection against oxidative damage and disease, *J Nutr Biochem*, 1996 ; 7(1) : 2-15.
2. Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H, Activeoxygen scavenging activity of plants extracts, *Biol Pharm Bull*, 1995 ; 18(1) : 162-6.
3. Ham SS, Oh DH, Hong JK, Lee JH, Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs, *J Food Sci Nutr*, 1997 ; 2(2) : 155-61.
4. Oh MH, Whang HJ, Chemical composition of server herb plants, *Kor J Food Sci Techol*, 2003 ; 35(1) : 1-6.
5. Ryoo JW, Cha BC, Mineral content and antioxidative activity in some herb plants, *Kor J Med Crop Sci*, 1998 ; 6(1) : 28-32.
6. Lee IC, Kim BH, Kim MK, Investigations of Samwhang-sasintang extracts on biological activities in vitro and vivo, *Lab Anim Res*, 2010 ; 26(1) : 15-20.
7. Kim SC, Ahn SK, Park CK, Jeon BS, Lee JT, Park WJ, Isolation of antioxidative compound from *Scutellaria baicalensis* G, *Kor J Medicinal Crop Sci*, 2006 ; 14(4) : 212-6.
8. Baek IS, Park CS, Park CG, The Effects of *Cnidium officinale* extract on the ischemic stroke and oxidative neural damage in rats brain, *Kor J Herbol*, 2003 ; 18(4) : 37-46.
9. Choi GP, Chung BH, Lee DI, Lee HY, Lee JH, Kim JD, Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants, *Kor J Medicinal Crop Sci*, 2002 ; 10(5) : 399-402.
10. Jung DS, Lee NH, Antimicrobial activity of the aerial part (leaf and stem) extracts of *Cnidium officinale* Makino, a Korean Medicinal herb, *Kor J Microbiol Biotechnol*, 2007 ; 35(1) : 30-5.
11. Kang SA, Oh MS, Kim DR, Kang JU, Kim WN, Chang MS, Park SK, Compositions of *Astragali Radix* and *Angelicae Radix* by DPPH radical scavenging activity, *Kor J Herbol*, 2006 ; 21(1) : 17-24.
12. Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi JS, Kwon OW, Lee HY, Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice, *Kor J Medicinal Crop Sci*, 2006 ; 14(4) : 206-11.
13. Park JH, Lee YJ, Keon SJ, Pharmacognostical studies on the Dang Gui from Korea, *Kor J Pharmacogn*, 2005 ; 36(2) : 141-4.
14. Bang MH, Song JC, Lee SY, Park NK, Baek NI, Isolation and structure determination of antioxidants from the root of *Paeonia lactiflora*, *J Kor Soc Agric Chem Biotechnol*, 1999 ; 42 : 170-5.
15. Kim SJ, Park JH, Choi SY, Son KH, Kim KU, Isolated and identification of biological activity compounds from leaves and stem of *Paeonia lactiflora* Pallas, *Korea J Medicinal Crop Sci*, 2007 ; 15(1) : 6-11.
16. Park HS, Min KJ, Cha CG, Song JW, Son JC, Antimicrobial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell by extract of *Paeonia lactiflora*, *Kor J Environ Health Sci*, 2007 ; 33(1) : 21-9.
17. Ahn SW, Kim MH, Chung WT, Hwang B, Seong NS, Lee HY, Enhancement of alcohol fermentation yield by adding the extract of dried *Rehmannia glutinosa* liboschitz, *Kor J Medicinal Crop Sci*, 2000 ; 8(4) : 351-61.
18. Ahn SW, Kim YG, Kim MH, Lee HY, Seong NS, Comparison of biological activities on *Rehmannia Radix* and *R. Radix preparata* produced in Korea, *Kor J Medicinal Crop Sci*, 1999 ; 7(4) : 257-62.
19. Blois MS, Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, 1958 ; 181 : 1199-200.

20. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978 ; 52 : 302–10.
21. Conner DE, Beuchat LR. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl Environ Microbiol.* 1984 ; 47(2) : 229–33.
22. Berger TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Hallivell B, Morrow JD, Roberts LJ, Frei B. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem.* 1997 ; 272(25) : 15656–60.
23. Aoshima H, Tsunoue H, Koda H, Kiso Y. Aging of whiskey increases 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity. *J Agric Food Chem.* 2004 ; 52(16) : 5240–4.
24. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC, Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Kor J Food Sci Technol.* 1995 ; 27(1) : 80–5.
25. Lee HW, Nam GW. Methods of measuring & evaluation moisturizers. *J Skin Barrier Res.* 2007 ; 9(2) : 52–8.
26. Cojocaru IM, Cojocaru M, Musuroi C, Botezat M, Lazar L, Druta A. Lipid peroxidation and catalase in diabetes mellitus with and without ischemic stroke. *Rom J Intern Med.* 2004 ; 42(2) : 423–9.
27. Saito M, Sakagami H, Fujisawa S. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Res.* 2003 ; 23(6C) : 4693–701.
28. Sohn HY, Kim YS, Kum EJ, Kwon YS, Son KH. Screening of anti-acne activity of natural products against *Propionibacterium acnes*. *Kor J Microbial Biotechnol.* 2006 ; 34(3) : 265–72.
29. Raimer SS. Managing pediatric atopic dermatitis. *Clin Pediatr.* 2000 ; 39(1) : 1–14.
30. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994 ; 7(1) : 117–40.
31. Kim YS, Yoon YH, Lee HS, Kim KY. Investigation of Antibacterial Activities of *Smilax china* Folium Extracts and Fractions against Cutaneous Microorganisms as a Natural Cosmetics Material. *J Kor Soc Cosm.* 2013 ; 19(3) : 557–64.
32. Jnawali HN, Lee EJ, Jeong KW, Shin A, Heo YS, Kim YM. Anti-inflammatory activity of rhamnetin and a model of its binding to c-Jun NH₂-terminal kinase 1 and p38 MAPK. *J Nat Prod.* 2014 ; 77(2) : 258–63.
33. Lowenstrein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Int Med.* 1994 ; 120(3) : 227–37.
34. Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytother Res.* 2003 ; 17(5) : 485–9.
35. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ; 91(25) : 12013–7.
36. Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun K, Lee KT. Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF- κ B inactivation in RAW264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int Immunopharmacol.* 2008 ; 8(3) : 431–41.