

익모초 추출물의 항산화 효과와 자외선으로 유도된 각질형성세포 손상에 대한 보호효과

김태연^{1,4}, 장선아², 채용병³, 박종필^{3*}

¹세명대학교 한의학과, ²가천대학교 생명과학과, ³세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터, ⁴세명대학교 한방뷰티클리닉

Antioxidant and Protective Effects of *Leonurus sibiricus* L. Extract on Ultraviolet B (UVB)-induced Damage in Human Keratinocytes

Tae Yeon Kim^{1,4}, Seon A Jang², Yong Byung Chae³ and Jong Phil Bak^{3*}

¹Department of Korean Medicine, Semyung University, Jecheon 27136, Korea

²Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 13120, Korea

³Clinical Trial Center for Bio-Industry, Semyung University, Jecheon 27136, Korea

⁴Department of Oriental Beauty Clinic, Semyung University, Jecheon 27136, Korea

Abstract - In this study, we investigated the anti oxidative potential and protective effects of water extract of *Leonurus sibiricus* L. leaf (LSLW) against ultraviolet B (UVB)-induced oxidative damage in human keratinocytes (HaCaT cells). To evaluate the anti oxidative activity of LSLW, we measured DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion scavenging activities, lipid peroxidation inhibition, and reducing power of LSLW. For induction of oxidative stress in HaCaT cells, the cells were irradiated with UVB at 40 mJ/cm². To investigate the protective effects of LSLW against UVB, we measured cell viability and apoptotic bodies using annexin V staining. LSLW showed anti oxidative activities by scavenging DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion and by reducing lipid peroxidation. In addition, LSLW showed high reducing values. The UVB-induced oxidative conditions led to cell apoptosis. However, treatment with LSLW ameliorated oxidative stress conditions, including inhibition of cell death, apoptotic body. Taken together, LSLW exhibited anti oxidative and protective effects against UVB-induced damage in HaCaT cells. Thus, LSLW could be useful for the development of cosmetics for UVB-induced skin aging.

Key words - *Leonurus sibiricus* L. leaf, Ultraviolet B, Human keratinocytes, Anti oxidative activity, Apoptosis

서 언

익모초(*Leonurus sibiricus* L.)는 꿀풀과(Lamiaceae)의 두해살이 식물로 우리나라 전국 각지에 자생하며 충위 또는 암논비앗이라고도 한다. 한의학에서는 여름철 줄기와 잎이 무성하고 꽃이 피기 전에 채취하여曬乾(曬乾)된 익모초를 사용하여 활혈거어(活血祛瘀), 소간조경(疏肝調經), 이뇨소종(利尿消腫)의 효능이 있어 주로 월경부조(月經不調), 통경(痛經), 혈체경폐(血滯經閉), 산후어저복통(産後瘀阻腹痛), 수종뇨소(水腫尿少) 등의 증상을 치료한다(본초학편찬위원회, 2010)고 알려져 있

고, 고지혈증 억제(Kim *et al.*, 2010), 혈압강하(Choi *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2000), 항암(Nagasawa *et al.*, 1992), 간기능 개선(Ghee *et al.*, 2001), 이뇨(Shin, 1984), 항산화(Lee *et al.*, 2006) 등의 다양한 효능들이 보고된 바 있으며 최근 익모초를 이용한 주름개선 기능성 화장품에 대한 연구(Jo, 2013) 또한 시도 되었다. 성분으로는 leonuridine, leonurine, leonurinine, stachydrine 등의 alkaloids와 linolenic acid, sterol, lauric acid, oleic acid, rutin, vitamin A와 같은 flavonoid, 다량의 염화칼슘이 주로 알려져 있다(Chao *et al.*, 2004; Boalino *et al.*, 2004; Satoh *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2001). 이렇듯 익모초에 관한 연구는 약리적 효능이나 유효성분의 규명을 중심으로 다양하게 진행되어 왔으나, 익모초의 항산화 효과가 UVB로 유도된 산화

*교신저자: jpbak77@gmail.com

Tel. +82-43-653-6409

적 손상에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바가 없다.

자외선(Ultraviolet, UV)은 피부를 손상시키는 주요한 환경 요인으로 크게 UVA (315~400 nm), UVB (280~315 nm), UVC (<280 nm)로 나눌 수 있다. 지구 표면에 도달하게 되는 UVA와 UVB 중에서 UVB는 지구에 도달하는 양이 1~10% 정도로 작은 부분을 나타내지만(Verschooten *et al.*, 2006), 최근 성층권의 오존층 감소로 인해 지구에 도달하는 양이 증가되고 있다(Pontin *et al.*, 2010; Filip *et al.*, 2011). UVB에 급성으로 노출되면 홍반, 부종, 일광화상, 세포의 이상증식, 염증 및 면역력 저하 등을 포함한 다양한 피부 부작용이 야기되며(Afaq *et al.*, 2005), 만성적으로 노출되면 피부암 및 피부노화로 이어진다(Afaq *et al.*, 2005; Yaar and Gilchrest, 2007). 또한, 수포(Malorni *et al.*, 1994), 세포골격 분자 변화(Zamansky *et al.*, 1991; Zamansky and Chou, 1990; Zamansky and Chou, 1987; Moll *et al.*, 1994), 세포자살(apoptosis)의 증가(Godar, 1996; Shindo and Hashimoto, 1998)로 각질형성세포의 생존력을 감소시키므로 UVB는 인체 피부에 유해한 영향을 주는 주요 자극원 중 하나라 할 수 있다.

표피세포인 각질형성세포가 UV에 과도하게 노출되면 산화적 스트레스가 유도되어 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되는데, 이는 피부의 항산화 방어체계를 무너뜨리고 지질 과산화로 인한 세포막의 손상을 초래하여 정상적인 세포의 기능을 떨어뜨리므로 피부의 광산화적 손상을 유도한다(Fuchs and Packer, 1991). UV에 의해 생성된 활성산소종 중에서 수산화 라디칼(hydroxyl radical), 과산화수소(hydrogen peroxide), 과산화 음이온(superoxide anion)은 세포신호전달체계에 있어 중요한 매개자 역할을 하여(Heck *et al.*, 2004), 지질, 단백질, DNA, 단백질 분해효소, 콜라겐, 탄수화물 등을 손상시키게 된다(Pugliese, 1995). 특히 DNA가 손상되면 세포는 세포주기를 멈추고 apoptosis를 일으킨다(Kulms *et al.*, 1999).

최근 국민들의 생활수준이 향상되면서 피부와 관련된 기능성 화장품에 대한 관심과 수요가 급증하고 있지만, 합성소재 기능성 화장품과 관련된 부작용이 지속적으로 제기되면서 효과적이면서도 독성이 없는 천연물을 이용한 화장품 개발연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 천연 약용식물 중에는 체내에서 유해한 활성산소종을 감소시키는 생리활성 물질을 포함한 것들이 다수 존재하므로(Yang *et al.*, 2011; Boo *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2013) 안전함과 동시에 피부노화를 지연시키는 효과적인 화장품 소재 발굴의 일환으로 UV에 의한 광노화 기전 중에서 산화적 스트레스로 초래되는 피부 손상 과정에 있어서 항산화 작용을 통하여 각질형성세포를 보호할 수 있는 기능성 천연물에

대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구는 각질형성세포에서 UVB로 유도된 산화적 손상에 대한 익모초 추출물의 항산화 능력 및 세포 보호효과를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서는 본초학 교재를 참고하여 13년 12월 26일 제천에서 채취되어 건조시킨 익모초(*Leonurus sibiricus* L., LSL)의 지상부인 네모난 줄기와 잎 부분을 새롬제약(한국, 안성)에서 구입하여 세명대학교 한의과대학 예방의학교실에 상온보관하였다. 익모초 200 g을 증류수로 씻은 뒤 3 L의 증류수를 넣고 전기약탕기(DW-790, 대웅바이오가전, 한국)로 3 시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액을 원심분리 하여 상층액을 취한 뒤 감압농축기(NE-1001, Eyela, Japan)로 200 ml가 되도록 감압 농축한 후 -80°C에서 동결시켰다. 이를 다시 동결건조기(Freeze dryer system, Labconco, USA)를 이용하여 7일 간 동결건조시킨 후 58.9 g의 분말을 얻었다. 익모초의 수득율은 23.75%로 -20°C에 보관하였다가 실험 직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μm syringe filter (Millipore, Ireland)로 여과 후 실험에 사용하였다.

시약

Cell viability 측정에 사용된 methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), DMSO는 Bio Basic (Canada)으로부터, cell apoptosis 시험에 사용된 annexin V & dead cell kit는 Millipore (USA)로부터, 본 연구의 항산화 시험에 사용한 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), iron (II) sulfate heptahydrate, hydrogen peroxide, 2-deoxy-D-ribose, thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), peroxidase, potassium ferricyanide, linolenic acid 및 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (USA)로부터 구입하였다.

세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 HaCaT 세포주는 Cell Line Service (passage 32, Germany)에서 분양 받았으며, 세포주를 배양하기 위하여 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin/streptomycin, Trypsin-EDTA 그리고 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)는 Life

technologies (USA)로부터 구입하였다. HaCaT 세포주를 배양하기 위하여 10% FBS와 100 unit/ml penicillin streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 동결된 HaCaT 세포주를 DMEM 배지를 이용하여 빠르게 해동시키고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 여분의 동결 보존액을 제거 하였다. 세포주에 10 ml의 DMEM 배지를 첨가하여 100 mm culture dish에 접종하고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 배양 하였다. 배지는 주 3회 교체하였으며 culture dish 바닥면적의 70% 이상 자랐을 때 계대배양 하였다. 계대배양 시 세포를 분리하기 위하여 0.25% trypsin-EDTA를 사용하였다.

익모초의 세포독성 실험

익모초 열수추출물이 HaCaT 세포주의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96 well plate에 2×10^4 cell/well이 되도록 세포주를 분주하고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 여기에 익모초 열수추출물을 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리하고 24시간 동안 추가 배양 후 MTT 수용액을 최종농도 1 mg/ml가 되도록 배지에 넣고 1시간 30분 동안 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 DMSO 용액을 각 well당 200 µl 넣은 뒤 30분 정도 웨이커에 올려놓아 석출되게 한 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다. 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

익모초의 항산화 능력 측정 실험

DPPH radical assay

Brand-Williams *et al.* (1995)의 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 익모초의 소거능력을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 익모초 열수추출물 500 µl를 1.5 ml tube에 넣고 0.3 mM DPPH 용액을 500 µl 가하여 10초 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 $[(\text{흡광도}_{\text{시료무첨가}} - \text{흡광도}_{\text{시료}}) / \text{흡광도}_{\text{시료무첨가}}] \times 100$ 의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 1 µg/ml vitamin C를 사용하였다.

Hydroxyl radical assay

Chung *et al.* (1997)의 실험방법을 변형하여 hydroxyl radical

에 대한 익모초의 소거능력을 측정하였다. 50 µl의 10 mM FeSO₄와 50 µl의 10 mM H₂O₂를 이용한 Fenton 반응으로 hydroxyl radical를 발생시켰다. 발생된 radical을 25 µl의 10 mM EDTA, 25 µl의 10 mM 2-deoxyribose, 150 µl의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)의 존재 하에서 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 익모초 열수추출물과 반응시킨 다음 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 여기에 250 µl의 2.8% trichloroacetic acid (TCA) 용액 및 250 µl의 1% TBA 용액을 첨가한 후에 100°C로 가열하였다. 그 후 상온에서 식힌 다음 1000 × g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 회수한 상등액은 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정 하였으며 항산화 활성은 $[(\text{흡광도}_{\text{시료무첨가}} - \text{흡광도}_{\text{시료}}) / \text{흡광도}_{\text{시료무첨가}}] \times 100$ 의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 µg/ml vitamin E를 사용하였다.

Hydrogen peroxide scavenging assay

Choi *et al.* (2002)의 실험방법을 변형하여 Hydrogen peroxide에 대한 익모초의 소거활성을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 익모초 열수추출물 각 80 µl를 20 µl의 10 mM hydrogen peroxide 및 100 µl의 0.01 M 인산완충용액(pH 5.0)을 37°C에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후, 15 µl의 1,25 mM ABTS 및 30 µl의 peroxidase를 37°C에서 10분 동안 반응시켜 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 항산화 활성은 $[(\text{흡광도}_{\text{시료무첨가}} - \text{흡광도}_{\text{시료}}) / \text{흡광도}_{\text{시료무첨가}}] \times 100$ 의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 200 µg/ml vitamin C를 사용하였다.

Superoxide radical scavenging assay

Liu *et al.* (1997)의 실험방법에 따라 superoxide radical에 대한 익모초의 소거활성을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 시료 각 20 µl에 62 µM nitro blue tetrazolium (NBT)와 98 µM β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)를 함유한 20 mM Tris 용액(pH 8.0) 800 µl를 혼합한 다음, 20 mM Tris 용액 80 µl와 33 µM phenazine methosulfate (PMS) 100 µl를 각각 첨가하였다. 즉, 비효소적으로 PMS / NADH로 유발된 superoxide radical은 NBT를 자주색의 formazan으로 환원시킨다. 생성된 formazan을 측정하기 위해 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 560 nm에서 10분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였다. 시료의 superoxide radical scavenging activity는 $[(\text{흡광도}_{\text{시료무첨가}} - \text{흡광도}_{\text{시료}}) / \text{흡광도}_{\text{시료무첨가}}] \times 100$

의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 mU superoxide dismutase (SOD)를 사용하였다.

Lipid peroxidation assay

Shlafer *et al.* (1984)의 실험방법을 변형하여 lipid peroxidation에 대한 익모초의 항산화 효과를 측정하였다. 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 익모초 열수추출물 2 μl 를 linolenic acid emulsion 98 μl 와 혼합한 후에 0.8 mM H_2O_2 50 μl 와 0.8 mM FeSO_4 50 μl 를 혼합하여 hydroxyl radical을 발생시킨 용액과 5시간 동안 반응 후 0.4% 2-thiobarbituric acid (TBA)를 200 μl 첨가하고 95°C에서 2시간 반응시킨 다음 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 다음 15 : 1 비율의 n-butanol : pyridine 용액을 500 μl 첨가하고 1000 \times g에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 지질과산화 정도는 [(흡광도시료무첨가 - 흡광도시료) / 흡광도시료무첨가] \times 100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 $\mu\text{g/ml}$ vitamin E를 사용하였다.

Reducing power assay

Oyaizu (1986)의 방법에 따라 익모초의 환원력을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 익모초 열수추출물 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액을 1 ml 가하여 13500 \times g에서 15분 동안 원심분리 하고 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml를 혼합한 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 reducing power는 [(흡광도시료무첨가 - 흡광도시료) / 흡광도시료무첨가] \times 100의 공식으로 계산하였다. 5 $\mu\text{g/ml}$ vitamin C를 사용하였다.

UVB로 유도된 세포손상 회복 실험

UVB에 의한 HaCaT 세포주의 세포사멸을 유도하기 위하여 6 well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 세포주를 분주하고 37°C, 5% CO_2 가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/cm^2 세기로 UVB를 조사하여 세포사멸을 유도하였다. 여기에 익모초 열수추출물을 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하고 48 시간 동안 추가 배양

후 MTT 수용액을 최종농도 1 mg/ml 가 되도록 배지에 넣고 1시간 30분 동안 암소에서 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 DMSO 용액을 각 well 당 1 ml를 넣은 뒤 30분 정도 웨이커에 올려놓아 석출되게 한 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다.

UVB로 유도된 apoptosis 억제 활성 실험

Hoechst 33342 staining

HaCaT 세포주를 6 well plate에 2×10^5 cell/well이 되도록 접종하고 37°C, 5% CO_2 가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/cm^2 세기로 UVB를 조사하였다. 이후 0 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 익모초 열수추출물이 포함된 DMEM 배지를 각각 첨가하여 16시간 동안 배양하였다. 세포의 핵을 염색하기 위하여 배지의 상층액을 제거한 후 차가운 DPBS로 3회 세척하고 4% paraformaldehyde로 상온에서 30분간 처리하여 세포를 고정하였다. 다시 DPBS로 3회 세척 후 Hoechst 33342 (Molecular probes, Life Technologies, USA)를 DPBS에 녹인 1 $\mu\text{g/ml}$ 수용액으로 15분간 염색하고 형광 현미경(EVOS fl, AMG, USA)을 이용하여 apoptotic body를 관찰 하였다.

Annexin V staining

HaCaT 세포주를 6 well plate에 2×10^5 cell/well이 되도록 접종하고 37°C, 5% CO_2 가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/cm^2 로 UVB를 조사하였다. 0 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 익모초 열수추출물이 포함된 DMEM 배지를 각각 첨가하여 16시간 동안 배양하였다. Annexin V staining을 하기 위하여 annexin V & dead cell kit (Millipore, USA)를 사용하여 염색한 후 cell analyzer (Muze, Millipore, USA)로 측정하였다.

결과 및 고찰

익모초의 세포독성 실험

익모초 열수추출물이 HaCaT 세포주의 생존율에 미치는 영

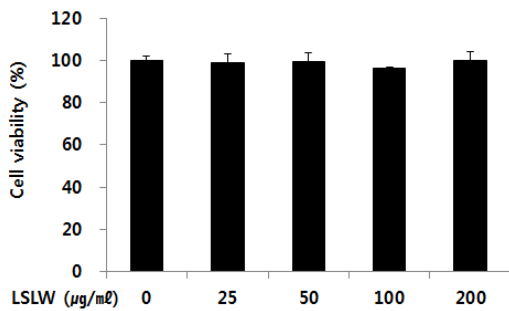


Fig. 1. Effects of LSLW on the cell viability of HaCaT cells. Data are given as means of values \pm S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test.

향을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군의 흡광도 평균을 100으로 정하고 각 흡광도 값을 환산하여 계산한 결과, 익모초 열수추출물 전 농도에서 대조군과의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 익모초 열수추출물은 200 µg/ml 이하의 농도에서 세포 생존율과 증식을 저해하지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

익모초의 항산화 능력

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 안정한 유리기로 cysteine, glutathion과 같은 황 함유 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine (p-phenylenediamine, p-aminophenol) 등에 의해 환원되어 자색이 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 익모초를 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 처리한 결과 DPPH radical 소거능은 16.39%, 35.81%, 62.52%, 66.15%로 농도가 증가함에 따라 소거효과의 증가를 관찰할 수 있었다. 항산화 효과가 있는 것으로 알려진 vitamin C를 양성 대조군으로 사용한 결과 10 µg/ml에서 44.12%의 DPPH radical 소거력을 보였다.

Fenton 반응에 의해 발생된 hydroxyl radical에 대한 익모초의 항산화 효과를 알아보기 위하여 hydroxyl radical assay를 수행한 결과 익모초를 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 처리했을 때 7.64%, 10.76%, 12.61%, 18.10%로 나타나 시료의 농도가 높을수록 유의성 있게 hydroxyl radical 소거능도 다소 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B).

Hydrogen peroxide에 대한 익모초의 항산화 효과를 알아보기 위하여 hydrogen peroxide scavenging assay를 수행한 결과 익모초는 100, 200 µg/ml 농도에서 각각 9.46%, 15.1%의 소

거능을 나타내어 200 µg/ml의 농도에서 14.96%의 소거능을 보여준 vitamin C와 hydrogen peroxide에 대한 유사한 항산화 능력을 확인할 수 있었다(Fig. 2C).

Xanthine과 xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide radical에 대한 익모초의 소거능을 평가한 결과 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리했을 때 27.81%, 40.65%, 59.31%의 superoxide radical 소거능을 확인할 수 있었으며 200 µg/ml의 농도에서는 79.01%로 superoxide radical 소거능이 뛰어난 것으로 알려진 superoxide dismutase (SOD) 100 mU (78.63%)와 유사한 항산화 능력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2D).

Lipid peroxide (LPO)는 세포막의 지질성분이 독성물질들에 의해서 손상을 받게 되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물로 LPO 함량은 생체 조직 중에서 생화학적 조직손상의 척도로 널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로 활용되어진다. 활성산소에 의해 생성된 과산화지질은 피부에 유해한 대표적인 물질로 불포화지방산이 산소를 흡수하여 산화되어 생기고, 이것이 증가하면 피부 섬유가 취약해져 주름살 색소 침착 등의 피부노화가 발생하며 뇌조직에 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Halliwell, 1987; Yu, 1993). 본 연구에서는 지질 과산화에 대한 익모초의 항산화 효과를 조사하기 위하여 linolenic acid를 Fenton반응으로 발생시킨 hydroxyl radical에 노출시켰다. hydroxyl radical에 의한 지질 과산화 확인을 위하여 기존에 알려진 친유성 항산화제인 vitamin E (10 µg/ml)를 사용한 결과 76.43%의 지질과산화 억제효과를 관찰할 수 있었으며 익모초는 100, 200 µg/ml 농도에서 9.38%, 32.86%의 지질과산화 억제효과를 나타내어 대조군과 비교하여 유의성 있는 지질과산화 억제효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 2E).

항산화 능력에서 중요한 화합물의 환원력은 항산화제로부터 제공되는 수소원자가 free radical과 반응하여 시작되는데 이러한 익모초의 환원력을 확인하기 위해 reducing power assay를 수행하였다. 익모초를 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 52.30%, 94.14%, 166.99%, 267.62%의 환원력을 관찰할 수 있었다. 양성 대조군으로는 항산화 효능이 잘 알려진 vitamin C (5 µg/ml)을 사용한 결과 211%의 환원력을 나타내어 200 µg/ml 농도의 익모초에서 유사한 항산화 능력을 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 2F).

UVB로 유도된 세포손상에 대한 익모초의 손상 회복 효과

UVB가 세포사멸을 유도하는지를 확인하고, 실험에 적절한

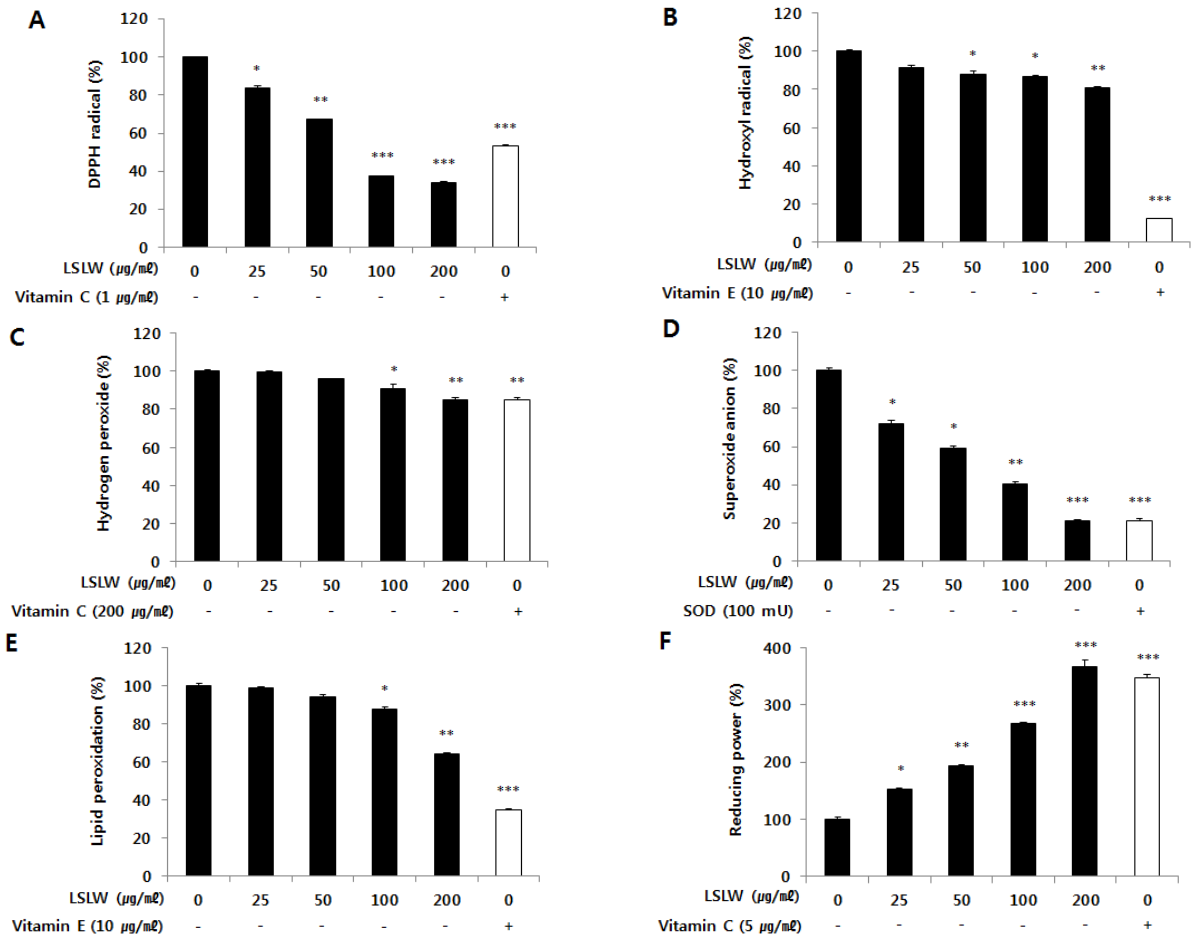


Fig. 2. Scavenging activities of LSLW on DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion, lipid peroxidation and reducing power of LSLW. DPPH radical(A), hydroxyl radical by Fenton reaction (B), hydrogen peroxide (C), superoxide anion (D), lipid peroxidation (E) and Reducing power (F) was evaluated in the presence of LSLW. After LSLW at the indicated concentrations was reacted with each radical, the optical density of each reaction mixture was measured at a specific wavelength with spectrophotometer. Data are given as means of values \pm S.D. from three independent experiments. Statistically significant value was calculated by comparing with negative control group using Student's t test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

세포사멸을 유도하는 UVB 조사량을 결정하기 위하여 HaCaT 세포주에 0, 20, 40, 80, 160 mJ/cm²로 UVB를 조사하였다. Fig. 3A 에서 보는 것과 같이 40 mJ/cm²을 조사하였을 때 세포의 약 50%가 사멸하였으며, 160 mJ/cm²을 조사하였을 때 세포가 모두 사멸한 것을 확인하였다. 따라서 최종 실험에 사용될 조사량은 LD₅₀ (lethal dose for 50 percent kill)에 해당하는 40 mJ/cm²로 결정하였다. UVB 손상에 대한 익모초 열수추출물의 회복력을 확인하기 위하여 세포에 UVB를 40 mJ/cm²로 조사한 후 익모초 열수추출물을 0, 25, 50, 100, 200 µg/ml로 처리하였다. Fig. 3B에서 보는 것과 같이 100, 200 µg/ml에서 손상 회복에 의한 생존율이 증가하였다. 따라서 익모초는 UVB로 유도된 세포손상에 대하여 회복 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

UVB로 유도된 apoptosis에 대한 익모초의 억제 효과

UVB로 유도된 apoptosis 현상에서 나타나는 apoptotic body를 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경에서 관찰하였다. UVB 조사 후 익모초 열수추출물 200 µg/ml를 처리한 군은 UVB만 처리한 군과 비교하였을 때, 회살표가 나타내는 것과 같이 정상세포 핵과는 다르게 핵의 응축이 일어나 apoptotic body를 형성한 세포가 현저히 감소하였음을 확인하였다(Fig. 4A).

UVB로 유도된 apoptosis에 대한 익모초의 효과를 수치화하기 위하여 annexin V staining을 시행하였다. 세포의 원형질막에 의지하고 있는 phosphatidylserine (PS)은 apoptosis에 의해 손상될 경우 early apoptosis 과정에서 원형질 외막으로 위치를 이동하게 된다. 따라서 세포의 원형질막에 있는 PS가 세포

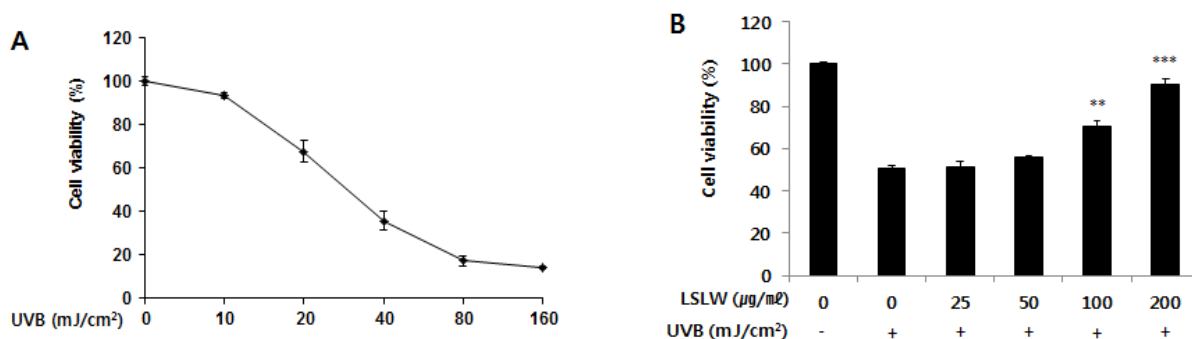


Fig. 3. Effect of UVB irradiation on HaCaT cells viability. Effect of various dose of UVB irradiation on cell viability (A). Cells were radiated with different doses of UVB irradiation and then incubated for 48 h. Effect of LSLW under UVB irradiation on cell viability (B). Cells were radiated with 40 mJ/cm² of UVB irradiation and then incubated with different doses of LSLW for 48 h. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Statistically significant value was calculated by comparing with UVB-only treated group using Student's t test (** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001).

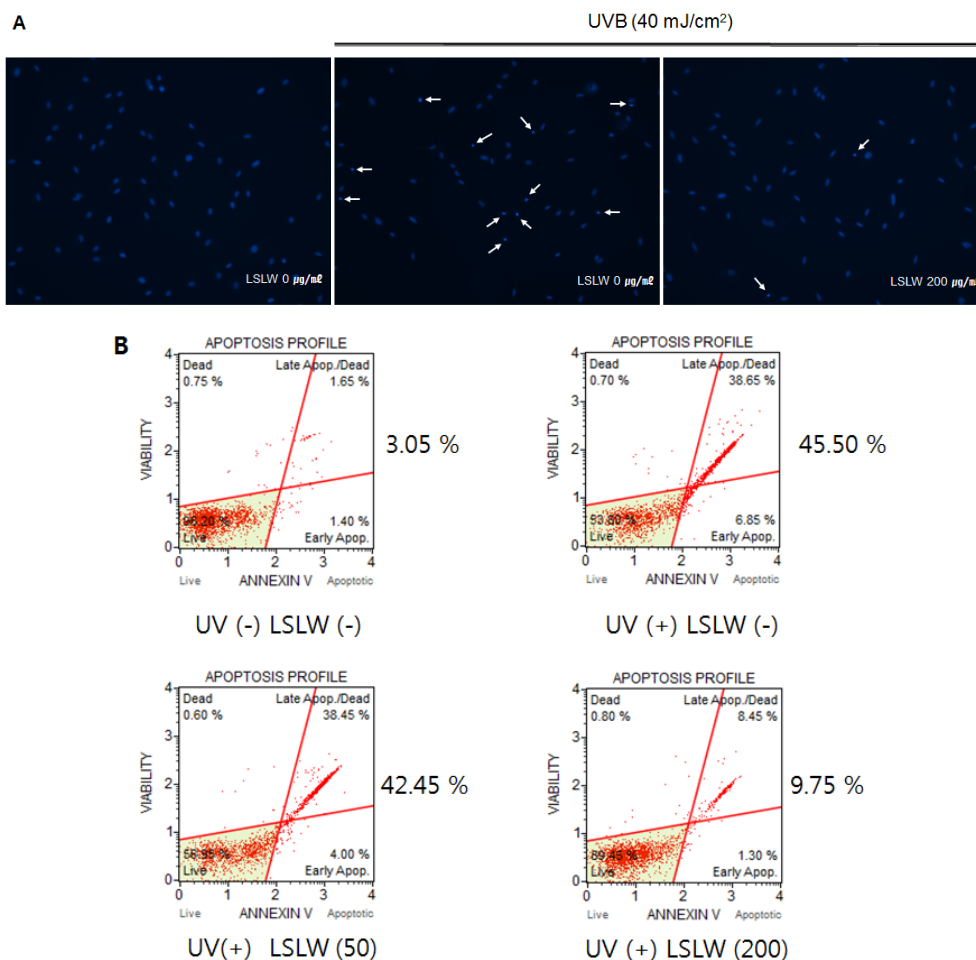


Fig. 4. UVB induces apoptosis in HaCaT cells. The cells were irradiated with the UVB (40 mJ/cm²), treat with LSLW, fixed and stained with Hoechst 33342 (A). The stained nuclei were observed under a fluorescent microscope, X200. Arrows indicate cells that show apoptotic body. Annexin V analysis in HaCaT cells after 40 mJ/cm² UVB irradiation then incubated with different doses of LSLW for 16 h (B).

외부로 노출되면 annexin V와 결합하게 되므로 apoptosis의 marker로 사용할 수 있다. 또한 annexin V & dead cell kit (Millipore, USA)의 dead cell marker는 세포막의 구조가 붕괴되어 손상에 대한 지표로서 살아있는 건강한 세포와 early apoptosis가 진행된 세포에서는 염색되지 않으므로 상기 kit를 통하여 apoptosis의 발현 및 진행 정도를 확인할 수 있다. UVB만 조사한 음성대조군에서는 early apoptosis가 6.85%, late apoptosis가 36.65% 유도되었다. UVB 조사 후 익모초 열수추출물을 200 µg/ml로 처리한 군에서는 early apoptosis가 1.3%, late apoptosis가 9.75% 유도되어 음성대조군과 비교하여 총 apoptosis 유도가 35.75% 감소하였다(Fig. 4B).

적 요

본 연구에서는 익모초 추출물의 항산화 효과 및 자외선으로 유도된 각질형성세포 손상에 대한 보호효과를 확인하고자 익모초 열수 추출물의 생체 내 산화적 스트레스와 관련되어 있는 DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide radical, lipid peroxidation에 대한 익모초 열수추출물의 소거 효과 및 환원력 평가 시험을 진행하였으며, 사람 각질형성세포 주인 HaCaT 세포주에서 UVB로 유도된 apoptosis에 대한 익모초의 억제 정도를 확인하였다. 그 결과, 익모초 열수추출물에서 농도 의존적으로 항산화 효과가 증가함을 확인할 수 있었으며, UVB로 유도된 apoptosis에 발현 또한 억제됨을 확인할 수 있었다. 현재 국내외적으로 천연물에 대한 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이를 바탕으로 하는 피부 보호 효과에 대한 연구는 항노화 측면에서 그 효용가치가 높다고 여겨진다. 따라서 본 실험 연구의 결과를 토대로 항산화 효과가 우수한 식물종에 대해 단일 물질에 대한 분리 작업과 함께 항노화 실험 뿐만 아니라 항염증이나 항암 등의 실험이 더 깊이 있게 진행된다면 새로운 천연물 유래 생리 활성 물질로서 효과적이면서도 안전한 화장품 소재로의 활용 또한 가능할 것으로 기대된다.

References

Afaq, F., V.M. Adhami and H. Mukhtar. 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res.* 57:1153-1173.

Boalino, D.M., S. Mclean, W.F. Reynolds and W.F. Tinto. 2004. Labdane diterpenes of *Leonurus sibiricus*. *J. Nat. Prod.* 67:714-717.

Boo, H.O., J.H. Shin, J.S. Shin, E.S. Choung, M.A. Bang, K.M. Choi and W.S. Song. 2012. Assessment on antioxidant potential and enzyme activity of some economic resource plants. *Korean J. Plant Res.* 25(3):349-356.

Brand-Williams W., M.E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol-Leb.* 28(1):25-30.

Chao, Z., L.L. Ma and X.J. Zhou. 2004. Determination of stachydrine and leonurine in *Herba Leonuri* by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Academic Journal of the First Medical College of PLA.* 24:1223-1226.

Cho, W.J., H.S. Yoon, Y.H. Kim, J.M. Kim, I.J. Yoo, M.D. Han and I.S. Bang. 2013. Cytoprotective effects and gene expression patterns observed based on the antioxidant activity of *Lonicera japonica* Extract. *Journal of Life Science* 23(8):989-997 (in Korean).

Choi, C.W., S.C. Kim, S.S. Hwang, B.K. Choi, H.J. Ahn, M.Y. Lee, S.H. Park and S.K. Kim. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 163(6):1161-1158.

Choi, G.P., B.H. Dhung, D.I. Lee, H.Y. Lee, J.H. Lee and J.D. Kim. 2002. Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10:399-402 (in Korean).

Chung, S.K., T. Osawa and S. Kawakishi. 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 61(1):118-123.

Filip, A., D. Daicovicu, S. Clichici, T. Mocan, A. Muresan and I.D. Postescu. 2011. Photoprotective effects of two natural products on ultraviolet B-induced oxidative stress and apoptosis in SKH-1 mouse skin. *J. Med. Food* 14:761-766.

Fuchs, J. and L. Packer. 1991. Photooxidative stress in the skin: *In* Sies, H. (ed.), *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, London, UK. pp. 559-583.

Ghee, S.S., G.J. Kil and Y.J. Lee. 2001. Effects of *Chiranthi flos* and *Leonuri herba* on the liver damaged with carbon tetrachloride treatment in rats. *Korean J. Herbology* 16:79-89 (in Korean).

Godar, D.E. 1996. Preprogrammed and programmed cell death mechanisms of apoptosis: UV-induced immediate and delayed apoptosis. *Photochem Photobiol.* 63:825-830.

Halliwell, B. 1987. Oxidants and human disease: some new

- concepts. *Fase. J.* 1:258-364.
- Heck, D.E., D.R. Gerecke, A.M. Vetrano and J.D. Laskin. 2004. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195:288-297.
- Hong, S.S., J.S. Hwang, S.A. Lee, B.Y. Hwang, K.W. Ha, K.R. Ze, R.S. Seung, J.S. Ro and K.S. Lee. 2001. Isolation and quantitative analysis of leonurine from *Leonuri herba*. *Korean J. Pharmacogn.* 32:322-326 (in Korean).
- Jo, Y.K. 2013. The development of anti-wrinkle cosmeceutical ingredients from *Leonuri herba* extract. *Korean J. Food Preserv.* 20(4):592-596 (in Korean).
- Kim, S.J., H.S. Han and Y.J. Lee. 2010. Effects of *Leonuri herba* and *Leonuri semen* on hypercholesterolemia. *Korean J. Herbology* 25:73-80 (in Korean).
- Kulms, D., B. Poppelmann, D. Yarosh, T.A. Luger, J. Krutmann and T. Schwarz. 1999. Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(14):7974-7979.
- Lee, S.W., G.E. Kim, J.Y. Kim, S.H. Chung, S.G. Kim, D.H. Kim, J.H. Kim and W.K. Whang. 2006. Compounds and anti-oxidative activities from the aerial parts of *Leonuri herba*. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* 20:53-59 (in Korean).
- Liu, F., V.E.C. Ooi and S.T. Chang. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extract. *Life Sci.* 60:763-771.
- Malorni, W., G. Donelli, E. Straface, M.T. Santini, S. Paradisi and P.U. Giacomoni. 1994. Both UVA and UVB induce cytoskeleton-dependent surface blebbing in epidermoid cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 26(3):265-270.
- Moll, I., E. Bohnert, U. Treib and E.G. Jung. 1994. Effects of ultraviolet B radiation on cytoskeletal and adhesion molecules in human epidermis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 10:26-32.
- Nagasawa, H., H. Inatomi, M. Suzuk and T. Mori. 1992. Further study on the effects of motherwort (*Leonurus sibiricus* L.) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. *Anticancer Res.* 12:141-143.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44:307-315.
- Park, K.K., J.W. Ryu, E.K. Choi and H.S. Ro. 2000. Anti-hypertensive effects of *Pini folium* and *Leonuri herba* extract on spontaneously hypertensive rat (SHR). *J. Applied Pharmacology* 8:27-31 (in Korean).
- Pontin, M.A., P.N. Piccoli, R. Francisco, R. Bottini, J.M. Martinez-Zapater and D. Lijavetzky. 2010. Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) leaves induced by ultraviolet-B radiation. *BMC Plant Biol.* 10:224.
- Professors of Herbology in College of Korean Medicine. 2002. *Textbook of Herbology*. Younglimsa Publishing Co., Seoul, Korea. p. 127, 131, 518, 534, 540, 583 (in Korean).
- Pugliese, P.T. 1995. The skin, free radicals, and oxidative stress. *Dermatol. Nurs.* 7:361-369.
- Satoh, M., Y. Satoh, K. Isobe and Y. Fujimoto. 2003. Studies on the constituents of *Leonurus sibiricus* L. *Chem. Pharm. Bull.* 51:341-342.
- Shin, S.H. 1984. Studies on active principles of *Leonurus sibiricus*. *Korean J. Pharmacogn.* 15:104-107 (in Korean).
- Shindo, Y. and T. Hashimoto. 1998. Ultraviolet B-induced cell death in four cutaneous cell lines exhibiting different enzymatic antioxidant defences: involvement of apoptosis. *J Dermatol Sci.* 17:140-150.
- Shlafer, M. and B.M. Shepard. 1984. A method to reduce interference by sucrose in the detection of thiobarbituric acid-reactive substances. *Analytical Biochemistry* 137(2): 269-276.
- Verschooten, L., L. Declercq and M. Garmyn. 2006. Adaptive response of the skin to UVB damage: role of the p53 protein. *Int. J. Cosmetic Sci.* 28:1-7.
- Yaar, M. and B.A. Gilchrist. 2007. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *British Journal of Dermatology* 157(5):874-887.
- Yang, Y.J., H.J. Kim, S.H. Kang and S.C. Kang. 2011. Screening of natural herb resources for anti-oxidative effects in Korea. *Korean J. Plant Res.* 24(1):1-9.
- Zamansky, G.B. and I.N. Chou. 1987. Environmental wavelengths of ultraviolet light induce cytoskeletal damage. *J. Invest. Dermatol.* 89:603-606.
- _____. 1990. Disruption of keratin intermediate filaments by ultraviolet radiation in cultured human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* 52:903-906.
- Zamansky, G.B., B.A. Perrino and I.N. Chou. 1991. Disruption of cytoplasmic microtubules by ultraviolet radiation. *Exp. Cell. Res.* 195:269-273.