



산벚나무 가지 추출물 및 용매 분획물의 Nitric Oxide 생성 억제 효과와 여드름 원인균에 대한 항균활성

양선아*† · 표병식** · 김선민**

*동신대학교 생물자원산업화지원센터, **동신대학교 한약재산업학과

Antibacterial and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of *Prunus sargentii* Branches Extract and Its Fractions against Pathogens of Acne

Sun A Yang*†, Byoung Sik Pyo** and Sun Min Kim**

*Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Naju 58245, Korea.

**Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju 58245, Korea.

ABSTRACT

Background: In this study, we investigated the antibacterial and nitric oxide (NO) production inhibitory activities of 75% ethanol extract of *Prunus sargentii* branches and its fractions against acne pathogens.

Methods and Results: The antibacterial activity against acne causing pathogens was determined using the disc diffusion assay. The ethyl acetate fraction showed higher activities against *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* than those shown by other fractions. In the DPPH radical and NO scavenging assays, the butanol fraction showed strong DPPH radical and NO scavenging abilities. These activities were related to the total polyphenol and flavonoid contents of butanol fraction. On the other hand, the chloroform and ethyl acetate fractions exhibited the highest NO production inhibitory activity in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw 264.7 cells compared to those exhibited by other fractions.

Conclusions: The extract and its ethyl acetate fraction from the branches of *P. sargentii* exhibited antibacterial activity and could be used as functional materials in antimicrobial related fields. Moreover, the chloroform and ethyl acetate fractions are potential anti-inflammatory agents and butanol fraction acts as an effective radical scavenger.

Key Words: *Prunus sargentii*, Acne, Antibacterial Activity, Antioxidative Activity, Anti-Inflammatory

서 언

피부는 외부 자극으로부터 신체를 보호하는 기관으로 체온 조절 작용, 에너지 저장 작용, 분비 및 흡수 작용, 비타민 D 합성 등의 많은 역할을 수행하고 있지만, 스트레스 및 외부 자극에 노출될 경우 1차적으로 가장 손상 받기 쉬운 부분이기도 하다. 피부에 영향을 미치는 요인으로는 생물학적 원인, 물리적 원인, 화학적 원인, 면역학적 원인으로 크게 구별된다 (Park and Choi, 2011). 그중에서 여드름은 모낭-피지선단위의 만성 염증성 질환으로 얼굴, 등, 어깨, 목에 주로 나타나며 사

춘기 청소년의 85%에서 관찰되며, 20대 중반부터 소실되지만 최근에는 성인기 여드름이 증가하는 경향을 보인다.

*Propionibacterium acnes*는 여드름의 주 원인균으로 혐기성 세균이며 피부 안쪽 또는 피지선에 존재한다. 청소년기 호르몬 활동이 증가하고 피지선의 분비가 활발할 때 *P. acnes*는 엄청난 수로 증가하고, 이때 생성되는 대사산물에 의해 염증이 생기고 여드름이 발생한다 (Raimier, 2000). 일반적인 치료법은 벤조일과산화물 (benzoyl peroxide), 레티노이드 (retinoid), 항생제, 압출요법, 광선치료, 여성호르몬, 스테로이드 등을 주로 사용한다. 하지만 치료과정중에 발생하는 부작용과 내성, 안전

†Corresponding author: (Phone) +82-61-336-3104 (E-mail) sa861126@gmail.com

Received 2016 February 2 / 1st Revised 2016 February 14 / 2nd Revised 2016 February 18 / 3rd Revised 2016 February 24 / Accepted 2016 February 25
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성 등의 문제로 인해 천연물을 이용한 새로운 치료물질 개발에 대한 관심이 높아지고 있다 (Kim *et al.*, 2013).

산벚나무 (*Prunus sargentii*)는 장미과 (Rosaceae) 벚나무속 (*Prunus*)에 속하는 식물로, 산벚나무의 수피와 가지는 벚나무 (*Prunus serrulata*), 왕벚나무 (*Prunus yedoensis*)의 수피와 함께 화피 (樺皮) 또는 앵피 (櫻皮)라는 생약재로 염증성 질환이나 피부 관련 질환에 빈번히 이용되어 왔다 (Shin, 2006). Sakuranin, aringenin, taxifolin, pinostobin 등이 지금까지 밝혀진 주요성분으로, 관련된 활성으로는 항산화 활성과 면역억제 활성, 항염증 활성, 피부 미백 활성, 항균활성 등이 연구되어 왔다 (Kang, 2007; Lee *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2008). 벚나무의 열매는 anthocyanin 함량이 풍부한 천연색소로서의 우수한 식용 적색 색소자원임을 보고하였고 (Kim, 1999), 벚꽃이 차의 재료로 우수한 자원이 될 수 있다 하였으며 (Kim *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007), 나무 심재 추출물에는 항균 및 항산화 활성물질이 발견되었다는 결과가 보고되는 (Lee *et al.*, 2001) 등 개발가능성이 매우 많은 식물인 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 산벚나무의 가지의 75% ethanol 추출물과 용매 분획별 항산화 활성, nitric oxide 생성 억제능과 피부질환 중 여드름 원인균에 대한 항균활성 등을 조사하여 산벚나무 가지를 이용한 피부 관련 기능성 소재 개발의 가능성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 산벚나무 (*Prunus sargentii*)가지는 2011년 6월 전라남도 나주시 야산에 자생하는 산벚나무에서 분리한 것으로 수세하여 40°C에서 건조시킨 후 4°C 이하로 냉장보관하였으며, 표본은 동신대학교 생물자원산업화지원센터 (BIC)에 보관되어 있다.

2. 추출 및 분획

건조된 산벚나무 가지를 마쇄한 후 75% Ethanol (EtOH)을 이용하여 80°C에서 환류추출을 실시하였다. 추출액은 여과, 농축 및 동결건조를 실시하여 9.40%의 수율로 추출물을 획득하였고, 이중 일부를 증류수에 분산시킨 후 chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol을 사용하여 용매분획을 실시하였다. 분획된 시료는 여과, 농축 및 동결건조하여 분말화하였다. 추출물과 분획물은 4°C 이하로 냉장보관하면서 실험에 사용하였으며, 분획수율은 BuOH 분획 (BF)과 Aqueous 분획 (AF)이 각각 39.82%, 35.11%로 높게 나타났으며 CHCl₃ 분획 (CF)은 8.65%, EtOAc 분획 (EF)은 16.42%로 나타났다.

3. 사용 균주와 세포주 및 시약

한국생명공학연구원 생물자원센터 (BRC)에서 분양받은 *Propionibacterium acnes* (KCTC3314) 균주는 Reinforced Clostridial Medium (RCM, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)을, *Staphylococcus aureus* (KCTC3881), *Staphylococcus epidermidis* (KCTC1917) 균주는 nutrient broth 및 agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)를 이용하여 항균활성 실험에 사용하였다. 세포독성 시험과 NO 생성 억제실험에 사용된 동물세포주인 Raw 264.7은 BRC에서 분양 받은 것을 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, WelGENE, Gyeongsan, Korea) 에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 혼합한 배지를 이용하여 실험에 사용하였다. 그 외 사용된 모든 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)을 통하여 구입, 사용하였다.

4. 총 polyphenol 및 flavonoid 함량 측정

Folin-Denis법을 이용하여 75% EtOH 추출물 및 분획의 polyphenol 함량을 측정하였다 (Folin and Denis, 1912). 1 mg/ml 농도로 Methanol (MeOH)에 용해시킨 시료액과 Folin-Denis reagent를 1:1로 혼합하여 3분간 반응시킨 뒤 동량의 10% Na₂CO₃를 혼합하여 1시간동안 암실에서 반응시킨 후, 상등액을 취하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 tannic acid를 MeOH에 0-500 µg/ml의 다양한 농도로 용해시켜 시료와 동일한 방법으로 표준 검량선을 작성하고 총 polyphenol 함량을 mg/g로 나타내었다. 한편, 페놀성 화합물중 여러 기능성을 가지는 것으로 알려진 flavonoid 함량을 알아보기 위해 Moreno 등 (2000)의 방법을 변형하여 flavonoid 함량을 측정하였다. MeOH에 1 mg/ml 농도로 용해시킨 시료액 100 µl 와 1 M potassium acetate 20 µl, 10% aluminium nitrate 20 µl, MeOH 860 µl를 혼합하여 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 사용한 rutin을 MeOH에 0-500 µg/ml의 다양한 농도로 용해시켜 시료와 동일한 방법으로 표준 검량선을 작성하고 총 flavonoid 함량을 mg/g로 나타내었다.

5. DPPH radical 소거능 측정

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 사용하여 radical 소거능을 측정하여 항산화 활성을 비교하였다 (Blois, 1958). MeOH에 일정농도로 용해시킨 시료액 20 µl 와 MeOH에 200 µM로 용해시킨 DPPH 용액 180 µl를 혼합하여 20분간 암실에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 50%의 radical을 소거하는데 필요한 농도 (SC₅₀)를 계산하였다. Positive

control로 천연 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid를 사용하였다.

6. Nitric oxide 소거능 측정

NO 소거능은 Marcocci 등 (1994)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 10 mM sodium nitroferricyanide (III) dihydrate 50 μ l와 증류수에 0.1 - 5 mg/ml의 농도로 용해시킨 시료액 30 μ l를 혼합하여 150분 동안 25°C에서 반응시켰다. 30% acetic acid에 용해시킨 1% sulfanilamide 60 μ l를 혼합하고 5분후 60% acetic acid에 용해시킨 0.1% N-(naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride 60 μ l를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 50%의 NO를 소거하는데 필요한 농도 (SC₅₀)를 계산하였으며, positive control로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

7. Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

Disc diffusion assay를 이용하여 산벚나무 가지 추출물과 분획의 항균활성을 비교하였다. 계대 배양된 각 균주 배양액 (10⁷ - 10⁸ CFU/ml)을 100 μ l씩 항균시험용 평판배지에 분주한 후 멸균 면봉을 이용하여 도말하였고, 시료를 6 mm의 paper disc에 1.0, 5.0 mg이 되도록 천천히 흡수시킨 뒤 건조한 후 평판배지 위에 밀착시킨 상태로 24시간 배양한 후 disc를 중심으로 생성된 생육저해환 (clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다. *P. acnes* 균주의 배양에는 5% CO₂가 공급되는 incubator를 활용하였다.

8. NO 생성량 및 세포생존율 측정

96 well plate에 Raw 264.7 세포를 1 × 10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양한 후, 농도별 시료액과 LPS (2 μ g/ml)를 혼합하여 24시간 동안 배양하였다. 각 well에서 세포 배양액을 50 μ l씩 회수하여 새로운 plate에 옮기고 50 μ l의 1% sulfanilamide (in 5% H₃PO₄)를 혼합하여 10분간 반응시킨 후, 다시 50 μ l의 0.1% N-(naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride (in H₂O)를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액 대신 PBS를 가하여 blank를 측정하였으며, 표준물질로 sodium nitrite를 농도별로 희석하여 시료액과 같은 방법으로 흡광도를 측정하여 작성한 검량선을 이용하여 NO 생성량을 산출하였다 (Ding *et al.*, 1988).

추출물 및 분획의 세포독성은 MTT assay 방법에 의해 측정하였다 (Shin *et al.*, 2003). 96 well plate에 1 × 10⁴ cells/well의 농도로 배양된 Raw 264.7 세포를 분주하여 24시간 배양하여 부착 및 안정화를 시킨 후, 다양한 농도로 조제한 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 2.5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 (in PBS)을 각 well에 20 μ l씩 가하고,

37°C, 5% CO₂ 조건에서 4시간 동안 반응시켜 MTT가 환원되도록 하였다. 배지를 제거한 후, 각 well에 생성된 formazan 결정을 용해시키기 위하여 100 μ l의 DMSO를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료액 대신 PBS를 사용한 well의 흡광도를 기준으로 세포 생존율 산출하였다.

9. 통계분석

모든 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차 (means \pm SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 windows용 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행하였으며, 유의성은 신뢰구간 *p* < 0.05에서 의미를 부여하였다.

결과 및 고찰

1. 총 polyphenol 및 flavonoid 함량

약용 자원식물 중에 존재하는 polyphenol 화합물은 phenolic hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물로서 활성산소를 제거하여 항산화 활성이나 항암 활성, 항염증, 항알레르기 등의 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Sivaranjani *et al.*, 2013). 한편, 전형적인 페놀성 화합물로서 C₆-C₃-C₆의 기본구조를 가지는 flavonoid의 polyphenolic한 성질은 free radical을 없애주는 항산화 활성을 비롯하여 항암, 항균 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Dewick, 2002).

산벚나무 가지의 추출물과 용매 분획별 시료의 polyphenol과 flavonoid 함량을 측정된 결과, 추출물 중 polyphenol 함량이 277.92 mg/g으로 나타났고, 용매 분획별 시료에서 EF와 BF의 함량이 각각 311.92 mg/g, 419.11 mg/g으로 추출물보다 높게 나타났으며, CF, AF의 함량은 각각 91.46 mg/g, 96.18 mg/g으로 추출물보다 현저히 낮은 함량을 보여주었다 (Table 1).

Table 1. Total phenolic compound and flavonoid content of extract and fractions from blanches of *Prunus sargentii*.

	Total phenolic compound (mg/g TAE ¹)	Flavonoid (mg/g RE ²)
EX	277.92 \pm 10.42c	20.36 \pm 0.31b*
CF	91.46 \pm 3.29d	10.07 \pm 0.31c
EF	311.92 \pm 7.31b	27.22 \pm 1.25a
BF	419.11 \pm 7.01a	27.40 \pm 0.62a
AF	96.18 \pm 0.24e	6.10 \pm 0.31d

EX; 75% Ethanol extract of *P. sargentii*, CF; Chloroform Fraction, EF; Ethyl acetate Fraction, BF; Butanol Fraction, AF; Aqueous Fraction. ¹TAE; Tannic Acid Equivalent, ²RE; Rutin Equivalent. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (*p* < 0.05).

Flavonoid 함량에서도 이와 유사한 양상으로 나타났는데, 추출물의 flavonoid 함량이 20.36 mg/g이었으나, EF와 BF의 flavonoid 함량이 각각 27.22 mg/g, 27.40 mg/g으로 추출물보다 높게 나타났다. 플라보노이드, 페놀산 등 페놀화합물을 다량 함유하고 있다고 알려진 베리류의 EtOH 추출물의 총 폴리페놀 함량을 살펴보면 아로니아G/블랙초크베리 (*Aronia G*, *Aronia melanocarpa*, GreenField s.c.)가 138.81 mg/g로 가장 높은 함량을 보여주었는데 이는 산벚나무 가지 추출물보다 2배정도 낮은 수치였다. 플라보노이드 함량도 총 폴리페놀 함량과 유사하게 베리류 중 가장 높은 함량을 보여준 아로니아G/블랙초크베리가 3.68 mg/g이었으나, 산벚나무 가지 추출물은 20.36 mg/g으로 5배 정도 높은 함량을 나타내었다 (Li and Jeong, 2015). 이러한 결과는 산벚나무의 항산화 활성을 비롯하여 항암, 항균 등 다양한 생리활성을 탐색하는 일차적인 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

2. DPPH radical 소거능

산벚나무 가지의 추출물과 용매 분획별 시료의 DPPH radical 소거능 측정에서 50%의 DPPH radical을 소거하는데 필요한 시료의 농도를 산출한 SC₅₀ 값과 positive control로 사용된 ascorbic acid의 SC₅₀ 값을 기준으로 비교한 relative activity를 Table 2에 나타내었다. BF의 SC₅₀ 값이 19.75 µg/ml로 30.13 µg/ml 인 추출물보다 높은 활성을 보여주었다. 이와 같은 SC₅₀ 수치는 relative activity에 나타난 바와 같이 BF의 활성이 135.62% 수준으로 positive control보다 높은 수준의 항산화 효과를 보여주었다.

식물체내의 페놀화합물은 2차 대사산물로서 항산화, 항균 등 다양한 생리활성을 나타내며 특히 페놀성 화합물의 함량이 높으면 자유라디칼 소거능도 우수한 경향이 있다고 보고되고 있다 (Anagnostopoulou *et al.*, 2006). 이와 같이 페놀 화합물

Table 2. SC₅₀ values in DPPH radical scavenging ability of extract and fractions from blanches of *Prunus sargentii*.

	SC ₅₀ (µg/ml) ¹⁾	Relative activity (%) ²⁾
EX	30.13 ± 1.21b*	88.88
CF	228.95 ± 10.07d	11.70
EF	32.48 ± 1.27b	82.44
BF	19.75 ± 1.22a	135.62
AF	66.68 ± 1.85c	38.99
AA	26.78 ± 0.28ab	100.00

EX; 75% Ethanol extract of *P. sargentii*, CF; Chloroform Fraction, EF; Ethyl acetate Fraction, BF; Butanol Fraction, AF; Aqueous Fraction, AA; Ascorbic Acid. Ascorbic acid was used as a positive control. ¹⁾SC₅₀; concentration of each samples for scavenging 50% of DPPH radical, ²⁾Relative activity; ratio of SC₅₀ value compared to positive control (ascorbic acid). Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (p < 0.05).

Table 3. SC₅₀ values in nitric oxide scavenging ability of extract and fractions from blanches of *Prunus sargentii*.

	SC ₅₀ ¹⁾ (µg/ml)	Relative activity ²⁾ (%)
EX	90.70 ± 12.20a*	344.87
CF	384.72 ± 17.74d	81.31
EF	121.55 ± 2.25b	257.34
BF	93.17 ± 7.44a	355.74
AF	569.37 ± 3.54e	54.94
AA	312.80 ± 6.24c	100.00

EX; 75% Ethanol extract of *P. sargentii*, CF; Chloroform Fraction, EF; Ethyl acetate Fraction, BF; Butanol Fraction, AF; Aqueous Fraction, AA; Ascorbic Acid. Ascorbic acid was used as a positive control. ¹⁾SC₅₀; concentration of each samples for scavenging 50% of nitric oxide, ²⁾Relative activity; ratio of SC₅₀ value compared to positive control (ascorbic acid). Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT (p < 0.05).

함량과 항산화 활성간의 상호작용에 대한 많은 연구결과들에서 알 수 있듯이 (Choi *et al.*, 2003; Velioglu *et al.*, 1998) 산벚나무 가지 BF의 항산화 활성은 높은 폴리페놀 함량에 기인한 결과인 것으로 판단되어진다.

3. NO 소거능

외부상처에 대한 반응 및 염증 같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 Interleukin 1 (IL-1)이나 Tumor Necrosis Factor (TNF) 등에 의해 유도된 inducible Nitric Oxide Synthase (i-NOS)에 의하여 생성되는 NO는 혈액응고 및 혈압 조절, 암세포에 대한 면역기능 등의 역할을 수행하는 물질이지만, 인체에 과량 존재하면 세포손상, 염증 반응, 뇌막염, 알츠하이머병과 파킨슨병 같은 퇴행성 질환에 중요한 요인으로 작용하는 등의 유해한 영향을 미치게 된다. 또한 superoxide 음이온 (O²⁻)과 반응하여 생성된 peroxynitrite (ONOO⁻)는 매우 반응성이 높고 독성이 강한 산화제로 반응 속도는 H₂O₂의 수천 배에 이르며 짧은 시간 동안 급속한 신경세포손상을 유발하는 것으로 보고되고 있다 (Park and Yang, 2008).

산벚나무 가지의 추출물과 용매 분획별 NO 소거능 측정에서 50%의 nitric oxide를 소거하는데 필요한 시료의 농도를 산출한 SC₅₀ 값을 Table 3에 나타내었다. BF의 SC₅₀ 값이 93.17 µg/ml로 90.70 µg/ml 인 추출물과 비슷한 수준의 활성을 보여주었다. Positive control의 SC₅₀ 값을 기준으로 비교한 relative activity에 나타난 바와 같이 추출물과 EF와 BF의 활성이 257.34 - 355.74%의 수준으로 positive control인 ascorbic acid보다 월등히 높은 수준의 NO 소거활성을 보여주었다.

4. 여드름 원인균에 대한 항균활성

피부질환 중 대표적인 여드름은 일반적으로 유전적 소질 및 피지생산의 증가, *P. acnes*의 증식 등의 주요인자가 복합적으

Table 4. Antibacterial activities of extract and fractions from blanches of *Prunus sargentii*.

	Concentration (mg/disc)	Diameter of clear zone (mm)		
		<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
EX	5.0	16.08 ± 0.39c	12.64 ± 0.66a	12.47 ± 0.53b*
	1.0	10.58 ± 0.07f	—	8.73 ± 0.54cd
CF	5.0	12.91 ± 0.10d	10.47 ± 0.23b	9.74 ± 0.20c
	1.0	11.70 ± 0.18e	8.37 ± 0.46c	8.25 ± 0.38e
EF	5.0	20.63 ± 0.41a	13.11 ± 0.33a	15.62 ± 1.30a
	1.0	17.19 ± 0.50b	10.08 ± 1.49b	9.78 ± 0.23c
BF	5.0	— ¹⁾	—	—
	1.0	—	—	—
AFF	5.0	—	—	—
	1.0	—	—	—
CM	0.5	NT ²⁾	20.59 ± 0.59	10.57 ± 0.55
	0.1	17.76 ± 0.40	NT	NT

EX; 75% Ethanol extract of *P. sargentii*, CF; Chloroform Fraction, EF; Ethyl acetate Fraction, BF; Butanol Fraction, AF; Aqueous Fraction, CM; Clindamycin. Clindamycin was used as a positive control. ¹⁾No inhibition, ²⁾Not tasted. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ($p < 0.05$).

로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다 (Cunliffe *et al.*, 2004). 물론 미생물학적인 원인균도 *P. acnes* 뿐만이 아니라 피부 상재균인 *S. aureus*, *S. epidermidis* 등과 같은 균주들이 관여하는 것이 일반적이다 (Ki *et al.*, 2005).

Disc diffusion assay를 활용하여 여드름 원인균에 대한 항균활성 비교한 결과를 Table 4에 나타내었다. *P. acnes*에 대한 항균활성 결과를 살펴보면, 5 mg/disc 농도로 처리하였을 경우 추출물은 16.08 mm의 생육저해환을 형성하였으며, EF가 20.63 mm의 생육저해환을 형성함으로써 가장 높은 활성을 나타내었다. 1 mg/disc로 처리하였을 때에는 CF와 EF가 각각 11.70 mm와 17.19 mm의 생육저해환을 형성함으로써 10.58 mm의 생육저해환을 형성한 추출물보다 높은 활성을 보여주었다. *S. aureus*, *S. epidermidis*에 대한 항균활성의 결과를 살펴보면 5 mg/disc 농도로 처리하였을 경우 EF에서 가장 큰 활성을 보여주었다. 하지만 여드름 원인균인 세 균주에 대한 CF가 가지는 항균활성은 세포독성에서 기인된 항균활성으로 사료되어진다. 이와 같은 항균활성은 산벚나무의 다른 부위인 잎 추출물 및 용매별 분획의 항균활성 (Yang *et al.*, 2012)과 비교하였을 때, 산벚나무 가지 추출물 및 분획이 산벚나무 잎 추출물 및 분획 보다 높은 활성을 보여줌으로써 활용가능성은 충분히 있는 것으로 판단되었다.

5. NO 생성 억제 활성과 세포독성

그람 음성균의 세포외막에 존재하는 독소인 LPS는 macrophage에 작용하여 inflammatory cytokine의 발현과 함께

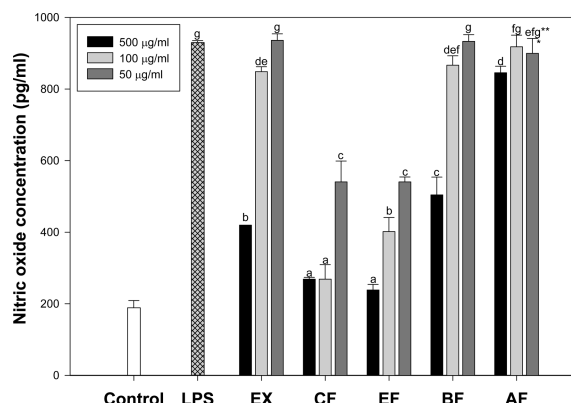


Fig. 1. Nitric oxide production inhibitory activity of the extract and fractions from blanches of *Prunus sargentii* in Raw 264.7 cell. EX; 75% Ethanol extract of *P. sargentii*, CF; Chloroform Fraction, EF; Ethyl acetate Fraction, BF; Butanol Fraction, AF; Aqueous Fraction. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ($p < 0.05$).

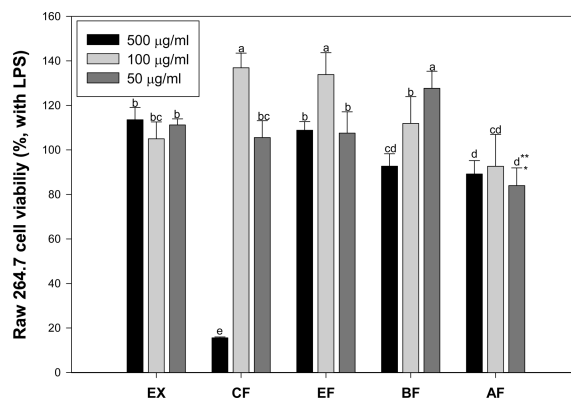


Fig. 2. Raw 264.7 cell viabilities of the extract and fractions from blanches of *Prunus sargentii* by MTT assay. EX; 75% Ethanol extract of *P. sargentii*, CF; Chloroform Fraction, EF; Ethyl acetate Fraction, BF; Butanol Fraction, AF; Aqueous Fraction. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *Means within a column followed by the same letter are not significant based on the DMRT ($p < 0.05$).

NO의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2004; Song and Lee, 2015). LPS로 염증반응이 유도된 Raw 264.7 cell에서 산벚나무 가지의 추출물과 분획의 NO 생성 억제활성을 측정된 결과 (Fig. 1), CF를 100 µg/ml의 농도로 EF를 500 µg/ml의 농도로 처리하였을 때, 각각 268.58 pg/ml, 238.38 pg/ml의 NO를 생성함으로써 높은 NO 생성 억제능을 보여주었다. CF의 경우에는 500 µg/ml의 농도로 처리하였을 때에도 268.58 pg/ml의 NO 생성량을 보여주었지만 세포독성에 기인한 활성으로 확인되어 적절한 농도의 설정이 필요할

것으로 판단되었다. 추출물과 BF의 경우에는 이미 생성되어 있는 NO를 소거하는 활성은 높지만, NO의 생성을 억제하는 활성은 소거하는 활성에 비해 낮은 것으로 판단되었다.

한편, LPS로 NO의 생성을 촉진시킨 상태에서 산벚나무 가지의 추출물과 용매별 분획의 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. CF를 500 µg/ml로 처리하였을 때, 세포 생존률이 15.90%로 독성을 나타냈으며, 추출물과 다른 분획의 경우에는 80% 이상의 세포 생존률을 보여줌으로써 세포독성을 나타내지 않았다.

이상의 결과에서 75% EtOH 추출물의 BF이 활성물질군인 polyphenol과 flavonoid 함량을 바탕으로 항산화 활성을 확인하기 위해 실시한 DPPH radical 소거능과 NO 소거활성 측정에서 가장 높은 항산화 활성을 보여주었다. 여드름을 유발하는 원인균으로 밝혀진 *P. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*에 대한 항균활성에서 추출물, CF와 EF가 강력한 항균활성을 나타내었는데 CF의 항균활성은 세포독성에 기인한 항균활성으로 판단되어진다. NO 생성 억제 활성에서는 CF와 EF에서 높은 NO 생성 억제활성을 확인할 수 있었다. 하지만 CF를 고농도로 처리하였을 때, 세포독성이 확인되어 적절한 농도의 설정이 필요할 것으로 판단되었다. 추출물과 BF의 경우에는 생성되어있는 NO를 소거하는 활성은 좋지만 NO의 생성을 억제하는 활성은 낮은 것으로 나타났다. 따라서 추가적인 연구를 진행한다면 산벚나무 가지 EF의 경우 여드름 원인균에 대한 항균활성을 이용한 기능성 소재로서 그리고 CF와 EF의 경우 항염증 관련 활성을 가지는 소재로서의 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

REFERENCES

- Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN and Boskou D.** (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel(*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*. 94:19-25.
- Blois MS.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200.
- Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM and Lee JS.** (2003). The antioxidant activities of the some commercial teas. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32:723-727.
- Cunliffe WJ, Holland DB and Jeremy A.** (2004). Comedone formation: Etiology, clinical presentation and treatment. *Clinics in Dermatology*. 22:367-374.
- Dewick PM.** (2002). Medicinal natural products. John Wiley and Sons. Chichester, England. p.149-151.
- Ding AH, Nathan CF and Stuehr DJ.** (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology*. 141:2407-2412.
- Folin O and Denis W.** (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*. 12:239-243.
- Kang GJ.** (2007). Inhibitory effect of organic extracts from *Prunus yedoensis* Matsum barks on the atopic dermatitis-like inflammation. Master Thesis. Cheju National University. p.56-60.
- Ki HG, Yun SJ, Lee JB, Kim SJ, Lee SC and Won YH.** (2005). Microorganism isolated from acne and their antibiotic susceptibility. *Korean Journal of Dermatology*. 43:871-875.
- Kim HJ, Heo BK, Baek SH, Park YS and Park YJ.** (2006). Effects of the tea manufacture method on mineral contents and sensory evaluation in flower and young leaf of *Prunus serrulata* Lindl. var. *spontanea* Max. *People, Plants and Environment*. 9:26-33.
- Kim SS, Hyun JM, Kim KS, Park KJ, Park SM and Choi YH.** (2013). Influence of essential oil in 'Shiranuhi' immature fruit on antioxidant and antimicrobial activities. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:493-497.
- Kim YH.** (1999). The characterization of anthocyanin pigments prepared from cherry(*Prunus serrulata* L. var. *spontanea* Max. Wils.) for the potential sources of red colorant. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 42:134-169.
- Lee ES, Ju HK, Moon TC, Lee E, Jang Y, Lee SH, Son JK, Baek SH and Chang HW.** (2004). Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor(NF)- κ B activation in cultured murine macrophage. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27:617-620.
- Lee SS, Lee HJ and Choi DH.** (2001). Studies on biological activity of wood extractives(VII): Antimicrobial and antioxidation activities of extractives from the heartwood of *Prunus sargentii*. *Journal of the Korean Wood Science and Technology*. 29:140-145.
- Li H and Jeong JM.** (2015). Antioxidant activities of various berries ethanolic extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:49-56.
- Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT and Packer L.** (1994). The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 201:748-755.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 71:109-114.
- Park EY and Yang KS.** (2008). In hibition of nitric oxide production by the extracts of *Hibiscus manihot*. *Yakhak Hoeji*. 52:259-263.
- Park JA and Choi MO.** (2011). Antimicrobial activity and anti-inflammation effect to the human skin pathogens by the *Rumex crispus* L. root extracts. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetology*. 9:9-16.
- Park JM, Lee JY, Park TS, Park GH, Park KS, Kim TH, Cho YJ, Kwon OJ, Choi KI and An BJ.** (2008). Biological activity investigation, and phenol compounds isolation from barks of *Prunus sargentii* R. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:173-182.
- Park YJ, Kim HJ and Heo BG.** (2007). Anti-microbial, anti-oxidant and anti-inflammation effects with of the flower and

- the young leaf extracts in Oriental cherry plants. Korean Society for Plants, People and Environment. 10:43-49.
- Raimer SS.** (2000). Managing pediatric atopic dermatitis. *Clinical Pediatric*. 39:1-14.
- Shin KM, Park YM, Kim IT, Hong SP, Hong JP and Lee KT.** (2003). *In vitro* antiinflammatory activity of amygdalin in murine macrophage Raw 264.7 cells. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 34:223-227.
- Shin MK.** (2006). Clinical traditional herbarology. Younglimsa. Seoul, Korea. p.399-400.
- Sivaranjani N, Rao SV and Rajeev G.** (2013). Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 7:2683-2685.
- Song JH and Lee SR.** (2015). Anti-oxidant and inhibitory activity on NO production of extract and its fractions from *Rosa davurica* Pall. leaves. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:20-26.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L and Oomah BD.** (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:4113-4117.
- Yang SA, Pyo BS, Kim SM and Lee KI.** (2012). Antibacterial activity and nitric oxide production inhibitory activity of the extract and its fractions from the leaves of *Prunus sargentii*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:308-314.