

참당귀, 중국당귀, 일당귀의 차등적 항산화 효능 연구

조남준 · 이용희¹ · 김기광 · 한효상^{2*}

충남대학교 생화학과, 1: 충남대학교 생물공학연구소, 2: 중부대학교 보건행정학과

Investigation of the Antioxidant Effect of Angelicae Radix from Korea, China and Japan

Nam Joon Cho, Woong Hee Lee¹, Kee Kwang Kim, Hyo Sang Han^{2*}

Department of Biochemistry, 1: Institute of Biotechnology, Chungnam National University,
2: Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University

The purpose of the present study is a comparison of the antioxidant effects of Angelica gigas Korea (AG), Angelica sinensis of China (AS), and Angelica acutiloba of Japan (AA), and comparison of the effects of AG, AS and AA on tight-junction related genes in human keratinocyte HaCaT cells. All species showed a strong antioxidant effect, and AA was higher than AG and AS in antioxidant effects. The cytotoxicity was confirmed to be higher in AS than AG and AA at a concentration of 1,600 µg/ml using the MTS assay in HaCaT cells. We analyzed the effects of AG, AS, and AA on mRNA expression levels of various tight-junction related genes in HaCaT cells. We found that no obvious changes in expression of Claudin 1, 3, 4, 6, 7, 8, Occludin, JAM-A, ZO-1, ZO-2, and tricellulin by treatment of all species, suggesting that there is less possibility of side effects and skin moisturizing effects due to changes in tight-junction gene expression. Our results suggest that AG, AS, and AA are thought to be effective in reducing the oxidative stress of the skin and preventing the aging of the skin.

keywords : Angelica gigas Nakai, Angelica sinensis (Oliv.) Diels, Angelica acutiloba Kitagawa, Anti-oxidant, Tight-junction

서 론

當歸는『神農本草經』¹⁾ 中品에 “味甘溫. 主咳逆上氣, 溫瘧寒熱 洗洗在皮膚中, 婦人漏下絕子, 諸惡瘡瘍, 金瘡, 煮飲之.”라고 처음 收載된 이후, 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸의 효능이 있어 月經不調, 經閉腹痛, 癥瘕結聚, 崩漏, 血虛頭痛, 眩暈, 痠痺, 腸燥便秘, 癰疽瘡瘍, 跌打損傷을 치료하는 약물로 사용되어 왔다.²⁾

현재 한국, 중국, 일본 3국에서 사용하는 당귀는 그 기원식물이 각각 달라 한국에서는 *Angelica gigas* Nakai, 중국에서는 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, 일본에서는 大和當歸 *Angelica acutiloba* Kitag의 根을 자국의 약전에 규정하고 있는 실정이며 당귀의 기원에 따른 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다.²⁾

함유성분으로는 coumarin계의 decursin, decursinol angelate와 nodakentin, umbelliferon, β-sitosterol 등³⁾으로 참당귀의 주성분은 decursin으로 주로 빈혈증, 복통, 신체동통, 월경불순, 월경관란, 월경통, 기타 부인의 갱년기장애 등에 응용한다. 중국 당귀는 뿌리에 0.4~0.7% 정도의 정유를 함유하고 있으며 정유의 주

요성분은 butylidene phthalide, N-valerophenone-O-carboxylic acid 및 Δ2.4-dihydrophthalic anhydride로 부인과 질환에 주로 많이 쓰이는데 특히 월경불순이나 폐경에 이용한다. 일본당귀는 뿌리에 정유를 0.2% 정도 함유하며, 그 중 phthalide계 성분으로 ligustilide, butylidene phthalide, cnidilide, isocnidilide 등이 있으며, 신체허약, 빈혈, 월경불순, 요슬냉통, 두통, 신체동통 등에 사용하고 있다.⁴⁾

당귀의 약리작용은 참당귀에서 혈관신생작용과 혈관이완효과에 대한 연구가 보고되었고⁵⁾, 중국당귀를 중심으로 혈액 및 조혈계통에 대한 작용, 자궁에 대한 작용, 심혈관 계통에 대한 작용, 면역계에 대한 작용, 진통작용, 소염작용, 항균작용, 간 기능 보호 작용, 항암작용 등이 보고되었으며, 일당귀에서는 중추억제작용이 보고되었다.⁶⁾

표피 각질층의 밀착연접 (Tight-junction)은 외부 환경으로부터 장벽을 형성하여, 물리적, 화학적 그리고 박테리아나 바이러스와 같은 생물학적 공격을 방어한다. 그리고 피부의 수분 증발을 막아 피부보습의 유지에도 중요한 역할을 한다.⁷⁾ 또한 마우스에서 피

* Corresponding author

Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Social Sciences, Joongbu University, 201, Daehak-ro, Majeon-ri, Chubu-myeon, Geumsan-gun, Chungcheongnam-do, Republic of Korea

E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr Tel : +82-41-750-6292

Received : 2017/03/15 Revised : 2016/04/19 Accepted : 2017/04/22

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

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.06.31.3.182

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

부 밀착연접중 하나인 Claudin 1을 결핍시킨 경우 표피층에서 심각한 수분 손실이 발생하였으며, 태어난 후 하루 만에 죽게 되는 연구 결과가 보고되어있다.⁸⁾

현재 일당귀가 피부에 가지는 미백 효능 및 피부노화억제 효능에 대한 연구 결과가 보고되어 있다.⁹⁾ 하지만 당귀가 인간 유래 각질 형성 세포인 HaCaT 세포의 밀착연접에 미치는 영향은 보고되지 않았다. 이러한 이유로 본 연구는 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 가지는 항산화 효능 및 HaCaT 세포에 가지는 독성과 밀착연접에 미치는 영향을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 참당귀, 중국당귀, 일본당귀는 한국 서울의 동양허브 주식회사로부터 2016년 9월에 구입 (NO: 2016-0901, 2016-0902, 2016-0903)하여 기원의 진위와 품질의 우열을 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였고, 약재는 초음파 세척기 (Branson, USA)를 이용하여 불순물을 제거하고 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수추출물 제조

참당귀, 중국당귀, 일당귀 각각의 약재를 50 g으로 정확하게 중량을 측정 후, 환류추출기에 1차 증류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출액을 filter paper (Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었으며, 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 참당귀 17 g, 수율 34%, 중국당귀 27.5 g, 수율 55%, 일당귀 14 g, 수율 28%였다.

2) 세포 배양

HaCaT 세포를 고려대학교 생명공학부에서 분양 받아 실험에 사용하였다. HaCaT 세포는 37°C, 5% CO₂조건에서 10% fetal bovine serum (FBS, WELGENE, Korea)과 1% penicillin, streptomycin (WELGENE, Korea)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, WELGENE, Korea)을 이용하여 배양하였다.

3) ABTS 라디칼 소거능 측정

항산화능 측정은 ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) assay를 이용하여 측정하였다. potassium persulfate (sigma, #216224, USA) 2.4 mM과 ABTS (sigma, #A1888, USA) 7 mM을 같은 부피로 혼합해주고 실온에서 차광된 상태로 24 시간 반응시켜 free radical 상태의 ABTS를 만들어 주었다. 그 후 free radical 상태의 ABTS를 0.7 부근이 되도록 증류수를 이용하여 희석하였다. 96 well plate의 각 well에 ABTS working solution 80 µl와 sample 20 µl를 넣어준 뒤, 4 분간 암실에서 반응시키고 microplate reader (Molecular Devices

EMax Plus, USA)로 650 nm의 흡광도를 측정하였다. 측정값을 이용하여 시료의 항산화 효능을 시료를 처리하지 않은 대조군 대비 백분율로 다음의 식에 따라 항산화 효능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sampleblank}}}{A_{\text{Blank}}}\right) \times 100$$

4) 세포 독성 평가

참당귀, 중국당귀, 일당귀가 HaCaT 세포에서 나타나는 세포 독성을 확인하고 적정 실험 농도를 확인하기 위해 MTS assay를 진행하였다. HaCaT 세포를 5,000 cells/well씩 96 well plate에 분주하고 24 시간 동안 배양하였다. 각각의 well에 각 시료를 농도별로 첨가한 후 다시 24 시간 동안 배양한 뒤, MTS 시약 (Promega, USA)을 첨가하고 microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 시료를 처리한 세포의 독성을 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교를 통해 상대적인 세포독성을 백분율로 표시하였다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{(\text{시료첨가군의 흡광도} - \text{시료자체의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

5) Quantitative RT-PCR

HaCaT 세포를 6 well culture dish에 1 X 10⁵ cells/well로 분주 후 24 시간 배양하였다. 이 후 각 시료를 200 µg/ml로 처리한 뒤, 36 시간 배양하였다. 각 시료가 첨가된 배지를 제거한 뒤, eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea)를 이용하여 RNA를 추출하였다. cDNA를 합성하기 위하여 The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA)를 이용해 RNA를 정량한 뒤, Total RNA 1 µg에 Random Hexamer (100 pmol/µl) 1 µl, dNTP mix (10 mM) 1 µl 를 넣은 후 DEPC-treated water를 이용해 총 부피를 10 µl로 조정하였다. 65°C에서 5 분간 반응시킨 후, 즉시 얼음에 냉각시킨 다음, M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA) 1 µl, 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA) 4 µl, RNase inhibitor (Enzynomics, Korea) 1 µl, DEPC-treated water 4 µl를 각각 추가적으로 첨가하였다. 10 분간 실온에서 둔 뒤에 1 시간 동안 50°C에서 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 증류수로 1/10로 희석시켜 실험에 사용하였다. 밀착연접 관련 유전자들의 mRNA 발현량을 quantitative RT-PCR (qRT-PCR)을 이용해 비교하였다. 1/10로 희석시킨 cDNA 5 µl에 nuclease free water 2 µl, 2X Prime Q-mater Mix (GENET BIO, Korea) 10 µl, 10 pmol/µl forward primer와 10 pmol/µl reverse primer를 각각 1.5 µl씩 넣고 AriaMx (Agilent, USA)를 이용하여 95°C에서 3 분, 95°C에서 20 초, 58°C에서 20 초, 72°C에서 20 초를 40 cycle 실시하여 qRT-PCR을 수행하였다.

3. 통계처리

대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 student's t-test로 분

적하여 p-value값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Table 1. Primer sequences

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
Claudin1	F	GCA GAT CCA GTG CAA AGT CT	136	58
	R	CAT ACA CTT CAT GCC AAC GG		
Claudin3	F	GCA TGG ACT GTG AAA CCT CA	145	58
	R	AAT ATC AAG TGC CCC TTC CA		
Claudin4	F	CGC ATC AGG ACT GGC TTT AT	131	58
	R	AGT TGA GGA CCT GGA AGG CT		
Claudin6	F	GGC CCT CTG AGT ACC CTA CC	136	58
	R	GCA GGA GGC AGA AAC AAA AG		
Claudin7	F	ATG TAC AAG GGG CTG TGG AT	132	58
	R	CAC CAG GGA GAC CAC CAT TA		
Claudin8	F	GGC TGT TTC TTG GTG GTG TT	137	58
	R	CAC GCA ATT CAT CCA CAG TC		
Occludin	F	TTT GTG GGA CAA GGA ACA CA	137	58
	R	ATG CCA TGG GAC TGT CAA CT		
JAM-A	F	TGC CTC TTC ATA TTG GCG AT	144	58
	R	TGT CAC GGA CTT GAA GGT GA		
ZO-1	F	AGA GCA CAG CAA TGG AGG AA	133	58
	R	GAC GTT TCC CCA CTC TGA AA		
ZO-2	F	AGC AGG AGC AGA AGC AGA AG	148	58
	R	CAT ATC AGC TCT TCC ATG CC		
Tricellulin	F	GGC AGC TCG GAG ACA TAG AG	147	58
	R	TTT GCT GTT CTC AGT TCC TTG A		
β-actin	F	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	295	58
	R	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G		

결 과

1. 참당귀, 중국당귀, 일당귀의 중금속 함량 분석

참당귀, 중국당귀, 일당귀 내에 포함된 납과 카드뮴의 양을 Inductively coupled plasma - mass spectroscopy (ICP-MS)를 이용하여 측정하였다. 그 결과 한약재의 한국 식품의약품안전처 중금속 기준인 납 5 mg/kg 이하, 카드뮴 0.3 mg/kg 이하를 참당귀, 중국당귀, 일당귀 모두 만족하는 것으로 확인하였다.

Table 2. Pb and Cd levels in Angelica gigas Nakai, Angelica sinensis (Oliv.) Diels and Angelica acutiloba Kitagawa

Sample	Element	Certified value	Unit
Angelica gigas Nakai	Pd	0.145	mg/kg
	Cd	0.027	
Angelica sinensis (Oliv.) Diels	Pd	0.129	mg/kg
	Cd	0.005	
Angelica acutiloba Kitagawa	Pd	0.043	mg/kg
	Cd	0.040	

2. 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열수추출물이 가지는 항산화 효과

당귀가 가지는 항산화 효능을 확인하기 위하여 ABTS 라디칼 소거능 실험을 수행하였다. 대조군으로 항산화능이 높은 것으로 잘 알려져있는 resveratrol의 ABTS 라디칼 소거능이 농도의존적으로 나타났다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 가지는 항산화 효능을 비교 확인한 결과 모든 당귀의 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거능이 증가하는 결과를 확인할 수 있었으며 흥미롭게도 일당귀는 참당귀, 중국당귀보다 높은 66.8%의 소거능이 확인되었다(Fig. 1).

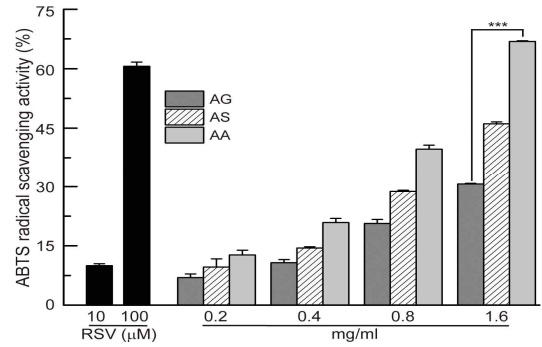


Fig. 1. ABTS radical scavenging activity of AG (Angelica gigas Nakai), AS (Angelica sinensis (Oliv.) Diels), AA (Angelica acutiloba Kitagawa) and RSV (Resveratrol). ***p < 0.001.

3. HaCaT 세포에 미치는 세포 독성 평가

참당귀, 중국당귀, 일당귀가 HaCaT 세포에 미치는 세포독성을 MTS assay를 이용하여 확인하였다. 그 결과 1,600 μg/ml 농도의 중국당귀는 세포활성도를 58.8%까지 감소시킨 반면 참당귀는 1,600 μg/ml 농도에서 94.3%, 일당귀는 1,600 μg/ml 농도에서 87.6%로 거의 독성을 보이지 않았다(Fig. 2).

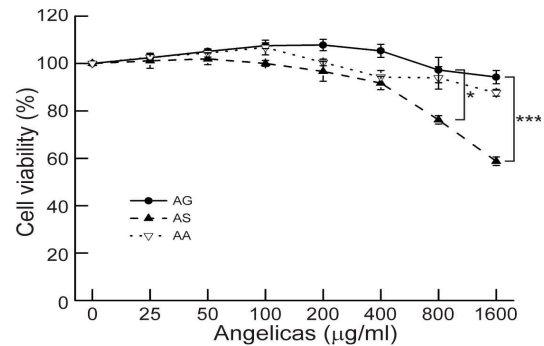


Fig. 2. Effect of AG (Angelica gigas Nakai), AS (Angelica sinensis (Oliv.) Diels), AA (Angelica acutiloba Kitagawa) on cell viability. HaCaT cells were treated with 0 to 1,600 μg/ml AG, AS, AA for 24 h. *p < 0.05, ***p < 0.001.

4. HaCaT 세포의 세포 연접 관련 유전자의 mRNA 발현 확인

참당귀, 중국당귀, 일당귀가 HaCaT 세포의 밀착연접에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. ABTS 라디칼 소거능 결과에 의하면 한국당귀, 중국당귀, 일당귀 모두 1600 μg/ml 농도에서 가장 높은 항산화 효능이 확인되었지만, 중국당귀의 경우 1600 μg/ml 농도에서 HaCaT 세포에 큰 독성이 나타났다. 이러한 이유로 HaCaT 세포의 세포활성도에 큰 영향을 미치지 않는 200 μg/ml 농도에서 참당귀, 중국당귀, 일당귀를 36 시간 처리하였고, 그 후 Claudin 1, 3, 4, 6, 7, 8, Occludin, JAM-A, ZO-1, ZO-2, Tricellulin의 발현량을 확인하였다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀 모두 여러 밀착연접 유전자의 발현에 큰 영향을 미치지 않았다. 실험 조건의 신뢰성을 확보하기 위해 다양한 밀착연접 중 Claudin 8 만 선택특적으로 발현량을 감소시키는 물질인 steviol을 250 μM 농도로 HaCaT 세포에 처리한 뒤 밀착연접 유전자의 발현변화를 확인하였다. 그 결과 Claudin 8의 발현이 0.29 배로 감소하였지만, Claudin 8을 제외한 다른 밀착연접 유전자의 발현에는 큰 영향을 미치지 못하였다.

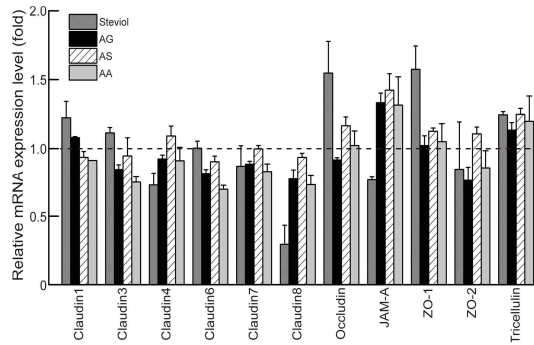


Fig. 3. Effect of AG (*Angelica gigas* Nakai), AS (*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels), AA (*Angelica acutiloba* Kitagawa) and steviol 250 μ M on mRNA expression of tight-junction related genes. After 36 h of 200 μ g/ml AG, AS, AA and 250 μ M steviol treatment in HaCaT cells, mRNA expression level was determined by qRT-PCR.

고찰

補血藥에 속하는 當歸(*Angelicae Gigantis Radix*)의 기원 식물은 현재 한국, 중국, 일본 3국에서 사용하는 기원식물이 각각 달라 자국의 약전에 규정하고 있는 실정이며 당귀의 기원에 따른 성분과 약리적 효과는 상이한 것으로 알려져 있다.²⁾

Coumarin 유도체로서 decursinol이 참당귀의 주성분으로 분리되어 있고, 기타 7-de-methyl-suberosine, umbelliferone, isoimperatorin, xanthyletin, nodakenin 등이 알려져 있다. 이외에도 참당귀에는 다당체로서 angelan이 함유되어 있다. 중국당귀에는 정유성분이 0.2-04 % 함유되어 있으며, 정유성분 중에서 ligustilide가 45 % 정도 차지한다. Ferulic acid 및 n-butylidenephthalide, angelicide 등도 함유되어 있다. 일당귀에는 정유로서 ligustilide, sedanonic acid, safrole 등이 함유되어 있으며, 지방산으로서 palmitic acid, linolic acid, coumarin 유도체로서 bergaptene, scopoletin 등이 함유되어 있다.¹⁰⁾

약리작용으로는 항산화활성^{11,12)}, 참당귀, 중국당귀, 일당귀 등 생육특성이나 감별법에 대한 연구¹³⁻¹⁶⁾, 활성성분에 대한 연구¹⁷⁻²⁰⁾, 혈관이나 혈액에 미치는 영향²¹⁻²³⁾ 등이 보고되었다.

본 연구에서는 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 가지는 항산화 효능의 비교 및 HaCaT 세포에서 밀착연접에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

생리적 작용에 의해 끊임없이 생성되는 활성산소는 피부의 면역기능을 감소시키고 염증을 유발하며 피부암을 포함한 각종 피부 질환의 원인이 되기도 하여 피부의 노화를 가속화시킨다.²⁴⁾ 이러한 활성산소의 효과적인 제거는 피부 건강을 유지시킬 수 있는 매우 중요한 요소이다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 가지는 항산화 효능을 확인하기 위해 ABTS 라디칼 소거능을 확인하였다. 1,600 μ g/ml 농도에서 참당귀는 30.7%의 ABTS 라디칼 소거능을 보였고 중국당귀는 참당귀보다 뛰어난 46.1%의 소거능을 보였다. 일당귀는 특히 참당귀, 중국당귀보다 높은 66.8%의 소거능을 보였다.

실험을 위한 물질 처리의 적정농도와 사람 피부에 대한 안정성을 확인하고자 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 HaCaT 세포에 미치는 세포독성을 MTS assay를 이용하여 확인하였다. 그 결과 1,600 μ

g/ml 농도의 중국당귀는 세포활성도를 58.8%까지 감소시킨 반면 참당귀는 1,600 μ g/ml 농도에서 94.3%, 일당귀는 1,600 μ g/ml 농도에서 87.6%로 거의 독성을 보이지 않았다.

상피세포에는 세포들 사이에는 gap junction, tight junction, adherens junction 및 desmosome과 같은 특화된 세포간의 구조를 가지는데, 그중 밀착연접은 세포 사이의 치밀한 이음부로서 외부 환경으로부터 장벽을 형성하고, 박테리아나 바이러스의 침입을 막으며 수분의 증발을 막아 피부 보습에 중요한 역할을 한다.^{25,26)} 피부에서 밀착연접 유전자 발현의 균형이 무너지면 경우 다양한 피부 질환의 원인이 된다. 아토피피부염 환자 피부에서 Claudin 1 mRNA와 protein이 급격하게 감소되어있는 현상이 보고되어 있으며²⁷⁾ 건선환자의 경우 Claudin 1, Occludin, ZO-1이 피부에서 비정상적으로 넓은 범위에서 발현되는 현상이 보고되어 있다.^{28,29)} 또한 Claudin 1의 유전자에 돌연변이가 나타난 경우 NISCH syndrome이 발생한다.³⁰⁾ 특히 Claudin 1을 결핍시킨 마우스에서 표피층에 심각한 수분손실이 나타났으며 Claudin 6가 과발현 되는 마우스에서는 다양한 밀착연접 유전자의 발현이 변화하여 표피층에서 높은 수분손실이 확인되었다.³¹⁾ 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 피부의 밀착연접 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하는 것은 피부의 보습 효과를 새롭게 규명할 수도 있으며, 보고되지 못했던 부작용 발생의 가능성 또한 찾을 수 있다 이러한 이유로 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 HaCaT 세포의 밀착연접에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. HaCaT 세포의 세포활성도에 큰 영향을 미치지 않는 200 μ M/ml 농도에서 참당귀, 중국당귀, 일당귀를 36시간 처리하였고, 그 후 Claudin 1, 3, 4, 6, 7, 8, Occludin, JAM-A, ZO-1, ZO-2, Tricellulin의 mRNA 발현량을 확인하였다. 그 결과 여러 밀착연접 유전자의 발현에 큰 영향을 미치지 않았다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀는 피부의 밀착연접에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각되며 이에 의한 피부 보습 효과 및 부작용의 발생 가능성은 없는 것으로 사료된다.

이러한 결과들을 통해 참당귀, 중국당귀, 일당귀는 항산화 효능을 보유하고 있어 피부의 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시켜 피부의 노화 방지 효과가 있을 것으로 생각되며 이에 대한 효과는 일당귀가 높을 것으로 생각된다. 또한 참당귀, 중국당귀, 일당귀는 다양한 밀착연접 유전자의 발현에 영향을 미치지 않아 밀착연접 유전자의 발현 변화에 의한 부작용 발생 가능성과 피부의 보습 효과는 없을 것으로 생각된다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀는 HaCaT 세포에 미치는 세포독성에 차이가 나타났으며 항산화 효능에도 차이가 나타났다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀를 사람 피부에 적용하기 위해 추후 참당귀, 중국당귀, 일당귀가 가지는 항산화 효능에 대한 분자 수준의 특성을 확인하는 연구의 진행이 필요할 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서 참당귀, 중국당귀, 일당귀를 열수추출하여 얻은 시료를 대상으로 항산화 효능의 비교 및 HaCaT 세포에서 밀착연접에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

참당귀, 중국당귀, 일당귀의 ABTS 라디칼 소거능을 확인한 결

과 1,600 µg/ml 농도에서 참당귀는 30.7%의 ABTS 라디칼 소거능을 보였고 중국당귀는 참당귀보다 뛰어난 46.1%의 소거능을 보였다. 일당귀는 특히 참당귀, 중국당귀보다 높은 66.8%의 소거능을 보였다.

참당귀, 중국당귀, 일당귀가 HaCaT 세포에 미치는 세포독성을 MTS assay를 이용하여 확인한 결과 1,600 µg/ml 농도의 중국당귀는 cell viability를 58.8%까지 감소시킨 반면 참당귀는 1,600 µg/ml 농도에서 94.3%, 일당귀는 1,600 µg/ml 농도에서 87.6%로 거의 독성을 보이지 않았다.

참당귀, 중국당귀, 일당귀가 HaCaT 세포의 밀착연접에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. HaCaT 세포의 세포활성도에 큰 영향을 미치지 않는 200 µg/ml 농도에서 참당귀, 중국당귀, 일당귀를 36 시간 처리하였고, 그 후 Claudin 1, 3, 4, 6, 7, 8, Occludin, JAM-A, ZO-1, ZO-2, Tricellulin의 발현량을 확인하였다. JAM-A의 발현을 참당귀, 중국당귀, 일당귀 열추출물 모두 1.4배 이상 증가시켰으나 의미 있는 발현 변화를 확인할 수 없었으며 JAM-A를 제외한 여러 밀착연접 유전자의 발현에도 큰 영향을 미치지 않았다.

이상의 실험결과는 참당귀, 중국당귀, 일당귀는 항산화 효능을 보유하고 있어 피부의 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시켜 피부의 노화 방지 효과가 있을 것으로 생각되며 이에 대한 효과는 일당귀에서 더욱 높을 것으로 생각된다. 또한 참당귀, 중국당귀, 일당귀는 다양한 밀착연접 유전자의 발현에 영향을 미치지 않아 밀착연접 유전자의 발현 변화에 의한 부작용 발생 가능성과 피부의 보습 효과는 없을 것으로 생각된다. 참당귀, 중국당귀, 일당귀에서 보이는 세포독성 및 항산화 효능의 차이에 대한 분자수준의 특성 연구 진행이 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 충남대학교 자체연구비 지원에 의해 수행되었습니다. 충남대학교 김기광 교수님께는 공동 연구 및 교신저자 역할을 성실히 수행해 주심에 다시 한번 감사 드립니다.

References

1. Wu, B. Shennongbencaojing. Beijing:Renminweishengchubanshe. 1982:64.
2. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY. Boncho-Hak. Seoul:Young-Lim Press. 2007:629-31.
3. Ahn KS, Sim WS, Kim IH. Decursin a cytotoxic agent and protein kinase c activator from the root of angelica gigas. Planta Med. 1995;62:7-9.
4. Kim CM, Shin MG, Lee GS, Ahn DK. Wanyeok Jungyakdaesajeon. Seoul:Jeongdam. 1998;3:1159-68.
5. Oh HS. Comparative studies of the angiogeni activity of extract of angelica gigas, A. sinensis and A. acutiloba. [Ph.D. dissertation]. Kyunghee University; 2001.
6. Dakaki, K. Whahanyakmoolhak. Tokyo:Namsandang. 1982:293-7.
7. Tsuruta D, Green KJ, Getsios S, Jones JC. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. Trends Cell Biol. 2002;112(8):355-7.
8. Masato M, Fumiyoshi Y, Akemi I, Keiko Y, Chikaako K, Shinji F, Eiichiro U, Yohichi M, Kohichi T, Hirokazu Y, Mituru H, Hajime I, Masahito I, Masaru O, Gen K, Taroh K, Junji T, Kiyofumi Y. Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). Proc Natl. Acad. Sci USA. 1998;95(3):1044-9.
9. Kang MS, Ha HY, Kim HT. An Experimental Study on the Effect of Angelica acutiloba Ethanol Extract on Hyaluronic Acid Synthesis. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2015;28(1):32-40.
10. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Eom JY, Kim SC, Yang JH, Cho MK, Lim JP, Hong SH. Hanbangyakrihak. Seoul:Shinilbukseu. 2007:337-43.
11. Kang SA, Han JA, Jang KH, Choue RW. DPPH Radical Scavenger Activity and Antioxidant Effects of Cham - Dang - Gui(Angelica gigas). J Korean Soc Food Sci Nutr. 2004;33(7):1112-8.
12. Choo MH, Choi HS, Seo YN, Lee MY. Effects of n-Hexane Fraction of Angelica acutiloba on Antioxidative System and Lipid peroxidation in Ethanol-Induced Hepatotoxicity of rats. Korean Journal of Food P reservation. 2004;11(3):364-72.
13. Yu HS, Park CH, Park CG, Kim YG, Park HW, Seong NS. Growth Characteristics and Yield of the Three Species of Genus Angelica. Korean J Medicinal Crop Sci.. 2004;12(1):43-6.
14. Lee MY, Im SH, Ju YS, Han KS, Jeong GJ, Ahn DK, Kang HC, Ko BS. Discrimination of the three Angelica species using the RADPs and Internal Root Structure. Korean J Medicinal Crop Sci. 2000;8(3):243-9.
15. Noh BS, Oh SY, Kim SJ. Pattern Analysis of Volatile Components for Domestic and Imported Angelica gigas Nakai Using GC Based on SAW Sensor. Korean J Food Sci. Technol. 2003;35(1):144-8.
16. Bang KH, Yu HS, Koo DH, Cho JH, Park HW, Seong NS, Park SI, Kim HS. Selection of RAPD marker to discriminate the bolting-resistant varieties and commercial dried medicinal materials of Angelica species. Korean J Medicinal Crop Sci. 2002;10(1):46-50.
17. Cho MG, Bang JK, Chae YA. Comparison of Volatile

- Compounds in Plant Parts of *Angelica gigas* Nakai and *A. acutiloba* Kitagawa. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2003;11(5):352-7.
18. Sung JS, Bang KH, Park CH, Park CG, Yu HS, Park HW, Seong N.S Discrimination of *Angelicae Radix* Based on Anatomical Characters. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2004;12(1):67-72.
19. Inn MK, Kang CK, Jung NI, Chang WH, Lai JH, Yook CS. Essential Oils in the Rhizoma of *Ligusticum sinensis* and *Ligusticum Chuanxing*. *Bull. K.H. Pharma. Sci.* 2000;28:33-43.
20. Ham MS, Kim SS, Hong JS, Lee JH, Chung EK, Park YS, Lee HY. Screening and Comparison of Active Substances of *Angelica gigas* Nakai Produced in Kangwon and *Angelica acutiloba* Kitogawa Produced in Japan. *Kor. J Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996;24(5):624-9.
21. Kang SA, Jang KH, Lee JE, Ahn DK, Park SK. Differences of Hematopoietic Effects of *Angelica gigas*, *A. sinensis* and *A. acutiloba* Extract on Cyclophosphamide-induced Anemic Rats. *Korean J Food Sci. Technol.* 2003;35(6):1204-8.
22. Oh HS, Kim HH, Ahn DK, Choi HY. Comparative studies on the angiogenic activity of water extract of *Angelica Gigantis Radix*, *Angelica Sinensis Radix* and *Angelica Radix*. *Kor. J Herbology.* 2001;16(2):19-27.
23. Song SH, Seo BI, Kim HG, Park JH. The Effects of *Angelicae Gigantis Radix*, *Angelicae Acutilobae Radix* and *Angelicae Sinensis Radix* Extract on Hydrocortisone Acetate-Induced Model of Blood Stasis. *Kor. J Herbology.* 2004;19(1):13-21.
24. Bickers DR, Athar M. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. *Journal of Investigative Dermatology.* 2006;126(12):2565-75.
25. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C1213-28.
26. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis.* 1999;20:1425-31.
27. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DY, Barnes KC, Beck LA. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2011;127(3):773-86.
28. Yoshida Y, Morita K, Mizoguchi A, Ide C, Miyachi Y. Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Archives of Dermatological Research.* 2001;293(5):239-44.
29. Peltonen S, Riehoakainen J, Pummi K, Peltonen J. Tight junction components occludin, ZO-1, and Claudin-1, -4 and -5 in active and healing psoriasis. *British Journal of Dermatology.* 2007;156(3):466-72.
30. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, Prost YD, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A. Claudin-1 Gene Mutations in Neonatal Sclerosing Cholangitis Associated With Ichthyosis: A Tight Junction Disease. *Gastroenterology.* 2004;127(5):1386-90.
31. Turksen K, Troy TC. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing Claudin 6. *Development.* 2002;129:1775-84.