

등수국 잎 추출물 유래 항염 및 항균 활성 성분

조 성 미¹ · 김 정 은² · 이 남 호^{3,†}

¹제주대학교 화학·코스메틱학과, 학생

²제주대학교 화학·코스메틱학과, 연구원

³제주대학교 화학·코스메틱학과, 교수

(2020년 6월 9일 접수, 2020년 7월 28일 수정, 2020년 8월 11일 채택)

Anti-inflammatory and Anti-bacterial Active Ingredients Derived from the Extract of the Leaves of *Hydrangea Petiolaris*

Seong Mi Jo, Jung Eun Kim, and Nam Ho Lee[†]

Department of Chemistry and Cosmetics, Jeju National University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju-si, Jeju 63243, Korea

(Received June 9, 2020; Revised July 28, 2020; Accepted August 11, 2020)

요약: 본 연구에서는 등수국 잎 추출물의 항염 및 항균 활성을 확인하고 유효성분을 분리하여 화학구조를 동정하였다. RAW 264.7 세포를 이용한 항염 활성 실험 결과, *n*-hexane (Hex) 및 ethyl acetate (EtOAc) 분획물이 세포 독성 없이 nitric oxide (NO)의 생성 및 iNOS 단백질의 발현을 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인하였다. 추가적인 항염 기전 연구 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 전염증성 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 또한 표피포도상구균과 여드름균을 이용한 활성 실험 결과, 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc, *n*-butanol (BuOH) 분획물에서 항균 활성이 나타났다. *n*-Hex 및 EtOAc 분획물의 활성 성분을 규명하기 위해 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 4 개의 화합물을 분리하였다; phytol (1), corosolic acid (2), asiatic acid (3) 및 1-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (4). 이들 화합물은 모두 등수국에서 처음으로 분리된 물질이다. 또한 HPLC 분석을 통해 등수국 잎 추출물에서 분리된 화합물의 함량을 측정된 결과 phytol (1) 이 27.8 mg/g 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 등수국 잎 추출물을 이용한 항염 및 항균 효과를 갖는 천연 화장품 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

Abstract: In this study, the anti-inflammatory and anti-bacterial activities of the extracts from the leaves of the *Hydrangea petiolaris* were identified, and the chemical structure was identified by separating the active ingredient. As the result of the anti-inflammatory activity experiment using RAW 264.7 cells, it was confirmed that the *n*-hexane (Hex) and ethyl acetate (EtOAc) fractions inhibited the production of nitric oxide (NO) and the expression of iNOS protein in a concentration-dependent manner without cytotoxicity. In addition, the *n*-Hex and EtOAc fractions reduced the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6). Upon the anti-bacterial tests using *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*, the extract, *n*-Hex, EtOAc and *n*-butanol (BuOH) fractions showed potent activities. In order to isolate the active constituents, the *n*-Hex and EtOAc fractions were further purified to afford four phytochemicals; phytol (1), corosolic acid (2), asiatic acid (3) and 1-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (4). All of the compounds 1 – 4 were isolated for the first time from this plant. In addition, the contents of isolated compounds were determined by HPLC and the quantity of phytol (1) was 27.8 mg/g for the 70% EtOH extract. Based on the above research results, it is believed that it will be possible to develop a natural cosmetic material that has anti-inflammatory and anti-bacterial effects using the extract of *H. petiolaris* leaves.

Keywords: *Hydrangea petiolaris*, anti-inflammation, anti-bacterial activity, isolation

† 주 저자 (e-mail: namho@jejunu.ac.kr)
call: 064-754-3548

1. 서 론

염증반응은 생체 내 항원침입이나 조직손상과 같은 응급상황이 발생하였을 때 림프구를 포함한 면역세포들에 의해 수행되는 일련의 생체보호반응이다. 그러나 염증반응이 과도하거나 지속적으로 나타나게 되면 주변조직의 손상과 더불어 생체기능에 이상을 가져와 질병의 상태를 악화시키거나 새로운 질병이 생기게 된다[1]. 염증반응에 관여하는 세포인 대식세포(macrophage)는 체내에서 선천적으로 면역반응을 담당하는 세포로 알려져 있으며 동물 체내 모든 조직에 분포한다[2]. 박테리아와 같은 세균이 체내로 침투하면 세균 세포막 성분인 lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 대식세포가 자극을 받아 활성화된다. 활성화된 대식세포는 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등과 같은 염증매개 물질들을 분비한다[3].

NO는 cytokine의 자극 또는 미생물의 침입으로 인해 세포가 활성화되어 생성되는 것으로, nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NOS는 neuronal NOS (nNOS), inducible NOS (iNOS), endothelial NOS (eNOS)와 같이 3 종류가 존재하며, 이 중 iNOS가 염증반응을 조절하는데 중요한 역할을 담당하고 있다. 이렇게 iNOS로부터 생성된 NO는 혈관 확장, 세포 내 항상성 유지, 항암 작용 등에 관여하는 신호전달자이지만, 과량으로 존재할 경우 만성염증, 퇴행성 뇌질환, 암의 진행 및 악화 등을 유발하게 된다[4,5]. 이러한 염증매개 물질과 염증 관련 효소의 발현을 조절할 수 있는 물질이 염증질환의 예방 및 치료제로 기능을 할 수 있으며, 부작용의 우려가 있는 합성 물질 대신 천연물 유래 소재를 찾으려는 노력이 지속되고 있다.

여드름은 모낭-피지선에서 발생하는 피부질환으로, 피지선에서 피지 분비가 증가하거나 피지선의 모공이 좁아지든지 막혀서 피지가 배출되지 못함에 따라 세균이 증식하여 염증이 생기는 것이다. 사춘기 나이에 분비되기 시작하는 안드로젠은 피지 분비를 촉진시키고, 표피의 과각화를 일으키며, 이로 인해 모낭이 막힘에 따라 모낭내부가 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*)를 비롯한 혐기성 세균이 잘 자랄 수 있는 환경이 된다[6,7]. 동시에 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)와 같은 다른 세균들이 모낭주위에서 여드름과 여드름 합병증을 일으키는데 역할을 한다[8].

여드름 유발균인 *C. acnes*는 지방분해 효소와 화학주성 인자를 분비하여 유리지방산을 만들고 백혈구가 모낭 주위에 모이게 하며, 이들이 모낭벽을 자극한 후 파괴하여 모낭 내용물이 진피 내로 유출됨으로써 염증반응이 일어난다. 그러나 여드름은 반드시 염증 반응을 수반하는 것이 아니며, 비염증성 여드름과 염증성 여드름으로 구분된다. 비염증성 여드름은 면포(comedo)와 같은 초기 여드름 상태로 반응매개 인자로는 사이토카인 중 IL-1 α 만이 관여하는 것으로 알려져 있다. 반면에 염증성 여드름은 구진(papule), 농포(pustule), 결절(nodule)이 속하며, 사이토카인인 IL-1 α , IL-8, TNF- α 와 PGE₂, NO 등 모든 반응매개 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다[9].

현재 여드름 치료제로 쓰이고 있는 약재로는 retinoid, benzoyl peroxide, clindamcin, erythromycin, triclosan 등과 같은 화장품 응용이 부적합한 의약품 항생제나 화학 합성품들이 대부분이며, 이들은 피부자극, 간독성, 내성 발생 등의 부작용이 알려져 있다[10,11]. 따라서 여드름 피부에 효과적이고 피부에 안전하며 부작용을 최소화 할 수 있는 천연 항균 물질에 대한 관심이 급증하고 있는 추세이며, 많은 연구자들이 천연 유래 여드름 치료제를 개발하려고 노력중이다[12].

등수국(*Hydrangea petiolaris*)은 범위귀과(Saxifragaceae)에 속하는 식물로 나무나 바위에 붙어 자라는 덩굴성 식물이다. 등수국은 가지에서 발생한 기근을 이용하여 바위 겉면이나 곰솔의 줄기 등에 착생하여 20 m 가량 자라는 것으로 알려져 있다. 또한 한국이 원산지이며 한국, 일본 등에 분포해 있고, 한국에서는 주로 울릉도, 제주도 등 남쪽 섬에 분포해 있다. 현재까지 보고된 등수국에 대한 생리활성 및 성분 연구로는 등수국 줄기(stems) 추출물의 항염, 미백 등의 효능과 catechin, ursolic acid 등의 유효 성분 연구가 보고되어 있다[13].

그러나 아직까지 등수국 잎(leaves)을 대상으로 한 생리활성 연구 및 유효 성분에 대해서는 보고되어 있지 않으므로 본 연구에서는 등수국 잎 추출물 및 극성별 용매 분획물의 항염 및 항균 효과를 확인하고 유효 성분을 분리, 동정하여 천연 화장품 원료 등으로 이용 가능한지 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

시료의 추출, 용매 분획 및 분리에 사용된 용매들은 Merck 및 OCI 제품을 사용하였다. Vacuum liquid chromatography (VLC)에는 silica gel (0.002 - 0.025 mm, Sigma, USA), gel filtration chromatography (GFC)에는 Sephadex™ LH-20 (0.1 - 0.025 mm, Fluka, USA)이 사용되었다. Medium pressur liquid chromatography (MPLC, Biotage, Sweden)에는 KP-C18-HS (Biotage, Sweden) 컬럼을 사용하였다. 구조분석을 위한 nuclear magnetic resonance (NMR)는 JNM-ECX 400 (FT-NMR system, JEOL, Japan)을 이용하였으며, NMR 측정 용매는 CIL 사의 NMR 전용 용매인 CDCl₃ 및 CD₃OD을 사용하였다.

2.2. 등수국 잎의 추출 및 용매 분획

실험에 사용된 등수국 잎(시료번호: 487)은 2018년 1월 제주생물자원(주) (Korea)에서 구입하였으며, 시료는 동결 건조 및 분쇄하여 사용하였다. 건조 및 분쇄된 등수국 잎 120.0 g을 70% 에탄올 24 L에 침적하여 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 흡입여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일한 조건으로 2 회 더 반복 실시하였다. 여과하여 얻어진 여액은 40 °C 수욕상에서 감압 농축하여 추출물 38.5 g을 얻었으며, 얻어진 추출물 30 g을 증류수에 현탁시키고, 용매 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane (Hex), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH), H₂O 분획물을 얻었다.

2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

n-Hex 분획물 1.7 g을 극성에 따라 나누기 위하여 VLC를 수행하였으며, *n*-Hex-EtOAc (0 - 50%)의 용매를 극성을 5%씩 높이는 방법으로 각 300 mL씩 용출하였다. 그 후 100% EtOAc 및 100% MeOH를 각 300 mL씩 용출하여 총 13 개의 fraction을 얻었다(Fr. V1 - 12). VLC fraction 중 Fr. V5 (162.2 mg)는 단일 화합물인 화합물 1로 확인되었다.

EtOAc 분획물은 MPLC를 이용하여 극성에 따라 세분화하였다. EtOAc 분획물 5.0 g을 용매(MeOH : DMSO = 1 : 1) 10 mL에 녹이고 0.45 μm PTFE syringe filter를 이용하여 여과한 후, C₁₈ 컬럼에 주입하였다. 이동상은 증류수(용매 A)와 메탄올(용매 B)을 사용하였으며, 유속은 15 mL/min으

로 하였다. 용출조건은 gradient mode로 100 min 동안 용매 B를 10 - 50%의 비율로 변화시킨 후, 10 min 동안 100% 용매 B를 용출시켜 총 48 개의 fraction을 얻었다(Fr. MP1 - 48). MPLC fraction 중 Fr. MP48 (31.4 mg)은 단일 화합물인 화합물 2로 확인되었으며, Fr. MP46, 47 (141.8 mg)은 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl₃ : MeOH = 15 : 1)을 수행하여 화합물 3 (5.0 mg)을 분리하였다. Fr. MP 12 - 15 (329.6 mg)는 Sephadex LH-20 컬럼(CHCl₃ : MeOH = 2.5 : 1)을 수행하여 화합물 4 (5.1 mg)를 얻었다.

Phytol (1) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 5.39 (1H, m, H-2), 4.13 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H-1), 1.96 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-4), 1.64 - 0.85 (19H, overlapped, H-5 - H-15), 0.85 - 0.81 (15H, overlapped, H-16 - 20); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 140.6 (C-3), 123.2 (C-2), 59.6 (C-1), 40.1 (C-14), 39.6 (C-4), 37.6 (C-8), 37.6 (C-10), 37.5 (C-12), 36.9 (C-6), 33.0 (C-11), 32.9 (C-7), 25.3 (C-5), 25.0 (C-13), 24.7 (C-9), 28.2 (C-15), 22.9 (C-17), 22.8 (C-16), 20.0 (C-18), 19.9 (C-19), 16.4 (C-20).

Corosolic acid (2) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 5.24 (1H, m, H-12), 3.62 (1H, m, H-2), 2.90 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-3), 2.20 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-18), 1.11 (3H, s, H-27), 1.02 (3H, s, H-23), 0.97 (3H, s, H-26), 0.94 (3H, s, H-24), 0.90 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-29), 0.89 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 0.84 (3H, s, H-25); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 181.7 (C-28), 139.9 (C-13), 126.8 (C-12), 84.6 (C-3), 69.6 (C-2), 56.8 (C-5), 54.5 (C-18), 48.5 (C-1), 48.4 (C-9), 48.4 (C-17), 43.4 (C-14), 40.9 (C-8), 40.6 (C-4), 40.5 (C-19), 40.5 (C-20), 39.3 (C-10), 38.2 (C-22), 34.3 (C-7), 31.9 (C-21), 29.5 (C-23), 29.2 (C-15), 25.4 (C-16), 24.6 (C-27), 24.2 (C-11), 21.7 (C-30), 19.7 (C-6), 17.9 (C-25), 17.8 (C-26), 17.7 (C-29), 17.4 (C-24).

Asiatic acid (3) ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ_H: 5.25 (1H, m, H-12), 3.50 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-23), 3.35 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-3), 3.27 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, H-23), 2.21 (1H, d, *J* = 11.5 Hz, H-18), 0.97 (3H, s, H-30), 0.89 (3H, d, *J* = 6.4 Hz, H-29), 0.85 (3H, s, H-26), 0.70 (3H, s, H-24); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ_C: 181.9 (C-28), 140.0 (C-13), 126.8 (C-12), 78.3 (C-3), 69.8 (C-2), 66.4 (C-23), 54.5 (C-18), 48.3 (C-9), 48.3 (C-17), 48.2 (C-1), 48.2 (C-5), 44.3 (C-4), 43.5 (C-14), 40.9 (C-8), 40.7 (C-20), 40.6 (C-19), 39.1 (C-10), 38.3 (C-22), 33.8 (C-7), 31.9 (C-21), 29.3 (C-15),

25.5 (C-16), 24.6 (C-27), 24.3 (C-11), 21.7 (C-30), 19.2 (C-6), 18.0 (C-26), 17.8 (C-25), 17.8 (C-29), 14.1 (C-24).

1-*O-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (4) ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ_{H} : 7.73 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7), 7.49 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2, 6), 6.82 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3, 5), 6.38 (1H, d, $J = 16.0$ Hz), 5.58 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1'); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ_{C} : 167.9 (C-9), 161.8 (C-4), 148.1 (C-7), 131.6 (C-2, 6), 127.1 (C-1), 117.0 (C-3, 5), 114.6 (C-8), 95.9 (C-1'), 79.0 (C-3'), 78.2 (C-5'), 74.2 (C-2'), 71.3 (C-4'), 62.4 (C-6').

2.4. 항염 활성

2.4.1. 세포배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 cell은 American type cell culture (ATCC, USA)로부터 분양받아 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin 및 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO Inc., USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO Inc., USA) 배지를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 항온기에서 배양하였으며, 2 - 3 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.4.2. NO 생성 억제 활성

24 well plate에 2×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액 100 μL 와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid) 100 μL 를 혼합하여 96 well plate에서 10 min 동안 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였고, sodium nitrite (NaNO_2)를 standard로 사용하여 정량하였다.

2.4.3. 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-6) 생성 억제 활성

24 well plate에 2×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 세포배양 상등액의 사이토카인 생성 함량을 sandwich enzyme-linked immunosorbent

assay (ELISA) kit를 이용하여 정량하였으며, TNF- α ELISA kit (Invitrogen, USA), IL-1 β ELISA kit (R&D Systems, USA), IL-6 ELISA kit (Invitrogen, USA)를 사용하였다. Standard에 대한 표준곡선의 r^2 값은 0.99 이상이었다.

2.4.4. Western Blot Analysis

60 mm dish에 9×10^5 cells/dish로 세포를 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 18 h 배양 후 배지를 제거하였다. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 포함하는 배지로 교환 후, 시료를 농도별로 각각 첨가하여 24 h 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, RIPA buffer (Sigma, USA)를 이용해 4 $^{\circ}\text{C}$, overnight으로 lysis 시킨 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)하여 단백질 상등액만 분리하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 Bradford 시약 (BIO-RAD, USA)을 사용하여 정량하였다. 정량한 단백질을 8 - 12%의 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 전이시켰다. 단백질이 전이된membrane을 5% skim milk를 포함한 TTBS (0.1% Tween 20, Tris-buffered saline)에 넣고 상온에서 2 h blocking 시킨 후, 1 차 항체와 반응시켰다. 1 차 항체 반응은 iNOS antibody (1 : 1,000, SantaCruze, USA), β -actin antibody clone AC-74 (1 : 20,000, Sigma, USA)를 이용하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 반응시켰다. 1 차 항체 반응이 끝난 membrane은 TTBS 용액으로 5 회 세척 후, peroxidase-conjugated 2 차 항체(1 : 5,000 또는 1 : 20,000, SantaCruze, USA)와 상온에서 1 h 반응 시킨 뒤, TTBS 용액으로 5 회 세척하였다. 단백질은 WESTA NOVA 2.0 (Cyanagen, Italy) 용액을 이용해 ECL 기질과 반응 시킨 후, Chemidoc (Fusion solo, VILBER LOURMAT, Germany)을 이용하여 각각의 단백질 발현 정도를 분석하였다.

2.5. 세포독성 평가(MTT Assay)

MTT assay는 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건하에서 전배양 후, LPS와 시료를 농도별로 동시에 처리하여 배양하였다. 이후 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3 - 4 h 동안 반응시킨 후, MTT 용액을 제거하였다. 여기에 DMSO를 가하여 살아있는 세포와 반응하여 생긴 formazan 침전물을 용해시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률(%)을 계산하였다.

2.6. 항균 활성

2.6.1. 균주 배양

표피포도상구균인 *S. epidermidis* (CCARM 3709, 3710, 3711)와 여드름균인 *C. acnes* (CCARM 0081, 9009, 9010)를 항생제내성균주는행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)으로부터 분양 받아 사용하였다. *S. epidermidis*인 경우, 배양배지를 TSB (tryptic soy broth)로 하여 37 °C에서 배양하였으며, 하루에 한 번씩 계대 배양하였다. *C. acnes*인 경우, 배양배지를 GAM broth로 하여 37 °C, 혐기성 조건에서 배양하였으며, 2 일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.6.2. 한천확산법(Paper Disc Diffusion Method)

시료의 항균 활성을 측정하기 위해 한천확산법으로 clear zone의 크기를 확인하였다. 각 균주는 0.5 McFarland standard로 탁도를 조절하여 1.5×10^6 CFU/mL로 맞춰준 후, 0.8% agar를 포함하는 배지에 넣어 하드배지(1.5% agar) 위에 붓는다. 배지가 균으면 시료 용액을 포함하는 직경 8 mm paper disc를 올린 후, *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 동안 배양하고, *C. acnes*는 37 °C에서 48 h 동안 혐기 배양 한 후, 형성된 원형 발육 저지환의 크기를 측정하였다. 대조군으로는 erythromycin을 사용하였다.

2.6.3. 최소억제농도(MIC) 및 최소사멸농도(MBC)

최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 미생물의 성장을 막는 항생물질의 최소농도로, 액체배지희석법(broth dilution method)을 변형하여 실험하였다. 96 well plate에 two-fold-dilution법으로 시료의 농도를 두 배씩 묽히면서 시료를 포함하는 배지를 100 µL 넣어준 후, 균 현탁액의 농도를 2×10^5 CFU/mL가 되도록 조절하여 100 µL 씩 넣어준다. *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 배양하였으며, *C. acnes*는 37 °C, 혐기성 조건에서 48 h 배양하였다. 이후 균의 증식이 나타나지 않는 최소농도를 확인하였다. 최소사멸농도(MBC, minimum bactericidal concentration)는 MIC값이 나타난 그 이상의 농도의 시료 배양액들을 하드 배지에 처리하여 colony를 형성하는지 확인하는 것으로, MIC를 진행한 96 well plate에서 loop를 이용하여 시료 배양액을 찍어내서 하드배지에 streaking 하였다. *S. epidermidis*는 37 °C에서 24 h 배양하였으며, *C. acnes*는 37 °C, 혐기성 조건에서 48 h 배양하여, colony가 형성되지 않는 최소 농도를 확인하였다.

2.7. 분리된 화합물 1 - 4의 함량 분석

등수국 잎에서 분리된 화합물 1 - 4의 함량을 확인하기 위해 HPLC (Alliance, Waters Co., USA), Kromasil 100-5-C18 column (4.6 × 250 mm, AkzoNobel, Netherlands)을 사용하여 정량 분석하였다. 이동상은 0.2% acetic acid가 함유된 증류수(용매 A)와 acetonitrile (용매 B)을 사용하였으며 유속은 1 mL/min, 주입량은 10 µL로 하였고 검출기는 UV detector (202 nm)를 사용하였다. 용출조건은 gradient mode로 20 min 동안 용매 B를 40 - 100%의 비율로 변화시키고, 5 min 동안 용매 B를 100%로 용출시켰다. 농도별로 제조한 화합물 1 - 4의 peak 면적을 구하여 회귀 방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였으며 검량선의 r^2 값은 0.999 이상이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 활성

3.1.1. NO 생성 억제 활성

등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염 효과를 확인하기 위해 마우스 대식세포인 RAW 264.7 cell을 이용하여 NO 생성 억제 활성을 측정하였다. 등수국 잎은 70% 에탄올을 이용해 추출하였으며, 얻어진 추출물을 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 얻었다. 우선 추출물 및 용매 분획물에 대하여 100 µg/mL의 농도에서 실험을 진행하였으며 그 결과, *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에서 NO 생성 억제 활성이 우수했으나, *n*-Hex 분획물은 세포독성이 나타났다(Figure 1). 추가적으로 *n*-Hex 분획물은 50 µg/mL 이하의 농도에서, EtOAc 분획물은 100 µg/mL 이하의 농도에서 농도별 실험을 진행한 결과, 등수국 잎 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하는 것을 확인하였다(Figure 2).

3.1.2. 전염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6) 생성 억제 활성

NO 생성 억제 활성이 우수한 등수국 잎 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대해 추가적인 항염 활성 기전 연구를 위해 ELISA kit를 이용하여 전염증성 사이토카인 생성 억제 활성을 측정하였다. 그 결과, 등수국 잎 *n*-Hex 분획물은 TNF-α 및 IL-1β의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 또한 등수국 잎 EtOAc 분획물

은 IL-1 β 및 IL-6의 생성을 농도의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다(Figure 3).

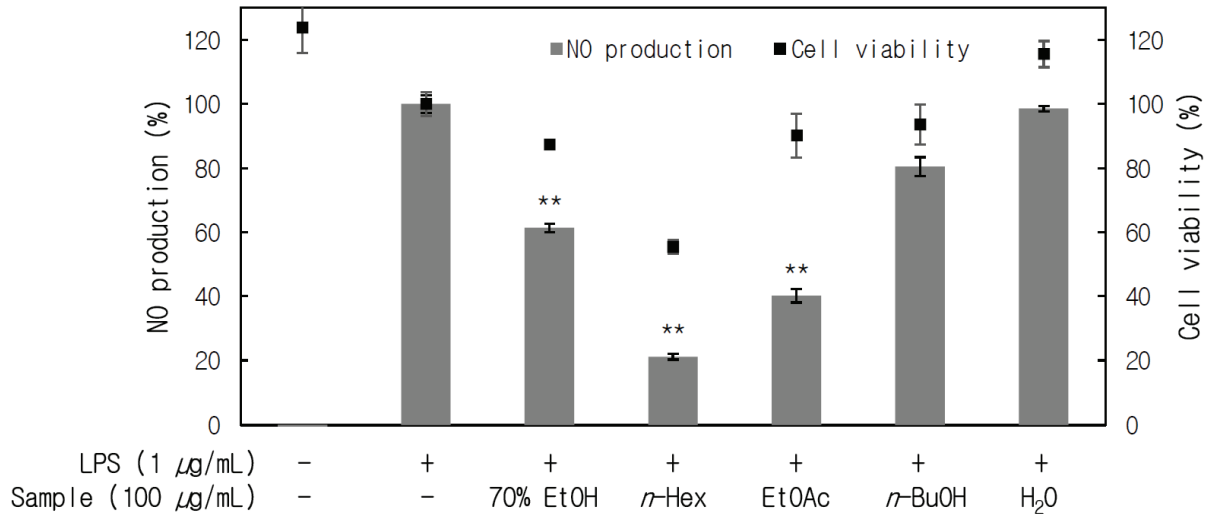


Figure 1. Effects of extract and solvent fractions from *H. petiolaris* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only, or with LPS plus *H. petiolaris* extract and solvent fractions for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of *H. petiolaris*. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$).

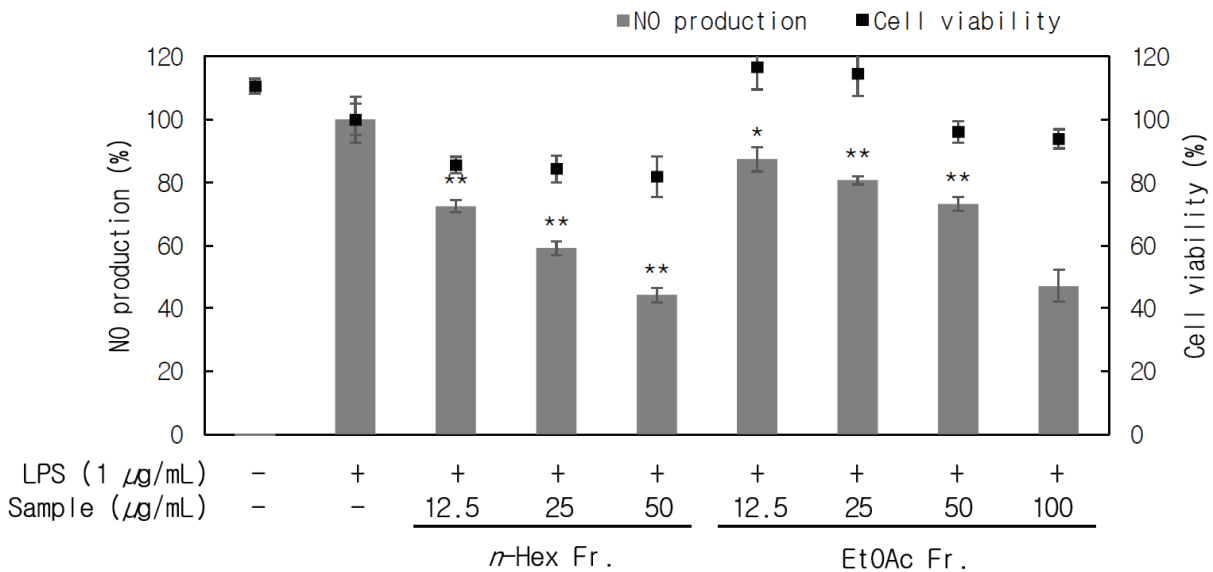


Figure 2. Effects of *n*-Hex and EtOAc fractions from *H. petiolaris* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of *n*-Hex and EtOAc fractions. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$).

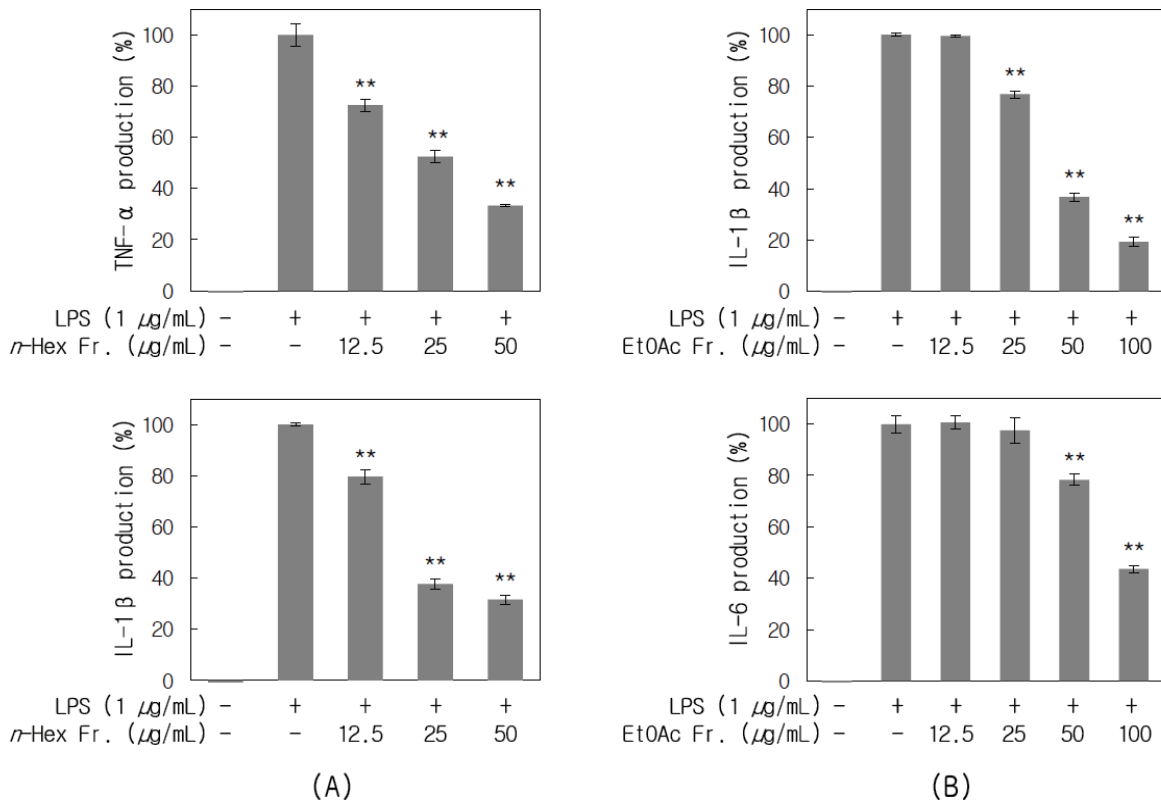


Figure 3. Effects of *n*-Hex (A) and EtOAc (B) fractions from *H. petiolaris* on production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μ g/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions for 24 h. TNF- α , IL-1 β and IL-6 produced and released into the culture medium was assayed using the ELISA method. The data represent the mean \pm SD of triplicate experiments (* p < 0.05, ** p < 0.01).

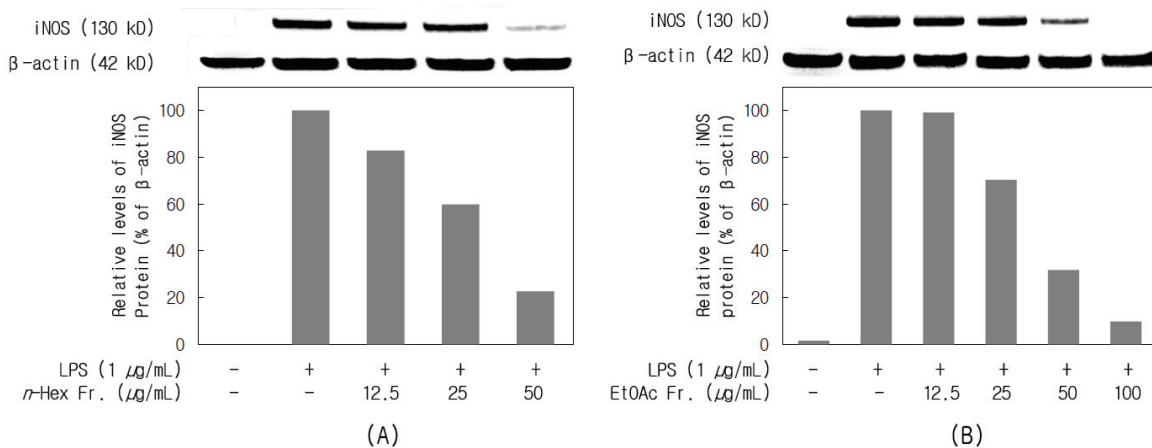


Figure 4. Effects of *n*-Hex (A) and EtOAc (B) fractions from *H. petiolaris* on level of iNOS protein in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 μ g/mL of LPS only, or with LPS plus *n*-Hex and EtOAc fractions for 24 h. Whole cell lysates (20 μ g) were prepared and the protein was subjected to 10% SDS-PAGE; expression of iNOS and β -actin were determined by Western blotting. β -actin served as a loading control.

3.1.3. iNOS 단백질 발현 억제 활성

대식세포가 *interferon- γ* 또는 LPS에 의해 자극될 때 iNOS가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되고 염증반응의 매개물질 역할을 하게 된다[14,15]. 이러한 염증반응에 관여하는 단백질인 iNOS의 발현을 western blot 분석법을 통하여 측정하고, 등수국 잎 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 NO 생성 억제 활성과 유사한 경향으로 iNOS 단백질의 발현을 농도의존적으로 저해시키는 것을 확인하였다(Figure 4).

3.2. 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 항균 활성

등수국 잎 70% 에탄올 추출물 및 용매 분획물에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 피부 관련 균주인 *S. epidermidis* 및 *C. acnes*를 이용하여 한천확산법으로 clear zone의 크기를 확인하였다. 그 결과, 등수국 잎 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 항균 활성이 나타났으며(Table 1), 추가적으로 최소억제농도(MIC) 및 최소사멸농도(MBC) 값을 확인하였다(Table 2).

Table 1. Anti-bacterial activities of *H. petiolaris* leaves

	Clear zone (mm) ¹⁾					
	<i>S. epidermidis</i>			<i>C. acnes</i>		
	CCARM 3709	CCARM 3710	CCARM 3711	CCARM 0081	CCARM 9009	CCARM 9010
Extract	8.5	-	8.5	10.5	8.5	11
<i>n</i> -Hex	-	-	-	9	9.5	8.5
EtOAc	10	13	9	12.5	10	10.5
<i>n</i> -BuOH	11.5	11.5	11	10	-	-
H ₂ O	-	-	-	-	-	-
Erythromycin	30	-	29	58	-	-

¹⁾Concentration of sample : 2 mg, erythromycin : 20 μ g

Table 2. MIC and MBC values of *H. petiolaris* leaves

		Extract ¹⁾	<i>n</i> -Hex ¹⁾	EtOAc ¹⁾	<i>n</i> -BuOH ¹⁾
<i>S. epidermidis</i>	CCARM 3709	MIC 2000	> 4000	2000	1000
		MBC 4000	> 4000	2000	2000
	CCARM 3710	MIC 1000	> 4000	1000	1000
		MBC 2000	> 4000	2000	2000
	CCARM 3711	MIC 1000	> 4000	500	1000
		MBC 4000	> 4000	1000	2000
<i>C. acnes</i>	CCARM 0081	MIC 4000	> 4000	2000	4000
		MBC > 4000	> 4000	4000	> 4000
	CCARM 9009	MIC 2000	4000	2000	2000
		MBC 4000	4000	4000	4000
	CCARM 9010	MIC 4000	> 4000	4000	4000
		MBC > 4000	> 4000	4000	> 4000

¹⁾Concentration of sample : μ g/mL

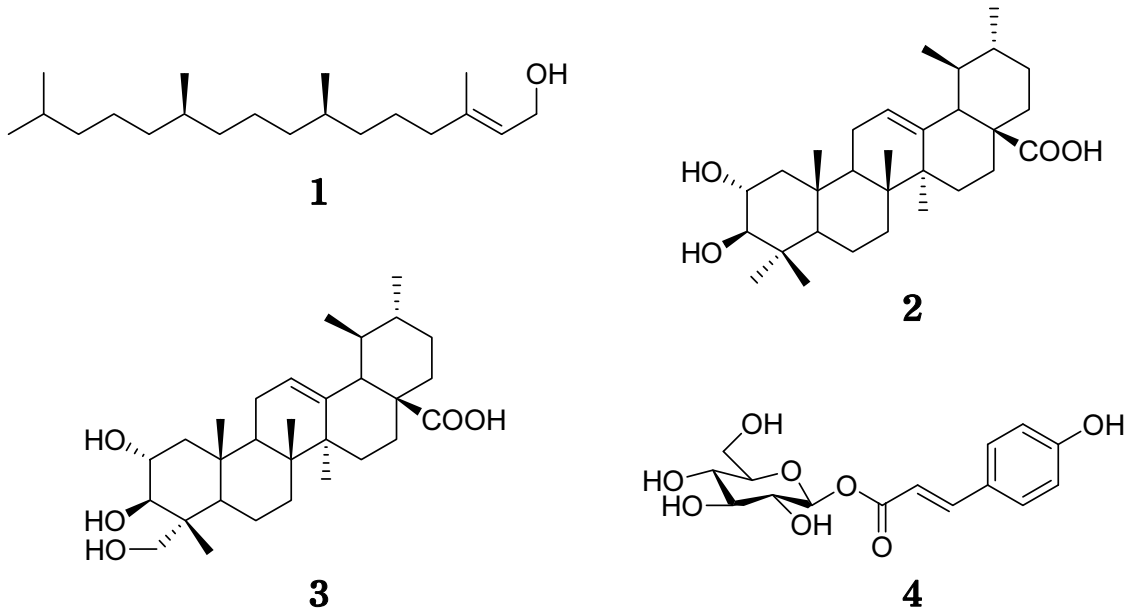


Figure 5. Isolated compounds 1-4 from *H. petiolaris* leaves.

3.3. 등수국 잎 추출물로부터 분리된 화합물의 구조 동정

항염 및 항균 활성이 우수한 등수국 잎 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대해 VLC, MPLC 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 4개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용하여 화합물의 구조를 확인하였다. 화합물 1은 ¹³C NMR 스펙트럼에서 20개의 탄소 피크가 관찰되었으며, δ_H 5.39 (1H, m) 및 δ_C 140.6, 123.2의 피크를 통해 한 개의 이중결합이 있음을 예상하였다. 또한 δ_H 0.82 - 0.85 (15H, m)에 해당하는 다섯 개의 methyl group과 δ_H 4.13 (2H, t, *J* = 7.8 Hz) 및 δ_C 59.6의 피크는 전기음성도가 큰 산소에 인접한 sp³ 혼성 탄소로 예상하였고 이를 바탕으로 문헌[16]을 통해 화합물 1은 phytol로 확인되었다. 화합물 2는 ¹³C NMR 스펙트럼에서 30개의 탄소 피크와 ¹H NMR 스펙트럼에서 6개의 methyl group을 포함하는 넓은 범위의 aliphatic signal을 바탕으로 triterpene으로 예상하였으며, δ_C 69.0, 84.3의 피크를 통해 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 2개의 sp³ 혼성 탄소 등을 예상하였고, 문헌[17]을 통해 corosolic acid로 확인되었다. 화합물 3은 화합물 2와 유사한 구조이며, ¹³C NMR 스펙트럼에서 전기음성도가 큰 산소에 인접한 위치의 3개의 sp³ 혼성 탄소(δ_C 66.8, 69.4, 78.6) 등을 통해 2번, 3번 및 23번 위치에 OH group이 결합되어 있음을 예상하였고 문헌[18]을 통해 asiatic acid로 확인되었다. 화합물 4는 ¹H NMR 스펙트럼에서 δ_H 7.49 (2H, d, *J* = 8.7 Hz)

및 δ_H 6.82 (2H, d, *J* = 8.7 Hz) 피크의 적분값과 coupling constant 값을 통해 서로 *ortho*-coupling을 하고 있는 대칭 구조의 aromatic ring을 예상하였다. 또한 δ_H 7.73 (1H, d, *J* = 16.0 Hz), δ_H 6.38 (1H, d, *J* = 16.0 Hz) 피크의 coupling constant 값을 통해 *trans*-form의 이중결합 및 δ_H 5.58 (1H, d, *J* = 7.8 Hz) 피크를 통해 β-form의 당이 결합되어 있을 것이라 예상하였고, 이를 바탕으로 문헌[19]과 비교하여 화합물 4는 1-*O*-*p*-coumaroyl-β-D-glucopyranoside로 확인되었다. 이들 화합물 모두 등수국에서 처음으로 분리된 물질이다(Figure 5).

3.4. 등수국 잎으로부터 분리된 화합물의 항염 및 항균 활성

등수국 잎으로부터 분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과, 화합물 1 및 3이 100 μM 이하의 농도에서 세포에 대한 독성 없이 농도 의존적으로 NO의 생성을 저해시키는 효과가 우수함을 확인하였다(Figure 6). Phytol (1)은 iNOS, COX-2 단백질의 발현 및 전염증성 사이토카인인 IL-1β, IL-6의 생성을 억제시키는 기전으로 항염 활성이 있음이 보고되어 있으며[16], asiatic acid (3) 또한 iNOS, COX-2 단백질의 발현 및 PGE₂, TNF-α, IL-1β, IL-6 등 전염증성 사이토카인의 생성을 억제시키는 기전으로 항염 효과가 있음이 보고되어 있으므로[20], 추가적인 기전 연구는 진행하지 않았다. 또한 분리된 화합물 중 triterpenoid

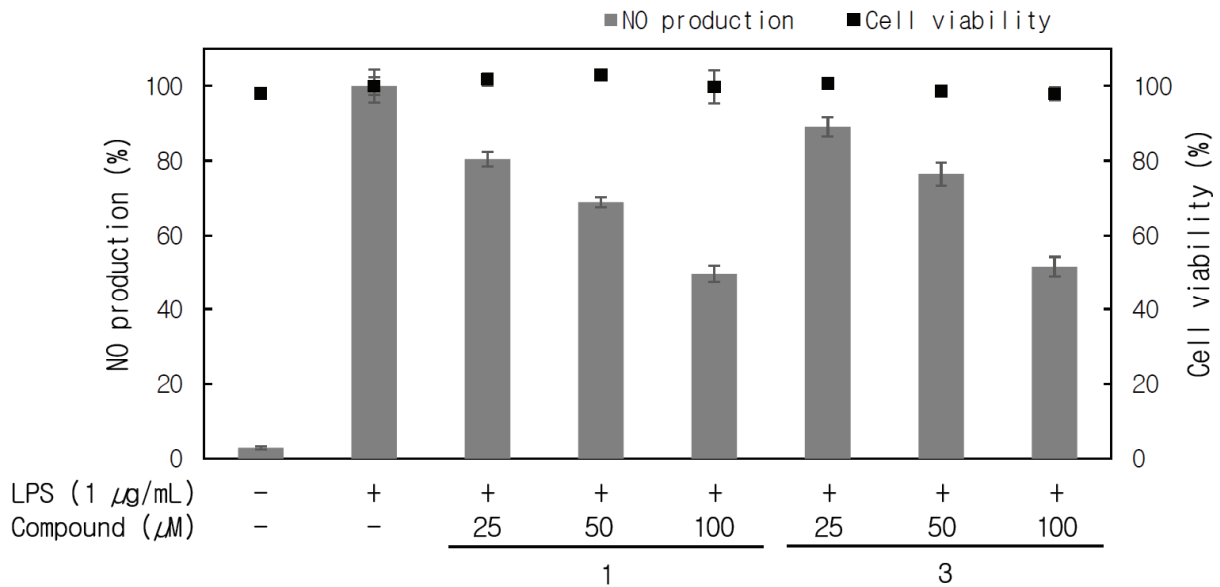


Figure 6. Effects of isolated compound **1** and **3** from *H. petiolaris* on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. The cells were stimulated with 1 µg/mL of LPS only, or with LPS plus compound **1** and **3** for 24 h. NO production was determined by the Griess reagent method. Cell viability was determined after 24 h culture of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of compound **1** and **3**. The data represent the mean ± SD of triplicate experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Table 3. Contents (mg/g) of isolated compounds **1** – **4** from *H. petiolaris* leaves

	1	2	3	4
70% EtOH extract	27.8	7.9	2.0	4.4
<i>n</i> -Hex fraction	134.1	20.9	< 1.0	< 1.0
EtOAc fraction	< 1.0	< 1.0	2.4	5.2

계열의 화합물인 corosolic acid (**2**) 및 asiatic acid (**3**)의 경우, 표피포도상구균 및 여드름균에 대한 항균 활성이 있음이 보고되어 있다[17].

3.5. 등수국 잎 추출물의 화합물 **1** – **4** 함량 분석

등수국 잎에서 분리된 화합물 **1** – **4**의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과 등수국 잎 70% 에탄올 추출물 1 g 당 phytol (**1**)이 27.8 mg/g (2.8%)으로 가장 많이 함유되어 있으며, corosolic acid (**2**)는 7.9 mg/g (0.8%), asiatic acid (**3**)는 2.0 mg/mg (0.2%), 1-*O*-*p*-coumaroyl-β-D-glucopyranoside (**4**)는 4.4 mg/g (0.4%)이 함유되어 있는 것으로 확인되었다(Figure 7, Table 3).

4. 결 론

현재까지 등수국(*H. petiolaris*) 줄기에 대한 생리활성 및 성분 연구는 보고되어 있지만, 등수국 잎에 대해서는 활성 및 유효 성분 연구가 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 등수국 잎 추출물 및 용매 분획물의 항염, 항균 활성을 확인하고 성분 연구를 진행하여 화장품 관련 천연 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

등수국 잎 70% 에탄올 추출물을 극성에 따라 분획하여 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 얻었으며, 항염 활성 실험 결과 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물이 NO 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 우수함을 확인하였다. 이를 바탕으로 추가적인 항염 기전 연구를 진행하였으며, ELISA를 이용하여 등수국 잎 *n*-Hex 분획물은 TNF-α 및 IL-1β의 생성을 감소시키고, EtOAc 분획물은 IL-1β 및

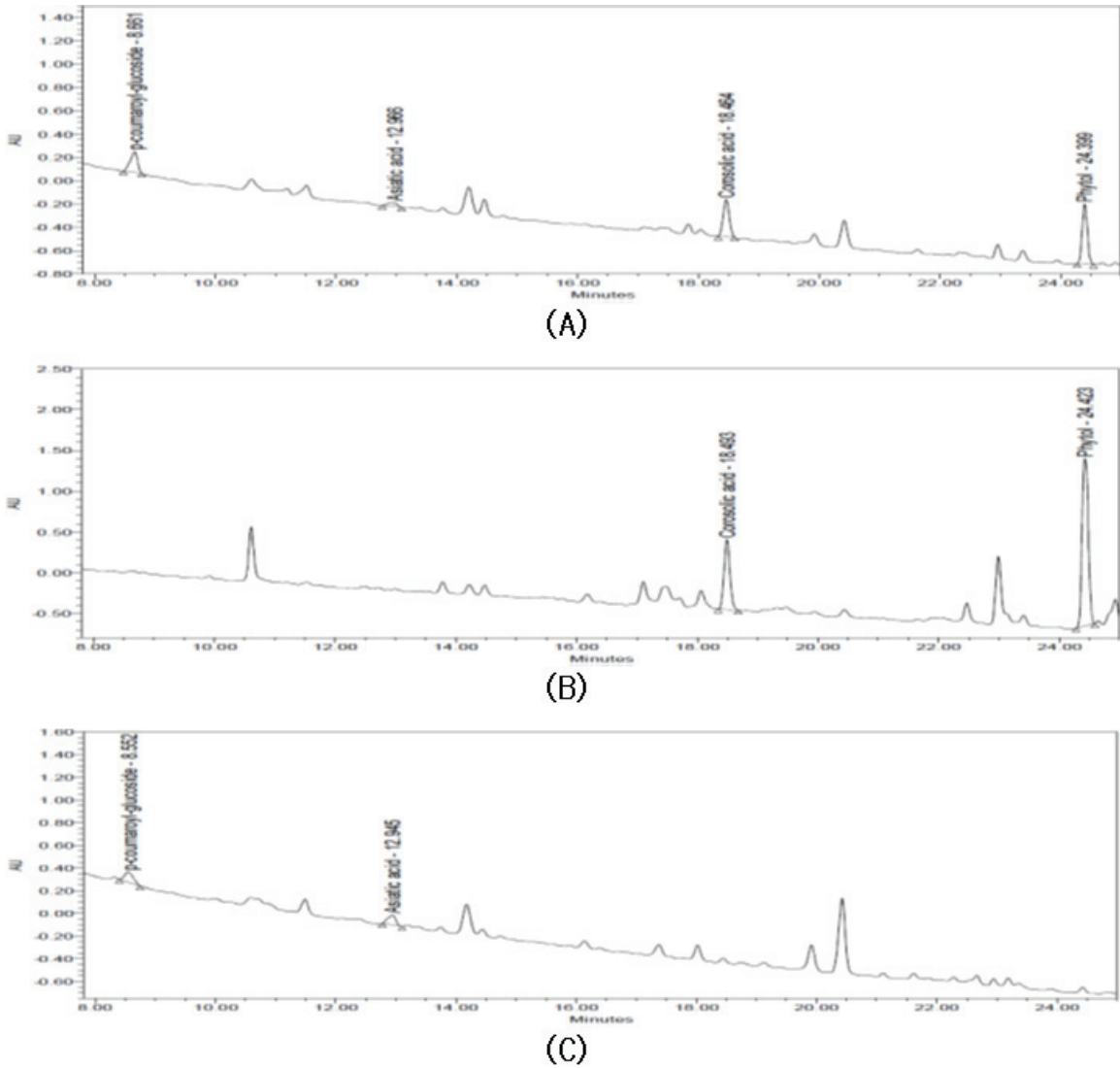


Figure 7. HPLC chromatogram of 70% EtOH extract (A), *n*-Hex fraction (B) and EtOAc fraction (C) from *H. petiolaris* leaves at 202 nm.

IL-6의 생성을 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. Western blot 분석법을 이용하여 iNOS 단백질의 발현량을 확인한 결과, 등수국 잎 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물은 iNOS 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제시키는 활성이 있었다.

또한 피부 관련 균주인 표피포도상구균(*S. epidermidis*) 및 여드름균(*C. acnes*)을 이용한 항균 실험 결과, 추출물 및 *n*-Hex, EtOAc, *n*-BuOH 분획물에서 활성이 나타났으며, 이와 같은 결과를 바탕으로 활성 성분을 확인하기 위해 *n*-Hex 및 EtOAc 분획물에 대해 MPLC, VLC 및 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 4 개의 화합물을

분리하였다. 분리된 화합물은 ¹H 및 ¹³C NMR을 이용해 화학구조를 동정하였으며, phytol (1), corosolic acid (2), asiatic acid (3), 1-*O-p*-coumaroyl-β-D-glucopyranoside (4)로 확인되었다.

분리된 화합물에 대한 항염 활성 실험 결과 화합물 1, 3이 NO의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 문헌을 통해 화합물 1, 3의 항염 효능 및 화합물 2, 3의 항균 효능이 알려져 있음을 확인하였다. 또한 HPLC를 이용하여 등수국 잎에서 분리된 화합물 1-4의 함량 분석 결과 phytol (1)의 함량이 27.8 mg/g으로 함량이 가장 많음을 확인하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 등수국 및 추출물은 항염 및 항균 효과를 갖는 천연 기능성 화장품 소재로의 개발이 가능할 것이라 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 광역협력권산업 육성사업(No. P0002225, 천연물과 바이오기술을 이용한 민감성 피부 개선 화장품 개발)으로 수행된 연구결과입니다.

Reference

1. A. Rabson, I. M. Roitt, P. J. Delves, Really Essential Medical Immunology, Blackwell publishing Ltd (2005).
2. H. N. Ko, Ph. D. Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2018).
3. H. S. Yeom, Master's Thesis Dessertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2018).
4. H. M. Yang, S. S. Lim, Y. S. Lee, H. K. Shin, Y. S. Oh, J. K. Kim, Comparison of the Anti-inflammatory Effects of the Extract from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**(3), 342 (2007).
5. P. K. Lala and C. Chakraborty, Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor progression, *Lancet Oncol.*, **2**(3), 149 (2001).
6. J. C. Harper, An update on the pathogenesis and management of acne vulgaris, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **51**, 36 (2004).
7. D. M. Thiboutot, Acne. an overview of clinical research findings, *Dermatol Clin*, **15**(1), 97 (1997).
8. S. Nishijima, I. Kurokawa, N. Katoh, and K. Watanabe, The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions, *J. Dermatol.*, **27**, 318 (2000).
9. A. Koreck, A. Pivarsci, A. Dobozy, L. Kemeny, The role of innate immunity in the pathogenesis of acne, *Dermatology*, **206**(2), 96 (2003).
10. H. S. Kim, Master's Thesis Dissertation, Konkuk Univ., Seoul, Korea (2011).
11. M. S. Kang, H. J. Oh, H. C. Lee, and J. S. Oh, Isolation and identification of lactic acid bacteria inhibiting the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, *Journal of Bacteriology and Virology*, **39**(1), 11 (2009).
12. J. Y. Choi, S. Y. Song, and H. H. Lee, Antibacterial and anti-inflammatory activity of *Corni fructus ethanol extract* in *Propionibacterium acnes*, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**(5), 623 (2015).
13. J. H. Park, Master's Thesis Dessertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2019).
14. P. J. Barnes and F. Y. Liew, Nitric oxide and asthmatic inflammation, *Mmunol. Today*, **16**(3), 128 (1995).
15. T. J. Guzik, R. Korbut, and T. Adamek-guzik, Nitric oxide and uperoxide in inflammation and immune regulation, *J. Physiol Pharmacol.*, **54**, 469 (2003).
16. S. Y. Kim, Master's Thesis Dessertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2013).
17. J. E. Kim, Ph. D. Dissertation, Jeju National Univ., Jeju, Korea (2016).
18. H. T. P. Nguyen, D. T. Thi, T. M. Pham, T. H. H. Tran, X. C. Nguyen, H. N. Nguyen, V. T. Nguyen, V. M. Chau, Secondary metabolites from *Dipterocarpus obtusifolius* TEIJSM. ex MIQ., *Vietnam Journal of Chemistry*, **53**(2e), 137 (2015).
19. B. T. Ahn, Phenolic Compounds from Leaves of *Spiraea salicifolia*, *Kor. J. Pharmacogn*, **27**(3), 179 (1996).
20. K. J. Yun, J. Y. Kim, J. B. Kim, K. W. Lee, S. Y. Jeong, H. J. Park, H. J. Jung, Y. W. Cho, K. Yun, K. T. Lee, Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways, *International Immunopharmacology*, **8**(3), 431 (2008).