

핑크-알로에의 항산화, NO 생성 억제 및 세포 재생 효과

이 경 주 · 장 옥 주 · 김 유 아 · 박 병 준 · 강 학 희†

한국콜마(주) 피부천연물연구소
(2020년 6월 12일 접수, 2020년 8월 13일 수정, 2020년 8월 27일 채택)

Antioxidant, Inhibitory on NO Production and *In-vitro* Cell Regeneration Effects of Pink-aloe

Kyung Ju Lee, Wookju Jang, You Ah Kim, Byoung Jun Park, and Hakhee Kang†

Skin & Natural Products Lab., Kolmar Korea Co., Ltd., 61, Heolleung-ro 8-gil Seocho-gu, Seoul 06800, Korea
(Received June 12, 2020; Revised August 13, 2020; Accepted August 27, 2020)

요 약: 알로에 베라(*Aloe barbadensis* Miller)는 예로부터 화상이나 상처, 습진 등의 다양한 피부 질환을 개선하기 위해 사용해 왔다. 이러한 효능은 알로에가 가지고 있는 비타민, 무기질, 당, 페놀 물질, 지방산, 아미노산 등의 다양한 성분에 의한 것으로 보고가 되었다. 알로에는 극한의 환경에서 스스로를 보호하기 위해서 성분을 변화시키며, 이로 인해 색깔이 녹색에서 적색으로 변화한다. Aloe-emodin은 알로에속 식물의 대표적인 페놀성 물질로 항산화 및 항염 활성을 나타낸다. 그러나 지금까지 알로에의 활성 물질인 알로에-에모딘을 증가시키고 알로에의 색상을 변화시키는 공정 개발에 대한 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구의 목적은 aloe-emodin 함량을 증가시키고 알로에의 항산화 및 항염 활성을 증대시키는 핑크 알로에 제조공정을 개발하는 것이다. 이를 위해 알로에를 적정 조건으로 가온한 결과 핑크 알로에는 일반 알로에 대비 aloe-emodin 함량이 증가하였으며, 항산화 활성 증대, NO 생성 억제, 세포 재생 촉진 등의 효과를 나타내었다. 본 연구를 통해 화장품 분야에서 핑크 알로에의 신규 향노화 소재로 활용성을 확인하였다.

Abstract: Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) has been used since ancient times to improve various skin diseases such as burns, wounds, and eczema. It has been reported that Aloe vera contains vitamin, enzyme, mineral, sugar, phenolic compound, fatty acid and amino acid. Aloe vera changes its color from green to red under the extreme thermal and arid climate to protect itself. These morphological changes induce variation of composition such as increasing of aloe-emodin content. Aloe-emodin is one of the major anthraquinone in aloe family plants. Since aloe-emodin contains a polyphenolic structure, this compound may be responsible for the reported antioxidant and anti-inflammatory effects of aloe. However, there is no research on the process of increasing the compounds of Aloe vera. Therefore, the purpose of this study is to develop a pink aloe manufacturing process that increases the aloe-emodin content and enhances the antioxidant and anti-inflammatory activities of aloe. As a result of heating aloe under appropriate conditions, pink aloe increased aloe-emodin content compared to general aloe, and exhibited effects such as increasing antioxidant activity, inhibiting NO production, and promoting cell regeneration. Through this study, the applicability of pink aloe as a new anti-aging material in the cosmetic field was confirmed.

Keywords: Aloe vera, Pink aloe, antioxidant, anti-inflammatory, wound healing

† 주 저자 (e-mail: hhkang@kolmar.co.kr)
call: 02-3459-5587

1. 서 론

알로에(aloe)는 전 세계적으로 약 500 종 이상이 속해 있는 백합과(Liliaceae)의 알로에 속(Aloineae)의 식물로, 주로 아프리카 아라비아를 비롯한 열대 지방에 광범위하게 분포한다[1-3]. 알로에는 지방산, 유기산, 플라보노이드 등 200여 가지의 화합물을 함유하고 있으며, 당단백, 다당체 등의 저분자 물질인 안트라퀴논(antraquinone), 안트론(anthrone), 크로몬(chromone), 피론(pyron), 아미노산, 비타민과 미네랄 등의 성분들을 포함하고 있다[4-5].

알로에 베라(Aloe vera) 겔의 주요 구성성분은 다당류인 glucomannans이며, 이 외에도 xylose, rhamnose, galactose, arabinose, lupeol, cholesterol, campesterol 및 β -sitosterol 등으로 구성되어 있다. 페놀성분으로는 anthraquinones이 주성분이며, 유도체인 isobarbain, anthrone C-glycosides 및 chromones이 포함되어 있다[6-7].

이와 같은 알로에의 활성 성분으로 인하여 항산화, 항염증, 항균, 항암, 간보호 등의 효과가 보고되었으며, 알로에의 즙액 및 건조분말은 식품, 의약품 및 화장품 소재로 사용되고 있다[8-11].

알로에는 극한의 환경에 노출될 경우 생존을 위해서 잎의 색상을 녹색에서 붉은 색으로 변화시키며, 이러한 색상 변화는 2차 대사산물의 구성이 변화하기 때문에 나타난다[12]. 이렇게 붉은색을 띠는 알로에에서 추출한 알로에 겔은 핑크색을 나타내므로 심미적 요인이 중요한 화장품 소재로의 활용을 기대할 수 있다.

알로에는 최근 국내 많은 연구를 통해 알로에 추출물에 대한 생리활성이 규명되었으며 알로에의 효능이 입증되었으나, 알로에가 지닌 효능을 향상시키는 방법에 관한 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 알로에가 갖는 효능을 향상시키고 알로에의 성상을 개선하여 신규 화장품 소재로서의 가치를 확인하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 알로에는 국내산으로 경상남도 거제시에 소재한 영농조합법인 알로에팜(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 표준품인 aloe-emodin은 Sigma-Aldrich (USA)로부터 구입하였으며, 핑크 알로에의 활성 평가를 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma, USA), L-ascorbic acid

(Sigma, USA), Griess reagent system Kit (Promega, USA), LPS (MILLIPORE, USA), Celecoxib (Sigma, USA), fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), Antibiotics & Antimycotics (Gibco, USA), DMEM/HIGH GLUCOSE (Hyclone, USA), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco, USA), phosphate buffered saline (Sigma, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 대식세포 주인 Raw 264.7 cell (ATCC TIB-71)은 ATCC (USA)에서 구입한 것을 사용하였으며, 인체유래 각질형성세포인 HaCaT cell는 경희대 한의학과 약리학교실 (Korea)에서 분양 받은 세포주를 사용하였다.

2.2. 알로에 겔 제조

알로에 베라 잎을 수세하고, 껍질을 제거한 후, 껍질이 제거된 알로에를 약 3 cm 간격으로 절단하여 물과 약 1 : 1의 중량비율로 혼합하여 원료를 준비하였다. 알로에와 물의 혼합물을 저속압착추출기(HH-SBF11, Hurom, Korea)를 이용하여 25 °C, 43 rpm 조건으로 2 회 반복하여 착즙한 후, 믹서기를 이용하여 착즙물을 분쇄하고, 380 mesh로 여과하여 알로에 겔로 제조하였다.

2.3. 핑크 알로에 제조 공정 확립

알로에 겔을 70 °C, 80 °C, 90 °C로 온도를 달리하여 1 h 동안 가온하여 최적 온도 조건을 확인하였다. 또한, 알로에 겔을 80 °C에서 가온 시간을 30 min, 1 h 및 2 h 으로 달리 가온하여 최적 시간 조건을 확인하였다. 제조된 핑크 알로에를 동결건조기(TD5070A, Il Shin Bio Base, Korea)를 이용하여 -50 °C에서 72 h 동안 동결건조하여, 파우더 상을 제조하였다.

2.4. 알로에 색상 변화 확인

증류수와 가온하지 않은 일반 알로에 겔을 대조군으로 설정하고, 가온 온도를 달리하여 제조한 핑크 알로에 겔을 색도색차계(CM-3500d, Konica Minolta Sensing INC, Japan)를 이용하여 반사율과 투과율을 측정하였다.

2.5. 핑크 알로에의 성분 분석

2.5.1. Thin Layer Chromatography (TLC) 확인

TLC plate는 Kiesel gel 60 F254 (Merck, Germany)를 사용하였고, aloe-emodin과 일반 알로에, 핑크 알로에를 HPLC grade의 hexane (Sigma, USA)과 ethyl acetate (Sigma, USA)를 6 : 4로 혼합한 용매로 포화된 chamber 내에서 전개시켰

다. TLC plate는 UV detector (CM-10A, Spectronics Corporation Westbury, USA)를 이용하여 254 nm, 365 nm에서 확인하였다.

2.5.2. Aloe-emodin 함량 확인

일반 알로에와 핑크 알로에에서 추출된 유효성분을 하기 분석조건에 의해 고속액체크로마토그래피(Prominence 20A, Shimadzu, Japan)를 이용하여 성분분석을 실시하였다. 일반 알로에와 핑크 알로에는 각각 methyl alcohol (Sigma, USA)에 5%(w/w) 농도로 희석하고, 10,000 rpm으로 10 min 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 사용하였다. HPLC (Shimadzu LC-20A HPLC system) 분석 시 사용한 column은 C18 (Phenomenex, 5 μm, 4.6 × 250 mm)이며 유속은 1 mL/min, 온도는 35 °C, 시료 주입량은 50 μL로 UV 254 nm에서 실험하였다. 이동상 조건은 A : water, B : methyl alcohol (A : B = 45 : 55)이다.

2.6. 핑크 알로에의 항노화 효과

2.6.1. DPPH Radicla Scavenging Assay

중류수와 ascorbic acid (100 μg/mL)를 비교군으로 설정하고, 일반 알로에와 핑크 알로에의 항산화 효과를 확인하였다. 알로에 파우더는 중류수에 100,000 μg/mL의 농도로 희석하고, 2,000 rpm, 25 °C, 차광조건에서 1 h 동안 섞어 주고, 10,000 rpm으로 10 min 원심분리하여, 상등액을 취하여 사용하였다. 준비된 시료를 100 μL/well 만큼 96 well plate에 분주하고, 시료와 동일한 부피의 DPPH solution (0.56 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)을 처리하였다. 시료 자체의 흡광도를 제거하기 위하여 준비된 시료를 100 μL/well 만큼 96 well plate에 분주하여 DPPH solution 대신 시료와 동일한 부피의 99.9% ethyl alcohol을 각 well에 처리하였다. 그 후, 차광 25 °C 조건에서 반응시키고, 180 min 반응 후 흡광도를 측정하였다. 흡광은 540 nm 파장을 측정하였다. 상기 실험은 총 3 회 독립적으로 시행하여 통계분석하였다. 항산화 효과는 아래 식에 의하여 도출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging effect(\%)} = 100 - \left\{ \frac{\text{시료별 } (OD_{\text{DPPH}} - OD_{\text{Ethyl alcohol}})}{(OD_{\text{DPPH}} - OD_{\text{Ethyl alcohol}})} \right\} \times 100$$

2.6.2. Nitric Oxide Production Assay

RAW 264.7 세포주를 96 well cell culture plate에 5 × 10⁵ cells/mL로 100 μL/well 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이

터 조건 하에 24 h 배양하였다. 배양된 세포에 NO의 생성을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS) 1 μg/mL이 포함된 배지로 교환한 후, 준비한 시료를 세포에 처리하였다. 시료는 각각 99.9% ethyl alcohol에 2,000 rpm, 25 °C, 차광 조건에서 1 h 동안 섞은 뒤 10,000 rpm으로 10 min 원심분리하여, 상등액을 취하여 사용하였다. 세포 배지를 사용하여 1.5% (w/w)의 농도로 희석하고 세포에 최종 각각 1500 μg/mL 이 되도록 처리한 뒤 24 h 재배양하였다. 생성된 NO의 양은 세포배양 상등액 100 μL와 Griess 시약 100 μL를 혼합하여 96 well cell culture plate에서 10 min 반응시킨 후 ELISA reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 질산나트륨(NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였고, 항염 효과는 아래 식에 의하여 도출하였다. 상기 실험의 양성대조군으로는 Celecoxib (10 μg/mL)를 사용하였으며, 총 3 회 독립적으로 시행하여 통계분석하였다.

$$\text{NO inhibition(\%)} = 100 - \left\{ \frac{\text{NO conc.}(\mu\text{M})_{\text{Positive control or Experimental}}}{\text{NO conc.}(\mu\text{M})_{\text{Vehicle group}}} \right\} \times 100$$

2.6.3. Wound Healing Assay

인간각질형성세포주인 HaCaT 세포주를 24 well cell culture plate에 2 × 10⁵ cells/mL로 1000 μL/well 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터 조건 하에 24 h 배양하였다. 배양 완료 후 형성된 세포 단일층에 1000 μL 틱을 활용하여 세포 표면을 일직선으로 그어 상처를 유도하였다. 상처 유도 후 탈리된 세포들은 phosphate buffered saline (PBS)을 1000 μL/well 처리 후 washing 하여 제거하였다. 이 후 serum이 포함되지 않은 배지로 교환한 뒤, 준비한 시료를 세포에 처리하였다. 시료는 99.9% ethyl alcohol에 2,000 rpm, 25 °C, 차광조건에서 1 h 동안 믹싱한 뒤 10,000 rpm으로 10 min 원심분리하여, 상등액을 취하여 사용하였다. 이후 세포 배지를 사용하여 0.625% (w/w)의 농도로 희석하고 세포에 최종 각각 625 μg/mL이 되도록 처리한 뒤 48 h 재배양하였다. 이후 세포 상처 부위는 웰의 중심을 기준으로 50 배율에서 총 5 구간을 촬영하며, 연속되는 사진간 최소 1/3 이상 영역이 겹치도록 촬영하였다. 이는 상처 유도 직후 및 시료 처리 48 h 후 동일한 구간을 촬영하여 세포 상처 면적을 수치화하여 재생율(wound healing rate, %)을 계산하였으며, 아래의 계산식으로 도출하였다. 상기 실험은 총 3 회 독립적으로 시행하여 통계분석하였다.

Eq 1. 상처율(%) =
$$\frac{[(\text{상처면적}_{\text{초기}}) - (\text{상처면적}_{\text{재생후}})]}{(\text{상처면적}_{\text{초기}})} \times 100$$

Eq 2. 재생율(%) =
$$\frac{[(\text{상처율}_{\text{초기}}) - (\text{상처율}_{\text{재생후}})]}{(\text{상처율}_{\text{초기}})} \times 100$$

2.6.4. 통계처리

본 실험의 통계처리는 SPSS 12.0 (Chicago, USA)을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준 편차로 나타내었으며, 실험값과 대조값 사이의 통계적 유의한 차이는 2-표본 t 검정을 하였으며, 통계적 유의한 판단 수준은 95% ($p < 0.05$)와 99% ($p < 0.01$), 99.9% ($p < 0.001$)의 세 가지 수준을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 핑크 알로에 제조 공정 확립

핑크 색상을 띠는 알로에를 화장품 소재로 개발하기 위하여 알로에 가온 실험을 수행하였다. 일반 알로에와 가온 온도를 달리하여 제조한 핑크 알로에의 반사율과 투과율을 측정된 결과, 일반 알로에에 비하여 가온 처리한 핑크 알로에의 적색도가 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Table 1).

가온 온도를 달리하여 1 h 동안 가온한 알로에 겔의 색상을 육안으로 관찰한 결과, 70 °C에서 얻은 핑크색을 나타내었으며, 80 °C에서 70 °C보다 훨씬 짙은 핑크색을 나타내었으며, 90 °C일 경우에는 80 °C와 비교하여 육안상 큰 변화를 확인할 수 없었다(Figure 1).

가온 시간에 따른 핑크 알로에의 색상 변화를 관찰한 결과, 약 30 min 동안 가온하였을 때, 핑크색이 관측되기 시작하였고, 가온 시간이 60 min에 가까울수록 붉은색이

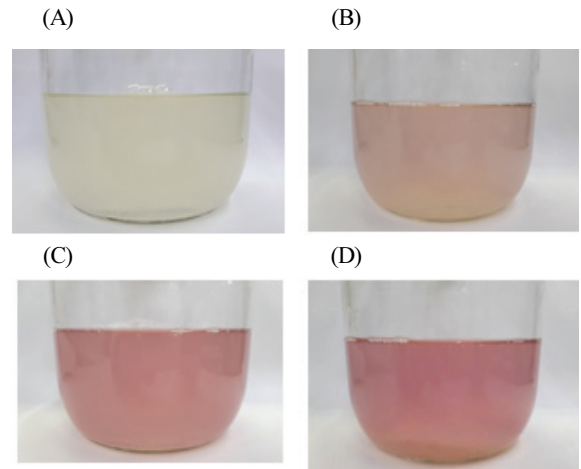


Figure 1. The effect of heating temperature on *A.vera* gel. (A) Normal aloe gel, (B) 70 °C, (C) 80 °C, (D) 90 °C.

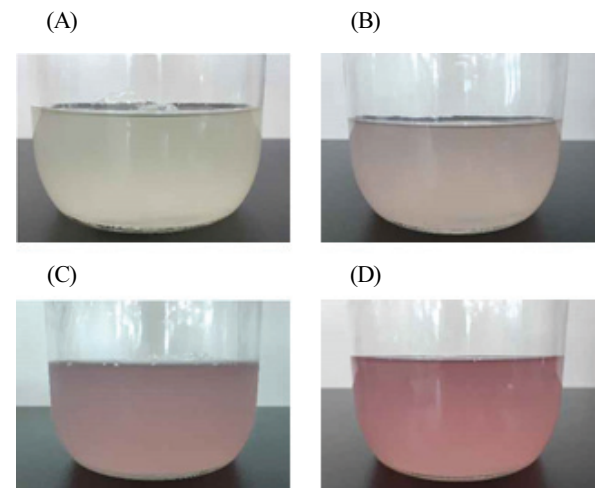


Figure 2. The effect of heating time on *A.vera* gel. (A) Normal aloe gel, (B) 30 min, (C) 1 h, (D) 2 h.

Table 1. Color characteristics of normal and heated *A.vera*.

	L*(D65*)		a*(D65)		b*(D65)	
	R*	T*	R	T	R	T
Water (Blank)	28.88	20.03	- 0.46	- 0.22	- 0.77	- 3.75
Normal aloe	28.85	21.03	- 0.51	- 0.37	- 0.64	- 3.68
70 °C	29.01	53.48	- 0.24	- 0.74	- 0.83	- 9.94
80 °C	29.10	54.28	- 0.21	- 0.74	- 0.90	- 10.35
90 °C	29.03	54.45	- 0.18	- 0.57	- 0.86	- 10.03

*L (Brightness), a (Redness), b (Yellowness), R (Reflectance), T (Transmittance), D65 (Standard illuminant)

점점 진해졌으며, 가온 시간이 60 min이 초과할 경우 육안 관찰 시 색상 변화가 거의 없음을 확인할 수 있었다(Figure 2). 이를 통해서 가온 시간이 길어질수록 알로에가 진한 핑크색을 띠는 것을 확인할 수 있었다.

알로에 겔의 가온 실험을 통해 알로에의 색상 변화에 가온 온도와 시간이 큰 차이 없이 동일한 영향을 미침을 확인할 수 있었으며, 일정 수준 이상의 온도와 시간 처리는 핑크 색상을 더 진하게 하지 않음을 확인하였다.

알로에는 아프리카 등의 열대 지방이 원산지로서, 열대 지방의 고온과 가뭄에 적응하기 위하여, 극한의 환경에서 과육에 함유되어있는 성분을 변화시키는 특징이 있다. 알로에 겔을 가온하면 알로에의 색상이 갈색 또는 붉은색으로 변색이 일어나며, 알로에가 함유하고 있는 다당류, 비타민 및 무기질 함량의 변화가 일어난다. 그러나 과도한 열처리는 알로에의 주요 성분을 감소시키고 항산화 활성을 감소시킬 수 있다[12-13]. 따라서 알로에의 주요 성분과 활성을

감소시키지 않으며, 알로에의 성상을 개선할 수 있는 최적의 조건 확립이 필요하다. 본 연구에서는 알로에 겔의 색을 핑크색으로 변화시키며 활성을 유지하는 가온 조건을 효율성을 고려하여 80 °C에서 1 h 동안 가온하는 것으로 설정하였다.

핑크 알로에 겔은 실온에 보관 시 시간이 지남에 따라 색깔이 핑크색에서 주황색으로 변색되는 현상이 발견된다. 핑크 알로에 겔의 색상 변화를 막기 위해서 액상 핑크 알로에를 동결건조하여 분말로 만든 결과, 가온 온도 및 시간이 증가함에 따라 진한 핑크색을 나타내었다(Figure 3). 따라서 화장품 산업에서 이용하기 위한 핑크 알로에의 최종 제조 공법은 알로에 겔을 80 °C에서 1 h 동안 가온하여 핑크색을 나타낸 후에, 동결건조하여 파우더형으로 제조하여 안정도를 유지하는 것으로 설정하였다.

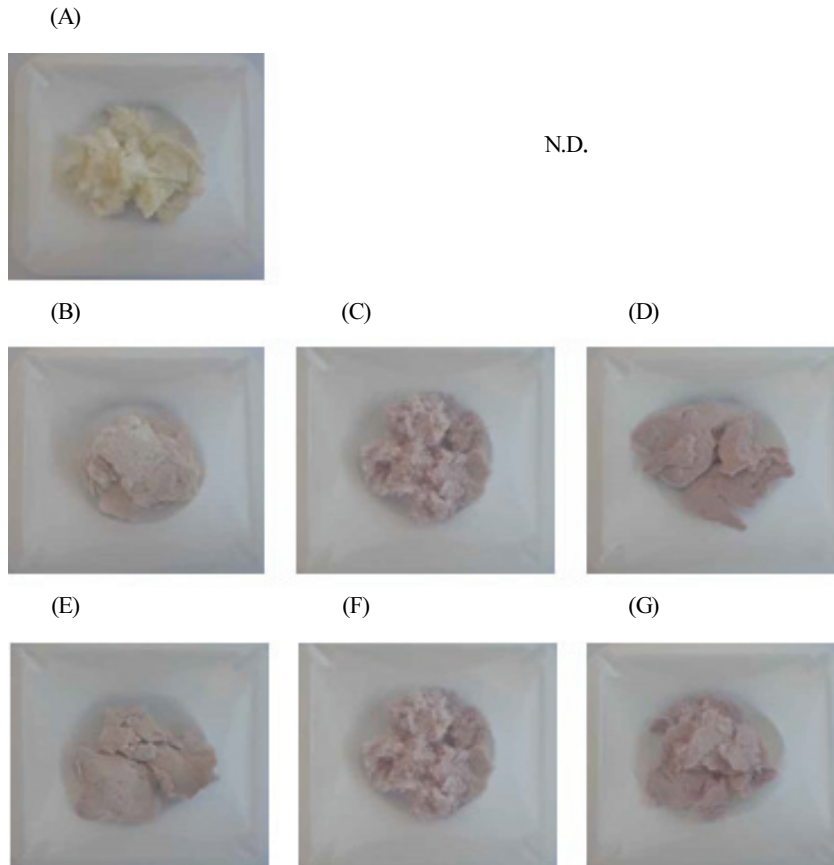


Figure 3. The powder of normal and pink aloe by freeze drying. (A) Normal aloe, (B) 70 °C, (C) 80 °C, (D) 90 °C, (E) 30 min, (F) 1 h, (G) 2h.

3.2. 핑크 알로에의 성분 분석

3.2.1 TLC 확인

Aloe-emodin을 TLC plate에 전개한 결과, aloe-emodin이 R_f 0.7에서 나타남을 확인할 수 있었다. 동량의 일반 알로에와 핑크 알로에 시료를 TLC plate에 전개하여 비교한 결과, 일반 알로에 대비 핑크 알로에의 aloe-emodin 농도가 높음을 확인할 수 있었다(Figure 4).

Aloe-emodin(1,8-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)anthraquinone)은 알로에속의 식물에서 발견되는 안트라퀴논류의 물질로 알로에의 육질에 다양한 종류의 에모딘이 존재한다[12].

3.2.2. Aloe-emodin 함량 확인

일반 알로에와 핑크 알로에의 유효성분을 확인하기 위해 HPLC 분석을 수행한 결과, 열처리하지 않은 일반 알로에의 aloe-emodin 함량이 0.47 ppm으로 낮은 것에 비하여, 핑크 알로에의 aloe-emodin 함량은 최소 2.3배 이상 증가하였음을 확인하였다. 특히, 80 °C에서 2 h 동안 가온한 처리구는 aloe-emodin 함량이 2.90 ppm으로 일반 알로에 대비 6.11 배 증가하였음을 확인하였다(Figure 5).

이전의 연구에서도 알로에를 적정 온도로 가온할 경우, 주요 활성 성분인 aloe-emodin의 함량이 증가한다는 것이 확인되었다[14]. 이는 알로에를 가온할 경우, 고온에 불안

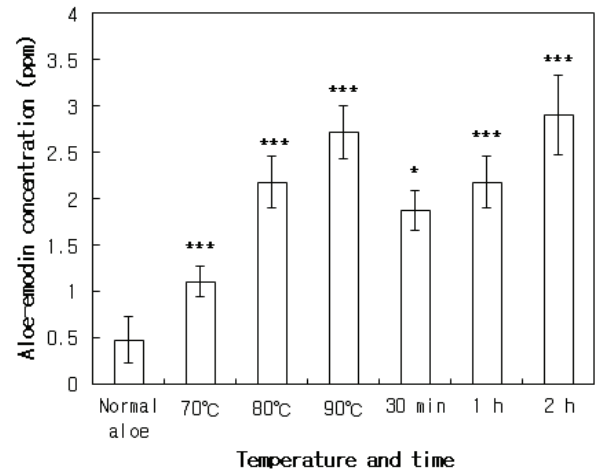


Figure 5. The concentration of aloe-emodin on normal and pink aloe. Data are means \pm SD, N = 3, * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with normal aloe.

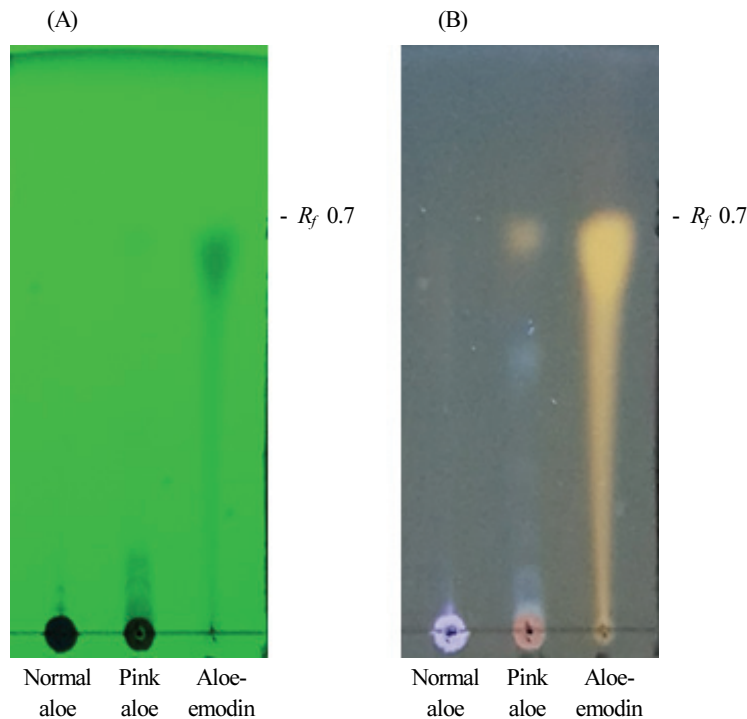


Figure 4. Thin layer chromatography of aloe-emodin, normal aloe, pink aloe. (A) 254 nm, (B) 365 nm.

정한 aloin 등의 물질이 열에 안정한 aloe-emodin 등의 물질로 변화하기 때문이다[12]. Aloe-emodin은 활성산소를 제거하는 활성이 뛰어나 항산화 및 항암 효능이 우수하며, 특히 UV에 의해 생성된 독소를 제거하는 효과가 있어 광으로부터 피부를 보호하는 효과가 있다[15-18]. 또한 aloe-emodin은 iNOS와 COX-2를 억제하여 염증 반응을 억제하는 효과가 있다[19]. 이를 통해서 알로에를 적절한 온도로 가온 처리할 경우 항산화, 항염 및 광보호 효능이 있는 aloe-emodin의 함량을 증가시킴으로써 알로에의 부가가치를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

3.3. 핑크 알로에의 항노화 효과

3.3.1. 항산화 효과 확인

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 강력한 산화작용으로 세포막 혹은 세포 소기관을 비롯한 DNA 파괴 등을 야기하여 다양한 질환 및 노화의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 이러한 ROS는 호흡 등과 같은 신체 내 대사에 의하여 발생하거나 태양 빛에서 유래한 자외선 혹은 기타 외부 자극원에 의하여 발생하기도 한다. 생체는 ROS로부터 방어하기 위한 다양한 방법을 보유하고 있으나, 내적인 산화물 처리 한계량을 넘는 과량의 혹은 지속적인 ROS의 노출은 질병을 야기하거나 노화를 촉진하는 원인이 된다. 따라서 ROS로부터 세포를 보호할 수 있는 항산화물질을 섭취하거나 화장품과 같은 제품 등을 활용하여 외적으

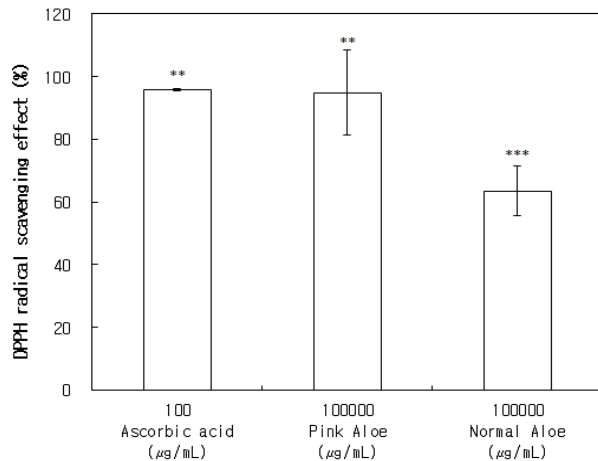


Figure 6. DPPH radical scavenging activity of pink aloe. Anti-oxidation activity of pink aloe was tested DPPH radical scavenging assay. Positive control used L-ascorbic acid (100 µg/mL). Data are means ± SD, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 compared with the vehicle group (data not shown).

로 공급하여 체내 항산화 능력을 향상시키는 것이 중요하다[20-21]. 본 연구에서는 DPPH radical을 활용하여 핑크 알로에의 항산화 효과 측정하였다. 일반 알로에의 라디칼 소거 활성은 100,000 µg/mL에서 59.7%의 DPPH radical을 소거함을 확인하였으나 핑크 알로에의 경우 100,000 µg/mL에서 92.2%의 라디칼 소거 능력을 나타내었다. 이를 통하여 일반 알로에가 핑크 알로에로 전환 되면 DPPH radical과 같은 라디칼 소거 활성이 개선됨을 알 수 있었다(Figure 6).

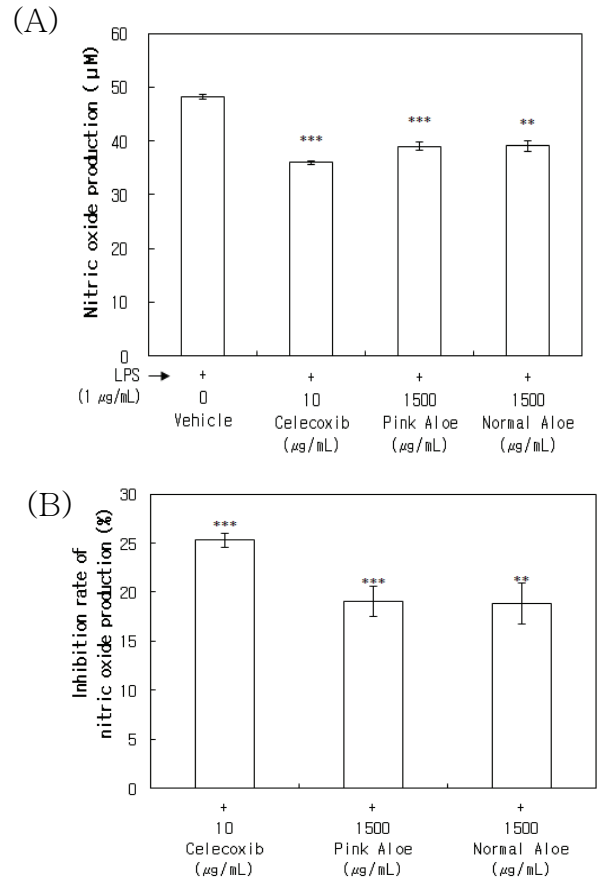


Figure 7. Inhibitory effect of Pink Aloe on Nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells. (A) Nitric oxide production (B) Inhibition rate of nitric oxide production compared by vehicle group. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 µg/mL) in the presence of Pink Aloe (1,500 µg/mL) or Normal Aloe (1,500 µg/mL). Positive control used celecoxib (10 µg/mL). Data are means ± SD, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001 compared with the vehicle group.

3.3.2. 항염 효과 확인

대식세포와 같은 면역 세포가 자극원을 인식하면 nitric oxide (NO)를 포함한 prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 염증매개 cytokine 분비가 유도되어 염증반응이 일어난다. 이러한 면역 매개인자 중 NO는 적절한 농도로 존재하면 다양한 생리활성을 조절하는 중요한 역할을 하지만 염증반응 등에 의하여 고농도로 존재하면 peroxynitrite 혹은 nitrogen dioxide 등의 생성을 촉진하여 세포 내 유해 산화물의 축적 및 DNA 손상 등을 야기하며, 이는 암과 같은 질병을 유도하는 것으로 알려져 있다[22-23]. 본 연구에서는 염증반응을 유도하는 내독소(endotoxin)인 lipopolysaccharide (LPS)를 Raw264.7 세포에 처리하여 과량의 NO 분비를 유도하고 동시에 핑크 알로에를 처리함으로써 LPS에 의한 NO 발생 억제 활성을 확인하였다. 그 결과 핑크 알로에는 1,500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 19%의 NO 생성 저해율을 나타내었으며, 일반 알로에는 1,500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 18.8%의 NO 생성 저해율을 나타냄을 알 수 있었다. 두 알로에간 NO 생성 억제 활성은 통계적 유의하지 않았으며, 이 결과를 토대로 일반 알로에가 핑크 알로에로 전환될 때 알로에의 고유한 항염 활성은 유지되는 것으로 판단된다(Figure 7).

3.3.3. 상처 재생 효과 확인

피부 최외곽을 구성하는 각질은 외부 항원 및 자극으로부터 신체 내부를 보호하며, 체내 수분 이탈을 조절하여 보습 기능 등 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 각질층은 각질형성세포(keratinocyte)로부터 분화되며 대략 28 일 주기로 각질 형성 및 탈리가 반복되는 순환구조를 통하여 피부장벽 항상성이 유지되고 있다. 각질층에 화학적 혹은 물리적 자극 등에 의하여 손상이 발생할 경우 상처부위에 keratinocyte growth factor와 같은 세포 증식인자를 비롯한 다양한 케모카인(chemokine)과 사이토카인(cytokine)이 분비되면 각질형성세포는 상처부위로 이주(migration)하여 재생피화(re-epithelialization) 과정을 거쳐 피부 재생을 재생하게 된다. 이러한 재생피화과정은 표피를 포함한 피부 손상부위의 collagen 및 fibronectin 등 피부 구성 단백질의 합성을 촉진하여 피부 재생을 도울 뿐만 아니라 피부 주름 및 탄력 개선 장벽 강화 등을 유도하여 피부 항노화에도 영향을 미친다[24-27].

본 연구에서는 핑크 알로에 처리에 따른 상처를 유도한 HaCaT cell의 세포 이동 촉진 효과에 미치는 영향을 알아

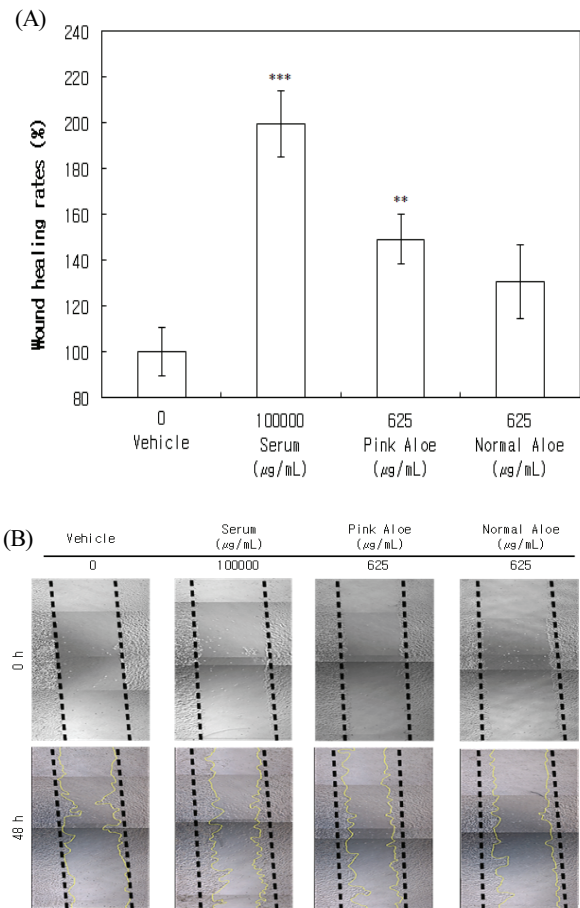


Figure 8. Wound healing effect of Pink Aloe on scratched HaCaT cell monolayers. (A) Micrographs of scratched HaCaT monolayers (B) The wound healing rate according to the ratio of the recovered wound area to the initial wound area was calculated and shown. Positive control used complete media (contained with 10% of serum). Data are means \pm SD, * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 compared with the vehicle group.

보기 위해 wound healing assay를 시행하였다. Figure 8과 같이 vehicle을 처리한 군은 초기 상처 면적 대비 회복된 비율인 wound healing rate가 21.2%인 반면 핑크 알로에 625 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리한 군의 wound healing rate는 31.6%로 대조군 대비 149%의 세포 이동 촉진 및 재생 효과가 관찰되었으며, 일반 알로에는 625 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 wound healing rate가 27.7%로 대조군 대비 30.6% 개선 효과가 관찰되었다. 따라서 본 실험을 통하여 알로에 처리에 따른 상처를 유도한 HaCaT cell의 세포 이동 촉진 및 재생 효과가 있다는 것을 확인하였으며, 특히 핑크 알로에가 일반 알로에

보다 우수한 재생효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 예로부터 식품, 의약품 및 화장품 소재로 이용된 알로에의 부가가치를 향상시키는 최적 조건을 확립하고 이의 항산화 및 항염 그리고 피부 재생 촉진 효과를 확인하였다. 알로에 겔을 적정 조건에서 가온하여 활성 성분인 Aloe-emodin 함량을 증가시켰으며, 핑크색을 나타내며 변색되지 않는 안정한 알로에 파우더를 획득할 수 있었다.

핑크 알로에는 일반 알로에보다 우수한 항산화 활성이 있음을 DPPH radical scavenging assay를 통하여 확인할 수 있었으며, 인체피부각질세포주인 HaCaT 세포에서 손상 부위를 일반 알로에보다 빨리 회복시키는 것을 통하여 핑크 알로에는 일반 알로에 대비 피부 세포의 재생 효과가 개선됨을 확인할 수 있었다. 하지만 대식세포주인 Raw264.7 세포에서 확인한 바와 같이 LPS로 유도한 NO 생성에 대한 억제 효과는 일반 알로에와 핑크 알로에 간의 유의적인 차이를 나타내지는 않았지만, 일반 알로에와 동등한 항염 효과가 유지됨을 확인하였다.

본 연구를 통해서 심미적 가치가 향상된 핑크 알로에의 가공조건을 확립할 수 있었으며, 항산화 및 항염 그리고 피부 재생 효과를 기대할 수 있어 화장품 산업에서 핑크 알로에가 천연물 기능성 신소재로써 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Reference

1. A. Viljoen, Ph. D. Dissertation, Randse Afrikaanse Univ. Johannesburg, Republic of South Africa (1999).
2. O. M. Grace, M. S. J. Simmonds, S. G. F. Mith, and A. E. Van Wyk, Therapeutic uses of *Aloe L.* (Asphodelaceae) in southern Africa, *J. Ethnopharmacol.*, **119**(3), 604 (2008).
3. B. H. Daru, J. C. Manning, J. S. Boatwright, O. Maurin, N. Maclean, H. Schaefer, and M. van der Bank, Molecular and morphological analysis of subfamily Alooideae (Asphodelaceae) and the inclusion of *Chortolirion* in *Aloe*, *Taxon*, **62**(1), 62 (2013).
4. T. Reynolds, The compounds in *Aloe* leaf exudates: a review, *Bot. J. Linn. Soc.*, **90**(3), 157 (1985).
5. N. Okamura, N. Hine, Y. Tateyama, M. Nakazawa, T. Fujioka, K. Mihashi, and A. Yagi, Iridoid chromones from *Aloe vera* leaves, *Phytochemistry*, **49**(1), 219 (1998).
6. J. H. Hamman, Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel, *Molecules*, **13**(8), 1599 (2008).
7. W. Rebecca, O. Kayser, H. Hagels, K. H. Zessin, M. Madundo, and N. Gamba, The phytochemical profile and identification of main phenolic compounds from the leaf exudate of *Aloe secundiflora* by high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy, *Phytochem. Anal.*, **14**(2), 83 (2003).
8. T. Reynolds and A. C. Dweck, *Aloe vera* leaf gel: a review update, *J. Ethnopharmacol.*, **68**(1-3), 3 (1999).
9. T. Norikura, D. O. Kennedy, A. K. Nyarko, A. Kojima, and I. Matsui-Yuasa, Protective effect of *Aloe* extract against the cytotoxicity of 1, 4-naphthoquinone in isolated rat hepatocytes involves modulations in cellular thiol levels, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **90**(5), 278 (2002).
10. S. Subramanian, D. S. Kumar, and P. Arulselvan, Wound healing potential of *Aloe vera* leaf gel studied in experimental rabbits, *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, **1**(2), 178 (2006).
11. S. Kametani, A. Kojima-Yuasa, H. Kikuzaki, D. O. Kennedy, M. Honzawa, and I. Matsui-Yuasa, Chemical constituents of cape aloe and their synergistic growth-inhibiting effect on ehrlich ascites tumor cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**(5), 1220 (2007).
12. A. Femenia, P. García-Pascual, S. Simal, and C. Rossello, Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller, *Carbohydr. Polym.*, **51**(4), 397 (2003).
13. M. Miranda, H. Maureira, K. Rodriguez, and A. Vega-Galvez, Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of *Aloe Vera (Aloe Barbadensis)* Miller gel, *J. Food Eng.*, **91**(2), 297 (2009).
14. X. L. Chang, C. Wang, Y. Feng, and Z. Liu, Effects

- of heat treatments on the stabilities of polysaccharides substances and barbaloin in gel juice from *Aloe vera* Miller, *J. Food Eng.*, **75**(2), 245 (2006).
15. T. Pecere, M. V. Gazzola, C. Mucignat, C. Parolin, F. Dalla Vecchia, A. Cavaggioni, and G. Palu, Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors, *Cancer Res.*, **60**(11), 2800 (2000).
 16. B. A. Jurkiewicz and G. R. Buettner, Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study, *Photochem. Photobiol.*, **59**(1), 1 (1994).
 17. F. Vargas, G. Fraile, M. Velasquez, H. Correia, G. Fonseca, M. Marin, and Y. Sanchez, Studies on the photostability and phototoxicity of aloe-emodin, emodin and rhein, *Die Pharmazie*, **57**(6), 399 (2002).
 18. F. Vargas, Y. Diaz, and K. Carbonell, Antioxidant and scavenging activity of emodin, aloe-emodin, and rhein on free-radical and reactive oxygen species, *Pharm. Biol.*, **42**(4-5), 342 (2004).
 19. M. Y. Park, H. J. Kwon, and Sung, M. K. Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**(4), 828 (2009).
 20. C. Lopez-Otin, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer, The hallmarks of aging, *Cell*, **153**(6), 1194 (2013).
 21. K. H. Wagner, D. Cameron-Smith, B. Wessner, and B. Franzke, Biomarkers of aging: from function to molecular biology, *Nutrients*, **8**(6), 338 (2016).
 22. I. Iontcheva, S. Amar, K. H. Zawawi, A. Kantarci, and T. E. Van Dyke, Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction, *Infect. Immun.*, **72**(4), 2312 (2004).
 23. G. L. Su, Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **283**(2), G256 (2002).
 24. H. H. Jang, H. H. Lee, and S. N. Lee, Epidermal skin barrier, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **14**(3), 339 (2016).
 25. M. M. Santoro and G. Gaudino, Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing, *Exp. Cell. Res.*, **304**(1), 274 (2005).
 26. E. A. O'toole, Extracellular matrix and keratinocyte migration, *Clin. Exp. Dermatol.*, **26**(6), 525 (2001).
 27. T. L. Tuan, L. C. Keller, D. Sun, M. E. Nimni, and D. Cheung, Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels, *J. Cell. Sci.*, **107**(8), 2285 (1994).