

Various Physiological and Anti-inflammatory Effects of *Sanguisorba officinalis* L. Roots as a Functional Cosmetic Material

Seung-Mi Park¹, Min-Jeong Oh², Hyeon-Ji Yeom², Mi-Ock Shim¹ and Jin-Young Lee^{2*}

¹Department of Nursing Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

²Division of Cosmetics and Biotechnology, Hoseo University, Asan 31499, Korea

Received February 28, 2023 / Revised May 3, 2023 / Accepted May 4, 2023

In this study, the various physiological and anti-inflammatory activities of *Sanguisorba officinalis* L. roots (SR) were assessed for potential use as functional cosmetic materials. As a result of measuring electron-donating abilities to determine the antioxidant ability of SR extract, activity increased as the concentration increased, showing an excellent antioxidant capacity of 93.8% at a 1,000 µg/ml concentration. Further, the antioxidant power of SR extract, which was determined using an ABTS⁺ assay measurement, was more than 99% at concentrations of 50 µg/ml or more, while the tyrosinase inhibition rate was 37.7% at the highest concentration of 1,000 µg/ml. Consequently, the elastase and collagenase inhibition of SR extract measured 84.9% and 90.3%, respectively, at a 1,000-µg/ml concentration. As a result of confirming the survival rate of Raw 264.7 cells, the cell survival rate was determined to be 80% or more below a 100 µg/ml concentration, and subsequent cell-related experiments were conducted at concentrations below 100 µg/ml. Furthermore, after applying a NO assay to identify anti-inflammatory activity, it was confirmed that SR extract had an inhibitory rate of 50.8% at a concentration of 500 µg/ml, and it was excellent at suppressing the inflammatory expression. As a result of verifying protein expression by treating SR extract in Raw 264.7 cells, it was confirmed that expression was inhibited concentrated in all factors. Therefore, it is judged that SR can be used as a functional cosmetic material with antioxidant, whitening, and wrinkle-improving physiological effects and anti-inflammatory activities.

Key words : Anti-inflammatory, COX-2, Cytokine, iNOS, *Sanguisorba officinalis* L. roots

서 론

염증(inflammation)이란, 미생물 및 화합물 등의 어떠한 자극에 의한 생체조직 방어반응의 하나로 조직의 변질, 손상과 세균으로부터의 감염에 대한 면역방어기전의 일종이다[21, 29, 33]. 활성산소가 증가하여 체내 항산화력이 저하되면서 발생하는 산화적 스트레스에 의해 촉진되며, 순환기 장애 및 아토피 등을 일으키는 특정한 세포의 유전자 발현을 증적하여 염증 반응을 일으킨다[1, 12, 33]. 이러한 염증과 관련된 인체의 면역세포 중 하나인 대식세포(macrophage)는 체내의 면역 체계에서 염증 반응에 대한 면역력 향상을 위한 기능을 조정하며, 인체 내의 항상성 유지, 생체의 환경 변화에 대한 대응, 생명 현상의 일정

한 상태 유지에 있어 영향력이 큰 역할을 한다[6, 7, 13, 17]. Lipopolysaccharide (LPS)란 지질 다당류로써 그람 음성세균의 외막을 이루는 주요 인자로 외부에서 독성 물질이 내부로 침입하는 것을 봉쇄하고 세포막 구조를 유지하는 역할을 하는데 대식세포는 이 LPS에 의해 자극을 받게 되면 산화질소를 생성하게 된다[11, 27, 28]. 산화질소(nitric oxide, NO)는 세포 내에서 arginine으로부터 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 형성될 수 있으며, 염증 매개에 중요한 역할을 하는데[20, 30, 31], 자극에 의해 염증 반응이 유발될 때 형성되는 염증 매개체인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) 및 interferon- α (INF- α) 등의 pro-inflammatory cytokines을 과발현이 되도록 유도하고[14, 35, 39] inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)로 알려진 prostaglandin-endoperoxide synthase-2의 유전자 발현을 일으켜 NO를 생성한다[34]. 염증인자인 COX는 cyclooxygenase-1 (COX-1)과 cyclooxygenase-2 (COX-2)로 나뉘는데 여러 환경에서도 발현되는 COX-1과 달리 염증 세포에서부터 유도되는 COX-2는 빠른 시간 내에 염증 증성 자극에 발현 현상이 나타나 COX-1과는 다른 인자로

*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9552, Fax : +82-41-540-9538

E-mail : jylee@hoseo.edu

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.

알려진 바 있으며 발열 및 압 등 염증 반응에 많은 개입이 되어 있는 것으로 알려져 있다[5, 38, 41].

우리나라 산지에서 자라는 다년생 초본 식물인 오이풀 (*Sanguisorba officinalis* L.)은 장미과에 속하는 여러해살이 풀이다. 줄기는 30~150 cm까지 곧게 자라 이르며 잎은 타원형으로 자라고 꽃은 짙은 붉은색으로 개화한다[15, 26]. 지유(地榆)란 오이풀 뿌리(*Sanguisorba officinalis* L. roots)를 말린 것으로 동의보감에 독이 없고 혈리(血痢)를 멈추게 하며 또한, 고름을 빨아내 다친 것은 낫게 한다고 나와 있다. 오이풀 뿌리에는 약리성분으로써 타닌산, 사포닌이 함유되어 있으며[19] 항응고작용, 지혈작용 등에 효능이 있다고 연구되어진 바 있다[8, 22]. 그러나 오이풀 뿌리에 관련하여 화장품 소재로서의 연구는 아직까지 미비한 실정이다.

본 연구에서는 오이풀 뿌리의 효소차원에서의 항산화, 미백, 주름개선 활성 및 세포차원에서의 항염증 활성을 검증하여 화장품 소재로서의 이용가치를 확인하여 기능성 화장품 천연 소재로서의 활용하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험의 소재인 오이풀 뿌리는 자연천사에서 구매하여 이하의 공정에 의해 추출하였다. 건조된 오이풀 뿌리를 파쇄하여 70% ethanol 10배의 양을 가한 후 상온에서 24시간 침지시켰다. 침지된 침전물과 상등액은 분리하여 추출 후 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과를 진행하였다. 감압 농축은 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)를 이용해 추출 용매인 70% ethanol을 제거하였으며 freeze drier (IlShinBioBase Co., Ltd., Korea)를 사용해 -80 °C에서 수분을 제거, 파우더 상태로 -20°C에 보관하며 실험의 소재로 사용하였다.

전자공여능 측정

항산화 측정을 위해 Blois의 방법[2]을 이용하여 전자공여능(EDA: electron donating abilities) 측정을 진행하였다. 60 µl의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약과 120 µl의 농도별 추출물을 가하여 15분간 암실 조건에서 반응 후 microplate reader (TECAN, Austria)를 이용하여 흡광도 517 nm에서 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

전자공여능(%) = $(1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$

ABTS⁺ radical scavenging activity 측정

ABTS⁺ decolorization assay 방법[32]에 의거하여 항산화

능 측정을 진행하였다. ABTS⁺ 형성을 위해 7 mM 2,2-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma-Aldrich Co., USA)와 2.45 mM potassium persulfate를 합하여 상온에서 24시간 반응을 진행해 라디칼 생성을 유도하였다. 이후 99.9% 에탄올에 희석된 ABTS⁺ 100 µl에 농도별 추출물 100 µl를 가하여 흡광도 700 nm에서 측정하였다.

ABTS⁺ radical 소거능(%) = $(1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$

Tyrosinase 저해활성 측정

미백 활성 측정을 위한 tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등[37]의 방법에 의거하여 진행되었다. pH 6.8의 67 mM sodium phosphate buffer 80 µl와 10 mM 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, Sigma-Aldrich Co., USA)을 용해한 40 µl 기질 액을 농도별 추출물 40 µl씩 가하여 혼합하였다. 이후 200 U/ml tyrosinase from mushroom (Sigma-Aldrich Co., USA) 40 µl를 첨가, 37°C에서 10분간 반응을 진행하였다. 반응 후 생성된 DOPA chrome을 흡광도 492 nm에서 측정을 진행하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

저해율(%) = $(1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$

Elastase 저해활성 측정

Cannell 등[3]의 방법에 의해 주름개선 측정을 위한 elastase 저해활성을 측정하였다. pH 8.6인 50 mM tris-HCl buffer에 2.5 U/ml elastase from porcine pancreas (Sigma-Aldrich Co., USA)를 녹인 용액 40 µl와 농도별로 추출물의 희석을 진행한 40 µl를 가한 뒤 37°C의 조건에서 2분간 반응시켰다. 그 후 pH 8.6인 50 mM tris-HCl buffer에 용해한 N-succinyl-L-ala-ala-ala-p-nitroanilide (Sigma-Aldrich Co., USA) (0.5 mg/ml) 기질 80 µl를 혼합 후 동일한 온도조건에서 30분 반응하여 흡광도 445 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

저해율(%) = $(1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$

Collagenase 저해활성 측정

Wünsch E와 Heindrich HG의 방법[36]에 의해 collagenase 저해활성을 측정하였으며 50 µl의 농도별 추출물과 pH 7.5인 0.1 M tris-HCl buffer에 4 mM calcium chloride (CaCl₂)를 가하여 Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH trifluoroacetate salt (0.3 mg/ml, Bachem Holding AG, Switzerland)를 용해한 기질 125 µl, collagenase, from *Clostridium histo-*

lyticum (Sigma-Aldrich Co., USA)를 합한 후 상온에서 20 분 반응하였다. 6% citric acid 250 μ l를 반응 정지 시약으로써 사용하고 ethyl acetate를 1,500 μ l 가하여 UV/VIS spectrophotometer (Hitachi, Japan)를 사용하여 흡광도 320 nm에서 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

세포주 및 세포 배양

본 연구에서 세포 배양 및 세포 관련 측정 등에 사용된 대식세포인 Raw 264.7 cell은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하였으며, 세포 계대에 필요한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS) 및 phosphate buffered saline (PBS)는 Thermo Fisher Scientific (HyClone™, Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Raw 264.7 cell은 DMEM에 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)를 추가한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea)의 조건에서 계대 배양하였다.

MTT assay

Carmichael의 방법[4]에 의해 농도별 추출물에 따른 세포 생존율 측정을 실시하였다. 96-well plate에 Raw 264.7 cell을 200 μ l씩 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하였고 37°C, 5% 조건의 CO₂ incubator에서 20~24시간 배양하였다. 배양된 96-well plate에 농도별로 희석된 추출물을 20 μ l씩 넣어 동일 조건(37°C, 5% CO₂ incubator)에서 20~24시간 배양하였다. 이 후 2.5 mg/ml의 농도가 되도록 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co., USA) 시약을 조제하여 40 μ l씩 첨가, 3시간 반응시켰다. 이 후 배양액을 suction하고 형성된 formazan에 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., USA)를 100 μ l씩 분주하여 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포 생존율은 농도별 추출물을 처리하지 않은 구의 흡광도를 100%로 하여 시료첨가구의 상대적인 생존율을 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = (\text{시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

NO assay

Green 등의 방법[9]에 의해 대식세포인 Raw 264.7 cell에서 발현된 NO의 양을 통해 항염증 활성을 측정하였다. 96-well plate에 Raw 264.7 cell을 1×10^5 cells/well로 200 μ l씩 분주하고 37°C의 5% CO₂ incubator에서 20~24시간 배양하였다. 이 후 1X PBS로 2회 세척한 다음 normal 구간을

제외한 농도별 구간에 lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serotype abortus equi (LPS, Sigma-Aldrich Co., USA)를 1 μ g/ml 처리하여 반응시켰다. 3시간 후 농도별로 희석된 추출물을 처리하고 24시간 배양한 뒤 상등액을 얻었다. 96-well plate에 상등액과 griess reagent (modified, Sigma-Aldrich Co., USA) 시약을 1:1 비율로 가하여 10분간 반응 후 흡광도 540 nm에서 측정하였다.

$$\text{NO 억제능(\%)} = (\text{시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

Western blot

염증관련 매개인자인 iNOS, COX-2와 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였으며 이에 대한 항염 활성 측정을 위해 Western blot을 통한 단백질 발현 저해 정도를 확인하였다.

대식세포인 Raw 264.7 cell을 1×10^6 cells/dish의 갯수로 100 mm tissue culture dish에 seeding하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20~24시간 배양하였다. 이 후 배지를 제거한 뒤 농도별 추출물을 가한 배지로 24시간 추가 배양하였다. 배양한 뒤 배지를 suction하고 1X PBS로 2회 세척하였다. 100 μ l의 M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent 용액을 각 dish에 첨가하여 cell을 lysis한 후 4°C, 13,200 rpm 조건에서 centrifuge (Hanil Science Inc., Korea)를 이용하여 20분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 BCA protein assay kit로 정량하여 각 농도별로 20 μ l씩 10% SDS-PAGE 상에서 전기영동하여 분리를 진행하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer하고 5% skim milk가 첨가된 blocking buffer에 60분간 blocking을 실시하였다. 3% skim milk in TBST (tris-buffered saline and tween 20)에 녹여 1:200 비율의 primary antibody를 제조한 후 4°C에서 overnight하였다. 이후 10분씩 3회 TBST로 3회 세척한 뒤 1:1,000 비율의 secondary antibody를 제조하여 1시간 30분간 반응시켰다. 반응 후 TBST로 10분씩 3회 세척한 뒤 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co., Korea) 기기를 사용하여 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

오이풀 뿌리 추출물의 우수한 항산화능

오이풀 뿌리 추출물의 항산화능을 알아보기 위해 전자공여능 측정을 실시하였으며 Fig. 1A와 같이 확인되었다. 농도가 증가함에 따라 항산화능 또한 증가하였으며 50 μ g/ml의 농도에서 88.9%의 효과를 나타내었고 최고 농도인 1,000 μ g/ml에서는 93.8%의 매우 높은 항산화능을 확인할 수 있었으며, 대조군으로 사용된 ascorbic acid와 비

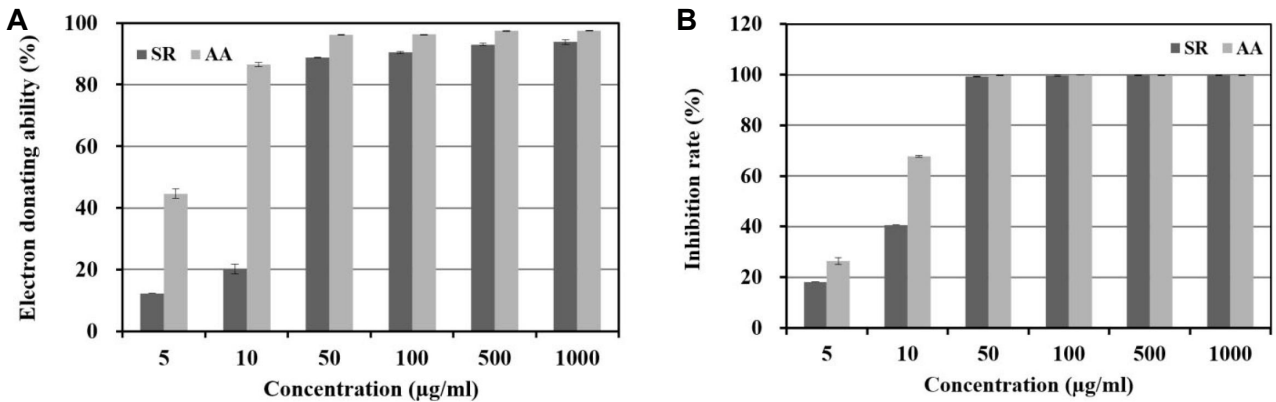


Fig. 1. Anti-oxidant activity of SR. (A) Electron donating ability of SR extract. Electron donating ability for SR extract from various concentration was determined with 0.2 mM DPPH ethanolic solution. (B) ABTS⁺ radical scavenging ability of SR extract. ABTS⁺ radical scavenging activity for SR extract from various concentration was determined with ABTS⁺ radical solution. Result are means ± SD of triplicate data. ■ SR: *Sanguisorba officinalis* L. roots, □ AA: Ascorbic acid.

교하였을 때 50 µg/ml의 농도부터 유의한 활성을 나타냄을 확인하였다. Kang 등의 연구[18]에 따르면 님과 컴프리 추출물은 62.5 µg/ml 농도에서 각각 43.36%, 45.45%의 효과가 보고됨에 따라 오이풀 뿌리 추출물이 낮은 농도에서도 우수한 항산화 활성을 나타내었다.

ABTS⁺ radical scavenging activity 측정을 통해 오이풀 뿌리 추출물의 항산화력을 확인한 결과 Fig. 1B와 같이 나타내었다. 농도 의존적으로 오이풀 뿌리 추출물의 항산화력이 증진하였으며 50 µg/ml 이상의 농도에서부터 대조군인 ascorbic acid와 근사하게 100%에 가까운 우수한 활성을 나타내었다. 이는 Yun 등[40]의 80% 에탄올 강황 추출물이 1,000 µg/ml 농도에서 55.04%의 활성을 나타낸 것에 비해 오이풀 뿌리의 항산화 활성이 높으므로 항산화 소재로서의 이용가치가 높다고 판단된다.

오이풀 뿌리 추출물의 미백활성

오이풀 뿌리 추출물의 미백활성 검증을 위해 tyrosinase 저해활성 측정을 시행하였으며 그 결과 Fig. 2와 같이 확인할 수 있었다. 오이풀 뿌리를 농도별로 처리함에 따라 tyrosinase 저해율이 증가하였으며 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 37.7%의 저해율이 나타났음을 확인할 수 있었다. Ko 등의 연구[23]에 따르면 비타민 나무 열매 추출물은 100 µg/ml에서 52.1%를 나타내었으며 동일 농도에서 약 78%를 나타낸 용담화 열수 추출물에 대한 연구[25]와 비교하였을 때 낮은 농도에서 유의하거나 높은 tyrosinase 저해활성을 확인할 수 있었다.

오이풀 뿌리 추출물의 주름개선 활성

오이풀 뿌리 추출물의 주름개선 활성을 알아보기 위해 elastase 저해활성 측정을 실시한 결과 Fig. 3A와 같이 확인되었다. 오이풀 뿌리 추출물을 농도별로 처리함에 따라

elastase의 저해율이 증가하였으며 모든 농도구간에서 대조군인 ursolic acid에 비해 높은 저해활성을 보였고, 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 84.9%의 매우 우수한 저해율을 확인할 수 있었다. Jeong 등[16]은 국내산 사과 과피 EtOAc 분획물의 elastase 저해활성을 측정된 결과 500 µg/ml에서 46.4%의 효과가 보고됨에 따라 동일 농도에서 78.9%의 저해능을 나타낸 오이풀 뿌리 추출물의 주름개선 관련 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

Collagenase 저해활성이 오이풀 뿌리 추출물에 미치는 영향을 알아보기 위해 collagenase 저해활성을 측정된 결과 Fig. 3B와 같이 나타내었다. 농도가 증가함에 따라 collagenase 저해율 또한 증가하였으며 10 µg/ml 농도부터 대조군인 epigallocatechin gallate (EGCG)에 비해 높은 저해활성을 나타내었고 1,000 µg/ml에서 90.3%의 우수한 저해

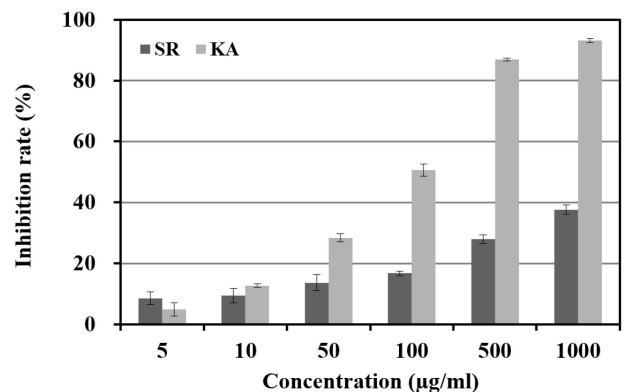


Fig. 2. Inhibition rate of extract from SR on tyrosinase. Inhibition rate of tyrosinase for SR extract from various concentration was determined with 200 U/ml mushroom tyrosinase solution. Result are means ± SD of triplicate data. ■ SR: *Sanguisorba officinalis* L. roots, □ KA: Kojic acid.

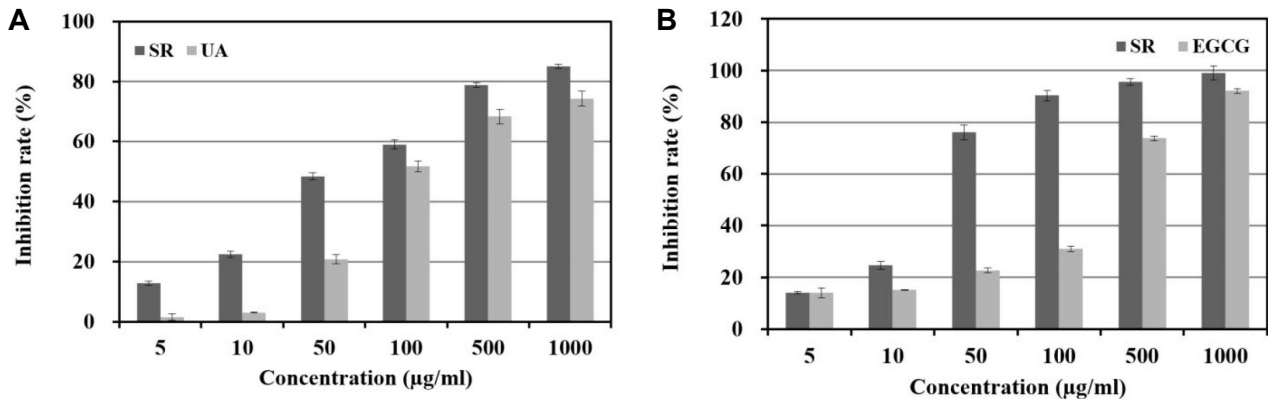


Fig. 3. Anti-wrinkle activity of SR. (A) Inhibition rate of extract from SR on elastase. Inhibition rate of elastase for SR extract from various concentration was determined with 2.5 U/ml elastase solution. (B) Inhibition rate of extract from SR on collagenase. Inhibition rate of collagenase for SR extract from various concentration was determined with 0.2 mg/ml collagenase solution. Result are means \pm SD of triplicate data. ■ SR: *Sanguisorba officinalis* L. roots, □ UA: Ursolic acid, □ EGCG: Epigallocatechin gallate.

율이 나타났음을 확인할 수 있었다. Gu 등의 연구[10]에 따르면 해방풍 잎 70% 에탄올 추출물은 동일한 농도에서 52.52%, 배롱나무 가지 추출물은 50 µg/ml에서 85% 이상의 저해활성을 나타낸 Lee 등의 연구[24] 결과와 비교하였을 때 유의하거나 높은 오이풀 뿌리 추출물의 collagenase 저해활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

대식세포에 대한 오이풀 뿌리 추출물의 세포 생존율

오이풀 뿌리 추출물 처리에 대한 대식세포인 Raw 264.7 cell의 생존율을 알아보기 위해 MTT assay에 따른 측정 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. 오이풀 뿌리 추출물은 100 µg/ml에서 80%에 가까운 세포 생존율을 보여 독성이 미미

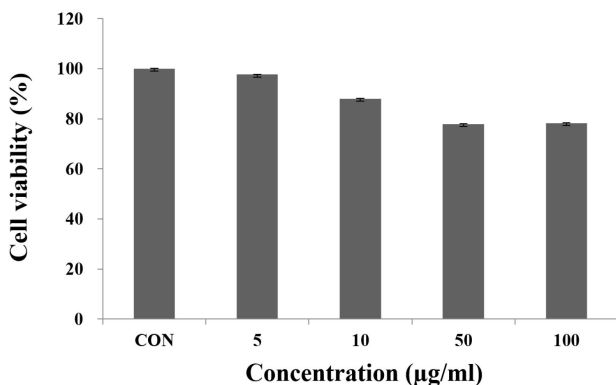


Fig. 4. Cell viability of extract from *Sanguisorba officinalis* L. roots on macrophage cell (Raw 264.7). After Raw 264.7 cells were incubated for 24 hr in DMEM, the cells were treated with 5, 10, 50, and 100 µg/ml concentrations of extract for 24 hr. CON: control, not treated with extract. Data are represented as means \pm SD of three individual experiments.

한 것으로 판명되었다. 따라서 이하의 세포 관련 실험에서는 100 µg/ml 이하 농도에서 오이풀 뿌리 추출물을 이용하여 실험을 시행하였다.

NO assay에 의한 오이풀 뿌리 추출물의 항염증 활성

오이풀 뿌리 추출물의 항염증 활성을 알아보기 위해 NO assay에 따른 NO 저해율을 측정한 결과 Fig. 5와 같이 나타내었다. LPS를 처리한 구간은 LPS를 처리하지 않은 구간에 비해 NO의 발현량이 높음을 확인할 수 있었고 오이풀 뿌리 추출물의 농도가 증가함에 따라 NO의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 오이풀 뿌리 추출물의 경우 500 µg/ml의 농도에서 50.8%의 저해율을 나타내었으며 오이풀 뿌리 추출물이 염증발현 억제에 뛰어난 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

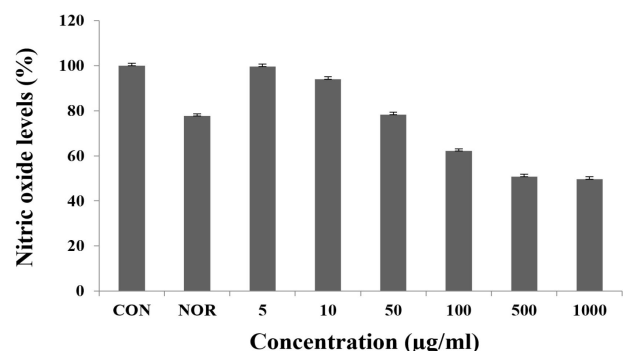


Fig. 5. Effect of *Sanguisorba officinalis* L. roots extract on production of nitric oxide in macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated with 1 µg/ml of LPS for 24 hr and then treated with six concentrations of extract for 24 hr. CON: control, treated with LPS, NOR: normal, not treated with LPS. Data are represented as means \pm SD of three individual experiments.

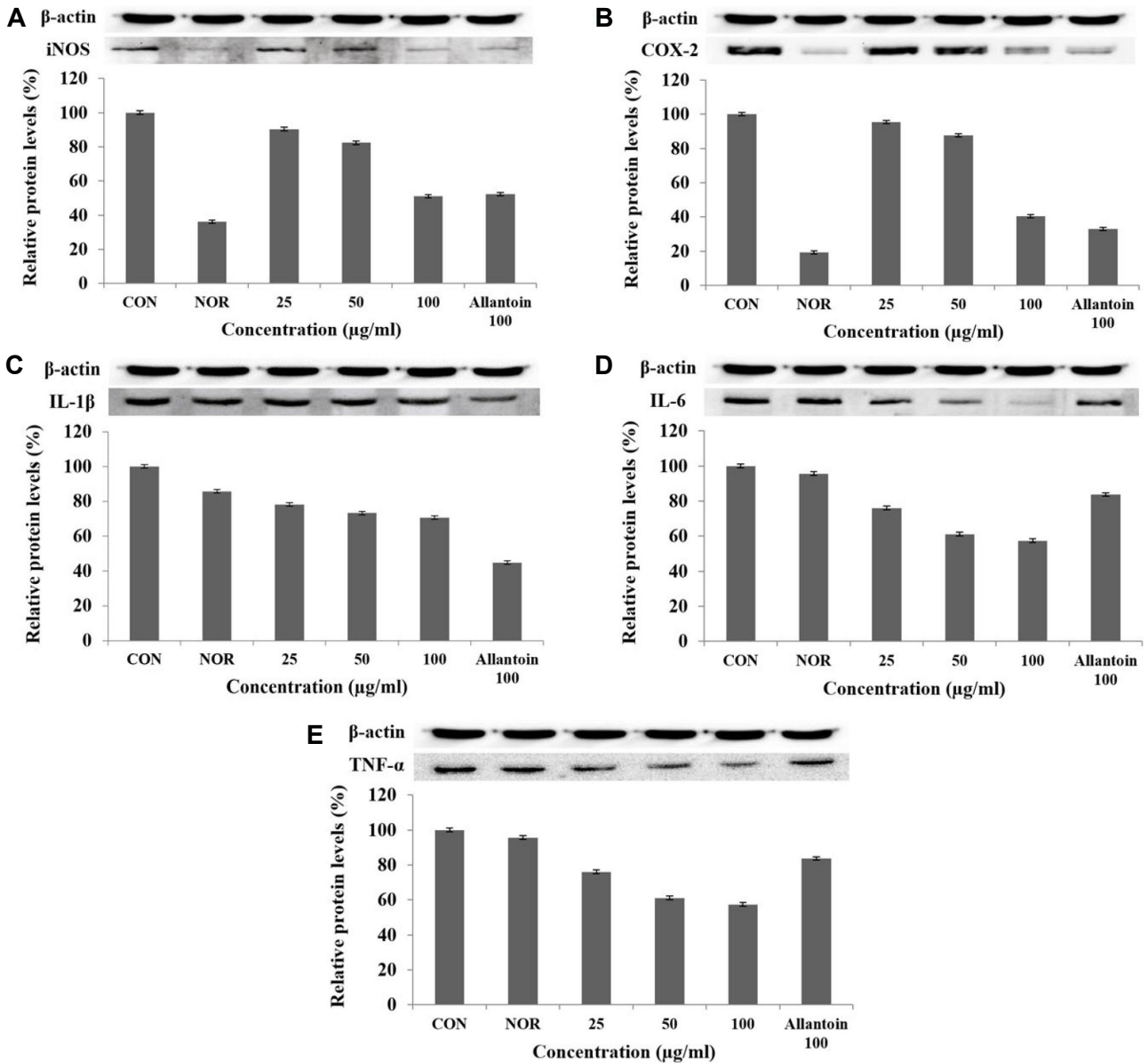


Fig. 6. iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6 and TNF- α protein expression rate of extract from *Sanguisorba officinalis* L. roots on macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated with 1 μ g/ml of LPS for 24 hr and then treated with three concentrations of extract for 24 hr. CON: control, treated with LPS, NOR: normal, not treated with LPS. Data are represented as means \pm SD of three individual experiments.

Western blot을 통한 단백질 발현에 미치는 오이풀 뿌리 추출물의 효과

오이풀 뿌리 추출물의 염증관련 매개인자인 iNOS, COX-2와 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 에 대한 항염 활성 측정을 위해 Western blot을 통한 단백질 발현 저해 정도를 확인한 결과 Fig. 6과 같이 나타내었다. 세포의 여러 가지 조건에서도 발현 정도의 차이가 미미한 house keeping gene의 β -actin을 positive control로 사용하였다. 오이풀 뿌리 추출물을 25, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 처리한 결과 모든 인자에서 단백질 발현량이 감소됨을 확인할 수 있었다.

특히 대조군인 allantoin과 비교하였을 때 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 인자에서 모든 농도 구간의 저해율이 우수함을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 과제(결과물)는 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다(2023RIS-001).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Beckman, K. B. and Ames, B. N. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547-581.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1120.
- Cannell, R. J. P., Kellan, S. J., Owsianks, A. M. and Walker, J. M. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**, 10-14.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Cheon, Y. P., Mohammad, L. M., Park, C. H., Hong, J. H., Lee, G. D., Song, J. C. and Kim, K. S. 2009. *Bulnesia sarmienti* aqueous extract inhibits inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Life Sci.* **19**, 479-485.
- Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R. and Kim, Y. M. 2001. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 1075-1079.
- Förstermann, U. and Kleinert, H. 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **352**, 351-364.
- Goun, E. A., Petrichenko, V. M., Solodnikov, S. U., Suhina, T. V., Kline, M. A., Cunningham, G., Nguyen, C. and Miles, H. 2002. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *J. Ethnopharmacol.* **81**, 337-342.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-139.
- Gu, Y. R., Kim, S. W. and Hong, J. H. 2018. Whitening and anti-wrinkle effects of *Glehnia Radix* leaf extracts according to extraction solvent. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **47**, 1103-1111.
- Guzik, T. J., Korbout, R. and Adamek-Guzik, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 501-514.
- Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1425-1431.
- Hinz, B. and Brune, K. 2002. Cyclooxygenase-2 – 10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 367-375.
- Im, R. J. 1999. Flora medica Coreana, vol. 2. Hankook-munhwasa, Korea.
- Jeong, H. R., Jo, Y. N., Jeong, J. H., Jin, D. E., Song, B. G. and Heo, H. J. 2011. Whitening and anti-wrinkle effects of apple extracts. *Kor. J. Food Preserv.* **18**, 597-603.
- Jeong, J. B., Hong, S. C., Jeong, H. J. and Koo, J. S. 2012. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Kor. J. Plant Res.* **25**, 299-307.
- Kang, B. H. and Ryu, M. J. 2021. Physiological activities of the neem and the comfrey extracts as cosmetic ingredients. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **19**, 223-234.
- Kang, B. S., Ko, U. C., Kim, S. H., No, S. H., Shin, Y. B., Song, H. J., Shin, M. G., Ann, D. G., Lee, S. I., Lee, Y. J. and Lee, T. H. 1994. In collaboration with a national college of oriental medicine herbology professor association. In Herbology. Younglim Press Co., Korea.
- Kim, D. H., Park, S. J., Jung, J. Y., Kim, S. C. and Byun, S. H. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of *Hwangnyeonhaedok-tang* in LPS-activated macrophage cells. *Kor. J. Herbol.* **24**, 39-47.
- Kim, S. A. 2011. Anti-inflammatory activity of dioscoreae rhizome in macrophages by inhibition of pro-inflammatory cytokines via NF-κB signaling pathway. Master's thesis, Sahmyook University, Seoul, Korea.
- Kim, Y. S., Roh, J. E. and Ann, H. S. 1993. Compositional analysis of polysaccharide from *Sanguisorba officinalis* and its anticoagulant activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**, 124-130.
- Ko, M. S., Lee, H. J. and Kang, M. J. 2012. Antioxidant activities and whitening effects of extracts from *Hippophae rhamnoides* L. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **22**, 812-817.
- Lee, B. G., Kim, J. H., Ham, S. G. and Lee, C. E. 2014. Study on biological activities of extracts for cosmeceutical development from *Lagerstroemia indica* L. branch. *Kor. J. Plant Res.* **27**, 29-34.
- Lee, H. S., Seok, J. H., Ting, C. W. and Kim, Y. J. 2018. A study on the whitening activities of *Gentiana scabra* extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **44**, 9-14.
- Lee, J. J., Choi, H. S., Lee, J. H., Jung, C. J. and Lee, M. Y. 2005. The effects of ethylacetate fraction of *Sanguisorba officinalis* L. on experimentally-induced acute gastritis and peptic ulcers in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1545-1552.
- Lee, J. Y., Joo, D. H., Yoo, D. H. and Chae, J. W. 2017. Anti-inflammatory activities verification of *Vaccinium oldhami* fruit ethanol extracts on RAW 264.7. *J. Life Sci.* **27**, 417-422.
- Lee, S. H., Jin, K. S., Son, Y. R., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2018. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Desmodium heterocarpon* extract in RAW 264.7 cells. *J. Life Sci.* **28**, 216-222.
- MacSween, R. N. M. and Whaley, K. 1992. Muir's text-

- book of pathology, 13th ed., London: Edward Arnold, UK.
30. McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A. and Corbett, J. A. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**, 24-32.
 31. Ohshima, H. and Bartsch, H. 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* **305**, 253-264.
 32. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
 33. Rocca, B. and FitzGerald, G. A. 2002. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 603-630.
 34. Shin, J. S., Kim, J. M. and An, W. G. 2012. Anti-inflammatory effect of red ginseng through regulation of MAPK in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7. *J. Physiol. Pathol. Kor. Med.* **26**, 293-300.
 35. Suter, M. M., Schulze, K., Bergman, W., Welle, M., Roosje, P. and Müller, E. J. 2009. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet. Dermatol.* **20**, 515-532.
 36. Wunsch, E. and Heidrich, H. C. 1963. Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* **333**, 149-151.
 37. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by Aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.
 38. Yang, E. J., Kim, M. S., Kim, S. Y. and Hyun, C. G. 2019. Anti-inflammatory activity of *Euphorbia jolkini* extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *KSBB J.* **34**, 120-125.
 39. Yi, H. S., Heo, S. K., Yun, H. J., Choi, J. W., Jung, J. H. and Park, S. D. 2008. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of draconis resina in mouse macrophage cells. *Kor. J. Herbol.* **23**, 179-192.
 40. Yun, J. J. and Park, S. K. 2022. *In vitro* antioxidant activities of *Curcuma longa* linne extracts according to extraction solvents. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **51**, 1103-1108.
 41. Yun, J. T., Song, Y. K. and Lim, H. H. 2006. Aqueous extract of *Anemarrhenae rhizoma* suppresses lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells. *J. Oriental Rehab. Med.* **16**, 49-60.

초록 : 기능성 화장품 소재로써 오이풀 뿌리(*Sanguisorba officinalis* L. roots)의 다양한 생리 활성 및 항염증 효과

박승미¹ · 오민정² · 염현지² · 심미옥¹ · 이진영^{2*}

(¹충북대학교 간호학과, ²호서대학교 화장품생명공학부)

본 연구에서는 기능성 화장품 소재로써 오이풀 뿌리 추출물의 다양한 생리활성 및 항염증 활성을 연구하였다. 오이풀 뿌리 추출물의 항산화능을 알아보기 위해 전자공여능을 측정한 결과 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며 1,000 µg/ml의 농도에서 93.8%의 우수한 항산화능을 나타내었다. 또한, ABTS⁺ radical scavenging activity 측정을 통해 알아본 오이풀 뿌리 추출물의 항산화력은 50 µg/ml 이상의 농도에서부터 99% 이상을 나타내었다. 미백활성 검증을 위해 tyrosinase 저해활성 측정을 시행하였으며 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 37.7%의 저해율을 나타내었다. 오이풀 뿌리 추출물의 주름개선 활성을 알아보기 위해 elastase 및 collagenase 저해활성을 측정한 결과 농도 의존적으로 저해율이 증가하였으며 각각 1,000 µg/ml의 농도에서 84.9%, 90.3%의 저해율을 나타내었다. MTT assay에 따른 Raw 264.7 cell의 생존율을 확인한 결과 100 µg/ml 농도 이하에서 80% 이상의 세포 생존율을 보여 이하의 세포 관련 실험에서는 100 µg/ml 이하의 농도에서 세포 실험을 시행하였다. 오이풀 뿌리 추출물의 항염증 활성을 알아보기 위해 NO assay를 측정한 결과 500 µg/ml의 농도에서 50.8%의 저해율을 나타내었으며 오이풀 뿌리 추출물이 염증발현 억제에 뛰어난 효능이 있음을 확인할 수 있었다. Raw 264.7 cell에 오이풀 뿌리 추출물을 처리하여 단백질 발현 저해를 확인한 결과 모든 인자에서 단백질 발현이 농도 의존적으로 저해됨을 확인할 수 있었다. 따라서 오이풀 뿌리가 항산화, 미백 및 주름개선의 생리활성과 항염 활성이 있는 기능성 화장품 소재로써 활용 가능성이 적합하다고 판단된다.