

Original Article / 원저

平肝開鬱止血湯의 항염증, 항산화 및 항노화에 미치는 영향

이경원¹ · 송영채² · 김희택³

세명대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과(¹대학원생, ²수련의, ³교수)

Effects of Pyeonggangaeduljihyeol-tang(PGJT) Extract on Anti-inflammatory, Antioxidant and Anti-aging

Kyounghwon Lee · Young Chae Song · Hee Taek Kim

Dept. Of Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology of Korean Medicine,
Semyung University College of Korean Medicine

Abstract

Objectives : The purpose of this study is to confirm the anti-inflammatory, antioxidant and anti-aging efficacy of Pyeonggangaeduljihyeol-tang(PGJT) extract.

Methods : In order to confirm the anti-inflammatory activity of PGJT extract, the inhibitory effect on NO PGE₂ production were evaluated and the expression level of iNOS, COX-2 and IL-6 mRNA were measured through qRT-PCR, Antioxidant activity was evaluated for radical scavenging activity using DPPH and ABTS, anti-aging activity was evaluated for collagenase, elastase, tyrosinase and L-DOPA oxidation inhibitory activity.

Results : PGJT extract shows anti-inflammatory effect by inhibiting the production of NO and PGE₂ by reducing the expression level of iNOS, COX-2 and IL-6 mRNA, antioxidant effect by increasing DPPH and ABTS scavenging ability in a concentration dependent manner. In addition, the anti-aging effect was confirmed by inhibiting collagenase, elastase, tyrosinase production and L-DOPA oxidation.

Conclusion : This suggests that PGJT showed an overall excellent anti-inflammatory effect and an inhibitory effect on the activity of antioxidant and anti-aging related enzymes.

Key words : Pyeonggangaeduljihyeol-tang; Anti-inflammation; Antioxidant; Anti-aging; Skin aging

I. 서 론

피부 노화는 시간의 경과와 함께 발생하는 퇴행성 변화에 따른 내인성 노화와 주로 광노화로 인해 발생하는 외인성 노화로 나눌 수 있고, 내인성 노화보다는 외인성 노화가 더 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다. 자외선은 외인성 노화의 주된 원인으로 활성산소 및 염증성 사이토카인의 발현을 증가시켜 교원질 및 탄력섬유 등 기질 단백질이 손상되어 피부 내 교원질의 양이 부족해지고 탄력섬유가 변성되어 피부 건조, 위축, 탄력 감소, 주름 등 피부노화를 일으킨다¹⁻⁴⁾. 한의학에서 피부노화는 장부의 기능, 경락, 기혈과의 관계에서 설명하고 있고, 그 원인으로 火, 熱, 痰, 瘀血 등이 중요한 역할을 하고 있다¹⁾. 최근 피부 노화와 관련하여 한방 처방이나 개별 한약재를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다⁵⁻⁸⁾.

平肝開鬱止血湯은 《傳青主男女科》에 수록된 처방으로 白芍藥, 白朮, 當歸, 牡丹皮, 生地黃, 甘草, 三七根, 荊芥穗, 柴胡로 구성되어 과도한 스트레스로 발생한 肝氣鬱結 증상과 그로 인한 血崩에 사용하는 처방이다⁹⁾. 본 저자는 肝의 정상적인 생리기능인 肝藏血, 肝主疏泄 기능의 장애로 기혈순환이 제대로 이루어지지 않아 발생한 瘀血과 火熱이 피부를 건조시키고 피부노화를 촉진시킨다고 생각하였다. 이에 본 연구에서는 補血, 涼血, 清熱의 효능이 있는 平肝開鬱止血湯이 항염증, 항산화 및 항노화 효과가 있을 것으로 판단하여 실험을 진행하였다. 平肝開鬱止血湯에 대한 최근 연구로는 간기능 장애¹⁰⁾, 간조직 손상 방지¹¹⁾, 瘀血¹²⁾ 등에 대해 보고되었으나 항염증, 항산화 및 항노화에 대한 연구는 없었다.

본 연구에서는 RAW 264.7 대식세포를 lipopolysaccharide(LPS)로 자극시킨 후 平肝開鬱止血湯 추출물의 항염증 활성과 항산화 활성 및 항노화 활성을 관찰하여

유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험방법

1. 실험 재료 및 시료 제조

1) 실험 재료

平肝開鬱止血湯에 사용되는 약재는 ㈜옵니허브(대구, Korea)에서 구매하여 사용하였으며, 구입한 약재들은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Contents of PGJT

Herbal name	Pharmacognostic Name	Weight (g)
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	37.5
白朮	<i>Atractylodis Macrocephale Rhizoma</i>	37.5
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	37.5
牡丹皮	<i>Moutan Cortex Radicis</i>	11.25
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	11.25
三七根	<i>Pseudoginseng Radix</i>	11.25
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	7.50
荊芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	7.50
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	3.75
Total		165.00

2) 시료 제조

平肝開鬱止血湯 한약재 1첩 분량을 혼합하여 3차 증류수 1,000ml와 함께 넣은 뒤 heating mantle (MS-DM 607, M-TOPS, Korea)을 이용하여 4시간 동안 가열하고 6시간 동안 냉각시켜 추출하였다. 추출물은 거르로 1차 여과한 후 여과지로 2차 여과를 하였고, 여과액을 감압농축(CH-9230 Flawil 1, BUCHI Switzerland)하여 100ml 농축액을 얻었다. 농축액은 -80℃ 냉동고(MDF-U52V, Sanyo, Japan)에 얼린 후 동결건조기(#77520-03, LABCCONCO, USA)를 이용하여 건조분말(21.5g, 회수율 13.0%)을 얻어 시료로 사용하였다.

Corresponding author : Hee Taek Kim, Dept. Of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology of Korean Medicine, Semyung University College of Korean Medicine, Jecheon, Chungbuk 27136, South Korea.

(Tel : 043-649-1817, E-mail : kht8725c@naver.com)

• Received 2024/1/5 • Revised 2024/1/25 • Accepted 2024/2/1

2. 세포 독성

1) 세포배양

본 연구에서 사용한 세포주인 RAW 264.7 macrophage cells는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용하였다. 배양시 배지는 10% fetal bovine serum(FBS; GenDEPOT, USA)과 1% penicillin/streptomycin(GenDEPOT, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM; GenDEPOT, USA)을 사용하였으며 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-17AIC, Sanyo, JAPAN)에서 배양하였다.

2) MTT assay

平肝開鬱止血湯 추출물에 의한 세포독성과 생존율을 알아보기 위하여 MTT assay를 실행하였다¹⁴⁾. 96 well plate에 1×10⁵ cells/well의 cell을 100μl씩 넣고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1×PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료를 농도별(각각 62.5, 125, 250 및 500μg/ml)로 각 well에 처리하고 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1μg/ml MTT(Sigma, USA)를 100μl씩 각 well에서 처리하여 알루미늄 호일로 차광시킨 뒤 2시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100μl 처리하고 37°C에서 2시간 방치한 다음 microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존률은 다음과 같은 공식으로 계산되었다.

$$\text{Viability(\%)} = \text{AT/AC} \times 100$$

AT: absorbance of tested extract solution
AC: absorbance of control

3. 항염증 활성

1) Nitric oxide(NO) assay

Lipopolysaccharide(LPS, Sigma, USA)로 염증이 유도된 RAW 264.7 macrophage cells를 사용하여 N

O의 생성능을 측정하였다¹⁵⁾. RAW 264.7 macrophage cells를 96 well plate에 1×10⁵ cells/well로 분주한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에 보관하여 안정화 시켰다. 상층액 제거 후 각각 62.5, 125, 250, 500 및 1,000μg/ml의 平肝開鬱止血湯과 LPS 1μg/ml를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 뒤 상층액 100μl을 다른 96 well plate에 옮겨준 뒤 Griess 시약 100μl를 혼합해 주었다. 상온에서 30min 동안 반응 후 색차계(Spectrophotometer CM-2600d, Minolta, Japan)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Prostaglandin E₂ (PGE₂) 생성능

PGE₂ assay kit(Amersham Bioscience, USA)를 이용하여 PGE₂ 함량을 측정하였다¹⁶⁾. 96 well plate에 검액과 표준액을 50μl씩 넣고 working antibody와 working conjugate를 순서대로 50μl/well로 넣은 다음 상온에서 1시간 반응시켰다. 이어서 상층액을 버리고 wash buffer로 4회 세척한 다음 TMB substrate를 150μl/well로 넣고 10분간 반응시켜 ELISA reader를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) qRT-PCR

RAW 264.7 macrophage cells에서 平肝開鬱止血湯 추출물의 iNOS, COX-2 및 IL-6의 발현억제 효과를 확인하기 위해서 qRT-PCR 분석을 진행하였다¹⁷⁾. 6 well plate에 5×10⁵ cells/well로 분주한 뒤 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 안정화시켰다. 24시간 뒤 각각 62.5, 125, 250 및 500μg/ml의 平肝開鬱止血湯과 LPS 1μg/ml를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 뒤 Trizol reagent(Ambion, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC treated-water; Sigma, USA)로 용해하여 사용하였고, total RNA를 정량 후 cDNA 합성 kit(Revetra ACE-α-; Toyobo, Japan)를 통해 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 후 tagman master mix(Thermo fisher, USA) 10μl, 멸균수 4μl, cDNA 5μl를 혼합하여

준비하였다. 실험에 사용된 primer의 sequence는 Table 2와 같다.

4. 항산화 활성

1) DPPH radical 소거 활성

2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma, USA) 용액으로 卍肝開鬱止血湯 추출물의 radical 소거 능력을 실험하였다¹⁸⁾. 각 시료 0.5ml에 100mM DPPH 3ml를 넣고 vortex한 후 15분 동안 실온의 명반응 조건에서 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = (1 - \frac{\text{반응군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}) \times 100$$

2) ABTS radical 소거 활성

ABTS radical을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 radical이 추출물 내의 항산화물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용하여 측정하였다¹⁹⁾. 7mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4mM이 되도록 용해시킨 다음 어두운 곳에서 14-16시간 동안 반응시켰다. 이를 414nm에서 흡광도가 1.5가

되도록 증류수로 조정한 후 추출물 1.0ml를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 414nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 항노화 활성

1) Collagenase 저해 활성

Collagenase 저해 효과 측정은 Wünsch와 Heidrich의 방법²⁰⁾을 이용하여 측정하였다. 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 4mM CaCl₂를 첨가형 제조한 용액과 시료 추출물 0.1ml, 4-phenylazobenzyl oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.3mg/ml) 농도의 기질용액 0.25ml를 혼합한 후 0.2mg/ml collagenase(Sigma-Aldrich Co. Louis, MO, USA) 농도의 효소 용액 0.15ml를 첨가하였다. 시약 반응은 실온에서 20분간 반응시킨 후 0.5ml의 6% citric acid 종료 시약을 넣어 반응을 정지시키고 ethyl acetate 2ml를 첨가하여 320nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2) Elastase 저해 활성

Elastase 활성은 Kranusoe 등의 방법²¹⁾을 이용하여 측정하였다. Elastase 활성 억제를 평가하기 위하여 추출물 0.1ml와 1ml의 0.2M Tris-HCl buffer(pH 8.0), 0.1ml의 0.8mM N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 기질 용액을 혼합하고, 1.0U/ml porcine pancreatic

Table 2. qRT-PCR Primer Sequences

Symbol	Gene Name	Primer Sequence (5'-3')
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: GTCTTCCTGGGCAAGCAGTA
		R: CTGGACAGAAACCCCACTTC
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	F: CGAAACGCTTCACTTCCAA
		R: TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
COX-2	Angelicae Gigantis Radix	F: AACCGCATTGCCTCTGAAT
		R: CATGTTCCAGGAGGATGGAG
IL-6	Moutan Cortex Radicus	F: ACAGCCACTCACCTCTTCAG
		R: CCAATCTTTTTCAGCCATCTTT

elastase(Sigma-Aldrich Co. Louis, MO, USA) 농도의 효소 0.1ml을 첨가하여 37°C의 water bath에서 20분간 반응을 시켜 p-nitroaniline 생성량을 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase 활성 측정은 Vanni 등의 방법²²⁾을 이용하여 측정하였다. 추출물 0.2ml와 0.1 M Sodium phosphate buffer(pH 6.8) 용액 2.3ml, 1.5mM L-tyrosine 농도의 기질 용액 0.4ml를 혼합하고, Mushroom tyrosinase(Sigma-Aldrich Co, Louis MO, USA, 250U/ml) 0.1ml를 넣고 37°C의 water bath에서 20분간 반응을 시킨 후 475nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) L-DOPA oxidation 억제 활성

L-Dopa oxidation 측정은 Joshi 등의 방법²³⁾을 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 추출물 50μl씩 넣은 후, Mushroom tyrosinase 333U/ml 30μl 넣고 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 60μl를 첨가하고 5분간 반응시킨다. 반응시킨 추출물에 12mM L-DOPA solution 100μl를 첨가 후 492nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

6. 통계 분석

실험 결과는 SPSS Window program Ver.15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였으며, 모든 측정값은 mean±SD로 나타내었고, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 Student's t-test로 분석하였으며, 유의수준 5%로 검정하였다.

III. 실험 결과

1. 세포 생존율에 미치는 영향

平肝開鬱止血湯 추출물을 안전하게 이용할 수 있는 농도 범위를 확인하기 위하여 세포독성 연구를 수행하였

다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 62.5, 125, 250, 500 및 1,000μg/ml로 처리하였을 때, 세포 생존율은 대조군에 비해서 99.39±1.70%, 97.32±2.00%, 94.07±3.06%, 89.85±2.53% 및 86.29±1.64%로 세포 생존율을 나타냈다. 이러한 결과로 平肝開鬱止血湯 추출물은 62.5, 125, 250, 500 및 1,000μg/ml 농도까지 20% 이상의 세포 생존율 감소가 없음을 확인하였다(Fig. 1).

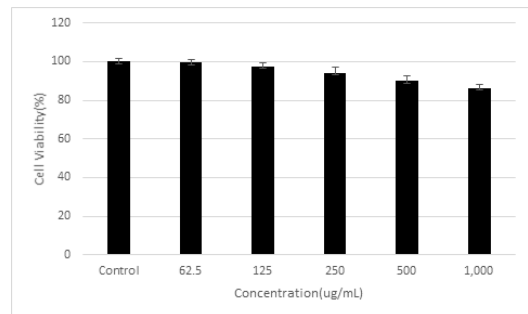


Fig. 1. Cytotoxicity of PGJT Extract on RAW 264.7 Macrophage Cells.

2. 항염증 활성

1) NO 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 macrophage cells에서의 NO 생성에 대한 平肝開鬱止血湯 추출물의 저해 효과를 측정하였다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 62.5, 125, 250, 500 및 1,000μg/ml로 처리하였을 때 NO 생성율은 49.7±1.6%, 47.1±3.0%, 43.7±1.8%, 37.3±2.9% 및 30.5±2.6%로 나타났다. 平肝開鬱止血湯 추출물 250, 500 및 1,000μg/ml 농도의 경우 통계학적으로 유의한 수준으로 NO 생성이 감소함을 확인하였다(p<0.05) (Fig. 2).

2) PGE₂ 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 macrophage cells에서의 NO 생성에 대한 平肝開鬱止血湯 추출물의 저해 효과를 측정하였다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 62.5, 125, 250, 500 및 1,000μg/ml로 처리하였을 때 PGE₂ 생성율은 99.84±

3.98%, $95.49 \pm 2.94\%$, $89.05 \pm 4.59\%$, $70.24 \pm 5.71\%$ 및 $61.88 \pm 3.90\%$ 로 나타났다. 平肝開鬱止血湯 추출물의 농도가 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 경우 통계학적으로 유의한 수준으로 PGE₂ 생성이 감소함을 확인하였다($p < 0.05$)(Fig. 3).

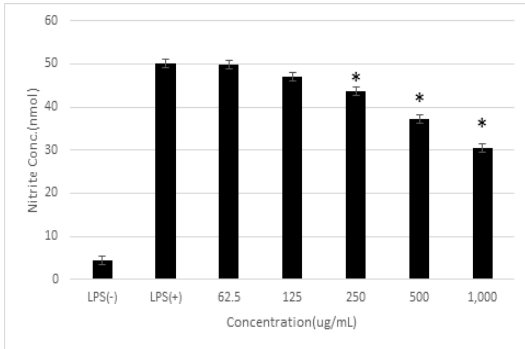


Fig. 2. Effect of PGJT Extract on NO Production in LPS-induced RAW 264.7 Macrophage Cells. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS(+).

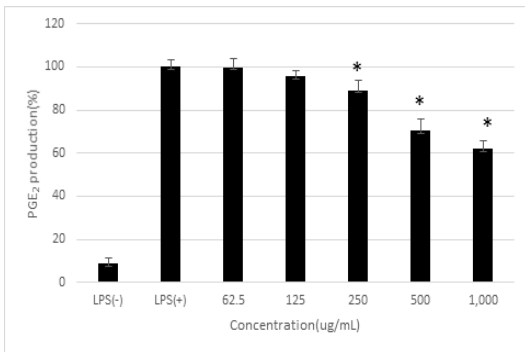


Fig. 3. Effect of PGJT Extract on PGE₂ Production in LPS-induced RAW 264.7 Macrophage Cells. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS(+).

3) iNOS, COX-2 및 IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

平肝開鬱止血湯 추출물의 항염증 효능을 연구하기 위하여, RAW 264.7 macrophage cells에 LPS를 처리하여 염증을 유발시키고 平肝開鬱止血湯 추출물을 농도별로 각각 처리한 후, 염증성 사이토카인들의 분비량을 측정하였다.

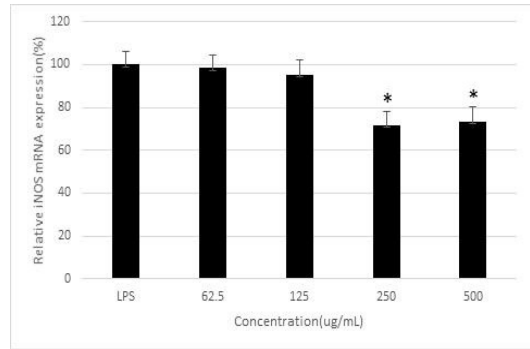


Fig. 4. Effect of PGJT Extract on iNOS mRNA Expression in LPS-induced RAW 264.7 Macrophage Cells. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS(+).

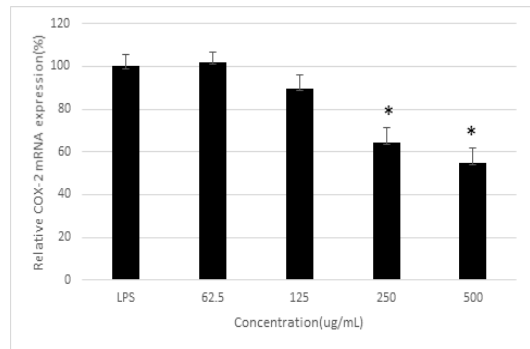


Fig. 5. Effect of PGJT Extract on COX-2 mRNA Expression in LPS-induced RAW 264.7 Macrophage Cells. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS(+).

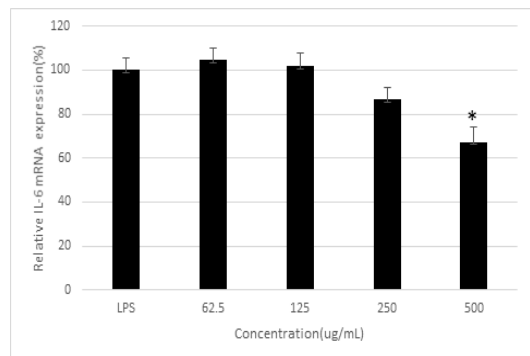


Fig. 6. Effect of PGJT extract on IL-6 mRNA Expression in LPS-induced RAW 264.7 Macrophage Cells. * $p < 0.05$ indicate a significant different from the LPS(+).

LPS로 자극하여 생성된 iNOS mRNA 발현은 平肝開鬱止血湯 추출물 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의하게 감소하였고, COX-2 mRNA의 발현은 平肝開鬱止血湯 추출물 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의하게 감소하였다. 그리고, IL-6 mRNA 발현은 平肝開鬱止血湯 추출물 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 유의하게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 4-6).

3. 항산화 활성

1) DPPH radical 소거 활성 평가

平肝開鬱止血湯 추출물의 항산화 작용을 확인하기 위해 DPPH를 사용하여 radical 소거율을 측정하였다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 농도별로 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 결과 radical 소거율이 12.56 \pm 2.47%, 23.58 \pm 3.05%, 35.39 \pm 3.98%, 57.74 \pm 3.16% 및 74.84 \pm 4.01%로 농도 의존적으로 증가함을 나타냈다(Fig. 7).

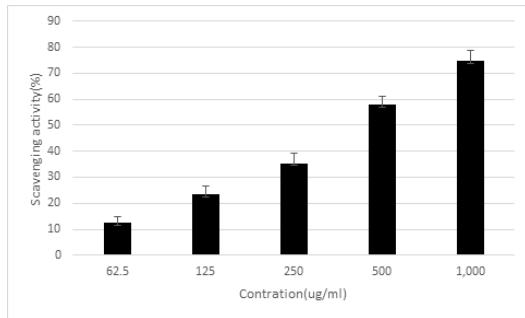


Fig. 7. Effect of PGJT Extract on DPPH Radical Scavenging Test.

2) ABTS radical 소거 활성 평가

ABTS를 사용하여 radical 소거율을 측정하였다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 농도별로 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 결과, radical 소거율이 21.28 \pm 3.54%, 29.67 \pm 4.12%, 31.28 \pm 3.88%, 48.24 \pm 5.59% 및 55.32 \pm 6.98%로 농도 의존적으로 증가함을 나타냈다(Fig. 8).

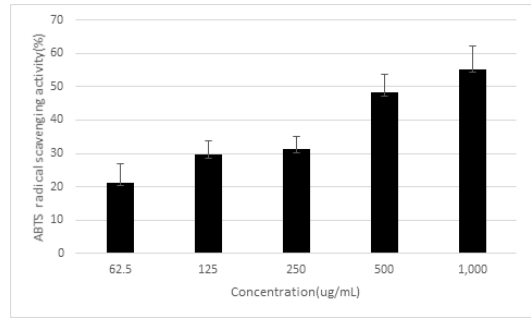


Fig. 8. Effect of PGJT Extract on ABTS Radical Scavenging Test.

4. 항노화 활성

1) Collagenase 저해 활성 평가

피부노화 억제 효과를 확인하기 위하여 collagenase 억제율을 측정하였다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 농도별로 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 결과, 억제율이 21.25 \pm 4.24%, 32.18 \pm 5.32%, 54.39 \pm 6.67%, 67.75 \pm 7.57% 및 75.44 \pm 9.92%로 농도 의존적으로 증가함을 나타냈다(Fig. 9).

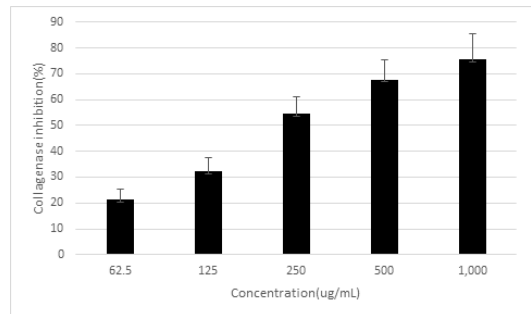


Fig. 9. Effect of PGJT Extract on Collagenase Inhibition Test.

2) Elastase 저해 활성 평가

피부노화, 특히 주름에 대한 개선 효과를 확인하기 위하여 elastase 억제율을 측정하였다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 농도별로 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 결과, 억제율이 11.18 \pm 2.64%, 11.89 \pm 2.97%, 24.48 \pm 3.85%, 35.54 \pm 4.09% 및 43.25 \pm

4.48%로 농도 의존적으로 증가함을 나타냈다(Fig. 10).

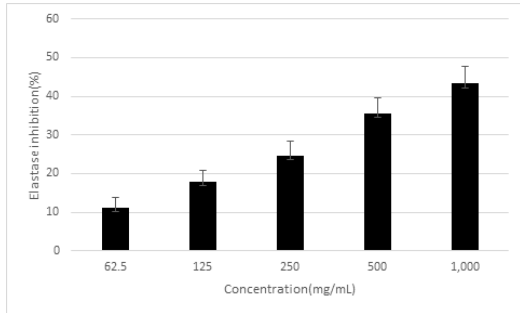


Fig. 10. Effect of PGJT Extract on Elastase Inhibition Test.

3) Tyrosinase 저해 활성 평가

피부에 대한 미백 효과를 확인하기 위하여 tyrosinase 억제율을 측정하였다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 농도별로 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL로 처리한 결과, 억제율이 10.21 ± 4.35%, 12.21 ± 7.78%, 14.57 ± 6.99%, 17.86 ± 7.52%, 20.99 ± 8.87%로 농도 의존적으로 증가함을 나타냈다(Fig. 11).

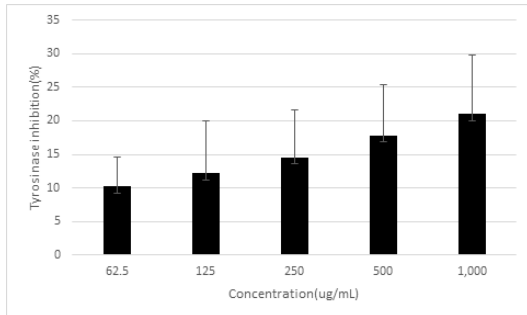


Fig. 11. Effect of PGJT Extract on Tyrosinase Inhibition Test.

4) L-DOPA oxidation 억제 활성 평가

L-DOPA oxidation 억제율을 측정하였다. 平肝開鬱止血湯 추출물을 농도별로 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 µg/mL로 처리한 결과, 억제율이 7.64 ± 2.25%, 10.98 ± 2.45%, 12.12 ± 3.01%, 25.57 ± 2.88% 및 30.36 ± 3.36%로 농도 의존적으로 증가함을 나타냈다

(Fig. 12).

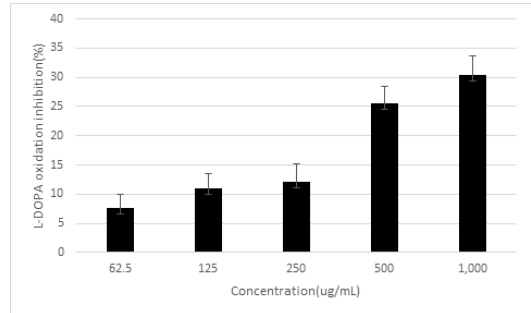


Fig. 12. Effect of PGJT Extract on L-DOPA Oxidation Inhibition Test.

IV. 고 찰

현대인들은 과학기술의 발달로 인해 사회적, 경제적으로 풍요로운 삶을 누리고 있으며, 이로 인해 건강뿐만 아니라 외적 아름다움에 대한 관심이 증가하면서 피부노화에 대한 관심이 높아지고 있다. 피부노화는 시간의 경과에 따라 체내 단백질 특성 변화 및 생합성 감소 등이 발생하는 내인성 노화와 환경적 요인, 자외선 등 인체 외부 요인으로 인한 외인성 노화로 나눌 수 있다. 자외선은 외인성 노화에서 가장 많은 비중을 차지한다. 자외선은 활성산소종과 염증성 사이토카인의 발현을 증가시켜 MMP의 생성을 증가시켜 콜라겐, 엘라스틴의 분해를 증가시킨다. 분해된 콜라겐과 엘라스틴은 분절화되고 탄력성을 잃어 피부노화 증상들이 발생하게 된다¹⁻⁴⁾.

한의학에서 피부노화는 장부의 기능, 경락, 기혈과의 관계에서 설명하고 있고, 그 원인으로 火, 熱, 痰, 瘀血 등이 중요한 역할을 하고 있다¹⁾. 활성산소종과 염증성 사이토카인은 한의학적으로 瘀血 혹은 痰飲으로 볼 수 있다. 瘀血, 痰飲은 氣, 血, 津液, 精과 같은 인체 구성 물질의 대사과정 중 발생한 노폐물로 볼 수 있는데, 이러한 노폐물이 쌓이면 염증반응을 일으키게 된다. 자외선과 활성산소 및 염증성 사이토카인 등이 피부노화의 중요한 원인으로 알려지면서 활성산소를 제거하고 염증을 억제

하여 피부노화를 예방하고 지연시킬 수 있는 항염증, 항산화 및 항노화 효과를 갖는 한방 처방이나 개별 한약재를 이용한 연구⁵⁻⁸⁾가 활발히 진행되고 있고, 천연 한방소재 기능성 제품 개발에 대한 관심이 고조되고 있다.

平肝開鬱止血湯은 《傳青主男女科》에 수록된 처방으로 白芍藥, 白朮, 當歸, 牡丹皮, 生地黃, 甘草, 三七根, 荊芥穗, 柴胡로 구성되어 과도한 스트레스로 발생한 肝氣鬱結 증상과 그로 인한 血崩에 사용하는 처방이다⁹⁾. 平肝開鬱止血湯의 구성약물 중 白芍藥은 養血柔肝하고 斂陰하는 효능이 있어 피부에 영양을 滋養하며 陰에 해당하는 津液을 수렴시키는 역할을 하고, 白朮은 生津, 化濁하는 효능이 있어 津液을 자양하고 탁한 瘀血이나 痰飲을 삭히는 역할을 하고, 當歸는 補血和血하고 潤燥하는 효능이 있어 血을 補하고 血이 과도하거나 부족한 인체 대사 기능을 和하며 潤하는 역할을 하고, 牡丹皮는 潤燥, 消瘀, 活血散瘀하는 효능이 있어 滋潤하고 血의 운행을 활발히 하여 瘀血을 삭히거나 없애는 역할을 하고, 生地黃은 生津, 滋陰, 清熱하는 효능이 있어 津液을 滋養하고 염증성 반응이나 물질인 熱을 제거하는 역할을 하고, 三七根은 消腫하는 효능이 있어 瘀血이나 痰飲을 삭히는 역할을 한다. 본 연구에서는 肝의 정상적인 생리기능인 肝藏血, 肝主疏泄 기능의 장애로 기혈순환이 제대로 이루어지지 않아 발생한 瘀血과 火熱이 피부를 건조시키고 피부노화를 촉진시킨다고 생각하고 영양 기능을 담당하는 血과 자운 기능을 담당하는 津液 補하고 염증성 반응인 熱을 淸하는 平肝開鬱止血湯을 선택하여 항염증, 항산화 및 항노화 효과에 대한 실험을 진행하였다.

연구에서 사용한 RAW 264.7 대식세포주는 항염증 약물의 효능을 확인하고 염증 매개물질의 합성과 이를 매개하는 신호전달경로의 억제효능을 가진 약물을 평가하기 위해 많이 사용되는 실험 모델이다²⁴⁾. 平肝開鬱止血湯 추출물의 세포독성과 생존율을 알아보기 위하여 MTT assay를 실행하였다. LPS로 염증반응을 유도한 RAW 264.7 cell에서 농도별로 平肝開鬱止血湯 추출물을 처리하여 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴본 결과, 62.5, 125, 250, 500 및 1,000 μ g/ml 농도까지 20% 이

상의 세포 생존율 감소가 없었다. 따라서 이 범위 내의 平肝開鬱止血湯 추출물을 이용하여 나머지 실험을 진행하였다.

平肝開鬱止血湯 추출물의 항염증 활성을 알아보기 위해 NO 생성, PGE₂ 생성 및 염증성 사이토카인들의 분비량을 측정하였다. NO는 L-arginine에서 합성되는 free radical로서 활성화된 대식세포에서 iNOS에 의해 과도하게 생성된 NO는 활성산소종을 생성하여 정상세포의 손상을 초래하는 염증 매개 물질로서 작용한다^{25,26)}. NO 생성에 대한 저해 효과를 측정한 결과, 平肝開鬱止血湯 추출물은 250, 500 및 1,000 μ g/ml 농도에서 통계학적으로 유의하게 NO의 생성을 억제하였고, 250 및 500 μ g/ml 농도에서 iNOS mRNA 발현을 감소시켰다. 이는 平肝開鬱止血湯 추출물이 iNOS mRNA 발현을 억제함으로써 NO의 생성을 억제하였음을 나타낸다.

PGE₂는 COX-2에 의해 arachidonic acid로부터 혈관 투과성의 증가를 유발해 염증으로 인한 주요 증상인 부종, 발열, 통증 등을 발생시킨다^{27,28)}. PGE₂ 생성에 대한 저해 효과를 측정한 결과, 平肝開鬱止血湯 추출물은 250, 500, 1,000 μ g/ml 농도에서 통계학적으로 유의하게 PGE₂ 생성을 억제시켰고, 250 및 500 μ g/ml 농도에서 COX-2 mRNA 발현을 감소시켰다. 이는 平肝開鬱止血湯 추출물이 COX-2 mRNA 발현을 억제함으로써 PGE₂의 생성을 억제하였음을 나타낸다.

IL-6는 대표적인 염증성 사이토카인의 한 종류이며, 주로 대식세포와 T 세포에 의해 생산되어 감염 또는 조직의 손상과 같은 자극에 조기 반응하는 사이토카인으로 초기 면역반응과 급·만성 염증의 핵심 매개 인자의 하나이다²⁹⁾. 본 연구에서 平肝開鬱止血湯 추출물은 500 μ g/ml에서 IL-6 mRNA의 발현을 감소시켰다. 이는 平肝開鬱止血湯 추출물이 IL-6 mRNA의 발현을 억제하여 염증을 조절할 수 있음을 의미한다.

平肝開鬱止血湯 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해 DPPH와 ABTS를 이용하여 radical 소거 활성을 평가하였다. DPPH는 매우 안정화된 자색의 free radical로서 항산화 물질에 의해 노란색으로 탈색되는 것을 육

안으로 쉽게 관찰할 수 있어 항산화력을 평가하는데 자주 사용된다³⁰⁾. DPPH를 사용하여 radical 소거율을 측정된 결과, 卍肝開鬱止血湯 추출물은 농도 의존적으로 높은 경향의 DPPH radical 소거능이 있음을 확인하였다. ABTS를 이용한 측정법은 양이온 radical을 소거하는 것으로 투명이 가까운 시약이 청록색으로 탈색되는 것을 흡광도 측정으로 쉽게 관찰할 수 있어 항산화력을 평가하는데 자주 사용된다³¹⁾. ABTS를 사용하여 radical 소거율을 측정할 결과, 卍肝開鬱止血湯 추출물은 농도 의존적으로 높은 경향의 ABTS radical 소거능이 있음을 확인하였다.

卍肝開鬱止血湯 추출물의 항노화 활성을 알아보기 위해 collagenase 저해 활성, elastase 저해 활성, tyrosinase 저해 활성, L-DOPA oxidation 억제 활성을 평가하였다. 콜라겐은 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 주요 구성 성분으로 피부에 결합성과 탄력을 부여하여 외부의 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다. 피부 구조 중 진피층의 90%를 차지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 밀접한 관계를 가진다³²⁾. Collagenase는 collagen의 펩타이드 결합을 끊는 효소로 卍肝開鬱止血湯 추출물은 농도 의존적으로 높은 경향의 collagenase 생성 억제 효능이 있음을 확인하였다.

Elastase는 피부 탄력을 유지하는 세포외 기질 구성 단백질 중 하나인 elastin을 분해하며, collagen을 포함한 다양한 단백질을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다³³⁾. 그러므로 피부노화의 주원인 중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase 활성을 저해시킴으로써 피부 결합 조직을 유지시켜, 탄력을 유지하고 피부가 처지는 것을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 본 연구에서 卍肝開鬱止血湯 추출물은 농도 의존적으로 높은 경향의 elastase 생성 억제 효능이 있음을 확인하였다.

Tyrosinase는 L-tyrosine의 수산화 반응을 촉매하여 L-DOPA로의 전환 및 L-DOPA를 L-DOPA-quinone으로 산화시켜 멜라닌 합성을 조절한다³⁵⁾. 따라서 tyrosinase 활성을 억제하는 것은 피부 미백과 피부노

화에 매우 중요하다. 이에 卍肝開鬱止血湯 추출물은 tyrosinase 생성과 L-DOPA oxidation을 농도 의존적으로 억제 효능이 있음을 확인하였다.

이상의 실험 결과 卍肝開鬱止血湯 추출물은 전반적으로 우수한 항염증 효과와 항산화 및 항노화 관련 효소의 활성 억제효과를 보였다. 그러나 임상이나 한방 소재 기능성 제품으로 활용하기 위해서는 동물 모델에서의 추가적인 연구와 자세한 기전 연구 및 卍肝開鬱止血湯을 구성하는 개별 약물들의 효능과 복합 처방의 효능의 비교가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에서 卍肝開鬱止血湯 추출물의 항염증 활성과 항산화 활성 및 항노화 활성을 평가한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 卍肝開鬱止血湯 추출물은 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 LPS에 의해 증가한 iNOS mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰고, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 NO 생성을 유의하게 억제하였다.
2. 卍肝開鬱止血湯 추출물은 250 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 LPS에 의해 증가한 COX-2 mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰고, 250, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 PGE₂ 생성을 유의하게 억제하였다.
3. 卍肝開鬱止血湯 추출물은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 LPS에 의해 증가한 IL-6 mRNA의 발현을 유의하게 감소시켰다.
4. 卍肝開鬱止血湯 추출물은 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시켰다.
5. 卍肝開鬱止血湯 추출물은 농도 의존적으로 collagenase, elastase, tyrosinase와 L-DOPA oxidation 생성을 억제하였다.

본 논문은 2023년도 세명대학교 박사학위 졸업논문입니다.

ORCID

Kyoung Won Lee
(<https://orcid.org/0009-0002-5615-401X>)

Young Chae Song
(<https://orcid.org/0000-0002-5673-8835>)

Hee Taek Kim
(<https://orcid.org/0000-0002-5581-3733>)

References

1. Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery. Globooks. 2022;45-6,72-6.
2. Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J drugs Dermatol*. 2008;7(2 Suppl):s12-6.
3. Yoon Y, Bae S, An S, Choe YB, Ahn KJ, An IS. Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin and Skin Cell Signaling Pathways. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2013;11(3):417-26.
4. Nam HJ, Kim YB. Aging and skin aging. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2004;17(1):16-33.
5. Oh HK. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Atractylodes japonica* according to extract methods. *Journal of the Korean Society of Applied Science and Technology*. 2021;38(6):1543-52.
6. Park HS, Ha HY, Kim HT. An Experimental Study on the Effect of *Angelica gigas* ethanol extract on Hyaluronic Acid synthesis. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2018;31(1):32-41.
7. Park JY, Hwang JG, Yun JK, Han KH, Do EJ, Kim SO, et al. Effect of Ssanghwa-tang Extract on Antioxidant and Anti-aging Enzyme Activities. *Kor. J. Herbology*. 2012;27(3):67-74.
8. Jeon BH, Song YC, Kim HT, Kim YM. Studies on Skin Anti-aging Effect of Chungpyesagan-tang(CPSGT). *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2023;36(1):40-9.
9. Bu C. *Bucheongjunamnyeogua*. Seoul:Daeseongmunhwa Publishing Co. 1989:88.
10. Oh SK, Kim WH. Effect of Pyungangaeulgyhyul-tang on CCL4-induced liver cell injury. *Dongguk Journal of the Institute of Oriental Medicine*. 1998;2(1):193-204.
11. Oh SK, Kim WH. Protective effects of Pyungangaeuljihyul-Tang on toxic agent induced liver cell damage. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 1999;20(2): 545-57.
12. Yun JW, Lee TG. The Influence of Pyeonggangaeuljihyeoltang on Pathologic Models of Blood Stasis. *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology*. 1995;8(1):131-269.
13. Hur J, Nguyen TTH, Park N, Kim J, Kim D. Characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) fermented by *Rhizopus oligosporus* and its bioactive properties. *Amb Express*. 2018;8(1):1-8.
14. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold spring harbor protocols*. 2018;2018(6):pdb. prot095505.
15. Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin DJ, et al. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38

- hibition in RAW 264.7 macrophage cells. *European journal of pharmacology*. 2006;545(2-3):192-9.
16. Takano-Ishikawa Y, Goto M, Yamaki K. Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: Comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*. 2006;13(5):310-7.
 17. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*. 2002;30(6):1292-305.
 18. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, MORI A, Fujita Y, Yasuhara T, et al. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI.: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1989;37(8):2016-21.
 19. Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*. 1999;299:379-89.
 20. Wünsch E, Heidrich H-G. Zur quantitativen Bestimmung der kollagenase. 1963.
 21. Kraunsoe JA, Claridge TD, Lowe G. Inhibition of Human Leukocyte and Porcine Pancreatic Elastase by Homologues of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. *Biochemistry*. 1996;35:9090-6.
 22. Vanni R, Peretti D, Bianchi U. Esame elettroforetico delle tirosinasi di *Musca domestica* L. *Atti della Accademia Nazionale dei Lincei Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali Rendiconti*. 1975;59:961-8.
 23. Joshi P, Sarkar S, Soni SK, Kumar D. Label-free colorimetric detection of Cr (VI) in aqueous systems based on flower shaped silver nanoparticles. *Polyhedron*. 2016;120:142-9.
 24. Kim BH, Lee YT, Kang KH. *Codonopsis lanceolata* Inhibits Inflammation through Regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2010;24(1):80-4.
 25. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*. 1992;70:705-7.
 26. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J*. 1996;316(1):209.
 27. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:145-82.
 28. Wang MT, Honn KV, Nie D. Cyclooxygenases, prostanooids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):525-34.
 29. Huang H, Patel DD, Manton KG. The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2005;10(1):192-215.
 30. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol-Leb*. 1995;28(1):25-30.
 31. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity a

- pplying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:1231-7.
32. Kim JK, Lee JH, Yang MS, Seo DB, Lee JS. Beneficial Effect of Collagen Peptide Supplement on Anti-aging Against Photodamage. *Korean J. Food Sci. Technol.* 2009;41(4):441-5.
 33. Tsukahara K, Nakagawa H, Moriwaki S, Takema Y, Fujimura T, Imokawa G. Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: Implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles. *Int J Dermatol.* 2006;45:460-8.
 34. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem Photobiol.* 2001;74(2):283-90.
 35. Mo JH, Oh SJ. Tyrosinase Inhibitory Activity and Melanin Production Inhibitory Activity of the Methanol Extract and Fractions from *Den Dropanax morbifera* Lev. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 2013;11(2):275-80.