

화장품 소재로서 가막살나무 추출물의 항염증 효능

권 유 빈 · 유 병 삼 · 김 대 신* · 문 성 준[†] · 윤 명 석 · 박 수 남**

코스맥스(주) 중앙연구소, *제주 한라수목원 제주특별자치도 환경자연연구원,

**서울과학기술대학교 그린코스메틱연구개발센터

(2010년 9월 6일 접수, 2010년 9월 13일 수정, 2010년 9월 20일 채택)

Anti Inflammatory Activity of *Viburnum dilatatum* Thunb. Extract as Cosmetic Ingredient

Yoo-bin Kwon, Byoung-Sam Yoo, Daeshin Kim*, Seong-Joon Moon[†], Moungh-Seok Yoon, and Soo Nam Park**

R&D Center, COSMAX Inc., 902-4, Sangsin-ri, Hyangnam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-937, Korea

*Halla Arboretum

**Research Center for Development of Green Cosmetic, Seoul National University of Science Technology

(Received September 6, 2010; Revised September 13, 2010; Accepted September 20, 2010)

요약: 본 연구에서는 가막살나무(*Viburnum dilatatum* Thunb.)의 잎과 가지로부터 유래되는 천연화합성분들을 얻고, 이들의 자극완화용 화장품 소재로서의 가능성을 확인하기 위하여 항산화 효능 및 항염증 효능을 조사하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 전자공여능 측정방법에 의한 항산화 효능 조사 결과, 가막살나무의 에탄올(Ethanol) 추출물(SC₅₀ = 17.03 µg/mL), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물(SC₅₀ = 13.97 µg/mL), 부탄올(butanol) 분획물(SC₅₀ = 10.30 µg/mL) 순으로 항산화능력이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 마우스 대식세포(RAW264.7 cells)에서 생성되는 산화질소(nitric oxide : NO) 생성의 억제능을 조사한 결과에서는 항산화 활성이 저조했던 헥산(hexane) 및 메틸렌클로라이드(methylene chloride) 분획물에서 10 µg/mL 시료농도를 기준으로 할 때, 50 % 이상의 NO 생성 억제율로 우수한 항염증 효능을 나타내었다. 특히, 위와 동일 실험 조건에서 헥산 분획물의 경우, 염증 반응 인자인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 cytokine과 iNOS, COX-2 효소의 발현이 농도의존적으로 억제됨을 RT-PCR 방법으로 확인할 수 있었다. 이번 연구 결과들로부터 가막살나무 유래 천연화합성분들은 자극완화용 화장품 소재 개발에 매우 유리하게 응용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

Abstract: The crude ethanol extracts and their solvent-partitioned fractions derived from the leaf and twig of *Viburnum dilatatum* Thunb. were investigated for their 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging efficacy. The results showed that the butanol-soluble fraction (SC₅₀ = 10.30 µg/mL) exhibited higher anti-oxidant activity than the crude ethanol extract (SC₅₀ = 17.03 µg/mL) in the DPPH assay model. Then, the effects of the same extract samples on the production of nitric oxide were examined in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Although the hexane and methylene chloride-soluble fraction showed a weak anti-oxidant activity, they exhibited potent inhibitory activity of NO production above 50 % at a concentration of 10 µg/mL. The hexane-soluble fraction also showed the inhibitory effect on mRNA expression of pro-inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7. These results suggest that the solvent extracts of *Viburnum dilatatum* Thunb. could be used as an anti-irritation ingredient.

Keywords: *Viburnum dilatatum* Thunb. extract, SLS, anti-inflammation, anti-oxidant activity, cytokine

[†] 주 저자 (e-mail: sjmoon@cosmax.com)

1. 서 론

그람-음성세균(gram-negative bacteria)의 세포 외막에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)는 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포 외막으로부터 방출되어 패혈증(gram-negative sepsis)과 패혈증성 쇼크(septic shock)를 일으킨다. LPS는 RAW264.7과 같은 단핵식세포(macrophage 또는 monocyte)로부터 다양한 염증 반응 인자로 알려진 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 염증 전구 사이토킨(pro-inflammatory cytokines)을 증가시키는 것으로 알려져 있다[1,2]. 특히 TNF- α , IL-1 β 는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현을 유도한다. iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 산화질소(nitric oxide, NO)를 생성한다[3]. 일반적인 NO형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 과도한 NO형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다[4].

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 전환시키는 효소로써 COX-1과 COX-2로 분류된다[5]. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지, 혈소판의 형성에 필요한 PGs의 합성 등 정상적인 생체기능에 작용하며, COX-2는 동물이나 인간의 염증 반응 부위에서 발견된다. COX-2에 의한 PGs의 합성은 염증반응을 매개하는 것으로 여겨지고 있으며, 염증매개물질이 prostaglandins E₂ (PGE₂)를 형성시킨다. PGE₂는 염증반응, 면역반응 및 혈관신생(angiogenesis) 촉진 등 암 발생에도 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다[6,7]. 따라서, arachidonic acid로부터 PGs류를 합성하는데 관련된 효소인 COX는 염증을 차단하는데 주된 목표가 되고 있다.

인체피부는 해부학적으로 외부와의 경계면에 위치하여 다양한 감염원들인 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 알레르기 유발 인자 및 자외선에 항상 노출되어 있다. 정상적인 경우, 인체 피부에서는 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 치유의 작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 과도하게 작용하게 되면 알러지 반응이나 아토피 피부염, 접촉성 피부염과 같은 만성염증 반응을 초래하게 된다[8]. 구체적인 예로서 인체피부가 장기간 태양광선에 노출될 경우, 자외선은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 유발하게 된다. 또한 과량의

ROS발생은 산화 환원 불균형 상태를 일으켜 표피와 진피를 구성하는 세포와 세포 사이의 기질, 혈관 등에서 염증을 유발하는 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) 및 효소(iNOS, COX-2), 그리고 이들 효소의 산물들인 PGE₂, 산화질소(NO)들이 생성되어 만성 염증상태가 된다[9-11]. 따라서 항염증 효능 소재들은 피부 자극완화 효과가 필요한 화장품류와 더불어 여드름 및 아토피를 완화하는데 도움을 주는 화장품류에 자주 활용되고 있다[12]. 이러한 소재들은 화장품 배합시 피부 안전성 면에서 부작용이 없어야 한다. 한편, 최근에는 안전하고 효과가 우수한 천연물 유래의 자극완화소재 및 화장품 개발이 증가되고 있는 추세이다.

가막살나무(*Viburnum dilatatum* Thunb.)는 인동과에 속하는 낙엽관목으로 산 중턱 이하의 숲속에서 서식하며 3 m 정도 크기로 자란다. 잎은 대생, 둥근 모양이며 길이는 6 ~ 12 cm 정도이고, 가장자리에 톱니가 있고, 양면에 털이 있으며, 뒷면에 선점이 있고, 양끝이 좁고, 턱잎은 없다. 꽃은 흰색이며, 열매는 붉은색을 띤다. 우리나라 강원도 이남, 특히 제주도에 자생하며, 관상용으로 많이 쓰이고 있다. 가막살나무 줄기나 잎을 험미라고 하는데, 봄과 여름에 채취하여 약용한다. 열매와 어린순은 식용으로 사용하기도 하며, 가막살나무 열매에는 항산화 효과가 있다고 알려지고 있다[13]. 그러나 가막살나무와 관련된 생리활성 연구는 활발히 진행되어 있지 않은 편이다.

본 연구에서는 가막살나무 추출물과 이것의 용매 분획물들이 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성 및 관련된 cytokine과 효소들(iNOS, COX-2)의 발현에 미치는 영향을 비교하였다. 또한, 동일한 시료들에 대하여 DPPH 라디칼 소거활성에 의한 항산화능력의 비교, 그리고 Sodium lauryl sulfate (SLS)에 의해 유발된 세포독성의 완화효과를 종합 고찰함으로써, 가막살나무 유래 천연성분들의 항염증 작용기전을 설명하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 식물재료 및 시료 추출물의 제조

가막살나무 생체시료는 제주도 한라수목원에서 채집하였다. 건조된 가막살나무 잎 50 g과 가지 50 g을 혼합하여 분쇄한 후, 80% EtOH로 상온에서 초음파를 이용하여 4 h 동안 추출하였다. 여과된 추출물은 감압회전농축기를 이용하여 농축되었다. 이와 같이 농축 건조된 추출물 시료 10 g에 hexane, methylene chloride, ethyl ace-

tate, butanol 용매를 순차적으로 가하여 정제된 분획물들을 제조하였다.

2.2. 세포배양

American Type Culture Collection (ATCC)로부터 mouse macrophage-like cell line인 RAW264.7과 fibroblast cell line인 CCD-986sk를 구입하였다. 두 종류 세포주 모두 10 % FBS (Invitrogen, USA)를 첨가한 DMEM (WelGENE, Korea) 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ 환경에서 배양되었다.

2.3. DPPH Radical 소거효과 측정

가막살나무 잎과 세지로부터의 에탄올 추출물과 이를 정제한 분획물들의 항산화 활성 효과는 Blois 등에 의해 보고된 방법으로 측정하였다[14]. 여러 농도의 시료와 0.2 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액을 96 well plate에 섞은 후 실온에서 30 min간 반응시킨 후 microplate reader (SPECTRA MAX 190, Molecular Devices, USA)를 사용하여 517 nm에서 측정하였다. 시료 대신 에탄올을 넣은 반응액을 대조군으로 하여 라디칼 소거능력을 측정하였다. 이때 사용된 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Scavenge (\%)} = \{1 - (A - B) / C\} \times 100$$

A : 시료액과 DPPH 용액을 반응시킨 실험군의 흡광도

B : 시료액 자체 흡광도

C : 에탄올과 DPPH 용액을 반응시킨 실험군의 흡광도

2.4. MTT 방법에 의한 세포생존율 측정

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma) assay는 Mosmann[15]의 방법을 변형하여 수행하였다. RAW264.7 세포는 24 well plate에 5×10^5 cells/well의 분포가 되도록 하였으며, 각각의 시료를 농도별로 처리하고 40 min 뒤에 1 µg/mL 농도로 LPS를 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 이후에 10 µg/mL 농도의 MTT 용액 10 µL을 각각의 well에 첨가하고, 다시 4 h 동안 배양하였다. 마지막으로 100 µL의 Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가하여 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군에 대한 백분율로 표현하여 독성 평가에 이용되었다.

2.5. Nitric Oxide 생성량 측정

NO의 생성은 NO의 대사물인 아질산염의 양을 측정하는 Griess assay (주석)를 이용하였다. RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/mL로 조절된 후 24 well plate에 접종하고, 시료와 LPS (1 µg/mL)를 함유한 새로운 배지를 처리하여 24 h 배양하였다. 생성된 NO의 양은 각 세포배양상등액 100 µL을 취하여 96 well plate로 옮긴 후 Griess reagent (1 % sulfanilamide in 5 % phosphoric acid and 0.1 % naphthylethylenediamine dihydrochloride in distilled water, sigma) 100 µL를 혼합하여 96 well plates에서 10 min 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite (NaNO₂)를 단계적으로 희석하여 얻었다.

2.6. RNA 분리 및 RT-PCR

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 배양하고 각각의 시료와 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 4 h 동안 배양하였다. 각 실험군의 total RNA를 추출하기 위해 Easy Blue extraction kit (Intron, Korea) 1 mL을 첨가하여 세포를 용해시키고 실온에서 5 min 동안 방치 후 chloroform 200 µL를 첨가하여 15,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리 하였다. 투명한 상층액을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 첨가한 후 15,000 rpm에서 10 min 동안 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 0.1 % DEPC가 처리된 75 % EtOH로 세척한 후 공기 중에서 건조시켰다. 역전사(reverse transcription) 반응은 Improm-II TM cDNA kit (Promega, USA)를 이용하여 total RNA 3 µg을 oligo (dT) primer, 2.5 µL 10 mM dNTPs mix, 1 µL random sequence hexanucleotides (25 pmole/25 µL), 1 µL RNase inhibitor (20 U/µL), 1 µL 100 mM DTT, 4.5 µL 5 × RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 uL의 Reverse transcriptase (200 U/µL)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였다. 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 s 동안 원심 분리하여 37 °C에서 60 min 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95 °C에서 5 min 동안 반응시켜 reverse transcriptase를 불활성화시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. cDNA로부터 TNF-α, IL-1β, IL-6, iNOS, COX-2, GAPDH를 증폭하기 위하여 3 µL의 cDNA, 4 uM의 primer, 10× buffer, 250 uM dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 이용

Table 1. The Sequences of Primers and Fragment Sizes of the Investigated Genes in RT-PCR Analysis

Gene	Primer sequences	Fragment size (bp)
TNF- α	F 5'-TATGGCTCAGGGTCCAACCTC-3'	494
	R 5'-AGCAAAAAGAGGAGGCAACAA-3'	
IL-1 β	F 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCA-3'	204
	R 5'-CAGGATGAGGACATGAGCAC-3'	
IL-6	F 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3'	421
	R 5'-GGAAATTGGGGTAGGAAGGA-3'	
iNOS	F 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCA-3'	496
	R 5'-GGCTGTGAGGCTCGTGGC-3'	
COX-2	F 5'-CACTACATCTGACCCACTT-3'	696
	R 5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'	

하여 PCR을 실시하였다. 합성하고자 하는 유전자들의 primer 염기서열은 Table 1과 같았다. 사용된 PCR에 의해 생성된 산물은 ethidium bromide로 염색된 1.0 % agarose gel에서 전기영동되었다.

2.7. SLS (Sodium Lauryl Sulfate)에 의한 세포독성 완화 효과 측정

접촉성 피부염을 일으키는 모델로 SLS를 사용하여 피부장벽 기능의 손실을 유발시키면 경피수분손실량(TEWL, trans-epidermal water loss)을 증가시킨다. 사람의 정상 섬유아세포(human normal fibroblast)를 DMEM 배지가 들어 있는 96 well micro plate에 접종시키고(2×10^4 cells/well), 10 % CO₂ 조건에서 37 °C로 24 h 배양하였다. 상기 사람의 정상 섬유아세포는 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하였다. 먼저 예비 실험을 통해 가막살나무 추출물이 10 μ g/mL 농도 이내에서 세포 독성이 없음을 동일조건의 실험을 통해 확인하였다. 그 후 100 μ g/mL 농도의 SLS와 농도별로 희석된 각 추출물시료를 동시에 처리하고, 또한 동일조건하에서 추출물시료만 없는 경우를 대조군으로 하여 비교 실험하였다. 48 h 배양 후 배지를 제거하고 앞서 설명된 MTT 방법에 의한 세포생존율을 측정하여 가막살나무 추출물의 SLS에 의한 세포 독성 완화 효과를 확인하였다.

2.8. 인체 피부 일차 자극 시험

가막살나무 추출물의 인체피부에 대한 일차 자극 유무를 확인하고자 전문 임상시험 기관인 (주)더마프로에 의뢰하여 수행하였다. 임상용 시료 추출물은 1,3-butylene

Table 2. Criterion about the Responses After Primary Human Skin Irritation Test

Symbol	Grade	Clinical observation
+	1	Slight erythema, either spotty or diffuse
++	2	Moderate uniform erythema
+++	3	Intense erythema with edema
++++	4	Intense erythema with edema & vesicles

glycol (1,3-BG) 용액에 1 % (weight/volume)의 농도로 준비하였다. 임상 시험 선정 기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 피험자 여성 30명을 선정하였다. 피험자를 대상으로 등 부위에 시료물질을 도포한 후 48 h 후에 제거하였다. 제거 후 30 min, 24 h 후에 시험부위를 관찰하였다. 피부 평가는 Table 2의 기준으로 평가하였고, 패치를 붙인 날을 기준으로 48 h 및 72 h의 평균 반응도를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 가막살나무 추출물의 DPPH Radical 소거효과 측정 에 의한 항산화능력 조사

가막살나무 추출물들의 항산화 능력을 조사하기 위하여 DPPH radical에 의한 전자공여능 확인실험을 수행하였다. 가막살나무 잎과 세지의 ethanol extract와 이것으로부터 hexane, methylene chloride (CH₂Cl₂), ethyl acetate, butanol 등의 유기용매를 순차적으로 이용하여 얻은 fractions를 대상으로 1, 5, 10, 30, 50, 100 μ g/mL의 농도에서 DPPH radical 소거 능력을 조사하였다. 이때, 우수한 항산화 효과로 잘 알려진 vitamin C (SC₅₀ = 4.64 μ g/mL)를 양성대조군으로 하여 위 추출물 시료들에 대한 항산화효과를 비교하였다. 실험결과, Figure 1에서와 같이 가막살나무 추출물 시료들 중에서 ethanol extract (SC₅₀ = 17.03 μ g/mL), ethyl acetate fraction (SC₅₀ = 13.97 μ g/mL), butanol fraction (SC₅₀ = 10.30 μ g/mL) 순으로 항산화 활성 효과가 증가함을 알 수 있었다. 양성대조군인 vitamin C보다는 낮은 항산화 능력을 나타내었지만, 이들 추출물 시료들이 여전히 수많은 천연화합성분들로 구성되어 있음을 고려한다면, 매우 높은 항산화 능력 잠재성이 있다고 생각된다. 특히, 가막살나무의 ethyl acetate fraction 및 butanol fraction에는 항산화 활성이 우수한 유효 지표성분이 존재할 것으로 예상된다. 반면에 hexane 및 methylene chloride fraction의 경우 crude 상태의 ethanol extract보다도 더 낮은 항산

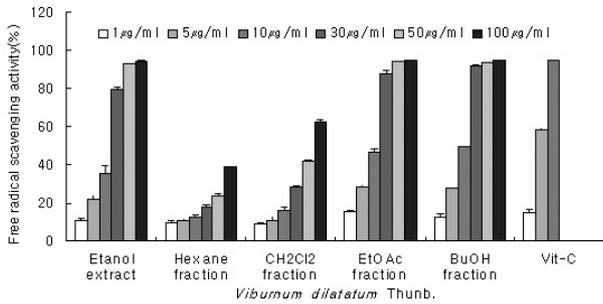


Figure 1. DPPH radicals scavenging effect of crude ethanol extract of *Viburnum dilatatum Thunb.* and its organic solvent fractions. All tests were run in triplicate and averaged.

화 활성 효과를 나타내었다.

3.2. RAW264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO· 생성에 대한 가막살나무 추출물의 억제효과

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포를 배양하여 항산화 능력에 평가되었던 동일한 가막살나무 추출물 시료들의 NO· 생성억제 정도를 조사하였다. 이들 추출물 시료들을 각각 10, 30, 50 µg/mL 농도에서 실험방법의 설명에 따라 NO· 생성억제를 측정하였다. 10 µg/mL 시료농도를 기준으로 할 때, hexane 및 methylene chloride fraction에서 50 % 이상의 우수한 NO· 생성저해율을 나타내었다(Table 3). 이때, RAW264.7 세포의 viability는 85 % 이상이었다. (data not shown) Ryu 등[16]의 연구보고에 따르면, 총 83종의 약용식물을 대상으로 본 연구와 유사한 조건으로 NO· 생성억제 효과를 조사한 결과, 80 µg/mL crude extract 농도에서 23종의 식물 추출물들이 60 % 이상의 저해율을 나타내었음을 보고하였다. 그러나 본 연구결과에서의 가막살나무 crude ethanol extract 시료는 50 µg/mL 농도에서 약 60 %의 저해율을 나타내었다. 이러한 고찰에 따라서 가막살나무 유래 천연성분들의 NO· 생성저해 효과가 우수함이 간접적으로 증명될 수 있었다.

3.3. LPS로 유도된 iNOS 및 Inflammatory Cytokine 발현에 대한 가막살나무 추출물의 억제효과

그람음성세균의 세포 표면을 구성하는 LPS로 대식세포에 영향을 주어 inflammatory cytokine을 유발시켰을 때 가막살나무 추출물이 이러한 염증 반응을 억제시키는 효과가 있는지 알아보았다. 또한, cytokine에 의해 활성화되며 염증 반응의 매개물질인 NO와 PGE2를 생합성

Table 3. Dose Dependent Inhibition of NO Production by *Viburnum dilatatum Thunb.* Extracts in LPS-activated RAW264.7 cells

Extract Samples	Inhibition (%)		
	50 ^a	30 ^a	10 ^a
Total ethanol extract	59.3	31.4	0.0
Hexane soluble fraction	80.7	69.3	68.2
Methylene chloride soluble fraction	80.4	64.9	51.4
Ethyl acetate soluble fraction	48.5	26.7	25.3
Butanol soluble fraction	65.7	45.0	41.5

^a Final concentration of samples in culture media in µg/mL. All tests were run in triplicate and averaged.

시키는 COX-2와 iNOS의 발현 억제도 RT-PCR로 확인해 보았다.

COX-2는 급성 염증반응에서 prostaglandins의 합성에 작용하여 염증을 유발하며, iNOS는 nitric oxide synthase작용에서 TNF-α, IL-1, LPS 등의 자극에 의해 활성화되어 혈관확장 및 조직손상을 유발하는 NO를 생성한다. 따라서 가막살나무 추출물에 대한 cytokine, COX-2, iNOS 발현을 측정함으로써 염증반응 억제정도 및 효능 작용기전을 판단할 수 있다. 본 실험에서는 NO 생성 억제효과가 가장 우수하였던, 가막살나무 hexane fraction 시료를 대상으로 수행하였다. 실험결과, Figure 2에서와 같이 LPS로 자극한 경우에 각각 TNF-α / GAPDH, IL-1β / GAPDH, IL-6 / GAPDH, iNOS / GAPDH, COX-2 / GAPDH의 mRNA 비는 1.14 ± 0.02, 1.21 ± 0.01, 1.19 ± 0.05, 1.24 ± 0.07, 1.23 ± 0.05이었고, 가막살나무 시료를 100 µg/mL 추가한 경우에는 각각의 mRNA 비가 0.04 ± 0.03, 0.03 ± 0.03, 0.01 ± 0.01, 0.01 ± 0.02, 0.01 ± 0.01로 급격히 낮아짐을 알 수 있었다. 이와 같은 결과에서, 가막살나무 시료 농도에 따라 mRNA의 발현을 저해하는 효과가 있는 것을 확인했다(Figure 2).

한편, 가막살나무 추출물 시료들 중 항산화 활성이 우수한 분획물들이 NO 생성 억제효과까지 우수하지는 않았다. 오히려 항산화 활성이 제일 저조하였던 hexane 및 methylene chloride fraction들이 NO 생성 억제효과가 가장 우수하였다. NO 생성은 염증반응과 관련된 다양한 cytokine과 효소들(iNOS, COX-2)의 발현으로 유도되지만, SLS와 같은 자극원이 피부에 접촉된 후 초기반응에서 발생된 ROS가 최종 NO 생성을 유도하는 일련의 염증반응 초기 인자로 작용할 수 있다는 보고가 있다[17]. 따라서 우수한 항산화 활성 성분들은 NO 생성 억제를

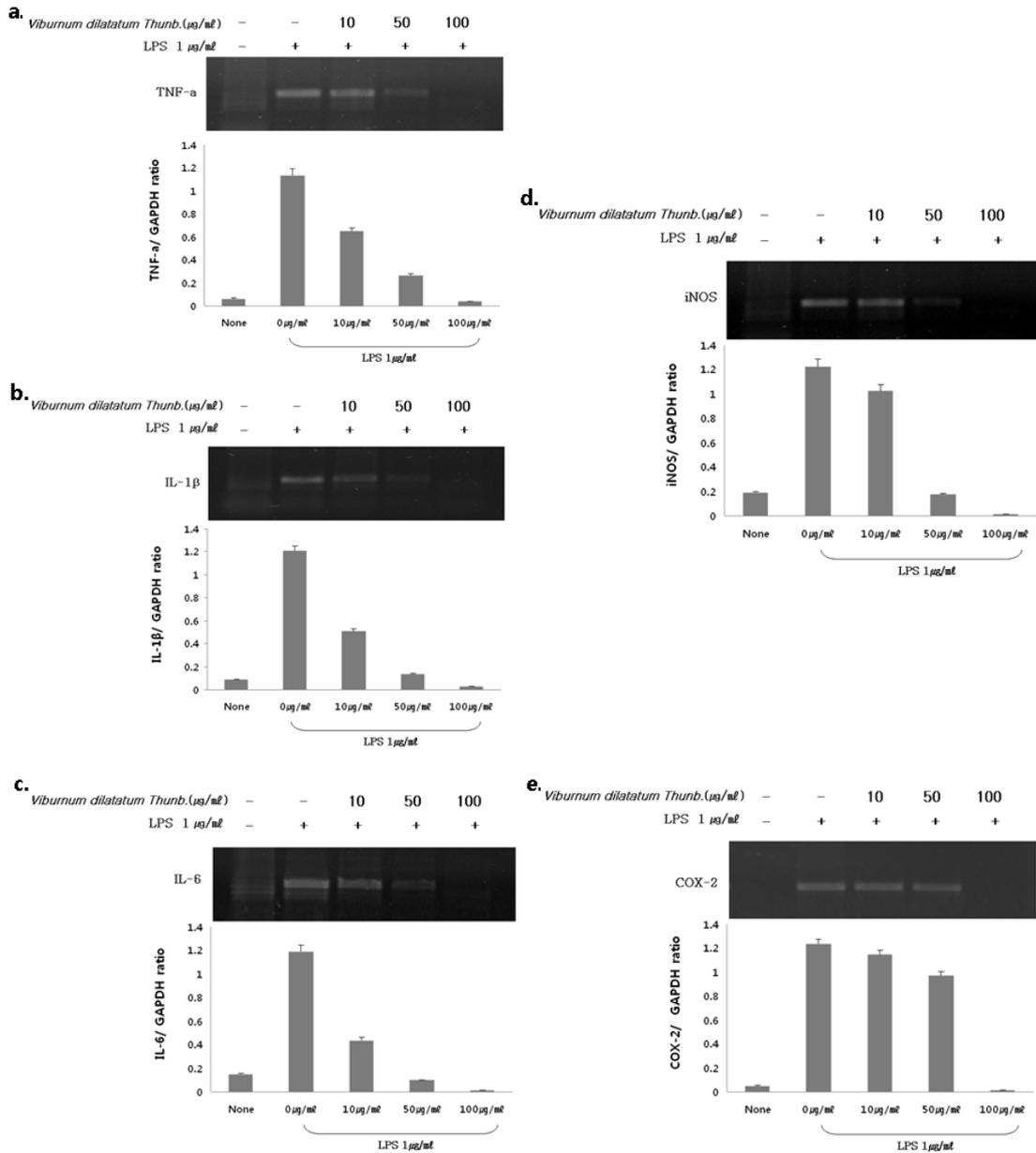


Figure 2. Effect of hexane soluble fraction of *Viburnum dilatatum* Thunb. on the mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS and COX-2 in LPS stimulated RAW 264.7 cells.

포함한 항염 효과도 기대될 수 있다. 그러나 본 연구결과에서 가막살나무 추출물 시료를 더욱 정제된 분획물 시료들의 항산화능력 및 NO 생성 억제능력이 서로 일치하지 않았고, 반면에 hexane 분획 시료의 경우 LPS로 유도된 TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS 및 COX-2 발현을 억제하는 항염증 효능이 확인되었다. 이러한 결과들을 종합하여 고찰해 볼 때, 가막살나무 추출물은 염증유발 자극원의 초기반응에서 발생하는 ROS를 소거하는 능력과

더불어 과도한 염증반응으로 유도되는 다양한 cytokine 과 효소들(iNOS, COX-2)의 발현을 억제하는 복합적인 항염증 작용기전이 있는 것으로 생각된다.

3.4. SLS로 유도된 세포독성에 대한 가막살나무 추출물의 세포보호효과

SLS는 세포막에 결합되어 세포대사 억제와 세포막을 파괴하는 피부자극 유발 물질로서 실험적으로 피부자극

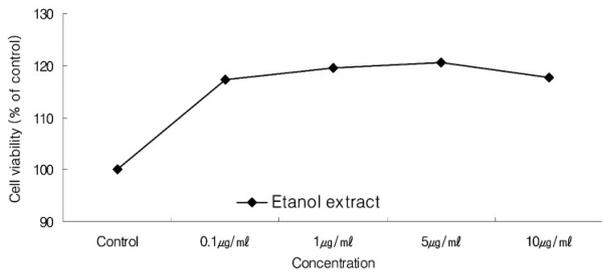


Figure 3. Protective effect of *Viburnum dilatatum* Thunb. extracts on SLS-induced cell damage.

을 유발할 때 가장 많이 사용되는 물질이다. Figure 3에서 가막살나무 crude ethanol extract 시료의 세포독성 완화 효과는 5 μg/mL 농도에서 가장 우수함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로 가막살나무 추출물은 화장품 조성물에 포함되었을 때 계면활성제에 의해 나타날 수 있는 피부 자극을 완화할 수 있는 물질임을 확인하였다. 한편, 위와 같은 실험결과를 앞선 항산화 효능 및 항염증 효능 결과들과 연계하여 종합 고찰해 보았다. 비록 인간의 섬유아세포에서 SLS에 의해 유도된 세포독성이 가막살나무 에탄올 추출물에 의해 완화됨을 나타낸 결과이지만, 앞서 고찰되었던 가막살나무 추출물의 항염증 작용기전이 간접적으로 설명될 수 있었다. 즉, 가막살나무 추출물은 염증유발 자극원의 초기반응에서 발생하는 ROS를 소거함과 동시에 과도한 염증반응으로 유도되는 다양한 cytokine과 효소들(iNOS, COX-2)의 발현을 또한 억제하는 것으로 생각된다.

3.5. 가막살나무 추출물의 인체피부자극 조사

본 시험은 가막살나무 추출물이 인체피부에 대한 일차 자극 유무를 확인하고자 수행되었다. 시험 대상자 30명의 평균 연령은 29.4 ± 8.2세로, 최고 연령자는 44세, 최저 연령자는 19세이다. Table 4에서 나타난 바와 같이 가막살나무 시료는 인체 피부 일차 자극 시험 결과에서 자극이 없는 것으로 확인되었다. 본 인체시험에 적용된 가막살나무 추출물 농도는 1 % (weight/volume)이며, 항염증 효능을 나타내는 농도인 100 μg/mL (Figure 2)를

고려할 때, 화장품에 가막살나무 추출물을 1 % 농도로 적용해도 최적 효능을 발휘할 수 있을 것으로 예상된다.

4. 결 론

본 연구에서는 가막살나무의 잎과 세지로부터 유래되는 천연화학성분들을 얻고, 이들의 자극완화용 화장품 소재로서 가능성을 확인하기 위하여 항산화 효능 및 항염증 효능을 조사하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 전자공여능 측정방법에 의한 항산화 효능을 조사한 결과, 가막살나무의 crude ethanol extract (SC₅₀ = 17.03 μg/mL), ethyl acetate fraction (SC₅₀ = 13.97 μg/mL), butanol fraction (SC₅₀ = 10.30 μg/mL) 순으로 항산화능력이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 리포다당체(lipopolysaccharide, LPS)에 의해 활성화된 마우스 대식세포(RAW264.7 cells)에서 생성되는 산화질소(nitric oxide : NO) 생성의 억제능을 조사한 결과에서는 항산화 활성이 저조했던 hexane 및 methylene chloride fraction에서 10 μg/mL 시료농도를 기준으로 할 때, 50 % 이상의 우수한 NO 생성저해율을 나타내었다. 특히, 위와 동일 실험 조건에서 hexane fraction의 경우 염증 반응 인자인 TNF-α, IL-1β, IL-6 등의 사이토킨과 iNOS, COX-2 효소의 발현이 농도 의존적으로 억제됨을 RT-PCR 방법으로 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 고찰해 보면, 가막살나무 추출물은 염증유발 자극원의 초기반응에서 발생하는 ROS를 소거하는 능력과 더불어 과도한 염증반응으로 유도되는 다양한 cytokine과 효소들(iNOS, COX-2)의 발현을 억제하는 복합적인 항염증 작용기전이 있는 것으로 생각된다. 또한, 인간의 섬유아세포에서 SLS에 의해 유도된 세포독성이 가막살나무 에탄올 추출물에 의해 완화됨을 알 수 있었는데, 앞서 고찰되었던 가막살나무 추출물의 항염증 작용기전이 간접적으로 설명될 수 있었다.

본 연구의 결과를 응용하여 가막살나무 유래 천연성분들의 항염증 효능을 극대화하기 위한 원료개발 전략을 구상할 수 있게 되었다. 즉, 피부자극 또는 피부염증 유

Table 4. Safety Evaluation of *Viburnum dilatatum* Thunb. Extract by Primary Human Skin Irritation Test

Samples	No. of responder	48시간			72시간			반응도		
		1+	2+	3+	1+	2+	3+	48 h	72 h	Mean
가막살나무 시료(1 %)	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
Control (1,3-Butylene glycol)	0	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0

발물질의 초기 작용기전에서 발생된 활성산소종(ROS)은 ethyl acetate fraction 및 butanol fraction으로 제거할 수 있는 반면, 과도한 염증반응으로 유도된 염증 반응 인자들의 생성은 hexane 및 methylene chloride fraction이 효율적으로 억제할 수 있을 것이다. 따라서 염증 반응의 주요단계를 선택적으로 동시 차단하여 항염증 효능을 더욱더 증가시킬 수 있기 위한 가막살나무 분획물들의 최적 혼합 비율을 찾을 수 있다고 생각된다. 최종 결론으로서 가막살나무 유래 천연화학성분들은 자극완화용 화장품 소재 개발에 매우 유리하게 응용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다(과제고유번호 : A092055).

참고 문헌

1. W. Lesslauer, H. Tabuchi, R. Gentz, M. Brockhaus, E. J. Schlaeger, and G. Grau. Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide-induced lethality, *Eur. J. Immunol.*, **21**, 2883 (1991).
2. K. M. Mohler, D. S. Torrance, C. A. Smith, R. G. Goodwin, K. E. Stremmer, and V. P. Fung. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists, *J. Immunol.*, **151**, 1548 (1993).
3. E. A. Hyun, H. J. Lee, W. J. Yoon, S. Y. Park, H. K. Kang, S. J. Kim, and E. S. Yoo. Inhibitory effect of *Salvia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in murine macrophage RAW264.7, *Yakhak Hoeji*, **48**, 159 (2004).
4. A. Weisz, L. Cicatiello, and H. Esumi. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine, *J. Biochem.*, **316**, 209 (1996).
5. T. C. Moon, K. C. Chung, K. H. Son, H. P. Kim, S. S. Kang, and H. W. Chang. Screening of cyclooxygenase-2 inhibitors from natural products, *YAKHAK HOEJI*, **42**, 214 (1998).
6. J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M. Leahy, and W. G. Smith. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3228 (1994).
7. K. Seibert, Y. Zhang, K. Leahy, S. Hauser, J. Masferrer, and W. Perkins. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12013 (1994).
8. T. Lawrence, D. A. Willoughby, and D. W. Gilroy. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 787 (2002).
9. M. Higuchi, N. Hisgahi, H. Taki, and T. Osawa. 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 (1990).
10. N. Laflamme and S. Rivest. Toll-like receptor 4: The missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components, *FASEB J.*, **15**, 155 (2001).
11. V. Willeaume, V. Kruys, T. Mijatovic, and G. Huez. Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharide in macrophages: similarities and differences, *J. Inflamm.*, **46**, 1 (1996).
12. L. C. Parish, J. L. Parish, H. B. Routh, and J. A. Witkowski. The treatment of acne vulgaris with low dosage doxycycline, *Acta Dermatovenerol. Croat.*, **13**(3), 156 (2005).
13. I. Kunihsa, O. Akio, and M. Hajime. Antioxidant activity and inhibitory effect of Gamazumi (*Viburnum dilatatum* Thunb.) on oxidative damage induced by water immersion restraint stress in rats, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **52**, 443 (2001).
14. M. S. Blois. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **29**, 1199 (1958).

15. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55 (1983).
16. J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim, Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages, *Phytother Res*, May, **17**(5), 485 (2003).
17. H.-Y. Thong and H. I. Maibach, Irritant dermatitis as a model of inflammation, *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, **5**(2), 221 (2008).