

## 加味淸肌散이 항산화와 염증성 사이토카인에 미치는 영향

이윤정<sup>1#</sup>, 심부용<sup>1</sup>, 이해진<sup>2</sup>, 박지원<sup>1</sup>, 김동희<sup>1\*</sup>

1 : 대전대학교 한의학과 병리학교실, 2 : 대전대학교 미용의학

### Effect of Gami-Chunggisan on Antioxidant and Pro-Inflammatory Cytokine

Youn-Jeong Lee<sup>1#</sup>, Boo-Yong Sim<sup>1</sup>, Hae-Jin Lee<sup>2</sup>, Ji-Won Bak<sup>1</sup>, Dong-Hee Kim<sup>1\*</sup>

1 : Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

2 : Department college of Beauty & Healthy Medicine, Daejeon University

### ABSTRACT

**Objectives** : Gami-Chunggisan extract (GCE) is one of the oriental traditional medicine. We investigated the antioxidant effect and reduction of pro-inflammatory cytokine as a functional ingredient for cosmetic products from the GCE.

**Methods** : GCE was prepared by extracting with 80% ethanol. We analyzed total polyphenol and antioxidant activities. To evaluate antioxidant activity, we measured 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay. Also we measured the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) on Raw264.7 cells. We researched reduction of anti-inflammatory cytokines from concentration of GCE on Raw264.7 cells.

**Results** : Total polyphenol quantity of GCE was included 46.6 mg/g. The GCE showed ABTS free radical scavenging ability with more than 89% at 1000  $\mu\text{g/ml}$ . In addition the DPPH free radical scavenging ability from the GCE was activated over 93% at 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Production of the ROS was decreased by approximately 26%, upon the GCE treatment at concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$ . The GCE at 100  $\mu\text{g/ml}$  concentration showed inhibitory effect on NO production by 38%. Production of IL-1 $\beta$  and IL-6 were decreased by approximately 56% and 36%, respectively upon GCE treatment at 100  $\mu\text{g/ml}$ . Also, production of TNF- $\alpha$  was decreased by approximately 79% at 100  $\mu\text{g/ml}$ . Moreover, the GCE showed inhibitory effects on the expression of the IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  genes in LPS-induced Raw 264.7 cells.

**Conclusions** : From the results above, we conclude that the GCE indicated significant antioxidant effects and induced reduction of pro-inflammatory cytokine.

**Key words** : Gami-Chunggisan, antioxidant, free radical, anti-inflammation, cytokine

### 서론

인체는 끊임없이 산소를 이용하여 호흡을 함으로써 생명유지를 위한 에너지를 생산하게 되는데, 그 과정에서 흡입한 산소의 일부가 인체에 유해한 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)로 전환된다<sup>1)</sup>. ROS는 과산화수소 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 초과산화이온 (superoxide ion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 수산화 라디칼 (hydroxyl radical, ·OH)과 같은 자유라디칼을

말하며, 산소가 공기 중에서 삼중항산소 (triplet oxygen, 3O<sub>2</sub>)로 존재하는데 형태가 변형이 되어 불안정한 상태가 되는 것을 말한다<sup>1)</sup>. 본래 인체에서 호흡과 물질대사가 이루어지는 과정에서 세포가 성장하고 분화될 수 있게 영향을 미치고 방어기능 등을 수행하나, 체내에서 정상적으로 소거되지 않았을 때는 잔존하여 산화적 스트레스를 유발시킨다<sup>2)</sup>.

산화적 스트레스는 세포내에서 친산화성 물질과 항산화 물

\*교신저자 : 김동희, 대전광역시 동구 대학로 62번지, 대전대학교 한의과대학  
· Tel : 042-280-2623 · FAX : 042-280-2624 · E-mail : dhkim@dju.kr

#제1저자 : 이윤정, 대전광역시 동구 대학로 62번지, 대전대학교 한의과대학  
· Tel : 042-280-2828 · FAX : 042-280-2624 · E-mail : kkamggiky@hanmail.net  
· 접수 : 2014년 6월 29일 · 수정 : 2014년 7월 18일 · 채택 : 2014년 7월 23일

질의 불균형으로 인한 산화적 손상으로 발생하는데, DNA 손상<sup>3)</sup>을 비롯하여 생체막의 이온 수송계 손상과 단백질 손상<sup>4)</sup>, 지질과산화물 포함한 세포대사의 심각한 이상 초래<sup>5)</sup>, 간경변증, 지방간, 동맥경화와 심혈관계 질환<sup>6)</sup>, 암<sup>7)</sup>, 노화<sup>8)</sup> 등 생체에 다양한 손상을 야기한다. 또한 NO (nitric oxide) 및 interleukin (IL)-1 $\beta$ , TNF (tumor necrosis factor)- $\alpha$ , IL-6와 같은 염증 관련 인자들의 발현과 생성을 유발시킨다<sup>9)</sup>. 산화적 스트레스로 인하여 NO와 염증 관련 사이토카인의 발현과 생성이 계속 증가하게 되면, 염증 반응이 더욱 악화되어 만성 단계로 진행된다<sup>9)</sup>. 특히, 피부에서 산화적 스트레스 및 이로 인한 염증성 사이토카인의 생성은 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 멜라닌 생성을 촉진시킴으로써 피부의 탄력을 감소시키고 주름 및 기미·주근깨 등의 각종 피부질환을 유발하여 피부 노화를 가속화시키는 것으로 보고되어있다<sup>8)</sup>.

산화적 스트레스에 대응하기 위하여 체내에서는 스스로 활성산소 분해효소를 생성한다. 그러나 다양한 원인으로 인하여 과량의 활성산소가 발생하는 경우 예방 및 치료적 차원에서 외부로부터 항산화제의 공급이 이루어진다<sup>10-12)</sup>. 의약품뿐만 아니라 식품과 화장품 등에서 합성 항산화제 첨가가 이루어지고 있으며, BHA 및 BHT 등의 항산화제가 개발되어 산화방지제로 사용되고 있으나 안전성에 논란이 있어 허용대상 식품이나 사용량이 엄격히 규제되고 있는 실정이다<sup>13-15)</sup>. 이에 최근에는 천연물을 소재로 하여 항산화 효능이 있는 다양한 기능성 화장품의 개발이 증가되고 있으며, 단일 약재뿐만 아니라, 효능이 입증된 한의학적 처방까지 원료로 하여 제품 개발이 이루어지고 있다<sup>8,9,15)</sup>.

따라서 본 연구에서는 산화적 손상과 더불어 염증 관련 인자들의 변화를 검색함으로써 화장품 원료로서 한약재 복합 추출물인 加味清肌散의 유효성을 평가하고자 하였다. 加味清肌散은 世醫得效方<sup>16)</sup>에 수록된 清肌散에 白鮮皮와 樺皮를 첨가한 것으로, 白鮮皮는 iNOS 억제 효능<sup>17,18)</sup>, 樺皮는 생리활성 효능<sup>19)</sup> 등이 이미 보고된 바 있다. 또한 구성 약물 중 甘草<sup>20)</sup>, 羌活<sup>21)</sup> 및 柴胡<sup>18)</sup>는 항산화 효능이 보고되었고, 荊芥는 NO 억제효능<sup>22)</sup>, 人蔘은 항산화 효능<sup>23)</sup>을 비롯하여 다양한 효능이 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 이들로 구성된 加味清肌散 역시 산화적 손상에 대하여 유의적인 결과가 나타날 것으로 기대되어 총 폴리페놀함량, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 라디칼, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 및 ROS 감소율을 측정하였으며, NO와 유관 염증 사이토카인 측정을 통해 항염증 효능도 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 기기

본 실험에 사용한 약재는 음니허브 (hallym farm, Daegu, Korea)에서 구입 하였으며, 대전대학교 RIC 난치성 면역질환의 동서생명의학연구소 (TBRC, traditional and biomedical research center)에서 확인 정선 후 사용하였다. 본 연구에 사용된 시약은 dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Welgene, Korea), dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Gibco, U.S.A.), 우태이혈청

(fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), anti-biotic (Gibco BRL Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS, Sigma, U.S.A.), cell viability assay kit (MTT solution, Daeillab sevice, Korea), nitric oxide detection kit (Intron, Korea), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH, Sigma), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma), isopropanol (Sigma Co., U.S.A.), gel red (Sigma Co., U.S.A.), agarose (FMC Co., U.S.A.), mouse cytokine milliplex map immunoassay kit (Millipore Co., U.S.A.), total RNA purification kit (GeneAll, Korea) 등을 사용하였다. 연구에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), CO<sub>2</sub> incubator (Forma scientific, U.S.A.), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), plate reader (Molecular Devices, U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan), freeze dryer (IIShin, Korea), flow cytometry system (BD biosciences, U.S.A.), Light Microscope (Carl Zeiss, Co., Germany) 등을 이용하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료의 제조

GCE의 구성 약재는 각 분량을 분쇄 혼합하여 80% 에탄올 1.5L에서 2시간 동안 80℃로 환류추출한 후 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액은 freeze dryer로 동결 건조하여 수율은 11.84%로 9.4 g의 분말을 얻었으며, 증류수에 용해시켜 연구에 사용하였다. 본 연구에서 사용한 시료는 Table 1의 분량으로 사용하였다.

Table 1. The prescription of GCE used in this study.

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	4
羌活	Osterici Radix	4
桔梗	Platycodi Radix	4
獨活	Araliae Continentalis Radix	4
薄荷	Menthae Herba	4
防風	Saposhnikoviae Radix	4
蟬退	Cicadidae Periostracum	4
柴胡	Bupleuri Radix	4
人蔘	Ginseng Radix Alba	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
赤茯苓	Red Poria cocos	4
前胡	Angelicae Decursivae Radix	4
枳殼	Aurantii Fructus Immaturus	4
天麻	Gastrodiae Rhizoma	4
荊芥	Schizonepetae Spica	4
樺皮	Betulae Cortex	8
白鮮皮	Dictamnii Radicis Cortex	8
Total amount		76

### 2) 세포독성 측정

마우스 유래 대식세포인 Raw 264.7 세포는 10% fetal bovine serum과 1% antibiotics (A/A)로 조성된 DMEM으로 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. 계대배양 횟수는 3 회 이상이 되었을 때 사용하였다. Raw 264.7 세포는 96 well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양한 후, GCE를 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 처리하

여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10  $\mu$ l의 MTT solution을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) 항산화 효능 측정

#### (1) 총 폴리페놀 함량 측정

GCE 1 ml에 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 ml를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 반응용액에  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  포화용액 1 ml와 증류수 7.5 ml 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 취해 96 well plate로 옮긴 뒤, 760nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준 물질로 이용하여 작성한 검량 선에 따라 시료의 총 폴리페놀 함량을 구하였으며 측정단위로는 GAE (gallic acid equivalent)/g을 사용하였다.

#### (2) ABTS 라디칼 소거율 측정

ABTS 용액은 7.4 mM ABTS가 되게 2.6 mM potassium persulphate에 용해시킨 후, 암소에서 16~24시간 동안 상온에 방치하여 양이온 ( $\text{ABTS} \cdot^+$ )을 형성시켰다.  $\text{ABTS} \cdot^+$  용액은 750nm에서 흡광도 값이  $0.7 \pm 0.03$ 이 되도록 희석하였다. 희석된  $\text{ABTS} \cdot^+$  용액과 GCE를 각각 1, 10, 100, 1000 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도가 되게 1:20의 비율로 혼합하였으며, 빛이 차단된 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### (3) DPPH 라디칼 소거율 측정

DPPH 용액은 0.2 mM이 되게 에탄올에 용해시켰다. 0.2 mM DPPH 용액과 GCE를 각각 1, 10, 100, 1000 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도가 되게 1:2.5의 비율로 혼합하였으며, 37°C, 암실에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율}(\%) = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

#### (4) DCF-DA를 이용한 Raw 264.7 세포 내 ROS 생성 측정

Raw 264.7 세포를 12 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well이 되게 분주하였다. 24시간 동안 배양한 후, GCE를 각각 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도와 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 모두 걷어 원심분리 후 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 세포에 10  $\mu\text{M}$ 의 DCF-DA를 첨가하여 15분 동안 37°C, 암소에서 염색하였다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 세척한 후 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리한 다음 상등액을 제거하고 다시 PBS 400  $\mu$ l를 넣어 부유시켰다. 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 ROS 생성 변화를 분석하였다.

#### (5) Nitric oxide (NO) 측정

NO는 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포는 96 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well로 분주하였고, 24시간 동안 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 의 조건으로 배양하였다. 배양 후, GCE를 각각 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도로 처리하고, LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. N1 buffer를 각 well에 50  $\mu$ l씩 처리하여 10분간 빛이 차단된 상온에서 반응 한 후, N2 buffer를 각 well에 50  $\mu$ l씩 처리하고 다시 10분간 빛이 차단된 상온에서 반응시켰다. 반응 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

### 4) 염증성사이토카인 측정

#### (1) Immunoassay

세포 내에서 염증성 사이토카인을 측정하기 위하여 luminex를 사용하였다. Raw 264.7 세포를 12 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 분주하였고, 24시간 동안 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 의 조건으로 배양하였다. 배양 후, GCE를 각각 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도로 처리하고, LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 원심분리 후 상등액으로 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 를 측정하였다.

#### (2) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT premix kit의 mixture (reaction buffer, dNTPs mixture, RNase inhibitor, stabilizer, oligo dT15 primer)를 사용하여 45°C heating block에서 60분, 95°C에서 5분 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. RT-PCR은 DNA polymerase 1U/tube에 250 mM dNTPs mix, RT buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 30 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ )를 포함한 mixture에 각 샘플과 primer를 넣고 PCR을 시행하였다 (Table 2). 2% agarose gel에 전기영동 하였으며, UV로 촬영하여 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 발현 정도를 확인하였다.

Table 2. The sequences of primers in used this study.

Primer	F/R	Sequences	Annealing (°C)
IL-1 $\beta$	F	GTTGACGGACCCCAAAGAT	62
	R	AAGGTCCAAGGGAAAGACAC	
IL-6	F	CCTACCCCAATTCCAATGC	59
	R	CGCACTAGGTTTGCCGAGTA	
TNF- $\alpha$	F	CTACTCCTCAGAGCCCCAG	59
	R	AGGCAACCTGACCACCTCTCC	
$\beta$ -actin	F	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT	61
	R	CCTAGAAGCACTTGCCTGTCACGATG	

### 5) 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며, 평균값 사이에 대한 유의성은 SPSS 11.0의 unpaired student's t-test를 사용하여  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  및  $P < 0.001$ 의 신뢰수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결 과

## 1. 세포생존율에 미치는 영향

GCE의 세포독성을 확인한 결과, 대조군을 100%로 하였을 때, GCE 1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 모두 세포독성을 나타내지 않았으며, 기존의 천연물 추출물의 세포독성 결과와의 비교 면에서도 안전한 것으로 평가되었다(Fig. 1).

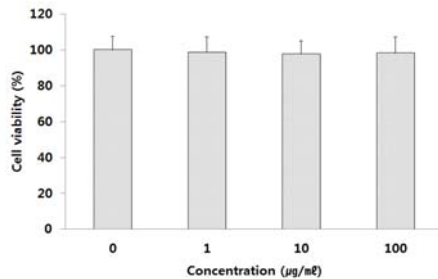


Fig. 1. The cell viability of the GCE in Raw 264.7 cells. Cells were treated with 1, 10 and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the GCE for 24hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean $\pm$ S.D. from three independent experiments.

## 2. 항산화 효능에 미치는 영향

### 1) 총 폴리페놀 함량

GCE의 총 폴리페놀 함량은 3회 이상 반복 측정하였으며, 그 결과 46,622 mg/g으로 나타났다(Table 3).

Table 3. The total phenolic contents of the GCE

Samples	Total phenolics (mg GAE <sup>a</sup> )/g ext.)
GCE	46,622 $\pm$ 0,571

<sup>a</sup>) The total phenolic contents was expressed as milligram of the gallic acid equivalent (GAE) per gram of extract.

### 2) DPPH 라디칼 소거율에 미치는 영향

GCE의 DPPH 라디칼 소거율을 측정한 결과, GCE 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 0.5%, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 2.8%, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 38.8%, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 92.7%의 소거율을 나타냈다(Fig. 2).

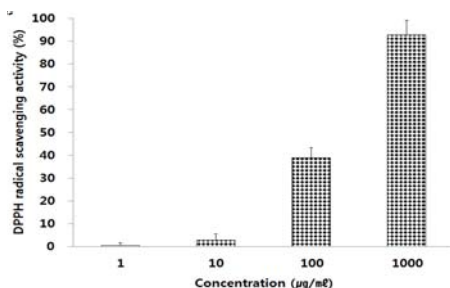


Fig. 2. The DPPH free radical scavenging activity of the GCE at 1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration. Extracts were incubated with the DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517nm. The results are expressed as mean $\pm$ S.D. from three independent experiments.

### 3) ABTS 라디칼 소거율에 미치는 영향

GCE의 ABTS 라디칼 소거율은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 0.5%,

10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 1.4%의 소거율을 나타냈으며, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 33.1%, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 89.4%의 소거율을 나타내었다(Fig. 3).

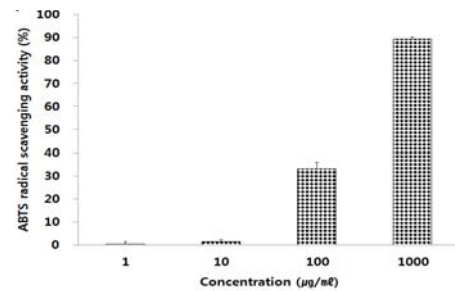


Fig. 3. The ABTS free radical scavenging activity of the GCE at 1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration. Extracts were incubated with the ABTS solution at RT for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 732nm. The results are expressed as mean $\pm$ S.D. from three independent experiments.

### 4) ROS 생성에 미치는 영향

GCE의 ROS 감소율은 대조군을 100%로 하였을 때, GCE 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 17.4% ( $P < 0.01$ ), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 20.9% ( $P < 0.05$ ), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 26.2% ( $P < 0.01$ )로 나타나 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 4).

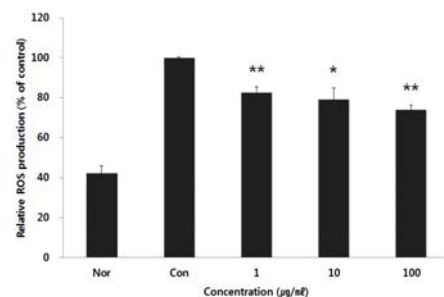


Fig. 4. Effect of the GCE on the ROS product in Raw 264.7. The cells were treated with different concentrations of the GCE and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24h. The ROS production was analyzed by FACS. Each value represent the mean $\pm$ S.D. from 3 independent experiments. (Significance of results, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )

### 5) NO 생성에 미치는 영향

GCE의 NO 감소율은 대조군을 100%로 하였을 때, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 6%의 미미한 감소를 나타냈지만, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 17.4% ( $P < 0.01$ )의 유의성 있는 감소를 나타냈으며, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 37.6% ( $P < 0.001$ )의 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 5).

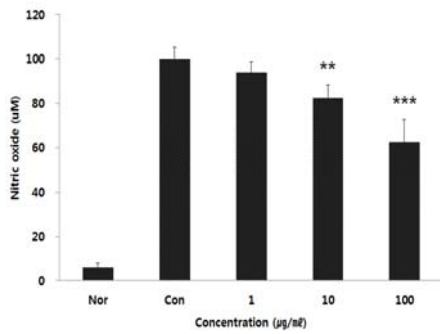


Fig. 5. The NO production of the GCE in Raw 264.7 cells. The cells was treated with 1, 10 and 100 µg/ml of the GCE and LPS (1 µg/ml) for 24hr. The amount of nitrate in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (Significance of results, \*\*P(0.01); \*\*\*P(0.001).

### 3. 염증성 사이토카인에 미치는 영향

본 연구에서 IL-1β 생성량은 대조군을 100%로 하였을 때, GCE 1 µg/ml 농도에서 35.4% (P<0.05), 10 µg/ml 농도에서 52.4% (P<0.01), 100 µg/ml 농도에서 56.1% (P<0.01)의 농도 의존적인 유의한 감소를 나타냈으며(Fig. 6-A), IL-6의 생성량의 경우 1 µg/ml 농도에서 37.7%의 감소를 나타냈고, 10 µg/ml 농도에서 52.1% (P<0.05), 100 µg/ml 농도에서 70.5% (P<0.01)의 농도 의존적인 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 6-B). 또한 TNF-α의 생성량의 경우 대조군에 비하여 1 µg/ml 농도에서 2.7%, 10 µg/ml 농도에서 9.9%의 감소를 나타냈으며, 100 µg/ml 농도에서 23.8% (P<0.05)의 농도 의존적인 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 6-C). RNA 수준에서의 IL-1β, IL-6, TNF-α의 발현 정도 측정에서도 역시 농도 의존적인 감소를 나타냈다(Fig. 6-A, B, C).

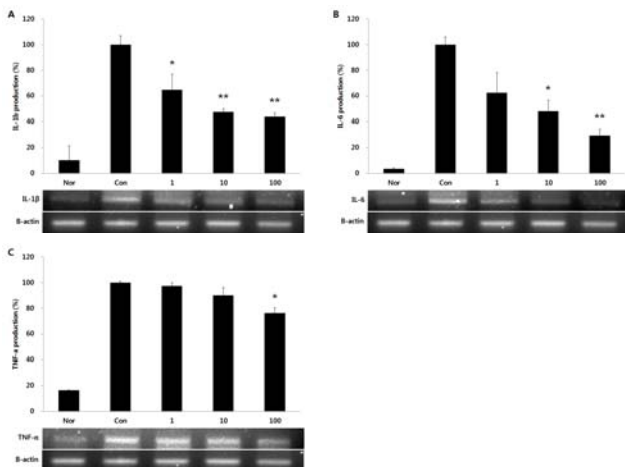


Fig. 6. Effect of GCE on LPS-induced IL-1β (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) production in Raw 264.7 cells. The cells was treated with 1, 10 and 100 µg/ml of the GCE in the presence of LPS (1 µg/ml) for 24hr. Cytokines was measured using a Luminex. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (Significance of results, \*P(0.05); \*\*P(0.01).

일반적으로 페놀계 물질들은 방향족 화합물들을 가리키는 것으로, 식물체에 특수한 색깔을 부여하고, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH)기를 가지며, 플라보노이드와 탄닌을 주성분으로 한다<sup>24,25</sup>. 또한 hydroxyl group은 유지의 유리기 수용체로서 유지 산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정된 화합물을 형성 하도록 하여 산화억제 작용을 하며<sup>26,27</sup>, 종류나 함량의 증가에 따라 항산화 활성에 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있다<sup>28</sup>. 현재 폴리페놀은 인체의 만성 질환을 예방하거나 개선하는데 활용되고 있고, 충치 예방, 고혈압 억제, 항에이즈, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있는데<sup>29,30</sup>, GCE의 총 폴리페놀 함량이 46.622 mg/g으로 확인 되었으며, 이는 GCE 내의 폴리페놀 성분이 항산화 작용에 기여할 것임을 시사하고 있다.

선행연구에 의하면 DPPH 라디칼은 산화된 형태에서 자유라디칼을 가지고 있기 때문에 전자공여체인 항산화제와 만나면 전자를 얻어 환원이 되며, 항산화 효능이 클수록 탈색의 정도가 크게 나타난다고 알려져 있다<sup>31,32</sup>. 본 연구에서 GCE의 DPPH 라디칼 소거율을 측정된 결과, 농도 의존적으로 소거됨을 나타내었고, 1000 µg/ml 농도에서는 92.7%의 소거율을 나타냈다. 이는 선행연구<sup>33</sup>에서 확인된 항산화제인 tocopherol 과 유사한 수준으로 라디칼 소거율을 나타낸 것으로써 높은 수준의 라디칼 소거능이 확인되었다.

ABTS 라디칼 소거율 측정 방법은 ABTS의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 감소되는 원리를 이용한 것으로, ABTS와 potassium persulphate를 혼합하여 생성된 ABTS·<sup>+</sup>가 항산화 물질에 의해 소거되면 특유의 색인 청록색이 탈색되는 원리를 이용한 것이다<sup>9,34</sup>. 또한 소수성과 친수성 시료 모두 측정이 가능하다는 점에서 유용하게 쓰인다<sup>35</sup>. GCE의 ABTS 라디칼 소거율은 농도 의존적으로 소거됨을 나타내었고, 1000 µg/ml 농도에서는 89.4%의 소거율을 나타내었다. 선행연구에서는 천연물의 페놀 화합물이 항산화에 중요한 역할을 하는 것으로, 라디칼 소거율은 폴리페놀 함량에 연관되어 증가한다고 보고되어져 있어<sup>28,32</sup>, 본 연구에서 측정된 폴리페놀 성분 함량과 ABTS와 DPPH 라디칼 소거율의 결과는 기존의 결과와 부합되어 유의적인 항산화능이 인정되었다.

ROS 감소율을 확인하기 위하여 사용된 Raw 264.7 세포는 마우스유래 대식세포주이며, 병원균의 내독소로 알려진 LPS에 의해 활성화되어 다양한 산화적 매개체뿐만 아니라 염증성 인자를 방출하는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>. ROS는 세포의 성장과 분화에 영향을 미치고 병원체 등을 공격하여 인체를 방어하는 작용도 하지만, 반면에 정상적으로 소거되지 않았을 때는 잔존하는 자유라디칼에 의해 산화적 스트레스를 일으키게 된다<sup>2</sup>. 세포내 생성된 ROS는 비형광을 나타내는 DCF-DA를 산화시켜 형광물질인 DCF로 전환시키는데 이렇게 전환된 형광물질의 양이 ROS의 양을 나타낸다<sup>37</sup>. 본 실험에서 GCE는 ROS를 농도 의존적으로 감소시켜 항산화와 연관된 다른 분석 실험 결과와 부합함으로써 세포대사의 이상, DNA손상과 단백질의 손상과 같은 산화적 손상 등을 억제하여 노화 방지와 더불어 세포 재생과 같은 효능을 발휘할 수 있을 것으로 기대된다.

체내에서 NO는 생리학과 병리학적인 관점에서 중요한 세포 내 신호분자로서 작용하여 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 하는 반

## 고찰

면, 산화적 스트레스로 인한 높은 수준에서의 NO 생산은 조직 및 신경의 손상을 일으키고<sup>38)</sup>, 유전자를 변이시키며<sup>39)</sup>, 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키는 등 과도한 염증 반응을 일으킨다<sup>9)</sup>. 본 실험에서 GCE가 농도 의존적으로 NO를 감소시킴으로 인하여 염증 반응으로 인한 조직의 손상 및 부종 완화도 감소시킬 수 있다는 것을 기대할 수 있어, 산화적 스트레스로 인한 염증 완화 효능을 나타낼 수 있는 가능성과 항산화 화장품의 원료로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다<sup>9)</sup>.

산화적 스트레스로 인하여 인체에 나타나는 피부 관련 질환의 대다수가 염증을 동반하는데, 이로 인해 노화가 촉진되며, 피부 질환이 더욱 악화되고, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6와 같은 염증성 사이토카인이 생성된다<sup>8,9)</sup>. IL-1 $\beta$ 는 대식세포를 활성화시키고, 림프구 및 호중구의 내피세포 접착을 항진시키며, 케모카인의 생성을 유도하여 염증 부위에 염증세포의 침윤을 상승시킨다<sup>40)</sup>. 또한 TNF- $\alpha$ 는 염증 반응 초기에 해당 부위로 호중구를 유도하며, 급성 염증 반응을 일으키고 악화시키는 인자이며<sup>41)</sup>, IL-6는 B림프구의 분화와 성장을 증가시키고 알레르기성 질병을 포함하여 염증성 질환을 만성적인 단계로 발달시킨다<sup>9,38)</sup>. 본 연구에서 GCE는 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 각각 IL-1 $\beta$ 는 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서, IL-6는 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서, TNF- $\alpha$ 는 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 유의한 감소를 나타냈다. 또한 RNA 수준에서의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 발현 정도 측정에서도 역시 농도 의존적인 감소를 나타냈다. 결과적으로 GCE가 염증 관련 사이토카인의 생성 억제를 통하여 다른 염증 세포들의 이주와 침윤을 비롯하여 활성화와 분화도 감소시킬 수 있음을 추정할 수 있었으며, 산화적 스트레스로 인한 염증 질환에도 유의적임을 객관적으로 확인할 수 있었다.

GCE의 기본방인 淸肌散은 아토피피부염 완화 효능<sup>42)</sup>, NO 생성 억제<sup>43)</sup>, Th2의 세포분화와 NF- $\kappa$ B의 억제<sup>44)</sup> 등에 대하여 이미 보고 된 바가 있다. 따라서 기본방 그리고 구성 약물 일부분과 가미 약물 모두 항염증과 항산화 효능<sup>17-23,42-44)</sup>이 보고된 바가 있어 GCE는 이들 약물간의 상호 작용으로 유의성 있는 항산화와 항염증 효능이 나타난 것으로 사료된다. 결과적으로 본 연구에서는 산화적 손상과 더불어 염증 관련 인자들의 변화에 대한 GCE의 효능을 검색하여 항산화와 항염증 효능을 일부 확인하였고, 이에 노화, 염증성 피부질환과 같은 증세의 치료제 또는 화장품 원료로서 GCE가 유용할 수 있음을 기초적 자료로서 제시하였다.

## 결론

피부 노화와 손상에 관련된 유의적인 소재 발굴을 위한 연구로 淸肌散에 임상에서 피부과 질환에 사용되고 있는 白鮮皮와 樺皮를 가미하여 항산화 활성화와 염증성 사이토카인의 감소 효능을 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 加味淸肌散의 총 폴리페놀 함량은 46.622 mg (GAE)/g으로 측정되었다.
2. 加味淸肌散의 ABTS 라디칼과 DPPH 라디칼의 소거율

은 1  $\mu$ g/ml와 10  $\mu$ g/ml의 농도에서는 미미한 소거능이 나타났으나, 100  $\mu$ g/ml와 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서는 현저한 라디칼 소거능을 나타내었다.

3. 加味淸肌散은 ROS 생성을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰고, NO 생성 역시 농도 의존적으로 감소시켰으며, 10  $\mu$ g/ml와 100  $\mu$ g/ml 농도에서는 유의성 있는 결과가 나타났다.
5. 加味淸肌散은 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성에서 농도 의존적으로 감소를 나타냈으며, 각각 IL-1 $\beta$ 는 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서, IL-6는 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서, TNF- $\alpha$ 는 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 유의한 감소를 나타냈다. 또한 RNA 수준에서의 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 발현 정도 측정에서도 역시 농도 의존적인 감소를 나타냈다.

결과적으로 加味淸肌散이 산화적 손상과 이와 관련된 염증성 사이토카인에 대하여 객관적으로 유의성 있는 효능을 발휘함으로써 향후 개별 약물에 대한 상호 비교 평가를 통한 최적 조합이 이루어질 경우 피부 노화와 손상에 관련된 유의적인 소재로써 응용 가능할 것으로 보인다. 아울러 기본방인 淸肌散이 피부 질환에 사용된다는 점에서 이러한 EBM (Evidence based medicine) 구축을 통하여 加味淸肌散 역시 임상에서 소양감을 동반한 다양한 피부 질환에 활용 가능할 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

## References

1. Bice F, Adrea H, Serial Review: Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS/RNS) in Lung Injury and Diseases, *Free Radic Biol Med*, 2013 ; 34(12) : 1507-16.
2. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage, *Oncogene*, 1999 ; 18(54) : 7719-30.
3. Wakamatsu TH, Dogru M, Ayako I, Takano Y, Matsumoto Y, Ibrahim OM, Okada N, Satake Y, Fukagawa K, Shimazaki J, Tsubota K, Fujishima H, Evaluation of lipid oxidative stress status and inflammation in atopic ocular surface disease, *Mol Vis*, 2010 ; 16 : 2465-75.
4. Kastle M, Grune T. Protein oxidative modification in the aging organism and the role of the ubiquitin

- proteasomal system, *Curr Pharm Des*, 2011 ; 17(36) : 4007-22.
5. Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress, *Arch Biol Med Exp (Santiago)*, 1998 ; 21(1) : 85-92.
  6. Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis, *J Atheroscler Thromb*, 2009 ; 16(5) : 532-8.
  7. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas, *J Biol Chem*, 1989 ; 264(14) : 7761-4.
  8. Shon MS, Song JH, Kim JS, Jang HD, Kim GN. Anti-oxidant activity of oil extracted from Korean Red Ginseng and its moisturizing function, *Kor J Aesthet Cosmetol*, 2013 ; 11(3) : 489-94.
  9. Lee HJ, Sim BY, Bak JW, Kim DH. Effect of Gami-sopungsan on Inflammation and DNCB-induced Dermatitis in NC/Nga in mice, *Kor J Orient Physiol Pathol*, 2014 ; 28(2) : 146-53.
  10. Kuramoto T. Development and application of food materials from plant extracts such as SOD. Up to date Food Processing, 1992 ; 27 : 22-3.
  11. McCord JM. Oxygen-derived radicals; a link between repercussion injury and inflammation, *Fed Proc*, 1987 ; 46 : 2402-6.
  12. Rhim TJ, Jeong HS, Kim YJ, Kim DY, Han YJ, Kwon HY, Kwon KB. A study on the comparison of antioxidant effects among cultivated ginseng, and cultivated wild ginseng extracts, *Kor J inst pharm*, 2009 ; 12(2) : 7-12.
  13. Hong SC, Jun JA, Kim DH. Comparative Study of Antioxidant abilities on *Prunus yedoensis* and *Betula platyphylla* var. *japonica*, *Kor J Orient Physiol Pathol*, 2013 ; 27(4) : 391-9.
  14. Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Choi JW, Jung JH, Park SD. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of *Draconis Resina* in Mouse Macrophage Cells, *Kor J Herbology*, 2008 ; 23(2) : 179-92.
  15. Park JS. Walnut Husk ethanol extract possess antioxidant activity and inhibitory effect of MMP-1 expression induced by tumor necrosis factor alpha in human keratinocyte, *Kor J Aesthet Cosmetol*, 2013 ; 11(4) : 715-9.
  16. Wei YL, Shi yi de xiao fang, Shang hai ke xue ji shu chu ban she, 1997 : 962.
  17. Park JS, Shin TY, Kim DK, Lee JH. The Effects of *Dictamni Radicis Cortex* on the iNOS Expression and Proinflammatory Cytokines Production, *Kor J Pharmacogn*, 2011 ; 42(4) : 348-53.
  18. Kwon JW, Lee EJ, Kim YC, Lee HS, Kwon TO. Screening of Antioxidant Activity from Medicinal Plant Extracts, *Kor J Pharmacogn*, 2008 ; 39(2) : 155-63.
  19. Im DY. Volatile Compounds Analysis of the Extract from Dried Bark of *Prunus sargentii* and Physiological Activity of the Main Compound, Benzaldehyde, *Kor J Aesthet Cosmetol*, 2014 ; 12(2) : 155-62.
  20. Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. Investigation of Antioxidative Activity and Stability of Ethanol Extracts of Licorice Root (*Glycyrrhiza glabra*), *Kor J Food Sci Technol*, 2006 ; 8 : 584-8.
  21. Kim SJ, Kim HK, Chun JM, Yang WK, Cheon MS, Sung YY, Park JY. Synergistic Effect of *Notopterygium incisum* with *Clematis manshurica* in the Anti-inflammatory Activity, *Kor J Herbology*, 2010 ; 25(4) : 11-6.
  22. Hwang EY, Kim DH, Kim HJ, Hwang JY, Park TS, Lee IS, Son JH. Antioxidant Activities and Nitric Oxide Production of Medicine Plants in Gyeongsangbukdo (*Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, *Paeonia lactiflora*). *J Appl Biol Chem*, 2011 ; 54(3) : 171-7.
  23. Song JH, Shon MS, Kim HO, Kim JS, Kim ES, Kim GN. Anti-oxidant Activity of Oil Extracted from Ginseng Seed, *Kor J Aesthet Cosmetol*, 2014 ; 12(2) : 235-40.
  24. Bengmark S, Mesa MD, Gil A. Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids, *Nutr Hosp*, 2009 ; 24 : 273-81.
  25. Kumar S, Kuma D, Manjusha, Saroha K, Singh N, Vashishta B. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad, methanolic fruit extract, *Acta Pharm*, 2008 ; 58 : 215-20.
  26. Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CK, Jeon YJ, Kim SH. Antioxidative activities of dried and fresh citrus peels in jeju, *Kor J Food Cookery Sci*, 2010 ; 26(1) : 88-94.
  27. Jang TO, Yoo YH, Hwang YC, Kim HK, Woo HC. Total polyphenol content and antioxidative activities of mistletoe (*Viscum album*) extracts by supercritical carbon dioxide, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2010 ; 39(1) : 20-4.
  28. Kim HW, Kim BJ, Lim SH, Kim HY, Lee SY, Cho SI, Kim YK. Anti-oxidative Effects of *Taraxaci Herba* and Protective Effects on Human HaCaT Keratinocyte, *Kor J Herbology*, 2009 ; 24(3) : 103-8.
  29. Lee IR, Kim YH, Jeong GJ. Studies on the Pharmacological Actions and Biological Active Components of Korean Traditional Medicine -The Components of Antitumor and Antimicrobial Activity from *Duchesnea indica*, *J Pharm Soci*, 1987 ; 31 : 230-5.
  30. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability, *Am J Clin Nutr*, 2004 ; 79 :

- 727-47.
31. Kim MJ, Park EJ. Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *Kor J Soc Food Sci Nutr*. 2011 ; 40(7) : 1053-62.
  32. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. *Kor J Food Sci Technol*. 2005 ; 37(2) : 233-40.
  33. Park SD, Moon JY. Antioxidative activity of Sihosamultang methanol extract. *Kor J Herbology*. 2001 ; 16(1) : 29-40.
  34. Hwang EY, Kim DH, Kim HJ, Hwang JY, Park TS, Lee IS, Son JH. Antioxidant Activities and Nitric Oxide Production of Medicine Plants in Gyeongsangbukdo (*Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, *Paeonia lactiflora*). *J Appl Biol Chem*. 2011 ; 54(3) : 171-7.
  35. Park DJ, Lee JC. A Study on the Antioxidative and Depigmentation Activities of the Ethanol Extract of *Saururus Herba*. *Kor J Herbology*. 2008 ; 23(2) : 193-202.
  36. Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun KJ, Lee KT. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF- $\kappa$ B inactivation in Raw 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int Immunophar*. 2008 ; 8 : 431-41.
  37. Choi WH, Oh YS, Ahn JY, Kim SR, Ha TY. Antioxidative and Protective Effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* Extracts on Glutamate-Induced Cytotoxicity in PC 12 Cells. *Kor J Food Sci Technol*. 2005 ; 37(3) : 479-83.
  38. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006 ; 2: S3
  39. van Triel JJ, Arts JH, Muijser H, Kuper CF. Allergic inflammation in the upper respiratory tract of the rat upon repeated inhalation exposure to the contact allergen dinitrochlorobenzene (DNCB). *Toxicology*. 2010 ; 269(1) : 73-80.
  40. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology sixth edition. London : Mosby. 2002 : 119,128,441.
  41. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*. 1992 ; 258 : 1957-9.
  42. Son DB, Seo ES, Yun CS, Kim NK, Hwang CY. Effects of Chunggi-san Administration along with Samhwangseze-gamibang on NC/Nga Atopic Mice. *Kor J Orient Physiol Pathol*. 2008 ; 22(5) : 1168-77.
  43. Ahn SH, Kim HH, Kim JT. Chunggi-san inhibits atopy dermatitis in NC/Nga mouse through regulation of iNOS mRNA expression & NO production. *Kor J Orient Physiol Pathol*. 2007 ; 21(5) : 1092-8.
  44. Ku YH, Hong SU. Therapeutic Effects of Cheonggisang Extract on Th2 cell differentiation and NF- $\kappa$ B p65 activation. *J Kor Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2007 ; 20(3) : 63-70.