

상항버섯, 감초 복합추출물의 항산화 및 인체적용 아토피 개선 효능 연구

권오준^{1#}, 이아름², 도국배^{3*}

1 : 경북지역사업평가단, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학 교실, 3 : (주)메디웨이코리아 피부과학연구소

Anti-oxidant Activities and Anti-atopic Dermatitis Effect of Combined Extract of *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis*

OJun Kwon^{1#}, AhReum Lee², KookBae Do^{3*}

1 : Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation, Republic of Korea

2 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

3 : Mediway Korea CO, LTD, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : This study investigated the anti-oxidant activities and improving effect of *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis* Extract (PGE) on Atopic Dermatitis.

Methods : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) radical, Hydrogen peroxides scavenging activities and Superoxide dismutase (SOD)-like activities were used for the measurement of anti-oxidant ability. Cytotoxicity of PGE in Raw 264,7 cell was evaluated by MTT assay. To evaluate the anti-atopic dermatitis effect of PGE, a total of 33 patients with atopic dermatitis were observed trans epidermal water loss, skin moisture content, modified SCORAD index of atopic dermatitis and pruritic degree after applying the PGE for 4 weeks.

Results : PGE scavenged DPPH (IC₅₀=25ppm) effectively, ABTS and Hydrogenperoxides scavenged similar to BHA. As for the SOD-like activity, it had lower effect than ascorbic acid, but it comparable activities in 500ppm. There was no cytotoxicity at PGE at concentrations of 10,000ppm. In clinical research about PGE on patients with atopic dermatitis, skin condition was improved. After 4 weeks, the application of PGE increased skin moisture content from 19.43 to 31.22. Moreover, it reduced the skin temperature (from 32.5 to 31.9), skin pH (from 5.39 to 5.22), trans epidermal water loss (from 39.03 to 24.46) and pruritus score (from 6.07 to 3.87). In addition, the Modified SCORAD index decreased from 31.28 to 20.3.

Conclusions : In conclusion, PGE possesses anti-oxidant and anti-atopic dermatitis activities, thus it could be potentially valuable as anti-atopic dermatitis material.

Key words : *Phellinus linteus*, *Glycyrrhiza uralensis*, anti-oxidation, cytotoxicity, anti-atopic dermatitis

I. 서 론

아토피 피부염 (atopic dermatitis)은 주로 유아와 소아기에 발병하는 만성 재발성 피부염으로서, 주로 극심한 소양감과 피부 건조증, 홍반, 삼출 등을 동반하는 피부 질환이다. 특히,

극심한 소양감으로 인하여 피부를 긁는 행위를 반복하게 되고, 피부를 긁음으로써 피부에 상처가 유발되고 이를 통하여 다시 소양감이 나타나게 되는 "itch-scratch-itch"의 반복을 통하여 피부의 염증이 심해지는 악순환이 나타나게 된다. 피부를 긁음으로써 피부 장벽의 손상이나 2차 감염이 유발되고, 피부의

*Corresponding author : Kook Bae Do, Mediway Korea CO, LTD, Republic of Korea

· Tel : +82-53-955-2225

#First author : OJun Kwon, Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation, Republic of Korea

· Tel : +82-53-818-9504 · E-mail : ojkwon@korea.kr

· Received : 10 February 2017 · Revised : 28 February 2017 · Accepted : 15 March 2017

두께가 증가하는 태선화가 나타나게 된다. 주로 5세 이하의 영유아에서 발병하며, 약 10-20%의 유병률을 지니는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 성인이 되면서 그 발병률이 감소하는 것으로 나타나고 있으나, 성인에서도 1-3%의 유병률을 보여 전체 인구 중 약 2-5%가 아토피 피부염을 앓고 있다고 보고 되어 있다^{1,2)}.

아토피 피부염의 원인과 발병기전은 아직까지 정립되지 않고 있다. 현재까지의 연구결과에 의하면 아토피 피부염은 유전적인 요인, 환경적인 요인³⁾, 피부 장벽의 이상⁴⁾ 등 다양한 요인이 복합적으로 작용하고 있다. 아토피 피부염은 일반적으로 IgE 합성의 증가와 호산구 증가증이 나타나는데 기존의 면역학적 연구에 의하면 IL-4, IL-5와 같은 Th2 cytokine이 증가하고 Th1 cytokine인 IFN- γ 의 분비가 감소하는 것과 관련이 있는 것으로 보고되었으며^{5,6)}, 이러한 Th1과 Th2의 불균형을 조절하는 방법으로 피부염의 치료에 접근하고 있다^{7,8)}.

현재 판매되고 있는 아토피 크림은 항염작용과 소독작용이 있는 tea tree, lavender, chamomile-roman으로 구성된 아로마 오일과 보습작용이 있는 베이스 크림으로 만든 외용제로 아토피 피부염의 염증을 줄여주는 역할을 한다⁹⁾.

본 연구에서는 상황버섯 감초 복합 추출물의 항산화 효과 및 세포독성을 검증하여 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고, 아토피 피부염 환자들에게 상황버섯 감초 복합 추출물을 함유한 리포솜 로션을 적용하여 안전성 및 안정성이 우수한 아토피 피부 개선化妆품을 개발하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출

본 실험에서 사용된 상황버섯 감초 복합 추출물 소재인 상황버섯은 경북 청도군 소재의 바이오길드에서 구입하였고, 감초는 경북 영천시 소재의 동우당 제약(주)에서 구입하여 사용하였다. 에탄올 추출물은 80% 에탄올을 시료의 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 추출물은 원심분리 및 여과, 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

2. 실험 세포

마우스 대식 세포주인 RAW 264.7 세포는 american type culture collection (ATCC, Rockville, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. Raw 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 DMEM을 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

3. 시약 및 기기

항산화능 검증 실험에 사용된 시약인 1 - 1 - diphenyl - 2 - picryl hydrazyl (DPPH), Pyrogallol, 2,2' - azino - bis (3 - ethylbenzothiazoline - 6 - sulfonic acid)(ABTS), hydrogen peroxide, potassium persulfate, Butylated

hydroxyanisole, ascorbic acid, 3 - [4,5 - dimethylthiazol - 2 - yl] - 2,5 - diphenyl - tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 UV/vis spectrophotometer (Hitachi, Japan), Rotary vacuum evaporator (Rikakikai Co., Japan), Centrifuge (Hitachi, Japan), Freeze drier (Ilsin, Korea), CO₂ Incubator (Hanbaek Scientific Co., Korea), B.O.D Incubator (Hanbaek Co., Korea), Autoclave (Hanbaek Scientific Co., Korea), ELISA reader (Bio Rad, Japan), Multi - Tube Centrifuge (Vision Scientific Co., LTD Korea)을 사용하였다.

피부 임상실험에서는 Corneometer (CM825; CK Electronics, Germany), Tewameter (TM300; CK Electronics, Germany), Skin Thermometer (ST500; Courage-Khazaka electronic GmbH, Germany), Skin pH meter (PH905; Courage-Khazaka electronic GmbH, Germany)를 사용하여 측정하였다.

4. 항산화 효능 측정

1) 전자공여능 측정

전자공여능 (EDA : Electron Donating Abilities)은 Blois 등의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 각 시료용액 100 μ l에 0.2 mM의 DPPH 용액 50 μ l를 넣고 교반한 후 30분 간 실온에서 반응한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁰⁾.

2) ABTS 라디칼 저해 활성 측정

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+ \cdot cation decolorization assay 방법에 의하여 측정하였다. 7mM ABTS와 2.4mM potassium persulfate를 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+ \cdot 을 형성시킨 후 ethanol로 희석 하여 ABTS+ \cdot 100 μ l 에 시료 100 μ l를 가하여 1분 동안 방치한 후 734nm에서 흡광도를 측정 하였다¹¹⁾.

3) Hydrogen peroxides 소거능 측정

Hydrogen peroxides 소거능 측정은 Gulcin 등의 방법에 따라 측정하였다¹²⁾. 희석한 시료 500 μ l와 40 mM hydrogen peroxide 500 μ l를 가한 후 37°C에서 10분 동안 반응시켜 230nm에서 흡광도를 측정하여 소거능을 측정하였다.

4) Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund 등의 방법을 변형하여 측정하였다¹³⁾. 각 시료용액 20 μ l에 Tris-HCl 완충용액 (50 mM tris + 10 mM EDTA 2Na, pH 8.5) 260 μ l와 7.2 mM pyrogallol 20 μ l를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 5 N HCl 10 μ l를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다.

5. 세포 생존율 측정

1) 세포 배양

본 실험에 이용한 RAW 264.7 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

2) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법에 따라 측정하였다. Raw 264.7 cell을 96 well plate에 0.6-8×10³ cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO : Ethanol (1 : 1) 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분 간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

6. 아토피 피부 개선 효과

1) 아토피 피부 개선 액정 리포솜 로션 제조

상황버섯 감초 복합 추출물을 첨가한 라멜라 액정을 넣어 9,000 rpm에서 25분간 Ultra-mixer (Woowon, Korea)를 이용하여 균일한 액정 리포솜 로션을 제조하였다.

2) 피험자 평가부위 및 측정방법

실험은 2-65세의 아토피 피부 증상을 가지는 자를 대상으로 35명 계획하여, 35명이 시험 참여하였으나 2명이 중도 탈락하여 33명의 결과를 얻을 수 있었다.

시험에 참여한 모든 피험자에게 시험제품을 4주 동안 하루에 두 번씩 병변부위에 도포하도록 하였으며, 제품 사용 전과 사용 4주 후의 병변부위를 촬영한 사진으로부터 아토피 증상이 개선되는 것을 확인하였다.

기기적 평가 대상 부위는 아토피 증상이 있는 부위로서, 전완부 (전주와 주름선의 약 2-3 cm 상측 또는 하측부위)를 주 측정부위로 하였다. 피험자의 전완부에 아토피 증상이 없는 경우는 슬와 주름선의 약 2-3 cm 상하측부위 또는 신체 기타 부위를 측정부위로 하였다. 기기적 평가를 위하여 피험자는 측정 부위를 물로 씻은 후 실내온도 20-25°C, 습도 40-60%의 항온항습조건의 화장품 임상평가실에서 30분 간 안정을 취하여

피부표면 온도와 습도를 측정공간의 환경에 적응하게 하였으며, 안정화는 동안의 수분섭취는 제한하였다. 객관적 측정을 위하여 동일한 연구자가, 제품사용 전과 제품 사용 4주 후에 동일한 부위를 측정하였다. 임상시험 프로토콜 (OMISC-CS-09)은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 임상시험심사위원회에서 임상연구의 필요성, 과학성 및 윤리성에 관하여 심사한 후 진행하였다.

3) 피부수분함유량 측정

리포솜 로션의 피부수분함유량을 측정하기 위하여 Corneometer를 이용하였는데, 측정원리는 probe에서 전류를 보내면 피부의 수분 함유량에 따른 피부의 전기전도도가 probe head에 남아 있는 절연이온 값으로 수치화되어 나타낸다. 본 실험에서는 정확한 측정치를 얻기 위해 상황버섯 감초 복합 추출물을 포함한 리포솜 로션을 적용 전 측정부위를 세척 후 30분 후에 측정하고, 상황버섯 감초 복합 추출물 사용 4주 후 시점 측정부위 세척 후 30분 후에 시험부위를 각각 5번씩 측정하였다.

4) 경피수분손실량 측정

경피수분손실량의 측정은 Tewameter를 이용하여 측정하였는데, Tewameter probe의 온도와 습도 sensor가 측정 부위의 단위 면적 당 시간 경과에 따른 수분 증발 양을 측정하였다. 본 실험에서는 정확한 측정치를 얻기 위해 시제품 적용 전 측정부위를 세척 후 30분 후에 측정하고, 시제품 적용 4주 후 시점 측정부위 세척 후 30분 후에 시험부위를 각각 5번씩 측정하였다.

5) 피부 온도 및 pH 측정

피부 온도는 Skin Thermometer를 사용하였고, 피부 pH는 Skin pH meter를 사용하여 각각 1회씩 측정하였다.

6) Modified SCORAD Index

성인 아토피 피부염은 팔꿈치와 오금의 굴곡부, 목의 양측, 얼굴 등에 주로 나타나므로 본 시험에서는 연구자가 육안으로 관찰하여 피험자의 머리 (목 포함), 양측 팔과 다리에 대해서만 아토피 증상 부위의 면적과 증상의 정도를 평가하였다. 또한 주관적인 아토피 증상 정도, 증상 부위의 면적정도 및 가려움증과 수면장애 정도를 평가하였으며, 다음 수식에 따라 Modified SCORAD Index를 구하고, 시험제품 사용전후를 비교함으로써 아토피 증상 개선도를 평가하였다(Table 1.).

Table 1. Modified SCORAD Index

$$\text{Modified Scorar Index(MSI)} = \text{ES}/5 + 7 \times (\text{IS}/2) + \text{SS}$$

Extent Score(ES) : Σ (atopic area of the measurement range (%) × Area transmutation constant)

measurement range	head	arm	leg
Area transmutation constant	0.045	0.045	0.090

Intensity score(IS): Objective degree of symptoms on atopic dermatitis such as erythema, edema exudative inflammation.
Subjective symptom Score(SS) : Subjective degree of itching and sleep disorder.

7) 피험자의 주관적인 가려움증 정도 평가

상황버섯감초복합추출물을 포함한 리포솜 로션을 사용하기

전과 후에 피험자가 느끼는 가려움증의 정도를 아래와 같은 10 cm 선분 위에 피험자 또는 보호자가 직접 표시하도록 하고,

그 길이를 측정하였다. 시험제품 사용 전 후의 가려움증 정도를 표시한 선분의 길이를 비교하여 가려움증 개선도를 평가하였다(Fig. 1.).

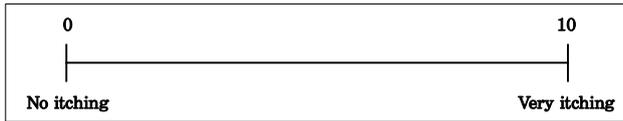


Fig. 1. Scoring methods of subjective degree on itching

Ⅲ. 결 과

1. 항산화 효과 측정

1) 전자공여능 측정

DPPH 라디칼을 이용한 항산화능 측정법은 주로 phenolic 구조와 aromatic amine 화합물에서 많이 사용되는 방법이다. 활성산소는 생체막 구성성분을 파괴하며 각종 산화작용을 나타내는 데, 본 실험에서는 이를 소거 할 수 있는 능력을 알아 보기 위하여 DPPH 라디칼 소거능 실험법을 사용하였다. 실험에 사용된 DPPH는 안정한 자유 라디칼로서 시료가 항산화 활성을 갖고 있다면, DPPH가 갖고 있는 free radical의 비공유결합을 소거하여 DPPH의 환원성을 높일 것이고, 보라색의 DPPH가 환원이 많이 될 수록 보라색을 잃게 되어 측정 시 그 수치도 낮아진다. 가시적인 DPPH의 보라색은 안정해진 분자의 몰수에 비례하여 노란색으로 변하게 된다. 이러한 DPPH는 dioxane이나 CCl_4 와 같은 비극성 용매 내에서는 2차, 3차 산화 반응이 일어나기도 하나지만 alcohol 용액 내에서는 비교적 안정하다¹⁴⁾.

상황버섯 감초 복합 추출물의 전자공여능을 측정된 결과, 25 ppm에서 IC_{50} 값을 나타내었고, 농도 50 ppm 이상에서는 대조군 BHA와 유사한 활성을 나타내어 우수한 전자공여능을 확인할 수 있었다. 따라서 현재 합성 항산화제로 사용되고 있는 BHA를 상황버섯 감초 복합 추출물이 대체 할 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 2).

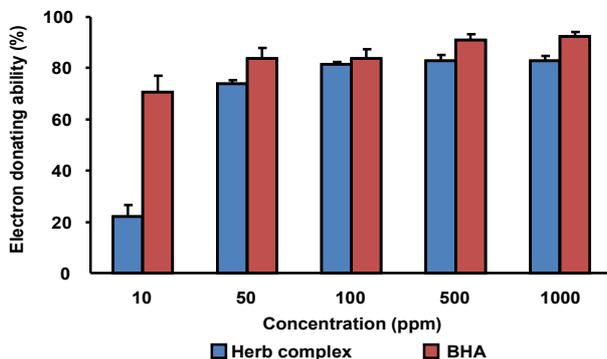


Fig. 2. Electron donating ability of herb complex.
Herb complex : Combined Extract of *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis*
BHA : butylated hydroxyanisole.

2) ABTS 라디칼 저해 활성 측정

DPPH radical의 소거활성과 같이 일반적으로 많이 사용

되는 ABTS radical cation 소거능은 ABTS와 potassium persulfate와의 반응으로 ABTS+radical이 생성되면 특유의 색인 청록색을 띄게 되는데, 시료를 첨가함에 따라 연한녹색으로 decolorization 되는 것을 측정하는 방법이며, hydrogen-donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정 할 수 있다. 추출한 상황버섯 감초 복합 추출물의 ABTS+라디칼 소거능을 측정된 결과, 농도가 40 ppm일때 80%이상의 소거능을 보였고, 100 ppm 이상의 농도에서는 대조군인 BHA와 유사한 소거능을 보여 항산화 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

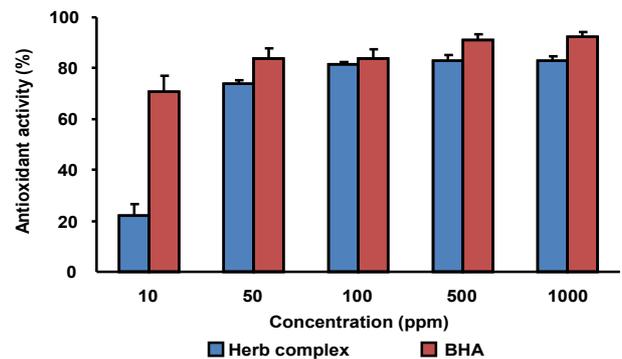


Fig. 3. ABTS radical scavenging activity of herb complex.
Herb complex : Combined Extract of *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis*
BHA : butylated hydroxyanisole.

3) Hydrogen Peroxide 저해 활성 측정

상황버섯 감초 복합 추출물의 hydrogen peroxide 저해 활성을 측정된 결과, 농도가 증가하면 할수록 소거능도 증가함을 볼 수 있고, 대조군인 BHA와 같은 농도에서 유사한 소거능을 가지고 있음을 확인하였다 (Fig. 4).

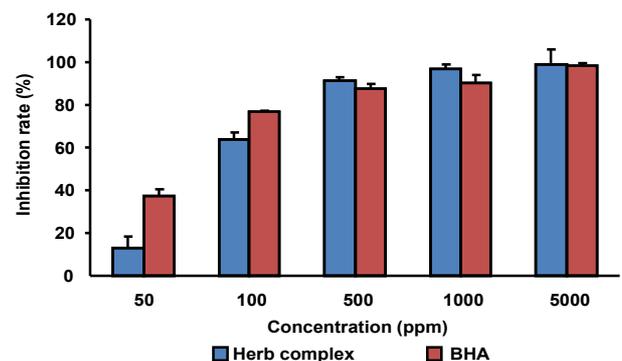


Fig. 4. Hydrogen peroxide scavenging activity of herb complex.
Herb complex : Combined Extract of *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis*
BHA : butylated hydroxyanisole.

4) SOD 유사활성 측정.

활성산소를 제거하는 대표적인 효소인 Superoxide dismutase는 체내에 필요 이상의 활성산소가 생겼을 때 이것을 중화하는 작용을 하는 물질로 세포에 유해한 환원 산소종을 과산화수소로 전환 시키는 반응을 촉매하는 효소이다. SOD에 의해 생성된 H_2O_2 는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환시켜 산소 상해로부터 생체를 보호

하는 기능으로 알려져 있다^{15),16)}. 또한 SOD는 비교적 우수한 항산화 효과를 나타내기 때문에 의약제재로서 많은 관심을 일으키고 있으며, 현재 항염증제제나 피부 노화방지를 위한 미용제재로 화장품 등에 이용이 되고 있다¹⁷⁾. 상황버섯 감초 복합추출물의 SOD 유사활성을 측정할 결과는 Fig. 5와 같다. 대조군인 ascorbic acid에 비해 다소 활성이 떨어지지만 500 ppm 이상에서는 유사한 활성을 보여 천연추출물로서 우수한 SOD 유사활성을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

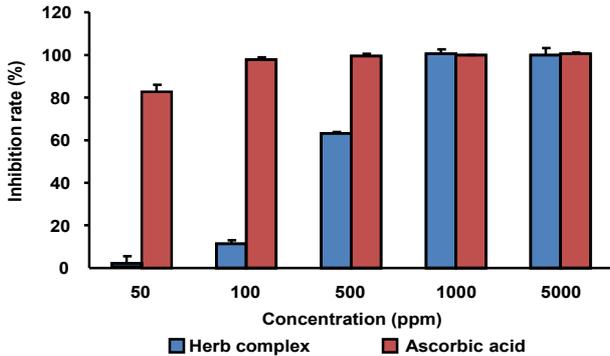


Fig. 5. SOD – like activity of herb complex.
Herb complex : Combined Extract of *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis*

2. 세포 생존율 측정

세포 생존율을 확인하기 위한 MTT assay는 ELISA reader (multi well microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있는 방법 중의 한 방법이다¹⁸⁾. 세포의 대사과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 되면, 이는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것이다¹⁹⁾.

상황버섯 감초 복합 추출물에 의한 Raw 264,7 세포의 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과, 모든 농도에서 세포에 영향을 미치지 않아 세포에 의한 독성은 거의 없는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

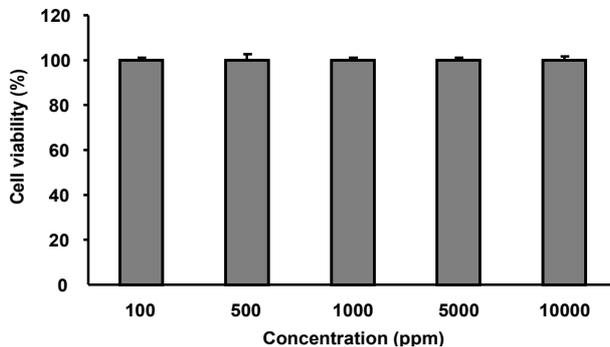


Fig. 6. Cell viability of herb complex on mouse macrophage Raw 264,7 cells.
Herb complex : Combined Extract of *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis*
Results are expressed as means ± S.D. of triplicate data.

3. 아토피 개선 효능 평가

1) 피부수분함유량 측정 결과

리포좀 로션 사용 전후의 피부수분함유량을 측정한 결과를 Table 2.과 같이 나타내었다. 아토피 피부의 경우 피부장벽의 붕괴와 세라마이드 합성의 감소로 인해 정상피부보다 피부수분함유량이 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있는데, 본 연구에서 개발된 리포좀 로션을 사용하기 전 피부 수분 유량은 19.43인데, 4주 동안 상황버섯감초복합추출물 리포좀 로션을 사용 후 피부수분함유량은 31.22로 나타나 피부에 수분함유량이 증가된 것을 볼 수 있고, 정상인 수분함유량과 유사한 값을 가져 정상피부로 개선된 것을 확인할 수 있었다 (Table 2.).

2) 경표피 수분손실량 측정 결과

상황버섯감초복합추출물 리포좀 로션 사용 전 후의 경표피 수분손실량을 측정한 결과, 리포좀 로션을 사용하기 전 경표피 수분손실량은 39.03인데, 4주 후 리포좀 로션을 사용 후 측정된 결과 24.46으로 감소하는 것을 볼 수 있어서 아토피 피부의 경표피 수분손실량이 개선되었다는 것을 확인할 수 있었다 (Table 2.).

3) 피부 온도 측정 결과

상황버섯감초복합추출물 리포좀 로션 사용 전 후의 피부 온도를 측정한 결과, 리포좀 로션을 사용하기 전 피부 온도는 32.5인데, 4주 후 리포좀 로션을 사용 후 측정된 결과 31.9로 감소되었다 (Table 2.).

4) 피부 pH 측정 결과

피부 pH를 측정한 결과를 Table 2.과 같이 나타내었다. 본 연구에서 개발된 리포좀 로션을 사용하기 전 피부 pH는 5.39인데, 4주 후 리포좀 로션을 사용 후 측정된 결과 5.22로 감소되었다 (Table 2.).

Table 2. Changes in skin condition of patients with atopic dermatitis after applying the PGE for 4 weeks.

Weeks	0	4
Moisture content	19.43	31.22
Transepidermal water loss	39.03	24.46
Temperature (℃)	32.5	31.9
pH	5.39	5.22

5) 아토피 증상 정도 평가 결과

리포좀 로션 사용 전후의 아토피 증상 정도인 Modified SCORAD Index (MSI)를 평가한 결과, 본 연구에서 개발된 리포좀 로션을 사용하기 전 MSI는 31.28인데, 4주 후 측정된 결과 20.30으로 감소되어, 아토피 증상 정도가 개선됨을 알 수 있었다 (Table 3.).

6) 가려움증 정도 평가 결과

리포좀 로션 사용 전 후의 가려움증 정도를 평가한 결과, 본 연구에서 개발된 상황버섯감초복합추출물 리포좀 로션을

사용하기 전의 가려움증 정도는 6.07인데, 4주 후 리포좀 로션을 사용 후 측정된 결과 3.87로 감소되어, 아토피 증상으로 인한 가려움증 정도가 개선됨을 알 수 있었다 (Table 3.). 또한 임상시험 대상자들은 4주 후의 방문에서 병변 부위의 호전을 보였고, 피험자의 주관적인 평가와 아토피 피부증상 등 모두 호전 또는 개선되었음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 7.)

Table 3. Modified SCORAD Index and pruritus score after applying the PGE for 4 weeks.

Weeks	0	4
Modified SCORAD Index	31.28	20.30
Pruritus score	6.07	3.87

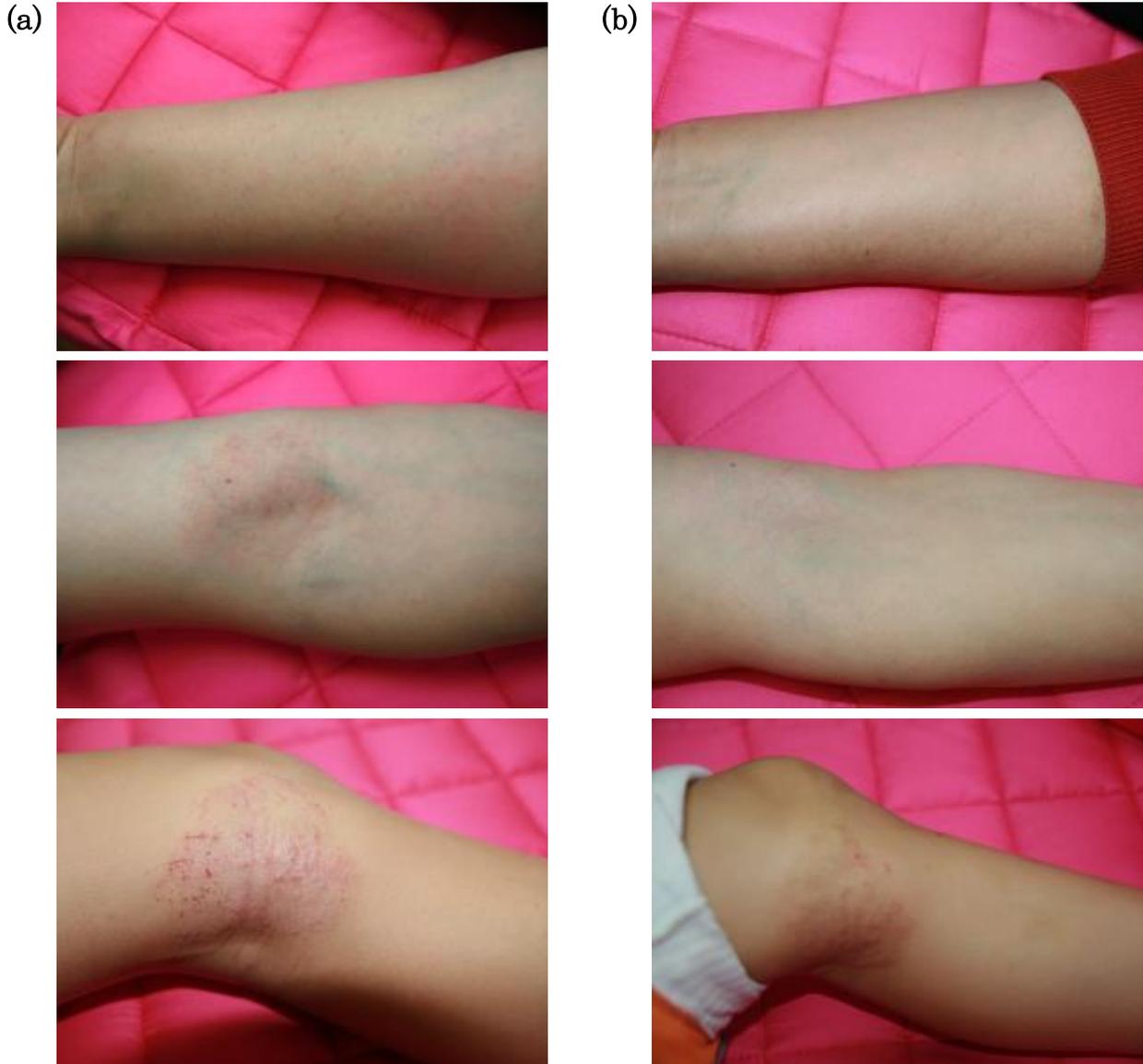


Fig. 7. Photographs of subjects before and after the use of test article. (a) before treatment (b) after treatment for 4 weeks

IV. 고 찰

상황버섯 (*Phellinus linteus*)은 민주름버섯목, 소나무비늘버섯과 진흙버섯속에 속하는 백색부후균으로서²⁰⁾ 피부에 관련된 효능으로는 항염증 및 주름제거 효과²¹⁾ 및 미백효과²²⁾가 보고되어 있다.

콩과 식물인 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 맛은 달고 성질은 평하며 한의학에서 항염작용, 해독작용, 항암작용, 항당뇨작용으로 쓰이며²³⁾, 주요생리 활성성분으로는 flavonoids 계열인 liquiritigenin, liquiritin, glabrone, glabrene 이 있

다²⁴⁾. 약리활성에 대한 연구로는 각질형성세포에서의 항염증 효과²⁵⁾가 밝혀져 있다.

따라서 본 연구는 항염증 효능이 뛰어난 뿐 아니라 피부학적으로 다양한 생리활성을 가지고 있는 상황버섯 및 감초를 복합 추출하여 상황버섯 감초 복합추출물의 세포독성 및 항산화 활성을 검증하고, 상황버섯 감초 복합추출물이 포함된 리포좀 로션을 아토피 피부염 환자들에게 적용하여 개선 효과를 확인하고자 하였다.

상황버섯 감초 복합 추출물의 항산화효능을 검증하기 위하여 DPPH, ABTS 라디칼 소거능, Hydrogen Peroxide 저해 활성

및 SOD 유사활성을 확인하였다. 그 결과, 상황버섯 감초 복합 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 25ppm에서 IC₅₀ 값을 나타내었고, 농도 50 ppm 이상에서는 대조군 BHA와 유사한 활성을 나타내었다. ABTS 라디칼 소거능의 경우, 농도가 40 ppm 일때 80%이상의 소거능을 보였고, 100 ppm 이상의 농도에서는 대조군인 BHA와 유사한 소거능을 보였다. Hydrogen Peroxide 저해 활성에서는 상황버섯 감초 복합 추출물의 농도 의존적으로 저해활성이 증가하는 것을 확인하였다. SOD 유사활성은 대조군인 ascorbic acid에 비해 다소 활성이 떨어지지만 500 ppm 이상에서는 유사한 활성을 보였다.

상황버섯 감초 복합 추출물에 의한 RAW 264.7 세포의 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과, 모든 농도에서 세포에 영향을 미치지 않아 세포 독성은 없는 것을 확인할 수 있었다.

상황버섯 감초 복합 추출물을 성분으로한 리포좀 로션을 제조하여 2-65세 아토피 피부염을 앓고 있는 대상자 33명에게 4주간 도포한 결과, 리포좀 로션을 사용하기 전 피부 수분 유량은 19.43인데 비하여, 리포좀 로션을 4주간 사용후 피부수분함유량은 31.22로 나타나 피부에 수분함유량이 증가된 것을 볼 수 있고, 경표피수분손실량 또한 39.0에서, 4주 후 측정된 결과 24.46으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 리포좀 로션 사용 전후의 피부 온도를 측정된 결과, 리포좀 로션을 사용하기 전 피부 온도는 32.5인데 비하여, 4주 후 측정된 결과 31.9로 감소되었다. 피부의 pH는 5.39에서 5.22로 감소되어 정상피부에 가까운 개선효과를 볼 수 있었다.

아토피 증상 정도인 Modified SCORAD Index (MSI)를 평가한 결과, 본 연구에서 개발된 리포좀 로션을 사용하기 전 MSI는 31.28인데, 리포좀 로션을 사용한 후 측정된 결과 20.30으로 감소되어, 아토피 증상 정도가 개선됨을 확인하였다. 가려움증 정도를 평가한 결과, 본 연구에서 개발된 리포좀 로션을 사용하기 전의 가려움증 정도는 6.07인데 비하여, 사용 후 3.87로 감소되어, 아토피 증상으로 인한 가려움증 정도가 개선됨을 알 수 있었다. 또한 육안적으로 아토피 피부염의 개선여부를 본 결과, 상황버섯 감초 복합 추출물을 포함한 리포좀 로션을 도포하기 4주전에는 팔과 다리에서 홍반, 부종 및 출혈을 확인 할 수 있으나, 4주 후에는 홍반과 부종이 가라앉은 모습을 확인 할 수 있었다.

이와 같은 연구 결과로 상황버섯 감초 복합 추출물은 항산화 효과를 가지며 세포독성이 없고, 아토피 피부염에 적용하였을 때 개선효과를 가지는 것을 확인하였다. 이는 상황버섯 감초 복합 추출물의 아토피 피부염 화장품 소재로서의 가능성을 제시한다.

V. 결 론

상황버섯 감초 복합 추출물의 항산화 효과 및 세포독성을 검증하고, 아토피 피부염 환자에게 이를 적용하여 개선효과를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 상황버섯 감초 복합 추출물은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 가진다.

2. 상황버섯 감초 복합 추출물은 Hydrogen Peroxide 저해 활성을 가지며 SOD 유사활성을 가진다.
3. 상황버섯 감초 복합 추출물은 Raw 264.7 cell에 10,000 ppm의 농도에서도 세포독성을 가지지 않는다.
4. 아토피 피부염을 가진 피험자에게 상황버섯 감초 복합 추출물을 포함한 리포좀 로션을 4주간 도포하였을 때, 피부수분 함유량은 증가하였고, 경표피 수분손실량은 증가할 뿐 아니라, 피부 온도 및 pH는 감소하여 아토피 피부염에 효과를 가지는 것으로 확인하였다.
5. 또한, SCORAD index 및 가려움증 정도에서도 그 수치가 감소하여 항 아토피 피부염 효능을 확인하였다.

따라서 상황버섯 감초 복합추출물은 항산화효과를 가지고 있고 아토피 피부염의 개선에 효과가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Schurer NY, Plewing G, Elias PM. Stratum corneum lipid function. *Dermatology*. 1991 ; 183(2) : 77-94
2. Elias PM, Brown BE. The mammalian cutaneous permeability barrier: defective barrier function is essential fatty acid deficiency correlates with abnormal intercellular lipid deposition. *Journal of technical methods and pathology*. 1978 ; 39(6) : 574-83
3. Chung YM, Kim SJ, Kim NI, Lee EY, Choue RW. Study of dietary fatty acid composition and immune parameters. *Journal of Nutrition and Health*. 2005 ; 38(7) : 521-32
4. Bak HN, Skin barrier and atopic dermatitis. *The Journal of Skin Barrier Research*. 2009 ; 11(1) : 97-111
5. Holm L, Ohman S, Hage-Hamsten V, Scheynius A. Sensitization to allergens of house-dust Mite in adults with atopic dermatitis in a cold temperate region. *Allergy*. 1999 ; 54(7) : 708-15.
6. Sanda T, Yasue T, Oohashi M, Yasue A. Effectiveness of house dust Mite allergen avoidance through clean room therapy in patients with atopic dermatitis. *Journal of allergy and clinical immunology*. 1992 ; 89(3) : 653-7.
7. Matsuoka H, Maki N, Yoshida S et al. A mouse model of the atopic eczema/dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy*. 2003 ; 58(2) : 139-45.
8. Katoh N, Hirano S, Suehiro M, Matsuda K, Kishimoto S. The characteristics of patients with atopic dermatitis demonstrating a positive reaction in a scratch test

- after 48 hours against house dust mite antigen. The Journal of dermatology 2004 ; 31(9) : 720–26.
9. Cho SJ, The miracle of aroma therapy, seoul, woosuk publishing house, 2006 : 210, 140, 169–171.
 10. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 1958 ; 181(4617) : 1199–200.
 11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine. 1999 ; 26(9) : 1231–1237.
 12. Gulcin I, Buyukokuroglu ME, Oktay M, Kufrevioglu OI. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *palsiana*(Lamb.) Holmboe. Journal of Ethnopharmacology. 2003 ; 86(1) : 51–8.
 13. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European journal of biochemistry. 1974 ; 47(3) : 469–74.
 14. Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Brée F, Zini R, Crevat A. Structure property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. Free Radical Biology and Medicine. 1998 ; 25(1) : 113–20.
 15. Pryor WA. Oxy-radicals and related species : their formation, lifetimes, and reactions. Annual Review of Physiology. 1986 ; 48(1) : 657–67.
 16. Greenstock CL. Radiation and aging : free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. Medical hypotheses. 1993 ; 41(5) : 473–82.
 17. Bryan DM, Murnaghan J, Jones KS, Bowley SR. Iron superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increase winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. Plant Physiology. 2000 ; 122(4) : 1427–38.
 18. Carmichael J, DeGraff William G, Gazdar Adi F, Minna John D, Mitchell James B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Chemosensitivity Testing. Cancer research. 1987 ; 47(4) : 936–42.
 19. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. Cancer research. 1987 ; 47(22) : 5875–9.
 20. Kim H, Yoon HS, Jeong JH, Jeong HS, Hwang JH, Yu KW. Enhancement of immunostimulation by fractionation of active polysaccharide from fermented gingseng with *phellinus linteus* mycelium in solid culture. Journal of Food Science and Technology. 2010 ; 42(2) : 223–32
 21. Yun WS, Effect of *Phellinus igniarius* Quel Extract on the Anti-inflammatory, Anti allergy, Anti-oxidant, Anti-wrinkle. Daejeon University. 2010.
 22. Jung YJ, The Synergy Effect of *Pellinus Linteus* Mushroom-hiitake Mushroom· *Puerariae Radix* Saponin on Antioxidation and Skin Lightening. Silla University. 2001.
 23. Kim SE, Kim YH, Lee JT. Antioxidant Activity and Whitening Efficacy of Ethanolic Extract of Herb Complex (*Oenothera laciniata*, *Phellinus linteus* and *Glycyrrhiza uralensis* Fischer). Journal of Investigative Cosmetology. 2014 ; 10(1) : 27–33
 24. Seo SH, Choi MO. *Glycyrrhizae Radix* Suppresses Human TNF- α -induced Inflammation Via Blockade of p38 Activation in HaCaT Cells. Journal of The Korean Society of cosmetology. 2013 ; 19(2) : 207–14
 25. Wang ZT, Nixon DW. Licorice and cancer. Nutrition and cancer. 2001 ; 39(1) : 1–11