

두충을 포함하는 한방추출물(Mix)의 항노화, 항염, 미백 효능 활성에 관한 연구

최 다 희 · 김 미 란 · 김 민 영 · 김 호 현* · 박 선 영* · 황 형 서†

세명대학교 화장품부티생명공학부

*세명대학교 한의과대학 생리학교실

(2018년 12월 30일 접수, 2019년 3월 7일 수정, 2019년 3월 14일 채택)

Studies on Antioxidant, Anti-inflammatory and Whitening Effects of Oriental Herbal Extracts (Mix) including *Eucommiae cortex*

Da Hee Choi, Mi Ran Kim, Min Young Kim, Ho Hyun Kim*, Sun-Young Park*, and Hyung Seo Hwang†

School of Cosmetic Science and Beauty Biotechnology, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, 27136, Korea

*Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, 27136, Korea

(Received December 30, 2018; Revised March 7, 2019; Accepted March 14, 2019)

요 약: 최근 미세먼지, 내분비장애, 환경 호르몬등에 의해 피부 염증 질환 환자들이 증가함에 따라 화장품 소재 개발 연구는 스테로이드, 항히스타민제 등의 피부염 치료 합성화합물 보다 이를 대체할 수 있는 천연물 기반의 보다 안전한 소재 발굴에 관심이 더 증가되고 있다. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 천연 약재 스크리닝을 거쳐 피부 효능 효과가 검증된 두충, 익지인, 백강잠의 한방추출물(Mix)을 선정하고, 이들의 새로운 피부 효능을 규명하여 천연 화장품 소재를 개발하고자 하였다. 우선 한방추출물(Mix)의 항산화 효능을 검증하기 위해 DPPH assay를 수행한 결과 400 µg/mL 농도 조건에서 약 98.8% DPPH radical 소거 활성을 확인하였다. 한방추출물(Mix)의 미백효능을 확인하기 위해 B16F10 세포주를 활용하여 한방추출물에 의한 멜라닌 합성량을 측정하였다. 400 µg/mL 농도 조건에서 α-MSH 처리군 대비 27.1% 수준까지 멜라닌 합성량이 감소하여 미백 효능 활성에 대해 유의성 있는 결과를 확인하였다. 또한 한방추출물(Mix)의 항염증 효능을 확인하기 위해 LPS 자극으로 활성화된 RAW264.7 대식세포에서 NO(nitric oxide) 합성 및 iNOS, COX-2의 유전자 발현을 관찰한 결과 모두 유의적으로 감소되는 것을 확인하였다. 염증성 사이토카인으로 알려진 IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA 발현을 분석한 결과에서도 한방추출물에 의해 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. 마지막으로 피부장벽 기능 강화를 확인하기 위해 인간 각질형성세포인 HaCaT을 이용해 tight junction 구성 단백질인 claudin 1 유전자의 발현 변화를 관찰한 결과 한방추출물에 의해 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통해 우리는 두충, 익지인, 백강잠을 함유한 한방추출물(Mix)이 항산화, 항염, 미백, 그리고 피부장벽 강화 등에 유효한 소재임을 확인하였고, 향후 피부 임상시험 등이 이뤄진다면 피부염 환자에 효과적인 천연 화장품 소재로 개발될 수 있을 것이다.

Abstract: Recently, due to the increase in skin diseases caused by particulate matter, endocrine disruptor and environmental changes, the trend of development of cosmetic materials has been shifting to the more safe and effective ingredients based on natural materials rather than existing synthetic compounds like steroids and antihistamines. This study aimed

† 주 저자 (e-mail: hshwang@semyung.ac.kr
call: 043)649-1618

to develop a new natural cosmetic materials using oriental herbs such as *Eucommiae cortex*, *Alpinia oxyphylla Miquel* and *Bombyx batryticatus*. First, DPPH assay was performed to examine the antioxidative activity of the herbal extract (Mix) and 98.8% DPPH radical scavenging activity was confirmed at 400 µg/mL concentration of it. In order to confirm the whitening efficacy of oriental herbal extracts(mix), the amount of melanin synthesized after stimulation of α -MSH with B16F10 cells was measured. Results showed that it was decreased to 27.1% comparing with the only α -MSH treated group, which confirmed the whitening efficacy. Also, both nitric oxide(NO) production and iNOS and COX-2 expression were significantly reduced in RAW264.7 macrophages activated by LPS in the presence of the extracts(Mix). The mRNA expression of the inflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α was also analyzed to confirm the inhibition effect of the extracts on inflammation. Finally, to confirm the enhancement of skin barrier function, the expression of claudin 1 gene, a tight junction protein, was observed using human keratinocyte HaCaT cells and increased as concentration dependent manner. From these results, it is concluded that the oriental herbal extracts(Mix) containing *Eucommiae cortex*, *Alpinia oxyphylla Miquel* and *Bombyx batryticatus* is effective for antioxidant, anti-inflammation, skin whitening, and skin barrier and thus could be applied as a new natural cosmetic material.

Keywords: *Eucommiae cortex*, *Alpinia oxyphylla Miquel*, *Bombyx batryticatus*, anti-inflammation, whitening efficacy, claudin 1

1. 서 론

피부는 외부환경의 다양한 자극으로부터 신체를 보호해 주며 인체의 항상성 유지에도 매우 중요한 신체 기관이다 [1]. 그러나 우리의 피부는 오존층 파괴 및 과도한 자외선 노출, 미세먼지, 미생물의 번식 등의 외부자극으로 인해 피부 세포의 DNA 돌연변이, 세포막 및 단백질 손상, 노화, 면역 기능 이상 등이 많이 발생된다. 이러한 결과들은 특히 두드러기, 건선, 습진, 접촉성 피부염, 아토피 피부염 등과 같은 염증성 피부질환으로 이어진다[2]. 피부에 염증 자극이 발생하면 면역세포인 대식세포(macrophage)가 활성화되어 nitric oxide(NO), prostaglandin E2(PGE2), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin(IL)같은 염증반응의 유발인자들이 분비된다[3-6]. 또한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 또는 그람 음성 세균의 세포막 성분인 lipopolysaccharide (LPS)의 내독소 같은 물질들의 지속적인 자극에 의해 피부노화 또는 홍반, 부종을 동반한 피부염이 발생된다. 이로 인해 피부의 표피 및 각질은 두꺼워지고 melanocyte의 과도한 활성화로 인해 피부 내 비정상적인 멜라닌 분포 및 색소침착이 증가하게 된다. 이는 피부염증 관련 질환을 가진 환자들의 피부에서 공통적으로 나타나는 증상이다[7-10]. 또한 피부염 환자 피부에서는 피부장벽 약화 및 보습 기능 저하가 흔히 관찰된다. 일반적으로 피부장벽 조절과 보습에는 밀착연접(tight junction, TJ)이 직접적으로 관여한다[11]. 대표적인 tight junction 단백질인 claudin과 occludin 단백질은 transmembrane domain을 포함하고 있어 세포막 내에 강하게 박혀 있고, zona occludens-1

(ZO-1), ZO-2 단백질이 함께 결합하여 신호 전달에 관여하는 것으로 알려지며, 수분 또는 이온들의 이동을 조절한다 [12-15]. 특히 TJ 관련 단백질 중 claudin family 단백질의 claudin 1은 피부 보습 효과 및 아토피 피부염 치료의 중요한 marker로 작용한다[16,17]. 그러나 이러한 피부염 치료에 가장 많이 쓰이는 소재는 피부 염증 증상을 낮춰주는 스테로이드제(부신피질호르몬제)와 항히스타민제이다. 스테로이드제는 국소 부위에만 사용 가능하며 장기간 사용 시 피부 진피의 손상, 색소 침착, 여드름, 알레르기, 피부 위축으로 인한 2차 세균감염 등의 부작용이 발생된다. 또한 항히스타민제는 피부염의 가려움증을 일시적으로 경감시키지만 지속적인 복용 시 불면, 불안, 식욕감퇴를 초래한다. 이로 인해 피부질환 환자들은 장기간 스테로이드, 항히스타민제 사용을 꺼려한다[18-20]. 따라서 본 연구를 통해 우리는 여러 피부염 환자들에게 폭 넓게 사용이 가능한 천연 유래 화장품 소재를 개발하고자 하였다. 이를 위해 오랜 기간 활용되면서 인체에 대한 안전성이 확보되어 있는 10종의 천연 약재를 대상으로 효능 연구를 수행하였다. 스크리닝 결과 항산화, 항염, 미백 활성이 나타나는 약재들을 우선 선별하였고, 열수 추출물 내 유효성분이 많이 함유되어 향후 화장품 소재 활용성 측면에서 유리한 백강잠, 익지인, 두충을 최종적으로 결정하였다. 두충 나무과의 수피를 건조한 두충(*Eucommiae cortex*)은 lignan 성분인 (+)-pinoselinol-di- β -D-glucoside 주성분이 포함되어 있으며, liriodendrin, iridoid 성분 등이 함유되어 있다. 약리작용은 항고혈압 작용, 항산화 작용 및 collagen 합성 촉진이 보고되었다[21-23]. 익지인(*Alpinia oxyphylla miquel*)은 생강과의

여러해살이풀의 익지의 열매로 항산화, 항염 효과가 보고되었고 당뇨병 예방제로도 널리 쓰인다.[24-26]. 백강잠(*Bombyx batryticatus*)은 누에나방과(*Bombycidae*)에 속한 곤충인 누에의 유충이 백강균(*Beauveria bassiana*)에 감염되어 죽은 잠체이며 미백효과 뿐만 아니라 항산화 효과와 세포 손상 방지, 항암 효과 등이 알려진다[27,28]. 따라서 본 연구의 최종 목표는 선별된 한방 혼합 추출물(Mix)로부터 항산화 및 항염 그리고 미백, 피부 장벽 강화 효능을 확인하고, 이를 통해 피부 염증 개선 화장품 신소재로의 활용 가능성을 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 두충, 익지인, 백강잠을 포함하는 한방추출물(Mix)은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 실험에 사용한 두충, 익지인, 백강잠 추출물은 동일 비율로 섞은 두충, 익지인, 백강잠 혼합물 400 g을 증류수 3,000 mL에 넣고 round flask에서 100 °C 조건에서 2 h 동안 가열 추출하였고, 추출액 제조는 rotary evaporator (Eyela, Japan)를 활용해 감압 농축한 후 동결건조기에서 건조하여 최종 분말 40.8 g을 제조하여 사용하였다.

2.2. DPPH radical 소거 활성 측정

한방추출물의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-aldrich, USA) radical 소거능을 측정하였다. 100 μM DPPH 용액 200 μL에 농도별 한방추출물 용액 100 μL를 첨가한 후 약 30 분간 반응시킨 이후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도의 감소 정도를 확인하였다. DPPH radical 소거능은 한방추출물 시료 자체 흡광도를 blank, DPPH 시약에 시료를 넣지 않은 흡광도를 대조군(control)으로 사용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH scavenging (\%)} = \left[1 - \frac{\text{sample} - \text{blank}}{\text{control}} \right] \times 100$$

2.3. 세포 배양

미백, 항염증 효능 연구를 위해 사용된 B16F10 마우스 흑색종 세포와 RAW264.7 마우스 대식세포는 한국세포주은행을 통해 분양받아 사용하였다. 모든 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Korea)과 100 U/mL penicillin,

100 μg/mL streptomycin (Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Korea)에서 배양하였다. 배양 조건은 37 °C, CO₂ 5% 유지 조건이며, 동물세포 배양기에서 피부세포를 배양하였다.

2.4. 세포 독성 평가

한방추출물(Mix)의 세포 내 처리 농도값을 결정하기 위해 cell counting kit-8 assay (CCK-8 assay, DoGen bio, Korea)를 진행하였다. 24 well-plate에 세포를 5.0 × 10⁴ cell/well로 분주한 후 하루 동안 안정화시켰다. 이후 기존의 배양액을 제거한 후 serum-free medium 조건에서 한방추출물을 농도별로 세포에 처리하여 24 h 동안 반응시켰다. 배양액을 제거하고 CCK-8 reagent (DoGen bio, Korea)를 phenol red가 없는 DMEM과 1 : 10 비율로 희석한 용액을 각 well에 500 μL씩 분주하여 30 min 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. NO 생성량 측정

세포 내 NO 생성량을 측정하기 위해 RAW264.7 세포를 24 well-plate에 1.0 × 10⁶ cell/well로 분주한 후 24 h 동안 plate 내에서 세포를 안정화 시켰다. 이후 lipopolysaccharide (LPS, Sigma-aldrich, USA) 1 μg/mL과 한방추출물(Mix)을 농도별로 동시에 처리하고 24 h 동안 반응 시켰다. 이후 세포가 아닌 상등액을 96 well plate로 100 μL씩 옮긴 후에 Griess 용액(G4410, Sigma-aldrich, USA)을 100 μL씩 1 : 1 동일한 비율로 섞고 30 min 동안 상온에서 반응을 시킨 다음 540 nm 조건에서 흡광도를 측정하였고, 이후 측정값을 계산하여 NO 생성량을 산출하였다.

2.6. 멜라닌 합성량 측정

세포 내 멜라닌 합성량을 측정하기 위해 B16F10 세포를 6 well-plate에 3.5 × 10⁴ cell/well로 준비한 후 200 nM alpha-Melanocyte-stimulating hormone (α-MSH, Sigma-Aldrich, USA)와 처리 농도별 한방추출물(Mix)을 동시에 처리하여 약 72 h 동안 멜라닌 합성을 자극시켰다. 양성 대조군은 미백 기능성 소재인 arbutin을 사용하였다. 배양된 B16F10 세포의 배양 배지는 제거하고 다시 세포를 PBS buffer로 깨끗이 세척한 후 trypsin/EDTA (Gibco, Canada)를 처리하여 B16F10 세포를 확보하였다. B16F10 세포는 원심분리하여 상등액을 제거한 후 10% DMSO에 녹인 1N NaOH를 첨가하여 80 °C에서 1 h 동안 끓여 멜라닌을 용해시켰다. 용

Table 1. Gene name and assay ID number in real-time PCR analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
IL-1 α	Interleukin 1 alpha	Mm00439620_m1
IL-1 β	Interleukin 1 beta	Mm00434228_m1
IL-6	Interleukin 6	Mm00446190_m1
TNF α	Tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_m1
COX-2	Cyclooxygenase-2	Mm00478374_m1
iNOS	Inducible Nitric Oxide synthase	Mm00440502_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm9999915_g1
CLDN1	Claudin 1	Hs00221623_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1

해된 멜라닌은 475 nm microplate reader (BioTek, USA)로 측정하였다.

2.7. RNA 추출 및 RT-PCR

6 well-plate에 RAW264.7와 HaCaT 세포를 각각 2.0×10^5 cell/well로 준비한 후 37 °C 조건에서 24 h 세포 배양하여 plate 위에 안정화 시켰다. 이 후 한방추출물(Mix)에 의한 항염증 활성을 확인하기 위해 RAW264.7 세포에 LPS (1 μ g/mL)와 각 농도별 한방추출물을 동시에 처리하여 6 h 배양한 후 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 피부장벽 조절 단백질(Claudin 1)을 확인하기 위해 HaCaT 세포를 이용하여 각 농도별 한방추출물을 동시에 처리하고 24 h 배양한 후 TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA는 1.5 μ g을 정량한 후 Revertra Ace Kit(Toyobo, Japan)을 이용 역전사 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 이 과정으로 합성된 cDNA는 real time PCR (Applied Biosystems, USA) 실험기법을 사용하여 실시간으로 증폭되는 특정 유전자의 mRNA 량을 비교 분석하였다. 사용된 Taqman probe는 Table 1에 표기하였다.

2.8. 통계처리

본 실험에서 모든 통계처리는 Student's *t*-test를 수행하였으며, *p* 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

3. 실험 결과

3.1. 한방추출물(Mix)의 DPPH radical 소거능 측정

한방추출물(Mix)의 항산화 효능을 검증하기 위해 DPPH radical 소거능을 확인하였다. 양성대조군 L-ascorbic acid와 동일하게 최대농도를 1000 μ g/mL까지 설정하였고, 농도를 1/10씩 희석한 조건에서 DPPH radical 소거능을 확인한 결과 한방추출물 100 μ g/mL, 1000 μ g/mL 을 처리하였을 때 L-ascorbic acid 대비 각각 $29.0 \pm 2.0\%$, $99.5 \pm 0.6\%$ 소거능을 나타내었다(Figure 1A). 이 후 소거능이 나타난 100 μ g/mL 부터 1000 μ g/mL까지 농도를 세밀히 구분하여 DPPH radical 소거능을 확인 한 결과 400 μ g/mL 농도 조건에서는 L-ascorbic acid 대비 약 $98.8 \pm 0.3\%$ 수준으로 거의 모든 DPPH radical이 L-ascorbic acid 수준으로 소거됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 우리는 한방추출물(Mix)이 농도 의존적 방식으로 유의성 있게 항산화 효능 활성을 갖고 있음을 알 수 있었다(Figure 1B).

3.2. B16F10 세포독성 평가 및 멜라닌 합성량 측정

한방추출물(Mix)에 의한 미백 효능 활성을 확인하기 위해 마우스 흑색종 B16F10 세포주를 활용하여 한방추출물에 의한 멜라닌 합성량을 측정하였다. 우선 세포독성이 없는 한방추출물의 최고 농도값을 결정하기 위해 CCK-8 cell viability assay를 수행하였다. B16F10에서 한방추출물은 400 μ g/mL 농도까지 세포독성이 관찰되지 않아, 400 μ g/mL을 최고농도로 설정하고 모든 멜라닌 합성 억제 실험을 진행하였다(Figure 2A). 또한 대조군인 α -MSH (200 nM) 및 arbutin 100 μ g/mL 동시 처리군 에서도 세포독성이 관찰되지 않았다(data not shown). B16F10에서 멜라닌 합성을

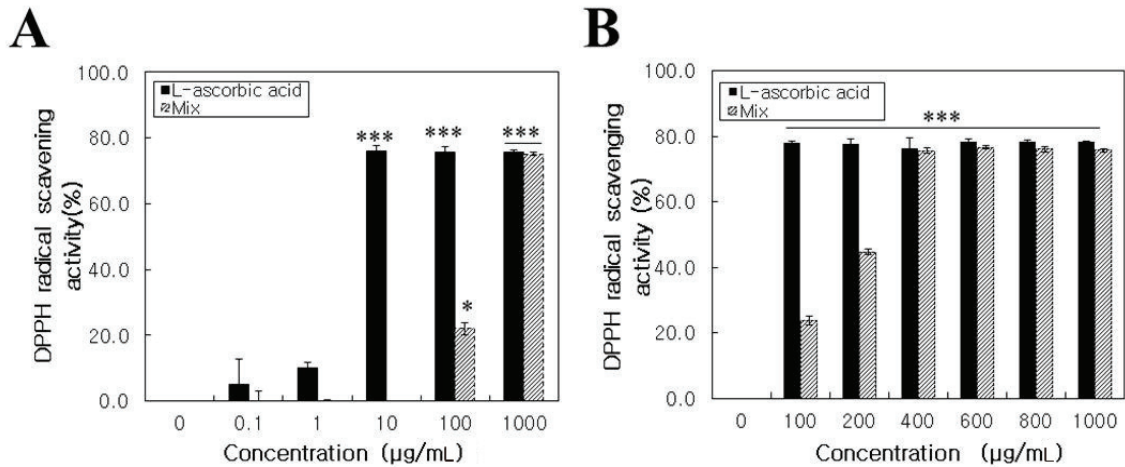


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of oriental herbal extracts(Mix). (A) DPPH assay was to validate scavenging activity of DPPH radical by Mix. Scavenging activity of Mix(100 µg/mL) showed about 29.0% level compared with L-ascorbic acid as positive control. (B) Anti-oxidant ability was measured by the DPPH assay at 100~1000 µg/mL of Mix. Mix(400 µg/mL) had almost 80% free radical scavenging effects, showing similar to those of ascorbic acid used as a positive control. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ compared to control.

촉진시키기 위해 멜라닌 합성 자극 호르몬인 α -MSH (200 nM)를 처리하였고, 이와 동시에 양성대조군인 arbutin 100 µg/mL과 한방추출물 0~최대 400 µg/mL 농도 처리군을 동시 처리 한 후 72 h 동안 배양하였다. 무처리 대조군 대비 α -MSH 처리군에서는 멜라닌 합성량이 $535.2 \pm 3.2\%$ 로 약 5.4배 증가되어 멜라닌 합성이 정상적으로 유도된 것을

확인 할 수 있었다. α -MSH 처리군과 비교하였을 때 양성 대조군인 arbutin 처리군에서는 melanin의 함량이 $343.8 \pm 7.5\%$ 로 α -MSH 처리군 대비 $64.2 \pm 7.5\%$ 로 감소되었다. 한방추출물을 100, 200, 400 µg/mL농도로 처리한 결과 melanin의 함량이 $462.3 \pm 13.9\%$, $375.9 \pm 3.7\%$, $145.1 \pm 2.8\%$ 으로 α -MSH 처리군 대비 각각 86.4 ± 13.9 , 70.2 ± 3.7 ,

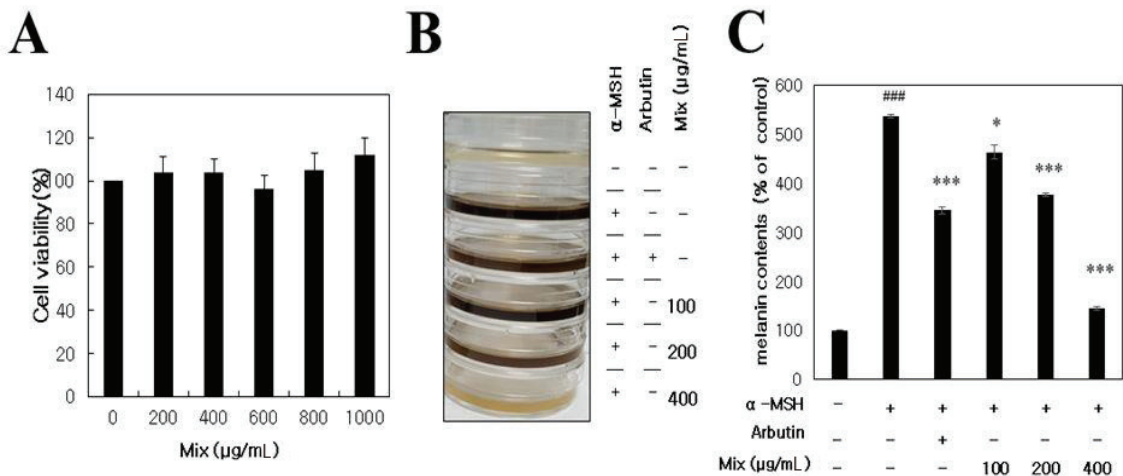


Figure 2. Oriental herbal extracts(Mix) has whitening activity. (A) The cytotoxicity of Mix was confirmed in B16F10 cells using the CCK-8 assay and then the maximum concentration was set at 400 µg/mL. (B) Effect of Mix on cellular melanin content compared with arbutin as positive control in α -MSH-stimulated B16F10 cells. (C) The results are expressed as mean \pm SD of data obtained three independent experiments. ### $p < 0.001$, compared to control, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, compared to α -MSH treated group.

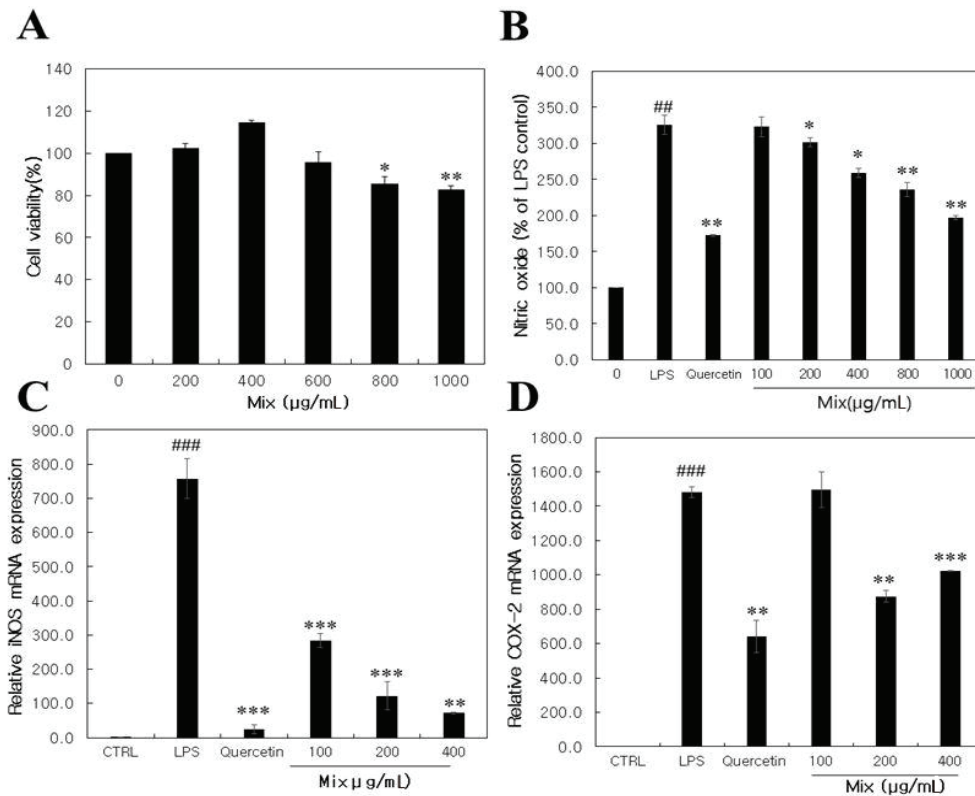


Figure 3. Studies on the anti-inflammatory efficacy of oriental herbal extracts(Mix). (A) RAW264.7 mouse macrophages were used to determine the cytotoxicity and NO production of the mix. The cytotoxicity was evaluated by the CCK-8 assay and the maximum concentration of the mix was 400 µg/mL. (B) Effects of Mix on NO synthesis in activated RAW264.7 cells by LPS. NO production was significantly decreased compared with that under LPS-treatment by Mix as concentration dependent manner. (C) The level of iNOS mRNA expression was significantly decreased compared with quercetin in activated RAW264.7 by LPS. (D) COX-2 mRNA expression was decreased from 200 µg/mL oriental herbal extracts(Mix). ### $p < 0.001$, compared to control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to LPS treated group.

27.1 ± 2.8% 수준까지 유의성 있게 감소하였다(Figure 2B, C). 이러한 결과들을 통해 우리는 두층을 포함하는 3종의 한방 추출물(Mix)의 피부 미백 효능 활성을 확인하였다.

3.3. NO 생성량 측정 및 iNOS와 COX-2 발현량 변화

한방추출물의 항염증 활성 여부를 확인하기 위해, 제일 먼저 Griess assay를 수행하여 NO 생성량 변화를 관찰하고자 하였다. 본 연구에서는 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포주를 사용하였다. 우선 한방추출물의 최대농도값을 설정하기 위해 CCK-8 assay를 수행하였다. 세포독성을 관찰한 결과 400 µg/mL 까지 독성이 관찰되지 않았으나, 600 µg/mL 부터 유의적인 세포 독성이 관찰되었다(Figure 3A). 따라서 항염증 활성연구에서 처리한 최대 농도는 400 µ

g/mL로 설정하여 모든 실험을 진행하였다. RAW264.7 대식세포에 LPS (1 µg/mL)를 단독 처리한 시험군에서 NO 생성량이 무처리군 대비 323.0 ± 13.5 %로 증가되었다. 양성대조군인 quercetin (10 µg/mL)을 LPS와 동시 처리한 시험군에서는 LPS 단독 처리군 대비 52.9 ± 1.6%로 유의성 있게 감소되었다. LPS와 한방추출물을 동시에 처리한 시험군에서는 100 µg/mL에서 323.0 ± 13.5, 200 µg/mL에서 301.5 ± 6.6, 400 µg/mL에서 259.3 ± 6.4%로 NO 생성량이 감소되는 것을 확인하였다(Figure 3B). 또한 우리는 한방추출물에 의한 NO 생성 메커니즘과 관련된 iNOS, COX-2 유전자의 발현량을 관찰하였다(Figure 3C, D). RT-PCR을 통해 iNOS mRNA 발현량을 분석한 결과 무처리군 대비 LPS 단독 처리군은 798.4 ± 57.16 배 증가하여 RAW264.7 대식

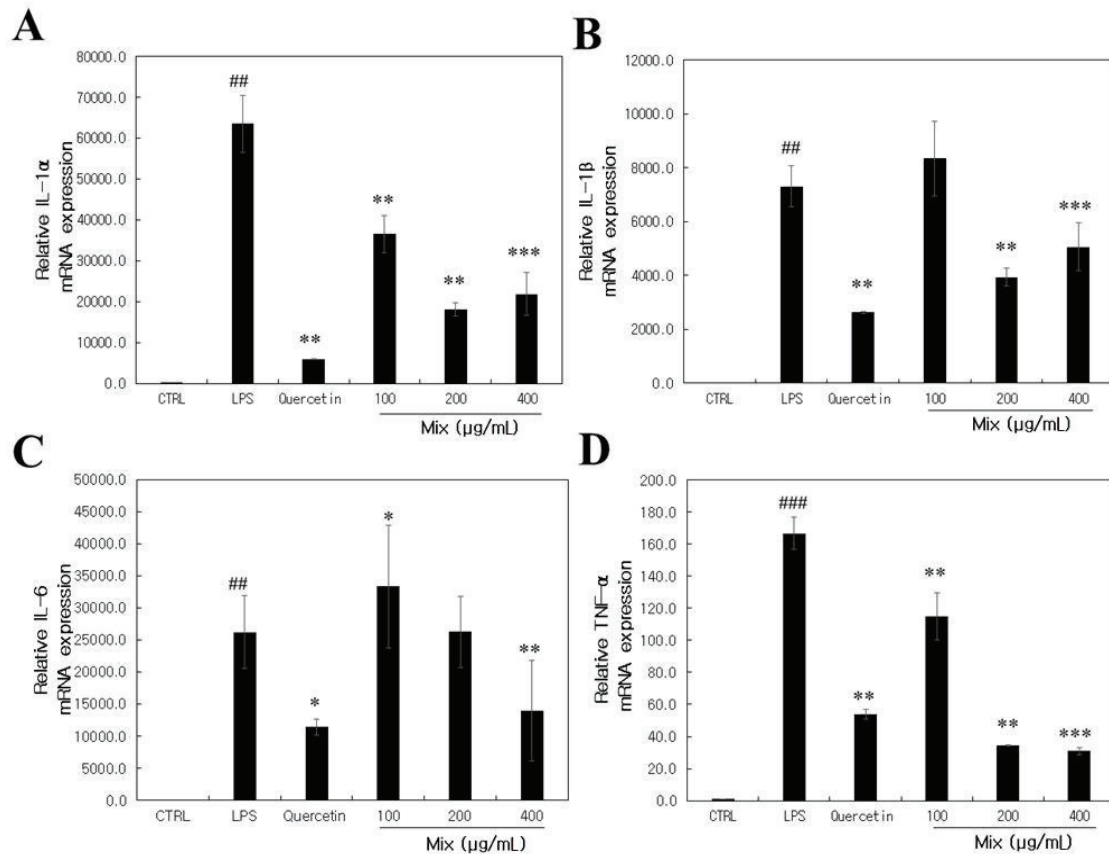


Figure 4. Effects of Mix on the mRNA expressions of inflammatory cytokines. RAW264.7 cells were seeded in a 6well culture dish and treated with Mix for 6 h. RT-PCR analysis of pro-inflammatory transcription factors, such as (A) IL-1 α , (B) IL-1 β , (C) IL-6, and (D) TNF- α . The Mix decreased the expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α compared with LPS-treatment. Quercetin(10 μ g/mL) was used as positive control. ## $p < 0.01$, compared to control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, compared to LPS treated group.

세포가 LPS 자극을 받아 iNOS 발현이 정상적으로 증가된 것을 확인 할 수 있었다. LPS와 양성대조군인 quercetin을 동시 처리한 시험군에서는 iNOS 유전자 발현이 LPS 처리군 대비 약 $96.9 \pm 1.6\%$ 감소하였고, LPS와 한방추출물을 100, 200, 400 μ g/mL로 동시 처리한 실험군에서는 LPS 단독 처리군보다 iNOS의 mRNA 발현량이 62.7 ± 0.0 , 84.0 ± 4.3 , $90.5 \pm 0.3\%$ 만큼 유의성 있게 감소하였다(Figure 3C). COX-2 유전자의 발현 결과 또한 LPS 단독 처리군은 1504.4 ± 57.16 배 증가하였고, quercetin 처리군에서는 $56.7 \pm 7.3\%$ 만큼 감소하였으며 LPS와 한방추출물을 200, 400 μ g/mL로 동시 처리한 실험군에서는 LPS 단독 처리군 대비 40.9 ± 3.6 , $30.9 \pm 1.6\%$ 만큼 COX-2 mRNA 발현량이 감소되었다.

3.4. 한방추출물에 의한 염증 유발 사이토카인 발현량의 변화

한방추출물의 항염증 활성 연구를 위해 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포주에서 한방추출물에 의한 염증 유발 사이토카인 IL-1 α /1 β , IL-6, TNF- α 들의 mRNA 발현 억제를 관찰하였다(Figure 4). 한방추출물의 최대 처리농도는 400 μ g/mL로 동일하게 설정하여 모든 실험을 진행하였다. RAW264.7 대식세포에 LPS (1 μ g/mL)를 단독 처리하여 활성화 된 시험군에서 IL-1 α 발현이 무처리군 대비 63467.4 ± 6861.28 배 크게 증가 되었다. 양성대조군인 quercetin을 LPS와 동시에 처리한 시험군에서는 LPS 처리군 대비 약 $90.5 \pm 0.9\%$ 만큼 발현이 억제되었고, LPS와 한방추출물 100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 400 μ g/mL를 각각 처리한 시험군에서는 42.5 ± 1.0 , 71.5 ± 0.4 , $65.4 \pm 4.5\%$ 만큼 감소하였

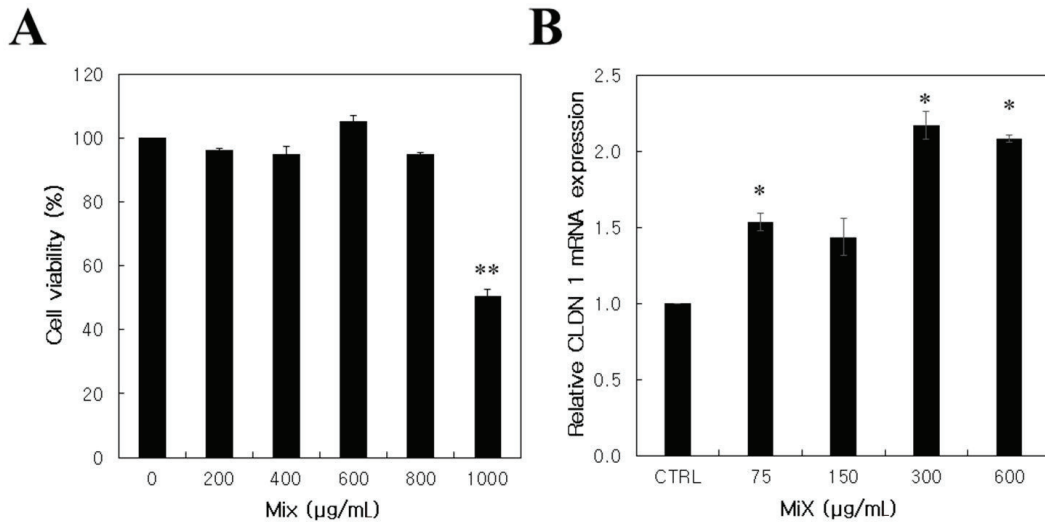


Figure 5. Effect of oriental herbal extract(Mix) on cytotoxicity and claudin1 gene expression. (A) Examination of the cytotoxicity of orient herbal extract(Mix) in human keratinocyte HaCaT cell. (B) The expression level of claudin1 was increased about two times or more in the presence of oriental herbal extract(Mix). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to control.

다(Figure 4A). IL-1 β 의 경우 RAW264.7 대식세포에 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 단독 처리하여 활성화 시킨 시험군에서 IL-1 β 발현이 무처리군 대비 7308.5 ± 754.48 배 크게 증가되었다. 양성대조군인 quercetin을 LPS와 동시에 처리한 시험군에서는 LPS 처리군 대비 약 $63.9 \pm 3.3\%$ 만큼 감소하였다. 또한 LPS와 한방추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 발현 감소가 나타나지 않았으나, 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$ 를 각각 처리한 시험군에서는 46.1 ± 1.0 , $31.1 \pm 5.1\%$ 만큼 감소되었다(Figure 4B). 마지막으로 RT-PCR을 통해 IL-6 mRNA 발현을 관찰한 결과 무처리군 대비 LPS 단독 처리군은 26218.9 ± 5711.27 배 증가하여 RAW264.7 대식세포가 LPS 자극을 받아 IL-6 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 이 때 양성대조군인 LPS, quercetin 동시 처리군에서는 LPS 단독 처리군 대비 IL-6 유전자 발현이 $56.0 \pm 4.9\%$ 만큼 감소하였고 LPS와 한방추출물을 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 로 동시 처리한 실험군에서는 한방추출물 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $48.6 \pm 18.8\%$ 로 LPS 단독 처리군보다 iNOS의 mRNA 발현량이 감소되었다(Figure 4C). 마지막으로 TNF- α 유전자의 발현 결과 또한 LPS 단독 처리군은 166.7 ± 9.96 배 증가하였고, quercetin 동시 처리군에서는 $67.6 \pm 3.8\%$ 로 감소하였으며, LPS와 한방추출물을 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 로 동시 처리한 실험군에서는 31.3 ± 4.7 , 79.3 ± 1.5 , $81.4 \pm 0.2\%$ 로 감소되었다(Figure 4C). 따라서 우리는 한방추출물(Mix)이 NO 생성, COX-2 발현 조절 뿐 아니라 염증 유발 사이토카인

의 mRNA 발현 억제 효과를 통해 항염증 효능 활성을 보이는 천연 항염증 소재임을 확인하였다.

3.5. 한방추출물에 의한 피부장벽 조절 단백질(클라우딘 1)의 발현량 변화

한방추출물에 의한 피부장벽 조절에 미치는 영향을 확인하기 위해 인간 유래 각질형성세포인 HaCaT 세포주를 활용하여 각질형성세포의 세포막에 위치하고 피부장벽 기능과 밀접한 관련이 있는 클라우딘 1(Claudin 1) 단백질의 유전자 발현량 변화를 관찰하였다. HaCaT 세포주에 처리한 최고농도를 결정하기 위해 CCK-8 assay를 통해 한방추출물의 세포 독성 실험을 진행하였다. 한방추출물의 농도는 0~1000 $\mu\text{g/mL}$ 까지 설정하여 HaCaT 세포에 한방추출물을 농도별로 처리하고 24 h 후에 세포 생존율을 확인한 결과 400 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 세포분열이 촉진되다가 600 $\mu\text{g/mL}$ 부터 유의적 감소가 관찰되기 시작해 최대농도값을 600 $\mu\text{g/mL}$ 로 설정하여 모든 실험을 진행하였다(Figure 5A). 각질형성세포의 세포막에 위치하고 피부장벽 기능과 밀접한 관련이 있는 claudin 1 mRNA 발현량 변화를 관찰하였다. HaCaT 세포에 한방추출물을 최대 600 $\mu\text{g/mL}$ 까지 24 h 동안 처리한 후 claudin 1의 mRNA 발현량을 관찰한 결과, 무처리군 대비 한방추출물 75, 150, 300, 600 $\mu\text{g/mL}$ 을 각각 처리한 결과, 1.5 ± 0.1 , 1.42 ± 0.0 , 2.2 ± 0.1 , 2.04 ± 0.1 배 증가되었다. 이러한 결과는 통해 한방추출물이 클

라우딘1 단백질 발현 증가를 통해 피부장벽을 강화시킬 수 있는 소재임을 보여준다.

4. 고 찰

현재 두드러기, 건선, 습진, 접촉성 피부염, 아토피 피부염 등과 같은 피부염의 치료제는 스테로이드제가 대부분이며, 가려움을 완화시키기 위해 항히스타민제를 사용한다. 하지만 이러한 화학성분의 치료제는 부작용이 발생되고, 2차 세균감염까지 초래해 오히려 피부염을 악화시킬 수 있다. 따라서 이를 대체할 한방 추출물을 사용함으로써 우수한 천연 유래 화장품 소재를 개발하고자 하였다. 본 연구는 안전성이 검증된 한방 추출물 두층, 익지인, 백강잠을 이용해 한방 혼합 추출물(한방추출물)을 제조하였다. 먼저 제조한 한방추출물을 이용하여 DPPH radical 소거능을 확인하였다. 한방추출물(Mix) 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도 조건에서부터는 약 98.8% 수준으로 거의 모든 DPPH radical이 소거됨을 관찰하여 항산화 효능 활성을 확인하였다. 이 후 세포독성이 없고 각 세포주마다 최대농도가 큰 차이가 나지 않는 농도 값을 결정하기 위해 CCK-8 assay를 수행하였고, 한방추출물의 최대농도를 B16F10 세포 주에서는 400 $\mu\text{g/mL}$, RAW264.7 세포 주에서는 400 $\mu\text{g/mL}$, HaCaT 세포 주에서는 600 $\mu\text{g/mL}$ 로 결정하여 모든 실험에 적용하였다. 피부염 발생 후 근본적인 문제인 색소 침착을 개선시키기 위해 한방추출물의 멜라닌 합성량도 함께 확인하였다. 마우스 흑색 종 세포인 B16F10 세포에서 melanin contents assay로 수행하였다. 한방추출물의 멜라닌 합성량을 측정 한 결과 한방추출물을 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 결과 melanin의 함량이 각 각 86.4 ± 0.1 , 70.2 ± 0.0 , $27.1 \pm 0.0\%$ 수준까지 유의성 있게 감소하였다. 이를 통해 한방추출물의 미백효능 활성을 확인할 수 있었다. RAW264.7 마우스 대식세포에서 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 염증반응을 유발 한 후 한방추출물의 NO 생성 억제효과를 확인하였다. 그 결과 세포독성이 나타나지 않는 최대농도 800 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 $39.5 \pm 0.1\%$ 만큼 NO 생성이 감소함을 확인하였다. 한방추출물의 항염증 연구를 위해 real time PCR 실험기법을 통해 연구를 진행하였다. 염증관련 유전자 iNOS, COX-2, IL-1 α , 1 β , 6, TNF- α 의 mRNA 발현 발현량을 확인하기 위해 RAW264.7 마우스 대식세포에서 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 염증반응을 유도하였다. iNOS mRNA 발현량을 비교 한 결과 LPS 처리군 대비 한방추출

물 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서부터 각각 62.7 ± 0.0 , 84.0 ± 4.3 , $90.5 \pm 0.3\%$ 만큼 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. COX-2의 mRNA 발현 또한 40.9 ± 3.6 , $30.9 \pm 1.6\%$ 만큼 감소됨을 확인하였다. 동일한 조건에서 염증 조절 사이토카인 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현량을 비교한 결과, LPS 처리군 대비 한방추출물 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 약 30 % 상의 발현 감소를 보였으며 이에 따른 항염증 효능을 확인하였다. 또한 표피 세포 사이를 연결 및 접합하여 전해질과 수분이동을 조절하고 외부 환경으로부터 물리적인 공격을 방어하는 피부장벽의 기능을 수행하는 타이트정선은 피부염 환자들의 피부장벽 강화에 도움을 줄 수 있다. 따라서 피부 장벽 강화에 대표적인 지표인 타이트정선 단백질, claudin 1의 유전자 발현을 분석하였다. 한방추출물 75 $\mu\text{g/mL}$ 약 1.5배의 claudin1 mRNA 발현 증가를 확인하였다. 150 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 유의성은 없었으나 부분적 증가가 확인되었고, 한방추출물 300 $\mu\text{g/mL}$, 600 $\mu\text{g/mL}$ 에서 무처리군 대비 약 2배 이상의 mRNA 발현 증가를 확인하였다. 이에 따라 우리는 한방추출물(Mix)에 의한 피부장벽 강화 효과 가능성을 제시하였다. 이처럼 본 연구에서 사용한 두층, 백강잠, 익지인을 함유하는 한방 추출물 소재의 항산화 및 항염 그리고 미백, 피부 장벽 강화 효능을 확인 함으로서, 피부염 개선 천연 화장품 소재로의 활용 가능성을 제시하였기 때문에, 향후 피부 염증 질환에 주로 처방되어 사용되는 steroid, antihistamine 원료들과 한방 추출물을 인체 적용시험 및 *in vitro* 효능연구등을 통해 대등한 효능이 확인된다면 향후 새로운 천연 화장품 원료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgement

본 과제는 2018년 충청북도와 제천시의 생활밀착형 천연물 소재 제품 연구개발지원사업에 의해 수행되었습니다.

Reference

1. Y. M. Yoon, S. H. Bae, S. K. An, Y. B. Choe, K. J. Ahn, and I. S. An, Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **11**(3), 417 (2013).
2. J. Giang, M. A. Seelen, M. van Doorn, R. Rissmann, E. P. Prens, and J. D. Damman, Complement activation

- in inflammatory skin diseases, *Front Immunol*, **9**, 639 (2018).
3. S. Saha, I. N. shalova, S. K. Biswas, and K. Subhra, Metabolic regulation of macrophage phenotype and function, *Immunol. Rev.*, **280**(1), 102 (2017).
 4. F. Aktan, iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation, *Life Sci.*, **75**(6), 639 (2004).
 5. J. H. Park and S. R. Lee, Anti-inflammatory activities of *Scolopendra subspinipes mutilans* in RAW264.7 cells, *J. Nutr. Health.*, **51**(4), 323 (2018).
 6. D. J. Stuehr, H. J. Cho, N. S. Kwon, M. F. Weise, and C. F. Nathan, Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**(17), 7773 (1991).
 7. H. F. Stich, The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds, *Mutat. Res.*, **259**(3-4), 307 (1991).
 8. D. Dreher and A. F. Junod, Role of oxygen free radicals in cancer development, *Eur. J. Cancer*, **32**(1), 30 (1996).
 9. S. N. Park, Skin aging and oxygen species, *J. Cosmet. Sci. Korea*, **23**(1), 75 (1997).
 10. E. H. Lee, J. K. Lee, J. T. Hong, K. M. Jung, Y. K. Kim, S. H. Lee, and Y. W. Lee, Protective effect of green tea extract, catechin on UVB-induced skin damage, *J. Food Hyg. Saf.*, **16**(2), 117 (2001).
 11. K. Morita, and Y. Miyachi, Tight junctions in the skin, *J. Dermatol. Sci.*, **31**(2), 81 (2003).
 12. E. E. Schneeberger and R. D. Lynch, The tight junction: a multifunctional complex, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, **286**(6), C1213 (2004).
 13. L. Gonzalez-Mariscal, A. Betanzos, P. Nava, and B. E. Jaramillo, Tight junction proteins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **81**(1), 1 (2003).
 14. L. A. Lapierre, The molecular structure of the tight junction, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**(3), 255 (2000).
 15. S. Tsukita, M. Furuse, and M. Itoh, Multifunctional strands in tight junctions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**(4), 285 (2001).
 16. R. Tokumasu, K. Yamaga, Y. Yamazaki, H. Murota, K. Suzuki, A. Tamura, and S. Tsukita, Dose-dependent role of claudin-1 *in vivo* in orchestrating features of atopic dermatitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**(28), E4061 (2016).
 17. M. Furuse, M. Hata, K. Furuse, and Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, and S. Tsukita, Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice, *J. Cell Biol.*, **156**(6), 1099 (2002).
 18. T. Hajar, Y. A. Leshem, J. M. Hanifin, S. T. Nedorost, P. A. Lio, A. S. Paller and E. L. Simpson, A systematic review of topical corticosteroid withdrawal “steroid addiction” in patients with atopic dermatitis and other dermatoses, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **72**(3), 541 (2015).
 19. M. Matura and A. Goossens, Contact allergy to corticosteroids, *Allergy*, **55**(8), 698 (2000).
 20. F. M. Arellano, C. E. Wentworth, A. Arana, and C. Fernandez, C. F. Paul, Risk of lymphoma following exposure to calcineurin inhibitors and topical steroids in patients with atopic dermatitis, *J. Invest. Dermatol.*, **127**(4), 808 (2007).
 21. T. Deyama, S. Nishibe, and Y. Nakazawa, Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and Siberian ginseng, *Acta Pharmacol. Sin.*, **22**(12), 1057 (2001).
 22. Y. P. Zhu, Chinese materia medica: chemistry, *pharmacology and applications*. CRC press, New York Washington, D.C. (1998).
 23. Y. Li, S. Kamo, K. Metori, K. Koike, Q. M. Che, S. Takahashi, The promoting effect of eucommiol from *Eucommiae cortex* on collagen synthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**(1), 54 (2000).
 24. C. Z. Wang, H. H. Yuan, X. L. Bao, and M. B. Lan, *In vitro* antioxidant and cytotoxic properties of ethanol extract of *Alpinia oxyphylla* fruits, *Pharm Biol*, **51**(11), 1419 (2013).
 25. N. Y. Jo, P. J. Lee, and J. Du Roh, Anti-inflammatory and Anti-oxidative effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* hot aqueous extract in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages, *J. Acupunct Rea*, **34**(2), 83 (2017).

26. Y. Xie, M. Xiao, Y. Ni, S. Jiang, G. Feng, S. Sang, G. Du, *Alpinia oxyphylla* Miq. extract prevents diabetes in mice by modulating gut microbiota, *J Diabete Res*, **2018**, 10 (2018).
27. H. C. Oh, K. S. Lim, C. Y. Hwang, and I. H. Youn, N. K. Kim, A study on the melanin synthesis inhibition and whitening effect of *Bombysis corpus*, *J. Kor. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **20(3)**, 1 (2007).
28. M. Hu, Z. Yu, J. Wang, and W. Fan, Y. Liu, J. Li, and C. Wu, Traditional uses, origins, chemistry and pharmacology of *Bombyx batryticatus*: a review, *Molecules*, **22(10)**, 1779 (2017).