

# 섬기린초(*Sedum takesimense*)에서 분리된 화합물들의 RAW 264.7 Cell에 대한 항염증 효과와 여드름 원인균에 대한 항균 효과

정은탁<sup>1,2</sup> · 박슬기<sup>3</sup> · 조경진<sup>2</sup> · 정금재<sup>2</sup> · 윤태미<sup>1</sup> · 최태호<sup>1</sup> · 김영목<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>다인소재, <sup>2</sup>부경대학교 식품공학과, <sup>3</sup>부경대학교 식품연구소

## Anti-inflammatory Effect on RAW 264.7 Cells and Antibacterial Effect on *Cutibacterium acnes* of Compounds Isolated from *Sedum takesimense*

Eun-Tak Jeong<sup>1,2</sup>, Seul-Ki Park<sup>3</sup>, Kyung-Jin Cho<sup>2</sup>, Geum-Jae Jeong<sup>2</sup>, Tae-Mi Yoon<sup>1</sup>, Tae Ho Choi<sup>1</sup> and Young-Mog Kim<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Antimicrobial Materials Lab., Dynesoze Co., Ltd., R&D Center, Yongin 16827, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

<sup>3</sup>Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

This study investigated anti-inflammatory and antibacterial activities of *Sedum takesimense* ethanolic extract, and 3 isolated compounds. To confirm anti-inflammatory and anti-acne activities, a nitric oxide (NO) inhibition assay, pro-inflammatory factor (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-8) inhibition assays, and minimum inhibitory concentration (MIC) tests were performed. The 3 isolated compounds were identified as 4,6-di-O-galloylarbutin (OGA), 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose (OGG), and 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -glucose (TOGG). The ethanolic extract and isolated compounds (OGA, OGG, TOGG) effectively inhibited production of NO and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-8). Furthermore, OGG and TOGG exhibited MIC values toward *Cutibacterium acnes* of 12.5  $\mu$ g/mL and 3.2  $\mu$ g/mL, respectively. These results suggest that *S. takesimense* extract exerts an anti-inflammatory effect on LPS-induced RAW264.7 cells, and an antibacterial efficacy against *C. acnes*.

Keywords: Antibacterial activity, Anti-inflammatory activity, *Cutibacterium acnes*, *Sedum takesimense*

### 서론

염증반응은 체내에서 발생하는 방어기전 중 하나이지만 과도한 염증반응은 만성 면역질환을 일으킬 수 있으며 이 과정 중에는 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)과 인플라마솜(inflammasome) 등의 다양한 물질이 관여하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2015). 흔히 염증성 사이토카인의 억제 활성을 탐색하기 위해 마우스에서 유래한 대식세포(RAW 264.7)가 사용되며 이는 단핵세포의 형태로 염증반응에 관여하는 주요 세포로 알려져 있고, lipopolysaccharide (LPS) 등에 의해 대식세포 또는 단핵구를 자극하여 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  및 interleukin (IL)-1 $\beta$ 와 같은 사이토카인들의 분비를 촉진한다

(Kang et al., 2015). 본 연구에서는 RAW 264.7 cell을 LPS로 염증을 유도하여 섬기린초 추출물 및 분리된 화합물을 처리하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-8과 같은 염증성 사이토카인의 발현 억제 효과에 대해 연구하였다. 또한, 여드름은 염증 반응에서 유래되는 만성염증 질환으로 과도한 피지생성으로 인한 모공막힘과 피지선에서의 염증반응으로 발생하는 흔한 질병이다(Omer et al., 2017; Wang et al., 2017a). 여드름은 농포, 낭종 및 면포 등을 형성하고 심각할 경우 흉터를 남길 수 있는 만성 염증성 피부질환으로 알려져 있다(Korean Dermatological Association Textbook Compilation Committee, 2008). 그 중 여드름을 유발하는 미생물인 *Cutibacterium acnes*는 모낭 내에 상주하여 피지의 중성지방을 분해하고 모낭 내 염증을 유발하며 피부 중

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5832 Fax: +82. 51. 629. 5824

E-mail address: ymkim@pknu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0552>

Korean J Fish Aquat Sci 54(4), 552-560, August 2021

Received 9 July 2021; Revised 3 August 2021; Accepted 19 August 2021

저자 직위: 정은탁(대학원생), 박슬기(연구원), 조경진(대학원생), 정금재(대학원생), 윤태미(연구소장), 최태호(대표), 김영목(교수)

피지의 생성 증가는 *C.acnes*의 증식에 좋은 영향을 줄 수 있다고 알려져 있다(Lee et al., 2016). 특히 여드름 치료에는 주로 스테로이드 또는 항생제 및 비타민 A 유도체가 사용되고 있으나(Kim et al., 2006), 주로 항생제가 많이 사용되고 있고 이로 인한 부작용에 대한 문제가 대두되고 있다. 수많은 연구에서 항생제의 남용과 잦은 사용은 문제를 유발할 수 있음을 경고하고 있으며 특히, doxycycline, tetracycline, clindamycin 및 erythromycin과 같은 항생제에 장기간 노출되면 내성균의 생성과 기관의 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다(Swanson, 2003; Tan, 2003; Park et al., 2004). 최근에는 항생제의 남용을 막고 사용량을 최소화하기 위하여 대체 항생제 역할을 할 수 있는 천연물 유래 물질 탐색에 대한 연구가 활발히 진행중에 있다.

섬기린초(*Sedum takesimense*)는 돌나물과(Crassulaceae) 돌나물속(*Sedum L.*)에 속하는 다년생 초본으로 한국의 울릉도와 독도에 주로 분포하는 특산식물이다(Chung and Kim, 1989). 국내에서 돌나물속의 일부 종은 민간요법으로 사용되어 왔으며 혈액순환 개선에 효과가 있다는 일부 보고가 있으며(Bae, 2000; Kim et al., 2004) 섬기린초 및 그 추출물이 나타내는 효능 및 효과에 대한 연구는 국내외 모두 부족한 실정이다. 이에 본 연구는 섬기린초 추출물과 그로부터 분리, 동정된 화합물 3종에 대해서 염증성 여드름 및 미생물에 의한 여드름 발생을 예방 및 관리할 수 있는 가능성을 검토하기 위해 RAW 264.7 cell에서 유도된 염증성 사이토카인의 발현 억제와 여드름 원인균인 *C. acnes*에 대한 항균 효과에 대해 연구하였다

## 재료 및 방법

### 섬기린초 추출물 제조 및 화합물 분획

본 연구에 사용된 섬기린초(*S. takesimense*)는 경북의 전통 시장에서 구매하였다. 섬기린초는 추출 전에 80°C에서 4일 동안 건조하였다. 건조된 섬기린초에 40% (v/v)의 주정을 10배로 첨가하여 30시간 동안 상온에서 추출하였으며 이후 여과하여 감압 농축한 다음 동결건조하여 그 분말을 사용하였다. 추출물 중 화합물의 분리는 실리카겔 컬럼(3.5 by 60.0 cm; Kiesel gel 60, 150 g, 230 to 400 mesh; E. Merck)을 이용하여 1차적으로 분리하였으며 추출 고형분 10 g이 포함된 농축 추출물을 실리카겔 컬럼 충전재 150 g과 혼합하였다. 이후 농축시료에 클로로포름, 메탄올, 증류수 및 아세트산을 부피비율로 55:36:8:1 (v/v/v)로 혼합한 용매를 흘려 1차 분취하였다. 1차 분취를 통해 수득한 분액을 Shephadex LH-20 (3.5×60 cm, 130 g, 70-100 µm; Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) 수지 150 g이 담긴 오픈 컬럼을 이용하여 메탄올로 용리하여 2차 분취하였다. 2차 분취액을 YMC-ODS-A (reverse phase C18, 250×20 mm, 5 µm; Waters Co. Ltd., Milford, MA, USA) 컬럼이 장착된 high performance liquid chromatography (HPLC)에 적용하여 이동상 아세토나이트릴 및 물(20:80, v/v; 15 mL/min)을 이용하여

용리하였다. 용리된 물질은 270 nm 파장으로 검출하였으며 컬럼과 반응하여 chromatogram에서 peak를 형성하는 시간을 기준으로 분취하여 구조 분석을 진행하였으며 이를 통해 정제된 단일 물질을 수득하였다.

### 섬기린초 추출 분획물의 구조 동정

섬기린초 추출 분획물의 구조 동정은 Vu et al. (2013)의 방법에 따라 수행하였다. 분취물들의 화학 구조 동정을 위해 liquid chromatography mass spectrometer (LC-MS)는 MSD 1100 single quadrupole (Agilent Co. Ltd., Santa Clara, CA, USA)와 ESI (electrospray ionization; Hewlett-Packard Co. Ltd., Houston, TX, USA)를 함께 사용하였다. 또한 분취물의 화학 구조를 결정하기 위하여 <sup>1</sup>H-NMR을 수행하였다. <sup>1</sup>H-NMR은 분리 및 정제된 화합물을 중수소화 메탄올(CD<sub>3</sub>OD; Merck, Darmstadt, Germany)에 용해시켜 500 MHz에서 1시간동안 Bruker AMX-500 (Bruker Analytische Messtechnik GmbH; Bruker Co. Ltd., Ettingen, Germany) 분광기를 사용하여 분석하였다. 내부 표준 물질은 테트라메틸실란(tetramethylsilane)으로 사용되었으며 커플링 상수는 Hertz가 사용되었다(Yoon et al., 2011). 정제된 화합물의 구조는 LC-MS 및 <sup>1</sup>H-NMR 데이터를 문헌과 비교하여 결정하였다.

### 세포 생존율 측정

섬기린초 추출물의 세포 독성은 formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, USA] 시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하는 Mosmann (1983)의 방법을 변형하여 수행하였다. 쥐의 대식세포에서 유래한 RAW 264.7 cell line을 사용하였으며 96-well plate에 3×10<sup>6</sup> cell/dish로 접종한 후 10% fetal bovine serum (FBS)를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후 실험에 사용하였다. 세포 배양액 중 섬기린초 에탄올 추출물을 농도별로 첨가한 뒤 MTT 시약을 5 mg/mL로 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 이후 생성된 formazan을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, USA)를 100 µL 첨가하고 1시간 반응 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하고, 대조구의 흡광도 값을 기준으로 세포 생존율을 비교하였다.

### Nitric oxide (NO) 생성 억제 활성화

RAW 264.7 cell을 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10<sup>6</sup> cells/mL로 희석하여 24 well plate에 접종하고 섬기린초 추출물(40% 주정)과 분리 및 동정된 화합물 그리고 LPS (1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 섬기린초 추출물과 분리 및 동정된 화합물은 100 µg/mL로 well에 처리되었다. 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 griess 시약(1% sulfa-

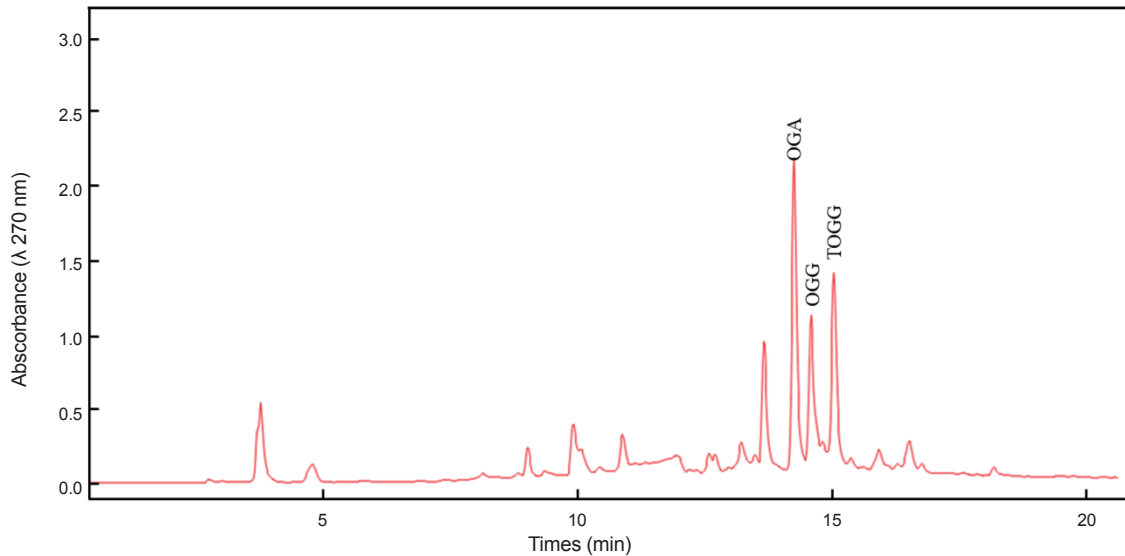


Fig. 1. HPLC chromatogram of 3 compounds isolated and identified from *Sedum takesimense*.

nilamide, 0.1% N-1-naphthylenediamine dihydrochloride and 2.5% phosphoric acid)을 처리하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )를 이용하여 표준곡선을 작성하여 도출하였다.

#### 염증성 사이토카인 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 및 IL-8) 생성 억제 효과

염증성 사이토카인 억제 생성 시험은 Masuki et al. (2016)의 방법을 약간 변형하여 ELISA kit (Abcam Co., Cambridge, UK)를 사용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 24시간 동안 전 배양 후 배지를 제거하고 0.1 mg/mL의 농도로 섬기린초 추출물과 분리 및 동정된 화합물을 처리하여 2시간 동안 반응시켰다. 반응 이후 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS를 첨가하여 6시간 동안 염증 반응을 유도하고, ELISA kit 공급사에서 제공하는 매뉴얼에 따라 시험을 수행하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-8과 같은 사이토카인 생성 억제 효과를 측정하였다.

#### 여드름 유발균 *C. acnes*에 대한 항균활성

여드름 유발균인 *C. acnes* KCTC 3314는 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받아 사용하였다. *C. acnes*에 대한 섬기린초 추출물의 항균 활성 평가를 위해 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서 제시하는 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 평가를 수행하였으며, MIC는 two-fold serial dilution을 통해 수행되었다. 최소저해농도 평가를 위해 *C. acnes*는 tryptic soy agar (TSA; Difco, Detroit, MI, USA)에서 37°C, 72시간동안 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 전 배양되었으며, 이를  $10^5$ - $10^6$  CFU/mL의 농도로 희석하여 접종 균액으로 사용하였다. 섬기린초로부터 추출 및 분리된 물질은

96 well plate에 two-fold serial dilution으로 희석하여 접종한 뒤 37°C, 72시간동안 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였으며 배양 후 microplate reader를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 측정된 흡광도 값의 차이로 최소저해농도를 도출하였다.

#### 통계분석

모든 실험의 측정값은 3회 이상 반복 실험한 결과의 평균값과 표준편차(means $\pm$ SD)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. 각 시험군 간의 측정값 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)를 수행하여 분석하였으며, 유의성은 신뢰 구간  $P < 0.05$  수준에서 Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)으로 사후 검정하여 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 섬기린초 추출물의 분리 및 구조 동정

섬기린초 추출물(CE)을 이용하여 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 분획을 수행한 결과 1차 분취액에서는 고형분이 3.5 g이 확인되어 추출 수율은 약 35% (w/w)으로 나타났다. 이후 2차 분취된 분액 중 고형분은 1.5 g으로 나타났으며 이 분액을 이용하여 270 nm로 검출한 결과 화합물 1, 2, 3이 각각 14.33분, 14.67분 및 15.12분에 용리되는 것을 확인하고 분취하여 각각 25 mg, 20 mg 및 215 mg의 단일화합물을 확보하였다(Fig. 1). 확보된 물질들의 구조 동정은 LC-MS와  $^1\text{H-NMR}$ 이 수행되었으며 기존의 연구결과(Tanaka et al., 1983; Tanaka et al., 1985; Xin-Min et al., 1987; Thuong et al., 2007; Wang et al., 2007b;

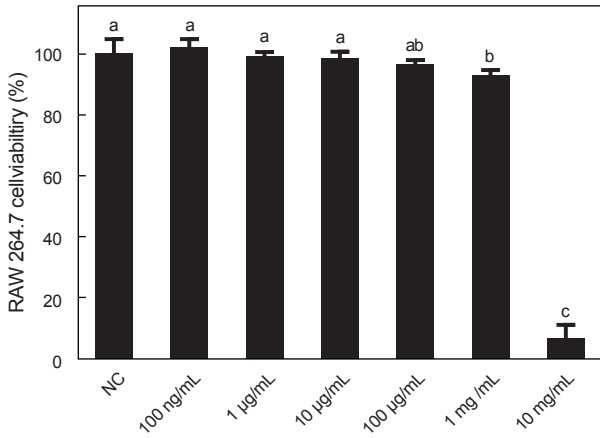


Fig. 2. Cytotoxic effect on *Sedum takesimensis* ethanolic extracts (CE) in RAW 264.7 cell. CE were treated at a concentration of 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1 mg/mL, 10 mg/mL, and NC, negative control. Values with different letters above the bars mean that significantly different (P<0.05).

Yang et al., 2007; Yuan et al., 2012; Hisham et al., 2011; Vu et al., 2013)와 비교하여 구조를 결정하였다(Fig. 1 and Table 1). Vu et al. (2013)이 보고한 바와 같이, 섬기린초에서 분리된 물질들은 gallic acid와 그 유도체로서 가수분해 가능한 tannin류에 속하며, 유도체는 2-4개가 galloylation된 galloylbutin로 구성된 것을 확인하였다. 분리된 화합물 1은 4,6-di-O-galloylbutin (OGA), 화합물 2는 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose (OGG), 화합물 3은 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-β-glucose (TOGG)로 동정되었다(Fig. S1).

### 섬기린초 추출물의 세포 독성 평가 결과

섬기린초 추출물의 세포독성 평가는 에탄올을 이용한 조추출물(CE)로 수행되었으며 그 결과는 Fig. 2와 같다. CE는 1 mg/mL 이상의 농도에서 유의적인 세포독성을 RAW 264.7 cell에 대하여 나타내었다. 하지만, 1 mg/mL의 농도에서 세포 독성은 7.07%로 나타났으며 세포 생존률은 92.93%로 높게 측정되어 1 mg/mL 이하의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다. 세포 독성 평가는 추출물 농도에 대하여 세포의 생존률을 분석하여 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 농도를 도출한다. 또한, Jang et al. (2016)은 본 연구에서와 같이 섬기린초 추출물이 RAW 264.7 cell에 대한 1 mg/mL 미만의 농도에서는 독성을 나타내지 않아 본 연구와 유사한 경향의 결과를 보고한 바 있다. 따라서 이를 바탕으로 이후 진행된 실험의 추출물 농도는 RAW 264.7 cell에 대해 독성을 나타내지 않는 100 µg/mL로 결정하여 수행하였다.

### 섬기린초 추출물 및 그 유래 화합물의 NO (nitric oxide) 생성 저해 활성

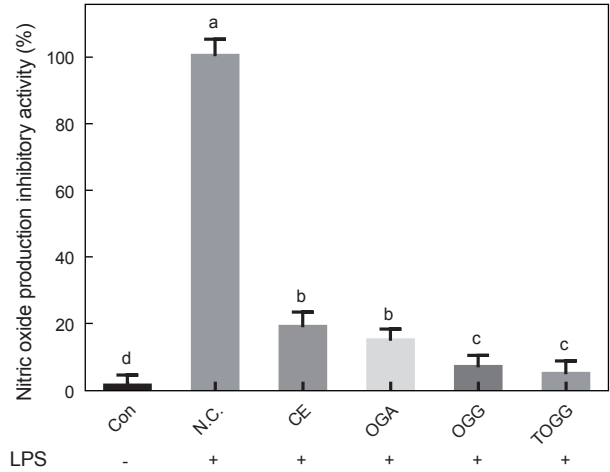


Fig. 3. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cell. Cells were treated with LPS (1 µg/mL) for 24 h, then extract and compounds treated at a concentration of 100 µg/mL. Values with different letters above the bars mean that significantly different (P<0.05). NC, negative control; CE, crude extract of *Sedum takesimensis* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose.

상처 및 염증과 같은 면역방어기전의 다양한 메커니즘을 매개하는 IL-1 또는 TNF 등에 의해 유도된 inducible nitric oxide (i-NOS)에 의해 생성되는 NO는 생체 내에서 다양한 역할을 수행하지만 염증과 같은 원인으로 인해 과량 존재할 경우 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키고 만성 염증 질환 및 자가 면역질환 등을 초래하는 것으로 알려져 있다(Yang et al., 2016). 세포 등은 염증 유래 인자 또는 ultra violet 등에 노출되었을 때 NO 생성 수준이 높아지고 이후 염증을 일으키는 사이토카인의 생성이 유도되는 것으로 알려져 있다(Vicentini et al., 2011). 섬기린초에서 유래한 추출물 및 분리된 화합물(CE, OGA, OGG, 및 TOGG)는 LPS 처리로 인하여 NO가 유도된 RAW 264.7 cell에 100 µg/mL로 처리되었을 때 NO production을 저해하는 효과를 나타내었으며 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에 따르면 섬기린초 조추출물은 LPS에 의해 유도된 NO의 생성량을 약 81% 감소시켰으며 분리된 화합물 OGA, OGG 및 TOGG는 NO 생성을 각각 85%, 93% 및 95% 감소시키는 것으로 나타났다. 섬기린초와 같은 식물 유래 추출물들의 항염증 활성은 다양하게 보고되어 있으며(Jang et al., 2016; Yang et al., 2016; Kim et al., 2017; Cho et al., 2017; Chang et al., 2018), 많은 종류의 식물 유래 추출물 및 그 유래 화합물들은 효과적으로 NO 생성을 억제하는 것으로 나타난다. Kim et al. (2017)에 따르면 누리장나무잎 추출물 중 폴리페놀 함량이 가장 높은 EtOAc (ethyl acetate) 분획물이 항산화 활성이 높게 측정되었으며 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell의 NO 생성도 효과적으로 억제한다고 보

고되었다. 식물 유래 추출물의 경우 폴리페놀을 포함하는 항산화물질 또는 다양한 종류의 생리활성 물질의 함량에 의존하여 NO 생성능이 저해되는 것으로 판단된다. 따라서 섬기린초 추출물과 그 유래 단일 물질들은 염증 반응의 결과로 발생하는 NO의 생성을 효과적으로 저해할 수 있는 것으로 판단된다.

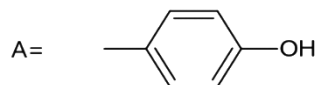
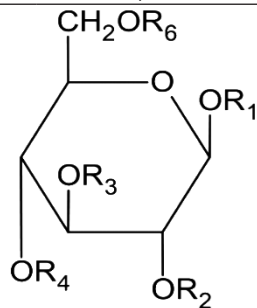
#### 염증성 사이토카인(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 및 IL-8) 생성 억제 효과

섬기린초 유래의 조추출물(CE)와 분리 및 동정된 화합물(OGA, OGG, TOGG)에 의해 LPS로 유도된 NO 감소 활성을 나타냈기 때문에 이를 이용하여 전염증 사이토카인에 해당하는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-8의 생성에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 4). 그 결과 양성대조군으로 RAW 264.7 cell에 LPS를 처리한 경우 각 염증성 사이토카인들은 발현되었으며 섬기린초 유래의 CE, OGA, OGG, 및 TOGG를 처리한 처리군은 사이토

카인 발현이 감소한 것으로 확인되었다. TNF- $\alpha$ 는 양성대조군 대비 CE를 100  $\mu$ g/mL으로 처리하였을 때 약 75%의 발현이 감소하였으며, OGA, OGG 및 TOGG를 같은 농도로 처리한 경우 약 87%, 89%, 및 90%의 발현량이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 4A). 또한 IL-1 $\beta$ 도 마찬가지로 유의적인 감소값을 나타내었는데, CE의 경우 약 82%, OGA의 경우 약 86%, OGG 및 TOGG의 경우 각각 약 87%가 감소하여 효과적으로 IL-1 $\beta$ 의 발현을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 4B). IL-8도 CE, OGA, OGG 및 TOGG에 의해 효과적으로 감소되어 양성대조군 대비 발현량이 약 80%, 85%, 88% 및 86%가 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4C). 정상조직에서도 발현되는 전염증 사이토카인들은 병변 과정에서 발현 정도가 증가하며 류마티스성 관절염 및 암 발생 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2011). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-8과 같은 전염증성 사이토카인들은 식물 유래 추출물들에 의해 발현량이 감소되는 효과에 대해 다

Table 1. Chemical shifts of hydroxyl proton in p-hydroxylphenyl, galloyl and glucose in the purified compound

Position	Compounds		
	OGA	OGG	TOGG
<b>p-hydroxylphenyl</b>			
2', 6'	6.93 (1H, dd, 9.0)		
3', 5'	6.61 (1H, dd, 9.1)		
<b>Galloyl</b>			
2', 6'			7.10 (2H, s)
2'', 6''	7.14 (2H, s)	7.14 (2H, s)	7.09 (2H, s)
2''', 6'''	7.12 (2H, s)	7.11 (4H, s)	7.05 (2H, s)
2''', 6''''			7.03 (2H, s)
<b>Glucose</b>			
1	4.87 (1H, d, 7.9)	4.85 (1H, d, 7.9)	6.04 (1H, d, 8.4)
2	3.69 (1H, dd, 8.1, 9.5)	5.13 (1H, dd, 8.1, 9.5)	5.35 (1H, dd, 8.3, 9.6)
3	3.70 (1H, t, 9.0)	3.75 (1H, t, 9.2)	4.18 (1H, t, 9.5)
4	5.22 (1H, t, 9.5)	3.59 (1H, t, 9.4)	5.37 (1H, t, 9.7)
5	3.83 (1H, m)	3.79 (1H, m)	4.19 (1H, m)
6	4.58 (1H, dd, 2.3, 12.0)	4.62 (1H, dd, 2.0, 11.9)	4.47 (1H, dd, 2.2, 12.3)
	4.47 (1H, dd, 6.7, 12.2)	4.48 (1H, dd, 6.6, 11.9)	4.27 (1H, dd, 2.2, 12.3)



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>6</sub>
OGA	A	H	H	G	G
OGG	H	G	H	G	G
TOGG	G	G	H	G	G

OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -glucose.

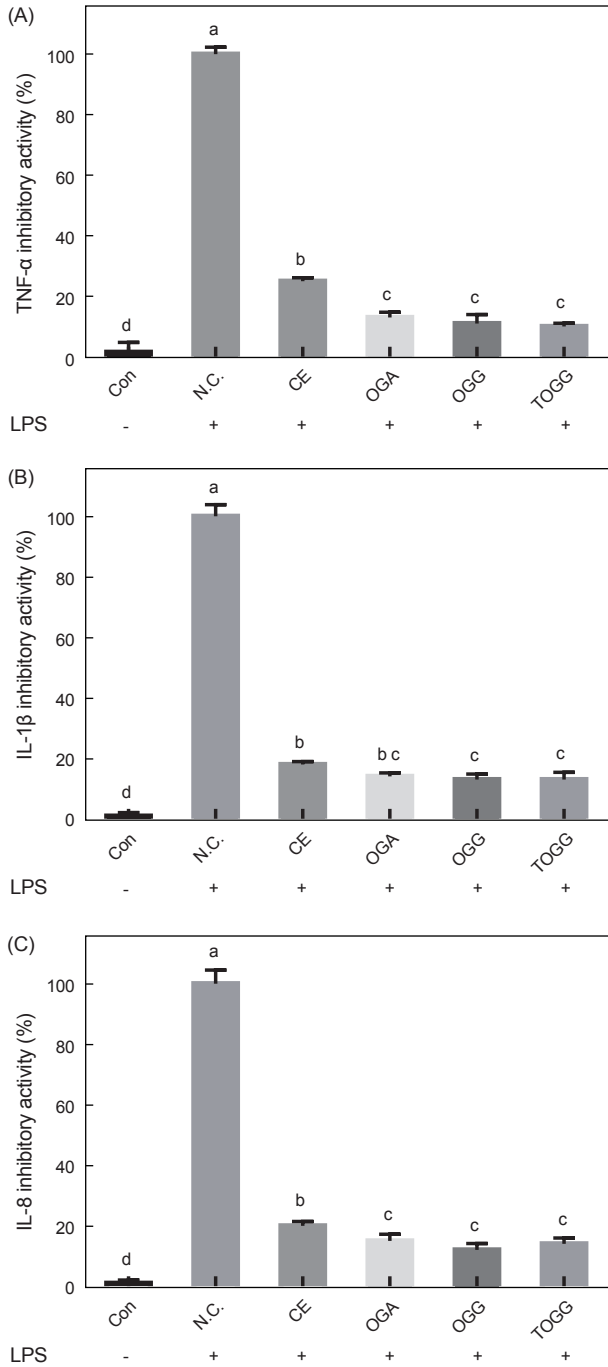


Fig. 4. Inhibitory effect of crude extract and single compounds on the production of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), and IL-8 (C) in RAW 264.7 cell. Cells were treated with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h, then extract and compounds treated at a concentration of 100  $\mu$ g/mL. Values with different letters above the bars mean that significantly different ( $P < 0.05$ ). NC, negative control; CE, crude extract of *Sedum takesimense* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose.

양한 연구가 수행되어왔다. 누리장나무 ethanol과 ethyl acetate 추출물이 효과적으로 NO 생성을 억제하였으며 이후 수행된 전염증 사이토카인 발현 저해 활성 시험에서도 TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS 및 COX-2와 같은 염증성 사이토카인들을 농도의존적으로 발현량을 감소시켰다(Kim et al., 2017). 또한 그라비올라 잎을 에탄올을 이용하여 추출한 추출물도 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS 및 COX-2와 같은 다양한 사이토카인을 농도의존적으로 감소시키는 것으로 보고되었다(Cho et al., 2017). 따라서, 본 연구에서 사용된 섬기린초 조추출물과 그로부터 분리 및 동정된 3가지 화합물은(OGA, OGG 및 TOGG) NO와 염증성 사이토카인들(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8)을 효과적으로 감소시키는 활성을 나타내어 항염증제로서의 가능성을 나타내었다.

### 여드름 원인균(*C. acnes*)에 대한 항균 효과

피부질환 중 대표적인 여드름은 일반적으로 피지생산의 증가와 *C. acnes* 등 염증유발 균주의 증식 등 다양한 주요인자가 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있다(Cunliffe et al., 2004). 미생물학적인 관점에서는 *C. acnes*의 다양한 피부상재균이 관여하는 것으로 알려져 있으며(Jang and Park, 2014) *C. acnes* 모낭에 상주하며 피부 중 생성된 피지를 이용하여 증식하여 모낭 내 염증을 유발한다고 알려져 있다(Lee et al., 2016). 본 연구에서는 섬기린초 유래의 추출물과 분리된 화합물을 이용하여 *C. acnes*에 대한 항균활성을 확인하기 위해 재료 및 방법에 서술된 방법대로 MIC를 수행하였다(Table 2). 그 결과 섬기린초 추출물 및 그 화합물 중 OGA를 제외한 CE, OGG 및 TOGG 모두 높은 항균 활성을 나타내었다. OGA의 경우 1,000  $\mu$ g/mL의 MIC 농도를 나타내어 여드름 원인균인 *C. acnes*에 대하여 항균활성이 없는 것으로 나타났으며, CE는 150  $\mu$ g/mL의 농도에서 최소 생육저해가 나타났다. OGG 및 TOGG는 12.5  $\mu$ g/mL 및 3.2  $\mu$ g/mL의 농도에서 최소 생육저해를 나타내어 여드름 원인균에 대한 높은 항균활성을 나타내었다. Yang et al. (2016)에 따르면 산벚나무 가지 추출물 및 용매분획물을 이용하여 disc diffusion assay를 수행하였을 때 여드름 원인균에 대한 항균효과를 나타냈다고 보고하였다. 또한 Sohn et al. (2006)은 335종 식물의 각 부위별 추출물을 이용하여 여드름균에 대한 항균활성을 disc paper법을 이용하여 보고하였다. 그 결과 25종의 식물 유래 추출물에서 clear zone이 관

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of *Sedum takesimense* extract and its isolated 3 compounds (OGA, OGG and TOGG) against *Cutibacterium acnes*

Strain	MIC ( $\mu$ g/mL)			
	CE	OGA	OGG	TOGG
<i>C. acnes</i> KCTC 3314	150.0	1,000.0	12.5	3.2

CE, crude extract of *S. takesimense* with 40% ethanol; OGA, 4,6-di-O-galloylarbutin; OGG, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose; TOGG, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose.

찰되었으며 같은 종류의 식물도 부위에 따라 활성이 달리 나타났다(Sohn et al., 2006). Seong et al. (2003)은 오미자와 솔잎을 이용하여 여드름 원인균의 성장에 미치는 효과를 연구하였으며 그 결과에서 *C. acnes*의 MIC 값은 75 µg/mL로 보고되어 있다. 또한 Vu et al. (2013)에 따르면 섬기린초 유래에서 분리된 OGA, OGG 및 TOGG 등을 포함하는 gallotanin 계열의 단일물질들은 토마토 풋마름병 원인 세균들에 대해서 항균 효과를 나타내었다. OGA는 토마토 풋마름병을 유발하는 9개의 세균에 대해서 0.10-1.00 g/L 최소저해농도를 나타내었으며, OGG는 0.04-0.50 g/L, TOGG는 0.03-1.78 g/L의 최소저해농도를 나타내었다. 이 중 TOGG는 다른 단일물질들과의 FIC (fractional inhibitory concentration) 결과에서 토마토 풋마름병 유발 세균 저해에 대한 시너지 효과를 나타내었다(Vu et al., 2013). 이와 같이 본 연구결과에서 분리된 화합물 2종인 OGG와 TOGG는 매우 낮은 농도에서 MIC 값을 나타내어 여드름 원인균을 효과적으로 생육저해를 할 수 있는 물질로써 잠재력을 나타내었다.

본 연구는 섬기린초 유래의 추출물과 분리 및 동정된 화합물 3종의 항염증 활성과 여드름 원인균에 대한 항균활성에 대해 연구하였다. 그 결과 RAW 264.7 cell에 대해 세포독성은 100 µg/mL 이하에서 나타나지 않았으며 염증반응에서 발생하는 산물인 NO를 효과적으로 감소시켰다. 또한 전염증 사이토카인에 해당하는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-8에 대해서도 발현량을 현저히 감소시키는 활성을 나타내었으며, 마지막으로 여드름 원인균인 *C. acnes*에 대한 항균활성도 높게 나타났다. 이 중 OGG와 TOGG는 여드름 원인균에 대해 최소저해농도가 12.5 µg/mL 및 3.2 µg/mL로 매우 강력한 항균 활성을 나타내었다. 섬기린초에서 유래한 단일물질들은 세포독성을 나타내지 않는 최대농도인 100 µg/mL에서는 항염증 활성과 항균활성 효과를 기대할 수 있다. 따라서 섬기린초 추출물에서 분리 및 동정된 3가지 화합물은 염증 인자를 효과적으로 감소시키며, 관련된 사이토카인 발현을 저해하고 여드름 원인균에 대해 높은 항균활성을 가져 피부에서 발생하는 염증 반응과 여드름 등의 트러블을 제어할 수 있는 제재로써의 잠재력을 확인하였다.

## 사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2021년)에 의하여 연구되었음.

## References

- Bae KH. 2000. The medicinal plants of Korea. Kyohak Publishing Co., Seoul, Korea, 202.
- Chung YH and Kim JH. 1989. A taxonomic study of sedum section aizoon in Korea. Korean J Plant Tax 19, 189-227. <https://doi.org/10.11110/kjpt.1989.19.4.189>.
- Cho EJ, Lee JH, Sung NY and Byun EH. 2017. Anti-inflammatory effects of *Annona muricata* leaf ethanol extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 46, 681-687. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2017.46.6.681>.
- Chang SJ, Jeon NB, Park JW, Jang TW, Jeong JB and Park JH. 2018. Antioxidant activities and anti-inflammatory effects of fresh and air-dried *Abeliophyllum distichum* Nakai leaves. Korean J Food Preserv 25, 27-35. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2018.25.1.27>.
- Cunliffe WJ, Holland DB and Jeremy A. 2004. Comedone formation: Etiology, clinical presentation and treatment. Clin Dermatol 22, 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.03.011>.
- Hisham DMN, Lip JM, Noh JM, Normah A and Nabilah MN. 2011. Identification and isolation of methyl gallate as a polar chemical marker for *Labisia pumila* Benth. J Trop Agric Food Sci 39, 279-284.
- Jang JH, Jung HK, Ko JH, Sim MO, Woo KW, Kim TM, Lee KH, Ahn BK, Cho HW, Cho JH and Jung WS. 2016. Anti-inflammatory effect of *Sedum takesimensense* Nakai water extract in RAW 264.7 cells. Korean J Med Crop Sci 24, 228-236. <https://doi.org/10.7783/KJMCS.2016.24.3.228>.
- Jang HN and Park SN. 2014. Antimicrobial activity of niaouli *Melaleuca quinquenervia* leaf extracts against skin flora. J Soc Cosmet Scientists Korea 40, 313-320. <https://doi.org/10.15230/SCSK.2014.40.3.313>.
- Kang BK, Kim KBWR, Kim MJ, Park SW, Park WM, Ahn NK, Choi YU, Bae NY, Park JH and Ahn DH. 2015. Anti-inflammatory effect of *Sargassum coreanum* ethanolic extract through suppression of NF- $\kappa$ B pathway in LPS induced RAW264.7 cells in mice. Microbiol Biotechnol Lett 43, 112-119. <https://doi.org/10.4014/mbl.1504.04008>.
- Kim DW, Son KH, Chang HW, Bae KH, Kang SS and Kim HP. 2004. Anti-inflammatory activity of *Sedum kamtshaticum*. J Ethnopharmacol 90, 409-414. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.11.005>.
- Kim HJ, Lim HW, Kim BH, Kim HS, Choi SW and Yoon CS. 2006. Studies on the anti-acne effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. J Soc Cosmet Sci Korea 3, 53-58.
- Kim JH, Song H, Ko HC, Lee JY, Jang MG and Kim SJ. 2017. Anti-oxidant and anti-inflammatory properties of *Clerodendrum trichotomum* leaf extracts. J Life Sci 27, 640-645. <https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.6.640>.
- Korean Dermatological Association Textbook Compilation Committee. 2008. Dermatology. 5th ed. Ryo Moon Gak, Seoul, Korea, 446-454.
- Lee HN, Lim DY, Lim SS, Kim JD and Yoon JH. 2011. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Eupatorium japonicum*. Korean J Food Sci Technol 43, 65-71. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2011.43.1.065>.
- Lee JR, Kim YW, Byun SH, Kim SC and Park SJ. 2015. Anti-inflammatory effects of the fermentation extracts consisting of soybean, red ginseng and *Citrus Unshiu* Peel. Korean J

- Herbol 30, 59-65. <https://doi.org/10.6116/kjh.2015.30.5.59>.
- Lee SJ, Lee EH, Shin JH, Kim SS, Kim NK, Choi E and Seo SR. 2016. *Eucalyptus globulus* extracts inhibit *Propionibacterium acnes*-induced inflammation signaling. Korean J Microbiol 52, 421-427. <https://doi.org/10.7845/kjm.2016.6066>.
- Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H, Nakata K, Uematsu K, Su CY and Kawase T. 2016. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). Int J Implant Dent 2, 19. <https://doi.org/10.1186/s40729-016-0052-4>.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Omer H, McDowell A and Alexeyev OA. 2017. Understanding the role of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris: The critical importance of skin sampling methodologies. Clin Dermatol 35, 118-129. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.10.003>.
- Park J, Lee J, Jung E, Park Y, Kim K, Park B, Jung K, Park E, Kim J and Park D. 2004. *In vitro* antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp. Eur J Pharmacol 496, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.05.047>.
- Seong JM, Park NY and Lee SH. 2003. Effect of *Schizandra chinensis* and pine needle on growth of pathogens relate to acne. Korean J Microbiol Biotechnol 31, 69-74.
- Sohn HY, Kim YS, Kum EJ, Kwon YS and Son KH. 2006. Screening of anti-acne activity of natural products against *Propionibacterium acnes*. Microbiol Biotechnol Lett 34, 265-272.
- Swanson JK. 2003. Antibiotic resistance of *Propionibacterium acnes* in acne vulgaris. Dermatol Nurs 15, 359-362.
- Tan HH. 2003. Antibacterial therapy for acne. Am J Clin Dermatol 4, 307-314. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83125-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83125-8).
- Tanaka T, Nonaka GI and Nishioka I. 1983. 7-O-Galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis*. Phytochemistry 22, 2575-2578. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80168-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80168-X).
- Tanaka T, Nonaka GI and Nishioka I. 1985. Punicafolin, an ellagitannin from the leaves of *Punica grantum*. Phytochem 24, 2075-2078. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83125-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83125-8).
- Thuong PT, Kang JH, Na KM, Jin YW, Youn JU, Seong HY, Song KS, Min BS and Bae KH. 2007. Anti-oxidant constituents from *Sedum takesimense*. Phytochemistry 68, 2432-2438. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.05.031>.
- Vicentini FT, He T, Shao Y, Fonseca MJ, Verri Jr WA, Fisher GJ and Xu Y. 2011. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- $\kappa$ B pathway. J Dermatol Sci 61, 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.01.002>.
- Vu TT, Kim JC, Choi YH, Choi GJ, Jang KS, Choi TH, Yoon TM and Lee SW. 2013. Effect of gallotannins derived from *Sedum takesimense* on tomato bacterial wilt. Plant Dis 97, 1593-1598. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-13-0350-re>.
- Wang YY, Ryu AR, Jin S, Jeon YM and Lee MY. 2017a. Chlorin e6-mediated photodynamic therapy suppresses *P. acnes*-induced inflammatory response via NF $\kappa$ B and MAPKs signaling pathway. PLoS One 12, e0170599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170599>.
- Wang KJ, Yang CR and Zhang YJ. 2017b. Phenolic antioxidants from *Chinese toon* (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*). Food Chem 101, 365-371. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.044>.
- Xin-Min C, Yoshida T, Hatano T, Fukushima M and Okuda T. 1987. Galloylarbutin and other polyphenols from *Bergenia purpurascens*. Phytochemistry 26, 515-517. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81446-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81446-6).
- Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chinag LC and Lin CC. 2007. The *in vitro* activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-flucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. J Ethnopharmacol 110, 555-558. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.039>.
- Yang SA, Pyo BS and Kim SM. 2016. Antibacterial and nitric oxide production inhibitory activities of *Prunus sargentii* branches extract and its fractions against pathogens of acne. Korean J Med Crop Sci 24, 129-135. <https://doi.org/10.7783/KJMCS.2016.24.2.129>.
- Yoon MY, Choi NH, Min BS, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Han SS, Cha B and Kim JC. 2011. Potent *in vivo* antifungal activity against powdery mildews of pregnane glycosides from the roots of *Cynanchum wilfordii*. J Agric Food Chem 59, 12210-12216. <https://doi.org/10.1021/jf2039185>.
- Yuan GQ, Li QQ and Qin J. 2012. Isolation of methyl gallate from *Toxicodendron sylvestri* and its effect on tomato bacterial wilt. Plant Dis 96, 1143-1147. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0150-RE>.



## 부 록

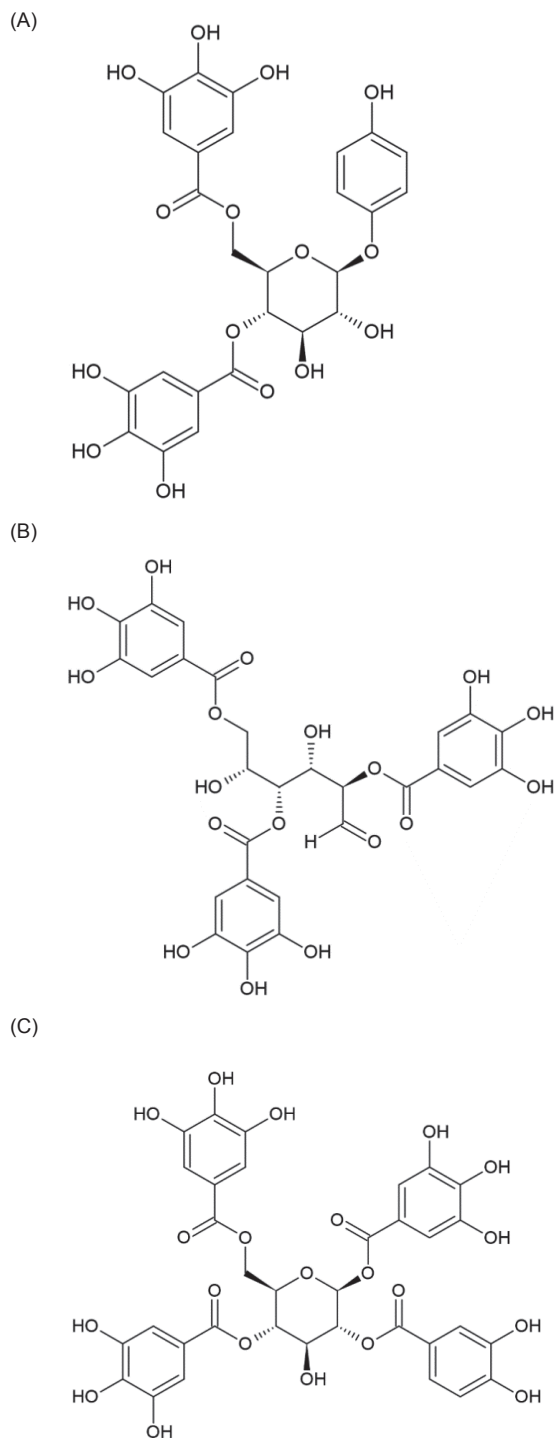


Fig. S1. Chemical structure of purified 3 compounds derived from the aerial part of *Sedum takesimense*. A, 4,6-di-O-galloylarbutin (OGA); B, 2,4,6-tri-O-galloyl-glucose (OGG); C, 1,2,4,6-tetra-O-galloyl-glucose (TOGG).