

향부자 에틸아세테이트 분획물의 염증 및 가려움증에 관한 연구

김도규^{1,†} · 이지연¹ · 문소현¹ · 김유경¹ · 김나리¹ ·
정아름¹ · 장준환¹ · 이재섭¹ · 한상배² · 배준태^{1,‡}

*㈜제이투케이바이오 기술연구소

**충북대학교 약학대학, 교수

(2022년 10월 14일 접수, 2022년 11월 11일 수정, 2022년 11월 15일 채택)

A Study on Inflammation and Itching of *Cyperus rotundus* Ethyl Acetate Fractions

Do Gyu Kim^{1,†}, Ji Yeon Lee¹, Sohyun Mun¹, Yukyung Kim¹, Nari Kim¹,
Ah Reum Jung¹, Jun-Hwan Jang¹, Jae-Soeb Lee¹, Sang Bae Han², and Jun-Tae Bae^{1,‡}

¹R&D Center, J2KBIO, 50-3, Dureungyuri-ro, Ochang-eup,
Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28103, Korea

²College of Pharmacy and Medical Research Center, Chungbuk National University

(Received October 14, 2022; Revised November 11, 2022; Accepted November 15, 2022)

요약: 본 연구에서는 향부자를 이용하여 에틸아세테이트로 분획물을 제조하고, 지표물질 α -cyperone의 함량을 확인하였다. 또한, 향부자 에틸아세테이트 분획물(EAFC) 및 α -cyperone의 항염증 및 가려움증 완화 효능평가를 통하여 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다. EAFC 내의 α -cyperone의 함량을 확인하기 위해 HPLC 분석을 실시한 결과, α -cyperone의 함량이 5.243%임을 확인하였다. EAFC 및 지표성분인 α -cyperone의 염증 완화 효과를 검증하기 위해 lipopolysaccharide (LPS)로 염증반응을 유도시킨 RAW 264.7 대식세포에서의 nitric oxide (NO) 생성 저해능을 확인한 결과, 농도의존적으로 NO 생성을 저해하였다. 추가적인 염증염증 유발 인자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현 역시 농도의존적으로 저해하였다. EAFC를 함유한 간단한 화장품 제형을 이용하여 임상시험을 실시한 결과, sodium lauryl sulfate (SLS)로 유발된 피부 자극이 진정되는 효과 및 가려움증이 완화되는 효과를 확인하였다. 이를 통하여 향부자는 염증 저해 및 가려움증 완화 효과를 가지는 천연 화장품 원료로 사용 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: In this study, *Cyperus rotundus* (*C. rotundus*) was fractionated into ethyl acetate to identify α -cyperone, a representative indicator, and its ethyl acetate fraction were evaluated to confirm the possibility as a functional cosmetic ingredient. As a result of HPLC analysis, it was confirmed that the content of α -cyperone was 5.243%. In order to verify the inflammatory relief effect of the ethyl acetate fraction from *C. rotundus* (EAFC) and α -cyperone, it was confirmed that nitric oxide (NO) production inhibitory ability in RAW 264.7 macrophages induced an inflammatory reaction with lipopolysaccharide (LPS). Real-time qPCR analysis confirmed inhibition of mRNA expression level of inflammatory factors, IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 and iNOS. As a results of conducting a clinical study using a simple cosmetic formulation containing EAFC, it was confirmed that the skin irritation stimulated by sodium lauryl sulfate (SLS) was calming and relieving itching. Through these results, it is believed that the *C. rotundus* can be used as a natural cosmetic ingredient that has the effect of inhibiting inflammation and relieving itching.

Keywords: *Cyperus rotundus*, α -cyperone, anti-inflammatory, nitric oxide, RAW 264.7

† 주 저자 (e-mail: dogyu@j2kbio.com)
call: 043-280-9021

‡ 교신저자 (e-mail: jtbae@j2kbio.com)
call: 043-280-9040

1. 서 론

향부재(*Cyperus rotundus*)는 사초과의 다년생 식물로 열대지방 및 아열대 지방에서 서식하는 잡초이다. 식용보다는 약용으로 이용되는데 기존에 알려진 약리작용으로는 진통, 자궁근육 이완의 작용이 있으며 한방으로는 생리불순, 갱년기 장애들에 처방되는 부인병의 묘약으로 알려져 있다 [1]. 이러한 이점에도 불구하고 향부자는 뿌리에서 일정한 화학물질을 생성하여, 다른 식물의 생존을 막거나 성장을 저해하는 작용을 일으키는 침습적인 식물로 분류되고 있다 [1-4]. 현재까지 보고된 향부자에 대한 성분 및 그 성분들에 대한 생리활성 연구로는 cyprotene, acopaene, cyperene, aselinene, rotundene 등의 유효 성분과 관련한 연구가 있다 [5]. 대표적인 활성 성분은 α -cyperone으로 알려져 있으며 이의 항염, 항산화, 항진균, 진통 효과에 대해 알려져 있으며 [6-8], 특히 α -cyperone은 NF- κ B의 음성 조절을 통해 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현과 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성을 억제함으로써 염증반응을 저해시킨다고 보고된 바 있다 [9].

일반적으로 염증반응은 세균 감염 등 외부의 물리적 자극이나 화학적 자극으로부터 생체를 보호하는 생리적인 반응이지만, 만성적 염증반응은 오히려 인간에게 질병을 일으키는 원인이 된다 [6]. 염증반응은 흔히 그람 음성균의 세포벽 구성 물질인 LPS에 의해 발생하는 경우가 많으며, 대식세포가 LPS에 의해 자극을 받아 활성화 된다 [10,11]. 활성화된 대식세포는 염증 유발 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) 등과 염증 매개 인자인 nitric oxide (NO)의 발생을 촉진한다 [11,12]. NO는 inducible NO synthase (iNOS)로 부터 생산되며 몸속으로 침투한 항원이나 세균으로부터 보호하거나 암세포에 대한 독성을 가지고 있어 신체 방어 물질로 흔히 알려져 있다 [13]. cyclooxygenase (COX)는 cyclooxygenase-1 (COX-1)과 COX-2로 나누어지는데, COX-1은 정상적인 생체 기능에 작용하지만, COX-2는 염증반응 부위에서 발현 된다 [14]. 대표적으로 COX-2는 iNOS와 PGE₂의 생합성을 매개하는 역할을 하며, 이를 통해 NO의 생성을 유도한다고 알려져 있다 [13,15,16].

인체 피부에서의 염증반응 역시, 외부감염원에 노출되어 손상된 조직을 보호하는 반응으로 작용하지만, 지속적인 염증반응은 접촉성 피부염, 아토피 피부염 등의 만성 피부 염증을 유발한다 [17]. 만성 염증은 지속적인 외부자

극원에 의해 표피에 손상이 일어나, 자극을 받은 각질 형성 세포에서 사이토카인이 분비되면서 염증이 발생하게 된다 [18]. 이러한 염증반응은 피부 온도가 높아지면 피부에 붉은 기가 나타나게 되며, 피부 가려움증을 동반한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 화장품 소재 연구에서도 NO 생성 억제 및 다양한 염증 유발 인자들의 발현 저해를 확인함으로써 실제로 염증 완화에 효과적인 소재 탐색이 이뤄지고 있다.

따라서 본 연구에서는 향부자를 이용한 분획물과 지표 성분인 α -cyperone이 LPS에 자극된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성 및 염증 관련 인자들의 발현에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 또한, sodium lauryl sulfate (SLS)에 자극에 대한 피부 진정 효과 및 가려움증 완화 효과를 인체적 용시험을 통해 확인하여 향부자를 이용한 염증 완화에 효과적인 소재를 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 향부자 전초는 충북 청주시 소재의 삼흥건재약업(Korea)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) powder, thiazolyl blue tetrazolium bromide, dimethyl sulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS), 1-naphthylmethylamide 및 sulfanilamide은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. Fetal bovine serum (FBS), antibiotic antimycotic solution은 Corning (USA) 제품을 사용하였으며, NucleoZOL은 Macherey-Nagel (Germany)에서 구입하여 사용하였다. HiSenScript™ RH(-) RT PreMix Kit는 intron biotechnology (Korea) 제품을 사용하였으며, BioFact™ 2X Real-Time PCR Master Mix는 Biofact (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 및 일급시약을 구입하여 사용하였다.

마이크로버블 추출을 위한 hybrid microbubble generator는 O2B-750S ((주)오투버블, Korea) 제품을 사용하였다. High-performance liquid chromatography (HPLC)는 Alliance Waters e2695 (Waters, USA) 제품을 사용하였다. 컬럼은 capcell PAK C₁₈ column (Osaka soda Co., Japan)제품, microplate reader는 spectramax abs plus (Molecular Devices, USA) 제품, real-time PCR은 QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, USA) 제품을 사용하였다.

주성분 분석을 위해 사용한 표준물 α -cyperone은 Sigma-

Table 1. Analysis Condition of HPLC

HPLC	Waters e2695 / 2998 UVD			
Column	Capcellpak C ₁₈ UG 120 5 μm, 4.6 × 250 mm			
Solvent	A : 0.5% TFA in Water, B : MeOH			
Gradient condition	Time	Flow rate	A %	B %
	0	1.0 mL/min	50	50
	30 s	1.0 mL/min	20	80
	40 min	1.0 mL/min	10	0
	42 min	1.0 mL/min	0	100
	50 min	1.0 mL/min	0	100
	65 min	1.0 mL/min	50	50
75 min	1.0 mL/min	50	50	
Detection	UV 254 nm			
Temp	35 °C			
Injection volume	20 μL			

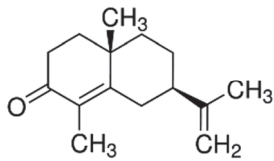


Figure 1. Chemical structure of α-cyperone.

aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다(Figure 1).

2.2. 향부자추출물의 제조

건조된 향부자 100 g을 50% 에탄올 1000 g으로 (1 : 10) 50 °C에서 3 h 동안 hybrid microbubble generator 기기를 이용하여 마이크로버블 추출 후, 5 μm 여과하였다. 추출액을 여과한 후에 여액을 회전 감압 농축기로 농축하여 향부자 추출물을 8 g 얻었으며, 그것을 정제수 80 g에 용해시켜 동일 부피의 에틸아세테이트로 총 3 회 분획하고 농축하여, 향부자 에틸아세테이트 분획물(ethyl acetate fraction from *Cyperus rotundus*, EAFC)을 1.623 g 확보하였다.

2.3. High-performance liquid chromatography (HPLC) 분석

EAFC의 지표성분인 α-cyperone 함량 확인하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다. 시료는 지표성분인 α-cyperone (Figure 1) 및 EAFC의 무게를 정확하게 측정한 후, 50% (v/v) 메탄올에 녹여 0.45 μm PVDF membrane filter로 여과하여 사용하였다. 1.0 mL/min의 유속으로 254 nm에서 검출하였다. 컬럼

Table 2. Primer List of Real-time PCR

Gene name	Sequence	
IL-1β	Forward	5'-TGGACCTTCCAGGATGAGGACA-3'
	Reverse	5'-GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'
IL-6	Forward	5'-TACCACTTCAACAAGTCGGAGGC-3'
	Reverse	5'-CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC-3'
TNF-α	Forward	5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3'
	Reverse	5'-GCCATAGAAGTATGAGAGGGAG-3'
COX-2	Forward	5'-GCGACATACTCAAGCAGGAGCA-3'
	Reverse	5'-AGTGGTAACCGCTCAGGTGTTG-3'
iNOS	Forward	5'-GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC-3'
	Reverse	5'-CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC-3'
GAPDH	Forward	5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'
	Reverse	5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'

온도는 35 °C로 설정하였고, 주입량은 20 μL로 진행하였다. 이동상은 0.5% trifluoroacetic acid in water (A)와 메탄올(B)을 gradient 조건을 사용하였다. 0 ~ 30 min 동안 (B)를 50 ~ 80%로, 30 ~ 40 min 동안 (B)를 80 ~ 90%로 진행하였고, 40 ~ 42 min 동안 (B)를 90 ~ 100%로 진행하였으며 42 ~ 50 min 동안 (B)를 100%로 유지하다가, 50 ~ 65 min 동안 (B)를 100 ~ 50%까지 진행하였다(Table 2).

2.4. 세포 배양

실험에 사용한 RAW 264.7 세포는 쥐 유래 macrophage로 한국세포주은행(Korea)에서 분양받아 이용하였고, 10% FBS와 1% antibiotic antimycotic solution을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였다. 5% CO₂가 공급되는 37 °C incubator에서 배양하였으며, 3 일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

2.5. 세포 생존율 평가

RAW 264.7 세포의 생존율은 MTT 분석 방법을 사용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 5.0 × 10⁴ cells/well이 되도록 180 μL 분주하여 5% CO₂가 공급되는 37 °C incubator에서 overnight 배양하였다. EAFC 및 α-cyperone을 농도별로 계열희석하여 20 μL씩 처리한 뒤 5% CO₂가 공급되는 37 °C incubator에서 24 h 동안 반응시켰다. 96 well plate에 well 당 5 mg/mL의 MTT 용액을 20 μL씩 처리하고 약 2 h 동안 37 °C에서 반응시켰다. 상층액을 제거하고 100 μL의 DMSO에 생성된 formazan을 완전히 녹여 주었다. Microplate reader로 590 nm에서 흡광도를 측정하였

으며, MIT 시약은 thiazolyl blue tetrazolium bromide을 5 mg/mL의 농도가 되도록 PBS에 용해하여 사용하였다.

2.6. NO 생성량 억제 평가

NO 생성량은 griess 시약 반응을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 5.0×10^4 cells/well로 분주하여 5% CO₂가 공급되는 37 °C incubator에서 overnight 배양하였다. 각 well에 세포독성이 없는 농도로 계열 희석한 EAFC 및 α -cyperone을 처리하여 2 h 배양한 후, 0.5 μ g/mL의 LPS를 처리하여 24 h 배양하였다. 배양액의 상층액을 취하여 동량의 griess 시약과 혼합하였다. 96 well plate에서 10 min 동안 반응시킨 후 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Griess 시약 A, B는 각각 0.2% 1-naphthylmethylamide와 5% phosphoric acid 및 1% sulfanilamide를 DW에 용해 1 : 1의 비율로 혼합하여 사용하였다.

2.7. Real-time qPCR을 통한 유전자 발현 억제 평가

RAW 264.7세포를 6 well plate에 5.0×10^5 cells/well로 분주하여 5% CO₂가 공급되는 37 °C incubator에서 overnight 배양하였다. 각 well에 세포독성이 없는 농도로 계열 희석한 EAFC 및 α -cyperone을 처리하여 2 h 배양한 후 0.5 μ g/mL의 LPS를 처리하여 4 h 배양하였다. 염증 관련 유전자의 mRNA 발현량을 비교 분석하기 위해 반응 후 세포를 NucleoZOL lysis buffer (NM, 740404)를 이용하여 harvest한 뒤, MN사에서 제공하는 protocol을 이용하여 RNA를 분리하였으며, 분리된 RNA를 microplate reader를 이용하여 정량한 뒤 HiSenScript™ RH(-) RT PreMix Kit (intron, 25087)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 2X real-time PCR master mix & premix (BioFACT)를 이용하여 진행하였으며, RT-PCR 실험은 real-time PCR system (AppliedBiosystems, USA)에 Taqman probe (Thermo Fisher, USA)를 이용하여 실시간으로 유전자별 mRNA 발현량을 분석하였다. 실험에 사용된 primer들은 Table 2에 표기 하였다.

2.8. 피부 진정 임상시험

화장품 주요 소비층인 여성을 임상시험 대상으로 선정하였으며, 이에 부합하는 만 20 ~ 55세의 성인 여성 20명을 EAFC의 sodium lauryl sulfate (SLS) 외부 자극 유발에 의한 피부 진정(붉은기 완화) 임상시험을 진행하였다. 본 임상시험은 세명대학교 화장품임상연구지원센터에 의뢰하여 진행하였으며, 세명대학교 부속제천한방병원 생명윤리위원회로부터 IRB 승인(GCC-077-20-001)을 받아 수행하였

다. 임상시험은 방부 처리된 EAFC이 5% 함유된 토너 제형으로 진행하였으며, 상기 원료가 함유되지 않은 대조 제품을 제조하여 시험에 사용하였다.

피험자 대상으로 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 40 ~ 60% 조건의 대기실에서 시험 부위를 세정한 뒤 30 min 동안 피부 안정을 취한 후 SLS 1.0%를 함유한 chamber를 시험 부위에 24 h 동안 부착하였다. 제품 사용 전 시험 부위에 chamber를 제거한 후 홍반이 유도된 부위에 제품 시료를 1 일 2 회 정해진 사용 방법에 따라 사용 전, 24 h, 48 h, 72 h 간격으로 측정하여 피부 진정(붉은기 완화) 효과를 평가하였다. 측정은 디지털카메라(EOS 70D, Canon, Japan)로 세팅값 및 카메라의 높이를 같은 조건으로 하여 시험 부위를 촬영하였고, 피부색의 붉은기 완화율(%)은 색차계(spectrophotometer CM-2600D, Minolta, Japan)를 사용하여 기기적 측정값(arbitrary unit: A.U.)을 적용하였으며, 측정 변수인 *a-value (redness)은 측정값이 커질수록 피부색이 붉어짐을 의미하며, 본 시험에서는 *a-value의 측정값이 낮을수록 시험 제품의 진정(붉은기 완화) 효과가 있다고 평가하였다.

2.9. 피부 가려움증 임상시험

가려움 수치 평가, 경피수분손실량(TEWL) 분석 및 피부 수분함유량 인체적용시험을 통해 EAFC에 대한 가려움증 효과를 확인하고자 하였다.

화장품 주요 소비층인 여성을 임상시험 대상으로 선정하였으며, 이에 부합하는 만 20 ~ 55세의 성인 여성 32명을 대상으로 EAFC의 가려움증 효과를 확인하고자 하였다. 본 임상시험은 세명대학교 화장품임상연구지원센터에 의뢰하여 진행하였으며, 세명대학교 부속제천한방병원 생명윤리위원회로부터 IRB 승인(GCC-073-22-001)을 받아 수행하였다. 임상시험은 방부 처리된 EAFC이 5% 함유된 크림 제형으로 진행하였으며, 상기 원료가 함유되지 않은 대조 제품을 제조하여 시험에 사용하였다. 피험자 대상으로 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 40 ~ 60% 조건의 대기실에서 시험 부위를 세정한 뒤 30 min 동안 피부 안정을 취한 후 다리오금(popliteal fossa) 하방 5 cm 이내 부위에 제품 시료를 1 일 2 회 정해진 사용방법에 따라 사용 전, 4 주, 8 주 차에 평가를 실시하였다.

2.9.1. 가려움증 수치 평가

가려움 평가는 시험 제품과 대조 제품의 가려움에 대한 10 점 척도를 가려움 평가도구인 visual analogue scale (VAS)로 평가하였다. 시험 대상자가 느끼는 가려움의 정

도를 10 cm 선분 위에 직접 표시하도록 하고, 그 길이를 수치화하여 가려움 개선도를 평가하였다.

2.9.2. 경피수분손실량(TEWL) 평가

TEWL은 피부 표면 상대습도를 측정할 수 있는 chamber 가 있는 기기인 vapometer (Delfin, Finland)를 이용하여 시험 부위의 TEWL을 3 회 측정하였으며, 이의 평균값을 구하였다. TEWL이 감소할수록 측정 수치가 낮아지며 측정 단위는 g/m²/h 로 표시하였다.

2.9.3. 피부 수분함유량 평가

피부 수분함유량 평가는 corneometer CM825 (Courage-Khazaka electronic GmbH, Germany)를 이용하여 측정하였으며, 3 회 측정하여 이의 평균값을 구하였다. 이 기기는 피부에 접촉하는 probe를 통해 전달되는 전류의 정전부하 용량 계측으로 이루어지는데, 수분의 함량과 정전부하용량은 서로 비례하는 성질이 있어서 수분 함유량이 높을수록 측정 수치가 높아지며, 측정 계수는 arbitrary unit (A.U.)로 표시하였다.

2.10. 통계처리

본 연구의 실험은 3 회 반복하여 수행하였으며, 실험 결과는 mean ± standard deviation (SD)로 나타내었다. 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 분석하였으며, 유의성 수준은 *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, †p < 0.01, ††p < 0.01, †††p < 0.01로 표시하였다.

3. 실험결과

3.1. HPLC 분석결과

EAFC 내의 α-cyperone의 함량을 확인하기 위해 HPLC 분석을 확인한 결과, α-cyperone (RT, 27.5 min)이 지표물질임을 확인하였고, 그 함량은 5.243%이었다(Figure 2).

3.2. 세포 생존율 확인

EAFC 및 α-cyperone이 대식세포인 RAW 264.7 세포의 독성에 미치는 영향을 확인하고자 MTT assay를 진행하였다. EAFC 및 α-cyperone을 다양한 농도로 계열 희석하여 처

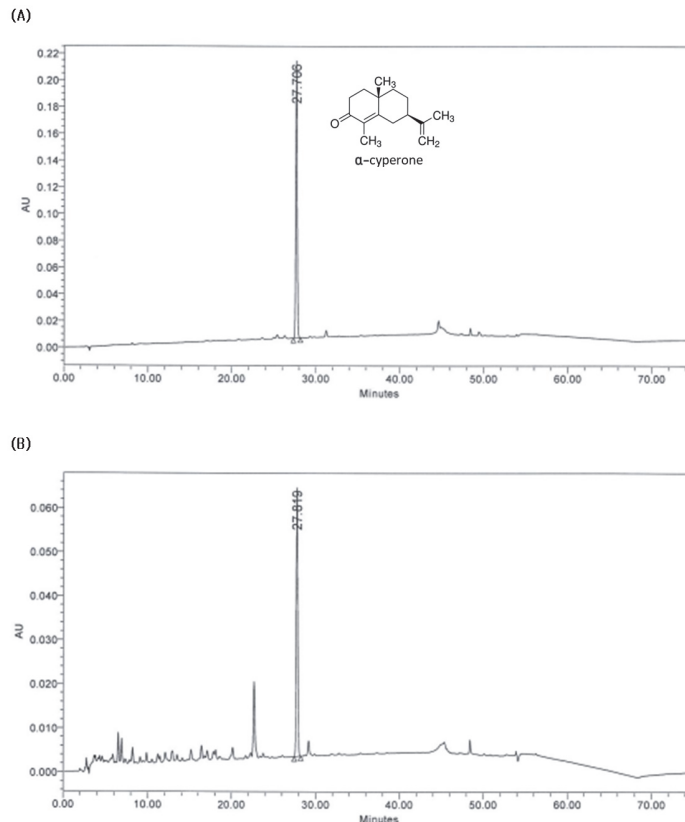


Figure 2. HPLC chromatogram of (A) α-cyperone, and (B) ethyl acetate fraction from *C. rotundus*.

리한 결과, EAFC는 250 $\mu\text{g/mL}$, α -cyperone은 50 $\mu\text{g/mL}$ 아래의 농도에서 95% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며 (Figure 3), 해당 농도를 참고하여 이후 항염증 관련 세포 실험에서 세포독성이 없는 농도에서 실험을 진행하였다.

3.3. NO 생성량 억제 확인

대표적인 염증 매개물질인 NO의 생성을 억제하는지 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 EAFC 및 α -cyperone을 세포독성이 없는 농도로 계열 희석하여 NO assay를 진행하였다. 그 결과, EAFC는 50 ~ 250 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 구간에서 LPS에 의해 증가한 NO의 생성량을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다(Figure 4A). α -cyperone은 10 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리한 구간에서 NO의 생성량을 농도 의존적으로 감소시켰다(Figure 4B). EAFC 및 그 지표성분인 α -cyperone은 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 염증 매개물질인 NO의 생성을 유의성 있게 저해시킨다는 것을 확인하였다.

3.4. Real-time qPCR을 통한 염증 관련 유전자 발현 저해 효과

염증 유발 인자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2, iNOS의 mRNA 발현 억제 효과를 측정하기 위해 real-time qPCR을 진행하였다. Real-time qPCR을 통해 얻은 실험 결과는 housekeeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

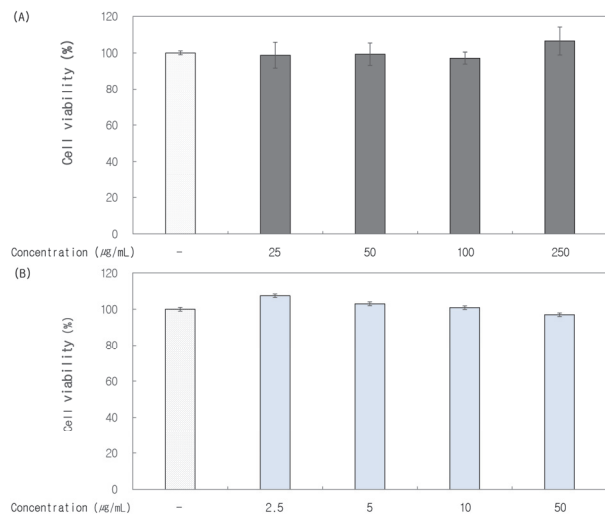


Figure 3. Cell viability of RAW264.7 macrophage cell on each concentration of sample ((A): α -cyperone, and (B): ethyl acetate fraction from *C. rotundus*). Each value presents the mean \pm SD of triplicate determinations.

(GAPDH)를 기준으로 계산하여 나타내었다. 그 결과, EAFC는 25 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 구간에서 LPS에 의해 증가한 염증 유발 인자 5종의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다. IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 COX-2 인자의 경우 처리한 모든 농도(25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)에서 그 발현량을 유의성 있게 저해하였으며, iNOS 인자의 경우는 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의한 저해 효과를 확인하였다(Figure 5). α -cyperone은 실험 진행 농도인 10 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 5종의 염증 유발 인자의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 저해하였으며, 모든 농도에서 유의성 있는 효과를 확인하였다(Figure 6). 이로써 피부 염증 유발 관련 인자 5종의 발현을 억제시키는데 EAFC 및 α -cyperone이 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 염증 완화 효과를 가지며, 염증 인자 5종을 유의성 있게 저해시킨다는 것을 확인하였다.

3.5. 피부 진정 임상시험 결과

SLS (sodium lauryl sulfate) 등과 같은 외부자극원에 대하여 EAFC의 피부 진정(붉은기 완화) 효과를 평가하기 위하여 세명대학교 화장품임상연구지원센터에서 인체적용시험

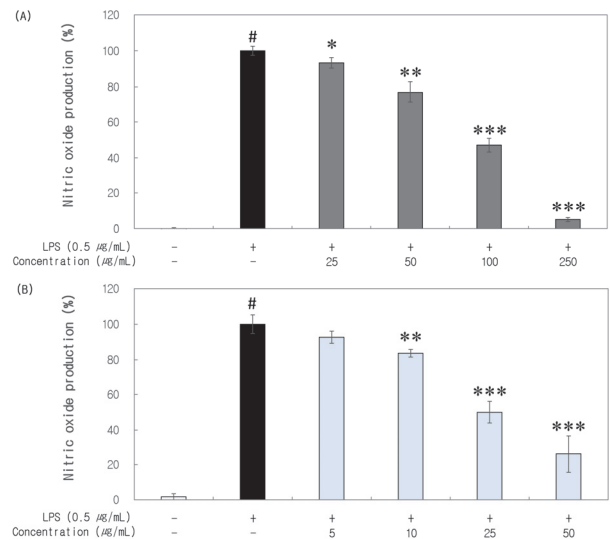


Figure 4. Nitric oxide production of LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell on each concentration of sample ((A): ethyl acetate fraction from *C. rotundus*, and (B): α -cyperone). Each value presents the mean \pm SD of triplicate determinations. # p < 0.05 indicate a significant difference from sample untreated group, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 indicate a significant difference from LPS-treated group.

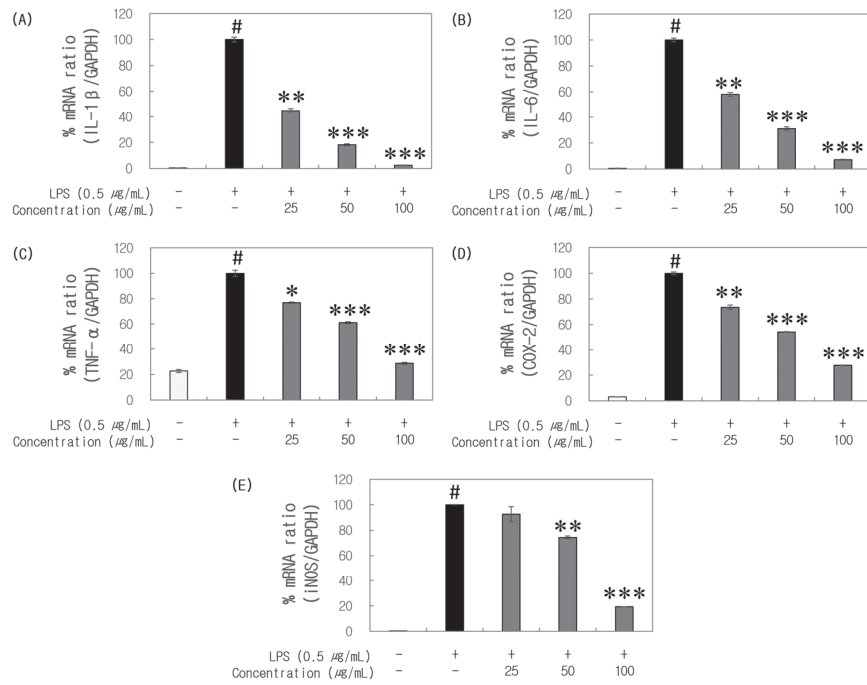


Figure 5. Relative mRNA levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, and iNOS in LPS-stimulated RAW264.7 cells on each concentration of ethyl acetate fraction from *C. rotundus*. Each value presents the mean ± SD of triplicate determinations. #*p* < 0.05 indicate a significant difference from sample untreated group, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 indicate a significant difference from LPS-treated group.

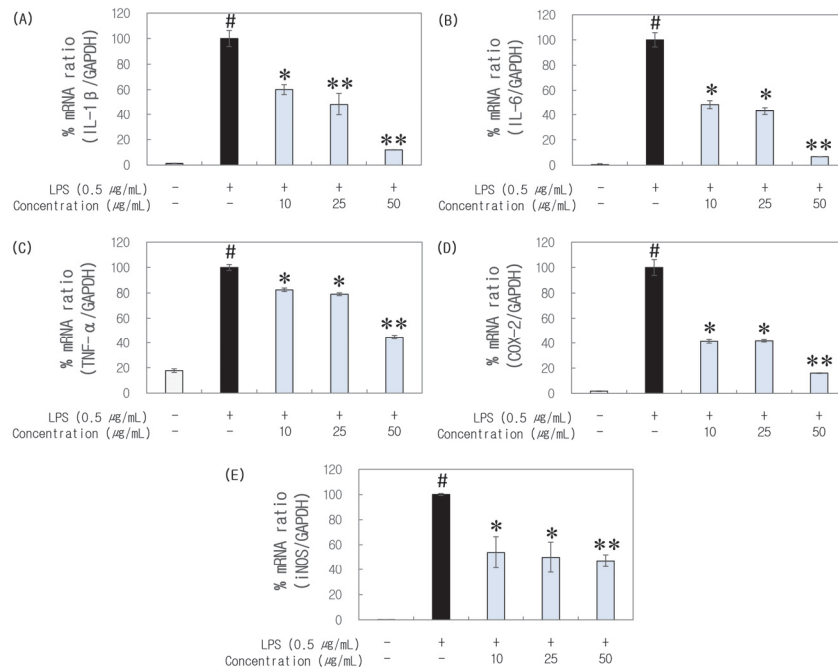


Figure 6. Relative mRNA levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2, and iNOS in LPS-stimulated RAW264.7 cells on each concentration of α-cyperone. Each value presents the mean ± SD of triplicate determinations. #*p* < 0.05 indicate a significant difference from sample untreated group, **p* < 0.05, ***p* < 0.01 indicate a significant difference from LPS-treated group.

을 실시하였다. Spectrophotometer를 이용하여 * a value를 측정
 한 결과, EAFC이 5% 함유된 토너 사용 부위는 대조군
 사용 부위와 비교하여 제품 사용 72 h 후에 두 군간 차이
 가 있음을 확인하였다(Figure 7). 제품 도포 후 72 h 후에
 붉은기 완화율(%)은 5.25%로 나타났다.

위의 결과를 토대로 EAFC는 외부 자극인 SLS에 의한
 피부 진정(붉은기 완화)에 도움을 줄 수 있음을 확인하였다.

3.6. 피부 가려움증 임상시험 결과

EAFC의 가려움증 효과를 평가하기 위하여 세명대학교
 화장품임상연구지원센터에서 인체적용시험을 실시하였다.

VAS를 이용하여 가려움증 수치 평가를 진행한 결과,
 EAFC가 5% 함유된 크림 사용 4 주 후, 8 주 후에서 통계
 적으로 유의하게 효과가 나타났으며, 대조군과 비교하였을
 때에도 4 주 후, 8 주 후에서 통계적으로 유의한 수준으로
 나타났다(Figure 8A). 또한 EAFC가 5% 함유된 크림 사용
 4 주 후에는 17.17%, 8주 후에는 33.87%의 가려움증 개선
 효과를 확인하였다.

Vapometer를 이용하여 TEWL을 측정한 결과, EAFC가 5%
 함유된 크림 사용 4 주 후, 8 주 후에서 통계적으로 유의하
 게 효과가 나타났으며, 대조군과 비교하였을 때에도 8 주 후
 에서 통계적으로 유의한 수준으로 나타났다(Figure 8B). 또한
 EAFC가 5% 함유된 크림 사용 4 주 후에는 16.31%, 8 주 후
 에는 37.57% 경피 수분 손실 개선 효과를 확인하였다.

Comeometer를 이용하여 수분함유량을 측정한 결과, EAFC
 가 5% 함유된 크림 사용 4 주 후, 8 주 후에서 통계적으
 로 유의하게 효과가 나타났으며, 대조군과 비교하였을 때

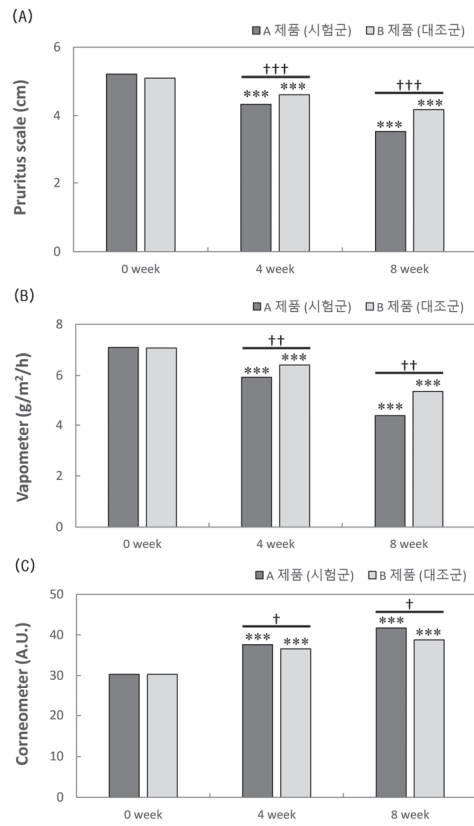


Figure 8. Clinical study for Effect of relieving itching on the skin of EACF. Change of a-value between control and test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ indicate a significant difference between sample treated group and sample untreated group. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ indicate a significant difference between experimental group and a control group. The experiment number of GCCSU is GCC-220624-E05-1135.

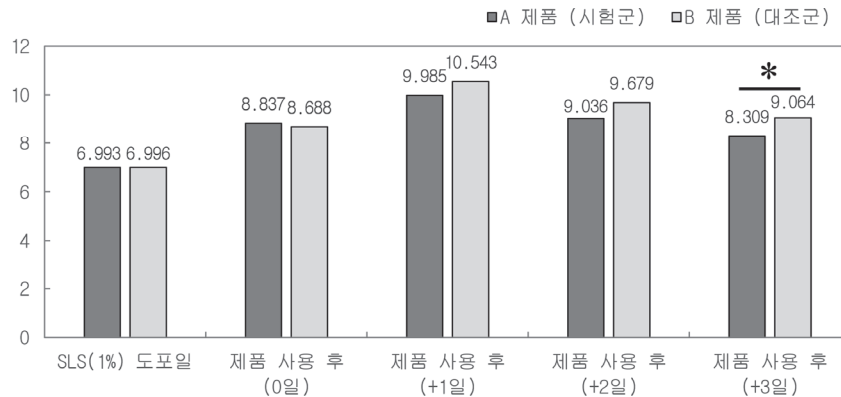


Figure 7. Clinical study for skin soothing (redness relief) effect on SLS stimulation of EACF. Change of a-value between control and test. * $p < 0.05$ indicate a significant difference between experimental group and a control group. The experiment number of GCCSU is GCC-201130-E12-3217.

에도 8 주 후에서 통계적으로 유의한 수준으로 나타났다 (Figure 8C). 또한 EAFC가 5% 함유된 크림 사용 4 주 후에는 24.01%, 8 주 후에는 37.70% 피부 수분 함유 개선 효과를 확인하였다.

위의 결과를 토대로 EAFC는 가려움증 개선에 도움을 줄 수 있음을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용한 *in vitro* 실험 및 *in vivo* 시험을 통하여 향부자(*Cyperus rotundus*) 에틸아세테이트 분획물(EAFC) 및 그의 지표물질인 α -cyperone에 대한 피부 염증 저해 및 가려움증 완화 효능이 있는 화장품 원료로서의 가능성을 검토하였다.

EAFC 및 α -cyperone는 LPS로 유도한 NO 생성을 농도 의존적으로 저해시키는 효과가 있음을 확인하였다. 또한 염증 관련 인자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α , COX-2 및 iNOS의 mRNA 발현을 감소시키는 효과가 우수하다는 것을 확인하였다.

이를 바탕으로 EAFC 5%가 함유된 토너 제품으로 피부 진정(붉은기 완화) 인체적용시험을 진행한 결과, 붉은기가 완화되는 것으로 나타났다. 추가적으로 EAFC 5%가 함유된 크림 제품으로 가려움증 인체적용시험을 진행한 결과, 가려움증 수치, TEWL 및 수분함유량에 모두 개선 효과를 확인하였다.

이와 같은 결과에 따라 EAFC는 세포독성이 없으면서도 NO 생성 억제, 염증인자 발현 저해, 인체 피부 진정 및 피부 가려움증 개선 효과를 기대할 수 있어 피부 염증 저해 및 가려움증 완화 효과를 가지는 천연 화장품에 효과적인 원료로 사용 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 중소벤처기업부와 중소기업기술정보진흥원의 “지역특화산업육성(R&D, S3089401)” 사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다.

References

1. K. I. Kim, K. U. Kim, D. H. Shin, and I. J. Lee, Growth characteristics of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) and establishment of its effective control method, *Korean J. Weed Sci*, **18**(2), 136 (1998).
2. S. Darmanti, S. Santosa, K. Dewl, and L. H. Nugroho, Allelopathic effect of *Cyperus rotundus* L. on seed germination and initial growth of *Glycin max* L. cv. Grobogan, *Biotma*, **17**(2), 61 (2015).
3. O. Abdessatar and H. S. Fethia, Biological behavior of *Cyperus rotundus* in relation to agro-ecological conditions and imposed human factors, *Afr. J. Plant Sci*. **3**(1), 63 (2009).
4. D. S. Akin and D. R. Shaw, Purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) and yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) control in glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max*). *Weed Technology*, **15**(3), 564 (2001).
5. A. Bisht, G. R. Bisht, M. Singh, R. Gupta, and V. Singh, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of burs of *Cyperus rotundus* Linn, *J Pharm Biomed Sci*, **17**(8), 1637 (2018).
6. W. G. Seo, H. O. Pae, G. S. Oh, K. Y. Chai, T. O. Kwon, Y. G. Yun, N. Y. Kim, and H. T. Chung, Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line, RAW 264.7 cells, *J Ethnopharmacol*, **76**(1), 59 (2001).
7. H. Weenen, M. H. Nikunya, D. H. Bray, L. B. Mwasumbi, L. S. Kinabo, and V. A. E. B. Kilimali, Antimalarial compounds containing an α , β -unsaturated carbonyl moiety from tanzanian medicinal plants, *Planta Med*, **56**(4), 3171 (1990).
8. E. Belgin, B. Eyup, D. Gulden, A. Ekrem, and D. Alpaslan, Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil and ethanol extract of *Cyperus fuscus* L. burs from Turkey, *Trop J Pharm Res*, **17**(8), 1637 (2018).
9. S. H. Jung, S. J. Kim, B. G. Jun, K. T. Lee, S. P. Hong, M. S. Oh, D. S. Jang, and J. H. Choi, α -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF- κ B signaling in RAW 264.7 cells, *J Ethnopharmacol*, **147**(1), 208 (2013).
10. Y. W. Kim, R. J. Zhao, S. J. Park, J. R. Lee, I. J. Cho, C. H. Yang, S. G. Kim, and S. C. Kim, Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines

- production, *Br J Pharmacol*, **154**(1), 165 (2008).
11. J. L. Wallace, Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **100**(1), 5 (2005).
 12. S. T. Yee, Y. R. Jeong, M. H. Ha, S. H. Kim, M. W. Byun, and S. K. Jo, Induction of nitric oxide and TNF-alpha by herbal plant extracts in mouse macrophages, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*, **29**(2), 342 (2000).
 13. D. Sarkar, P. Saha, S. Gamre, S. Bhattacharjee, C. Hariharan, S. Ganguly, R. Sen, G. Mandal, S. Chattopadhyay, S. Majumdar, and M. Chatterjee, Anti-inflammatory effect of allylpyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF- κ B pathway, *Int Immunopharmacol*, **8**(9), 1264 (2008).
 14. M. J. Kim, T. K. Jung, and K. S. Yoon, Anti-aging effects of prescription extracts containing *Forsythia viridissima* L., *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(1), 85 (2015).
 15. J. Tabart, T. Franck, C. Kevers, J. Pincemail, D. Serteyn, J. O. Defraigne, and J. Dommes, Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(8), 3228 (1994).
 16. C. S. Eun, E. Y. Hwang, S. O. Lee, S. A. Yang, and M. H. Yu, Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of barley sprout extract, *J Life Sci*, **26**(5), 537 (2016).
 17. T. Lawrence, D. A. Willoughby, and D. W. Gilroy, Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, **2**(10), 787 (2002).
 18. S. N. Bains, P. Nash, and L. Fonacier, Irritant contact dermatitis, *Clin Rev Allergy Immunol*, **56**(1), 99 (2019).