

## 미세먼지 PM10으로 손상을 유도한 피부각질형성세포에서 한약재 추출물의 피부 개선 효능 평가

김동희<sup>1</sup> · 강윤환<sup>2</sup> · 김보애<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>한국한의학진흥원, 선임연구원

<sup>2</sup>한국한의학진흥원, 센터장

<sup>3</sup>목원대학교 화장품공학과, 교수

(2023년 8월 4일 접수: 2023년 8월 30일 수정: 2023년 8월 30일 채택)

## Evaluation of skin improvement efficacy of herbal medicine extracts on skin keratinocytes stimulated with fine dust PM10

Dong-Hee Kim<sup>1</sup> · Yun Hwan Kang<sup>2</sup> · Bo-Ae Kim<sup>3,†</sup>

<sup>1,2</sup>Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongbuk 38540, Korea

<sup>3</sup>Department of Cosmetic Engineering, College of Technology Sciences, Mokwon University,  
Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 35349, Korea

(Received August 4, 2023; Revised August 30, 2023; Accepted August 30, 2023)

**요 약** : 환경오염에 의한 미세먼지의 증가로 피부는 산화적 손상과 노화가 가속화된다. 본 연구에서는 선별된 한약재 추출물의 항산화, hyaluronic acid, filaggrin, MMP-1, ROS 항목을 평가함으로써 PM10으로 부터의 각질형성세포 보호 효능을 확인하였다. 그 결과 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS), FRAP assay에서 농도의존적으로 항산화능이 증가하는 것을 확인하였다. 각질형성세포에 PM10 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 단독으로 처리한 군에서는 hyaluronic acid 및 filaggrin이 50% 이상 감소하였으며, 고량강, 유백피, 토복령 추출물을 처리한 군에서는 증가하였다. MMP-1의 경우 PM10 단독처리군에는 55% 이상 증가하였으나, 추출물을 처리한 경우 감소하여 콜라겐, 엘라스틴의 분해를 저해하는 것으로 평가된다. 또한 제브라피쉬 배아를 이용한 ROS 측정의 경우 추출물을 처리하였을 때 감소되는 것을 확인하였다. 특히 토복령 추출물의 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 음성대조군과 유사한 형광의 세기를 나타내어 ROS의 생성이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 본 연구를 통하여 선별된 한약재 소재인 고량강, 유백피, 토복령은 미세먼지로부터 피부를 보호하거나 개선할 수 있는 소재로서 피부 개선을 위한 안티에이징 제품으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 한약재추출물, 각질형성세포, 미세먼지, PM10, 제브라피쉬

<sup>†</sup>Corresponding author

(E-mail: kba@mokwon.ac.kr)

**Abstract :** Due to the increase in fine dust caused by environmental pollution, oxidative damage and aging of the skin are accelerated. In this study, the antioxidant, hyaluronic acid, filaggrin, MMP-1, and ROS level of selected herbal extracts were evaluated to confirm the protective efficacy of keratinocytes treated PM10. As a result, the antioxidant capacity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS), and FRAP assay increased in a concentration-dependent manner. Keratinocytes the group treated with 300  $\mu\text{g/ml}$  of PM10, hyaluronic acid and filaggrin decreased by more than 50%, and increased in the group treated with extracts of *Alpinia officinarum*, *Ulmus macrocarpa*, and *Ulmus macrocarpa* but decreased when the extract was treated, which is evaluated as inhibiting the degradation of collagen and elastin. In addition, in the case of ROS measurement using zebrafish embryos, it was confirmed that the extract was reduced when the extract was treated 25  $\mu\text{g/ml}$ , the intensity of fluorescence similar to the negative control was shown, confirming that the production of ROS was significantly reduced. Through this study, the selected oriental medicinal materials, *Alpinia officinarum*, *Ulmus macrocarpa*, and *Ulmus macrocarpa*, protect the skin from fine dust. It is thought that it can be used as an anti-aging product for skin improvement as a material that can be improved or improved.

**Keywords :** Herbal Medicine extracts, Keratinocyte, Fine dust, PM10, Zebrafish

## 1. 서론

미세먼지(particulate matter: PM-10, 2.5)는 인체에 해로운 물질들이 대부분이며, 특히 이 속에 포함된 중금속은 소량으로도 인체에 치명적인 영향을 준다. 미세먼지는 호흡기 질환, 면역기능 저하, 눈병, 알레르기 악화 등의 여러 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근 PM 10 이하를 기준으로 한 인체의 유해성에 대한 연구가 활발하게 이루어 지고 있다. 피부는 인체의 중요한 면역기관으로 해로운 물질에 직접 노출되는 기관이며, 피부장벽이 파괴되면 이를 통해 미세먼지, 중금속 등이 피부 내로 침투하고 결국은 알레르기 반응 유발, 염증 발생 및 피부 노화로 진행된다. 미세먼지 노출로 인한 피부노화가 빠르게 진행됨이 보고 되어져 있으며, 기존의 피부질환도 악화시킨다는 연구가 있다. 이 외 다른 연구에서는 대기 오염이 심해지면 피부발진, 소아피부염, 두드러기, 접촉피부염 등의 발생률이 증가한다는 사실을 보고하고 있다. 이러한 보고들을 종합하여 볼 때 환경오염 물질이 피부에 노출되었을 때 피부 항상성(skin integrity)에 직간접적 영향을 주며 즉, 환경오염 물질이 피부에 노출되었을 때 표피의 장벽을 손상시키고 유해 물질들이 피부에 침범하여 표피층과 진피층에 손상을 일으킨다고 볼 수 있다[1-3]. 이를 바탕으로 본

연구에서는 미세먼지로 손상된 피부에 사용이 가능한 천연에서 유래한 화장품 소재를 개발하고자 하였다. 이를 위해 식품의약품안전처에 등록된 한약재 중 섬유질이 풍부하며 안전성이 확보되어있는 20종의 천연 약재를 대상으로 하여 효능 연구를 수행하였다. 선행 연구로 스크리닝 실험을 통해 향산화, 항염, 미백 활성이 나타난 약재들을 우선하여 선별하였으며, 70% 에탄올 추출물 내 유효성분이 많이 함유되어 향후에 화장품 소재로 활용 가능성 측면에서 유리한 고량강, 유백피, 토복령을 최종적으로 결정하였다. 고량강은 생강과에 속하는 다년생초본의 뿌리줄기이며, 주요 성분은 1,8-cineole, methyl cinnamate,  $\alpha$ -cadinene, galangol, flavonoid 등을 함유하고 있다[4]. 고량강은 예로부터 소화불량, 구토, 복통, 방향성 건위로 사용되어지며 향산화, 항염증 등의 약리활성 등이 보고되어져 있다. 유백피는 느릅나무의 껍질로서 관절염 예방에 주로 사용되어져 왔다. 주요 성분은 (+)-catechin 7-O- $\beta$ -D-glycopyranoside, procyanidin B-1, (+)-catechin, (-)-epicatechin으로 알려진 약리활성은 향산화, 항균, 항암, 미백, 주름개선 등이 보고 되어져 있다[5]. 토복령은 백합과에 속하는 활엽 덩굴성 관목으로 청미래덩굴(*Smilax china* L.)의 근경이다. 주요 성분은 chlorogenic acid, caffeic acid, polydatin, resveratrol, astilbin, rutin 및 oxyresveratrol,

kaempferol-7-O- $\beta$ -Dglucoside,으로 알려져 있다[6]. 토복령의 연구로는 통풍, 해독, 항염, 항암 및 항산화 효과가 알려져 있다[7-9]. 본 연구의 최종 목표는 선별된 한약재 추출물로부터 미세먼지로부터 자극 되어진 피부각질세포의 손상에 항산화, 항염에 유효한 효능을 확인하고, 이를 통해 미세먼지로부터 손상된 피부 개선용 화장품 신소재로서 활용 가능성을 규명하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 추출물의 제조

본 실험에서 사용한 고량강, 유백피, 토복령은 휴먼허브에서 구입하여 세척 후 사용하였다. 추출물의 제조 시료 추출물은 70% 에탄올 추출물은 고량강, 유백피, 토복령 100g 에 용매로 70% 에탄올 1000 mL 를 가하여 상온에서 24 시간 동안 교반하여 추출하였다. 추출물은 Whatman No. 1 filter paper(Whatman Inc., Piscataway, NJ, USA)로 여과하고 동결건조기(FD8518, Ilshinbiobase Co., Dongducheon, Korea)를 사용해  $-85^{\circ}\text{C}$ 에서 동결건조하였다. 이후 실험에서 동결건조물을 증류수에 용해하여 중량비 농도 (20-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 맞추어 실험을 진행하였다.

### 2.2. 시약

L-ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>p-nitroanilide, elastase(0.35 mg protein/mL, 7.8 units/mg protein), Mushroom tyrosinase, Potassium persulfate, Ferric chloride, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine), Sodium acetate 는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin, 0.4% trypan blue, dulbecco's modified eagle medium(DMEM), 는 Gibco BRL Co.(Grand Island, USA)에서 구입하였고, 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide(MTT), haemocytometer (Marienfeld, Germany)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Hyaluronic acid (HA) enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit, Filaggrin

Kit 는 R&D Systems (Minneapolis, USA)에서 구입하였다.

### 2.3. 항산화 평가

항산화 효과 측정을 위해 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS), FRAP assay 를 측정하였다. DPPH radical 소거 활성에서 저해율(%)은 (1-반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times 100$  으로 하여 계산하였다. ABTS radical cation decolorization 측정은 저해율(%) (1-반응구의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times 100$  으로 계산했다. FRAP 은 Benzie 와 Strain 법[1996]의 방법에 준하여 측정하였으며[10], FRAP 는 표준 물질인 Trolox 을 사용하며(25 and 600 mM)mM Trolox equivalents (TE)/g 로 값을 계산하였다[11].

### 2.4. 세포배양

사람의 각질형성 세포주(human keratinocyte cell)인 HaCaT세포는 계명대학교로부터 분양을 받아 사용하였다. 세포는 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (100U/mL)을 포함한 DMEM 배지를 사용하였으며,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 계대 배양하였다.

### 2.5. MTT assay에 의한 세포독성 측정

HaCaT 세포를 96-well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well이 되게 seeding하고, 시료를 각각 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 하여 첨가한 후  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 여기에 5mg/ml 농도의 MTT 용액 0.02ml를 첨가하여 4시간 배양 후 상등액을 제거하고 각 well 당 DMSO 0.15ml를 처리하여 실온에서 15분간 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타냈다.

### 2.6. Wound healing assay

HaCaT 세포를 6-well plate에  $6 \times 10^5$  cells/well로 분주하고, plate에 confluent cell layer가 될 때까지 배양하였다. HaCaT 세포의 표면에 200 $\mu\text{l}$  tip을 이용하여 scratch를 유도한 다음 PBS로 1회 세척한 뒤 PM10 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 한약재 추출물을 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 시간의 따른 healing 정도

를 현미경으로 관찰하였으며, 남아 있는 scratch 면적을 측정된 후 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 세포 이동 면적을 백분율로 나타내었다.

## 2.7. Hyaluronic acid 및 filaggrin 생성량 측정

HaCaT 세포에 PM10 300  $\mu\text{g/ml}$ 과 한약재 추출물을 농도별로 처리했을 때 hyaluronic acid의 합성량을 측정하기 위해 6-well plate에 각 well 당  $5 \times 10^5$  cells/well 세포가 되도록 seeding 후 24시간 동안 안정화하였다. 이후, 배지를 제거하고 한약재 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well로 부터 상등액을 회수하였으며 제조사의 매뉴얼에 따라 ELISA assay를 수행하였다.

## 2.8. MMP-1 발현 측정

HaCaT 세포를 96-well plate에  $5 \times 10^4$ 개로 seeding하여 추출물을 무혈청 배지에 용해하여 농도별로 24시간 배양하였다. 배지를 제거하여 PBS로 세척 후 PM10을 포함한 배지에 처리해 세포 손상을 유도한 후 세포배양 상등액을  $189 \times \text{g}$ 에서 5분 원심분리하고 MMP-1 level을 MMP-1 (cat. no. DMP100) ELISA kit (R&D Systems Inc., MN, USA)를 사용하여 fluorescence microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 측정하였다.

## 2.9. 제브라피쉬 사육

대체실험동물모델인 제브라피쉬는 폐쇄 자동순환 여과 시스템인 zebrafish automatic system (Genomic design, Korea)에서 사육하였다. 제브라피쉬 성어는 낮 16h, 밤 14h 주기로 생육의 최적온도인  $27 \sim 28^\circ\text{C}$  수온을 유지하였으며 brine shrimps(*artemia salina*, nauplii)를 하루 3회 급여하였다. 배아 채취를 위해 mating cage에 divide를 이용해 암수 구획한 후 다음날 divide를 제거하고 빛 조사로 산란을 유도하였다. 채취 후 건강한 배아만을 획득해 sea salt solution으로 충분히 세척하고 100 mm dish에 50~100마리로 분주해 항온조( $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) 조건에서 사육하며, 24시간 주기로 배아 media를 교체하였다.

## 2.10. PM10에 의한 제브라피쉬의 ROS 측정

미세먼지가 조사된 제브라피쉬의 ROS 수준을 측정하기 위해 46시간 배양한 제브라피쉬 배아에

농도별로 추출물을 처리하여 1시간 동안 배양한 뒤 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 PM10을 처리하였고 20  $\mu\text{g}$ 의 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, USA)를 첨가하여 1시간 동안 배양 후 Egg Water로 세척하여 형광현미경 (AM4115T-GFBW, Dino-Lite, Taipei)으로 관찰하였다.

## 2.11. 통계처리

결과통계처리는 SPSS 12.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)프로그램을 이용하여 t-test를 이용하여 통계적 유의수준  $p < 0.05, 0.01$ 에서 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. DPPH radical 소거활성

DPPH radical 소거 활성 시험법은 항산화 활성 물질이 DPPH의 radical을 소거하여 탈색된다는 점을 이용하여 항산화 활성을 측정하는 방법이다. 전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여해 지질 산화를 억제하는 척도로 사용되고 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화 억제 작용의 척도로도 이용된다[12]. 각 고량강, 유백피, 토복령 70% 에탄올 추출물과 합성 항산화제인 ascorbic acid(Vit.C)의 항산화 활성을 DPPH radical 소거활성으로 측정하여 비교하였다(Fig. 1). 3가지 한약재 추출물은 가장 높은 농도인  $1000 \mu\text{g/ml}$ 에서 각각 40%, 53%, 63%의 높은 소거활성을 나타내었으며, 추출물 중 토복령이 대조물질인 Vit.C의 활성과 가장 유사한 소거능임을 확인하였다.

### 3.2. ABTS free radical 소거활성

ABTS radical 소거활성법은 항산화 효능을 측정하기 위한 방법으로서 널리 이용된다[13]. ABTS와 potassium persulfate를 암소에 반응시키면  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 가 생성되는데 추출물의 항산화력에 의하여  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 가 소거되어 radical 특유의 청록색이 탈색된다. 이와 같이  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  탈색 반응은 이미 생성되는 free radical의 제거 정도를 흡광도 수치로 나타내어  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  소거활성 효능을 측정하는 방법으로 소수성, 친수성 모두에 적용이 가능하다[12]. 본 실험에서는 유백피, 고량강, 토복령 한약재 추출물과 ascorbic acid(Vit.C)의

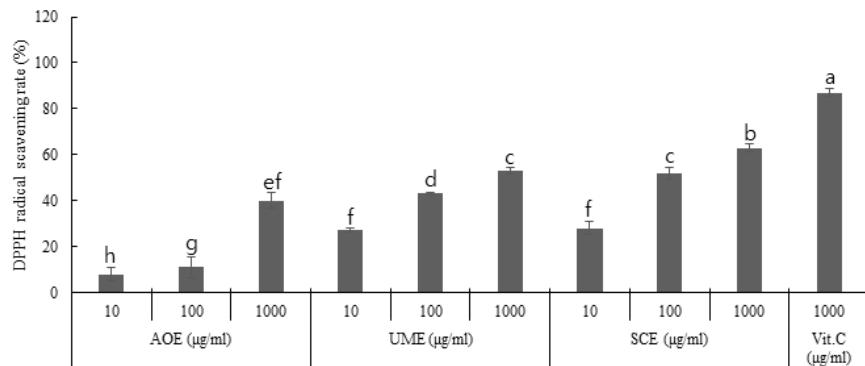


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity different extracts of herbal medicine. AOE, *Alpinia officinarum* 70% ethanol extracts; UME, *Ulmus macrocarpa* 70% ethanol extracts; SCE, *Smilax china* 70% ethanol extracts; Vit.C, Vitamin C. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assay. Different letters, such as a, b, and c, showed significant difference ( $p < 0.05$ ).

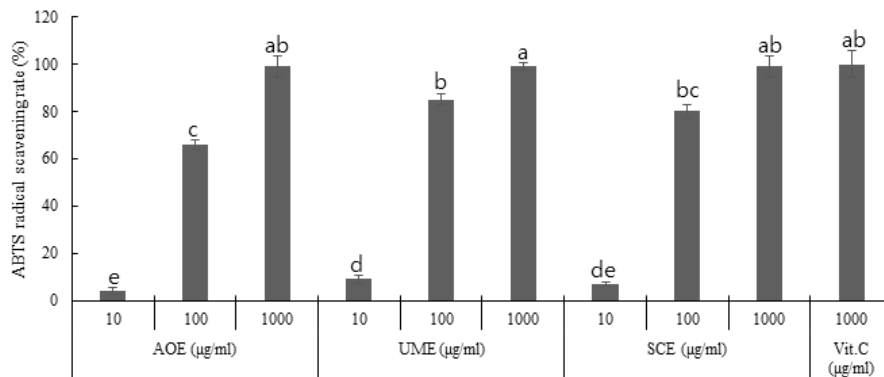


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity different extracts of herbal medicine. AOE, *Alpinia officinarum* 70% ethanol extracts; UME, *Ulmus macrocarpa* 70% ethanol extracts; SCE, *Smilax china* 70% ethanol extracts; Vit.C, Vitamin C. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assay. Different letters, such as a, b, and c, showed significant difference ( $p < 0.05$ ).

ABTS<sup>+</sup> 소거활성을 비교 측정하여 나타내었다 (Fig. 2). 고량강, 유백피, 토복령 한약재 추출물은 1,000 µg/mL의 농도에서 90% 이상의 높은 소거 활성을 나타냈다. 이는 DPPH· 소거활성 결과와 유사한 경향을 나타낸다. 국내 시판되는 다양한 종류의 항산화제 효능을 검색한 결과 DPPH· 소거활성과 ABTS<sup>+</sup> 소거활성 사이에 높은 상관관계가 있다고 보고된다[13,14]. 이에 따라 고량강, 유백피, 토복령 추출물이 DPPH·와

ABTS<sup>+</sup> 소거활성 효능이 높게 나타나 그 경향이 유사함을 알 수 있었다.

### 3.3. FRAP 항산화 활성

FRAP 방법은 DPPH radical 소거 활성의 측정 방법과는 메커니즘이 다른 항산화 활성평가법이다. DPPH radical 소거활성 측정법은 free radical을 직접적으로 소거하는 것에 의하여 활성을 평가하는 방법이고, FRAP 방법은 ferric ion

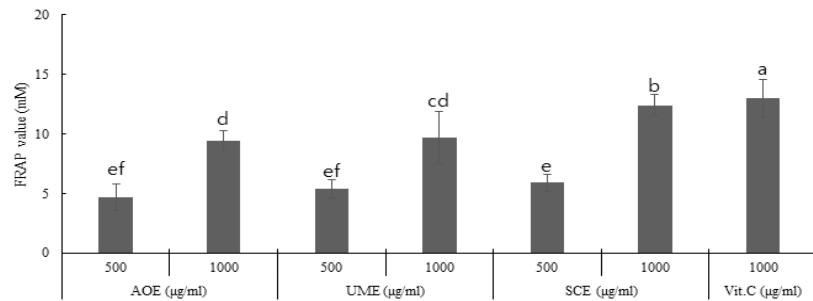


Fig. 3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of the different extracts of herbal medicine. AOE, *Alpinia officinarum* 70% ethanol extracts; UME, *Ulmus macrocarpa* 70% ethanol extracts; SCE, *Smilax china* 70% ethanol extracts; Vit.C, Vitamin C. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assay. Different letters, such as a, b, and c, showed significant difference ( $p < 0.05$ ).

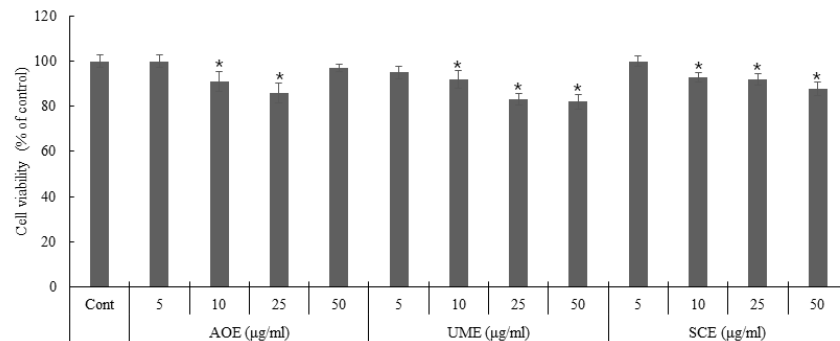


Fig. 4. Effect extracts of on cell viability of HaCaT. AOE, *Alpinia officinarum* 70% ethanol extracts; UME, *Ulmus macrocarpa* 70% ethanol extracts; SCE, *Smilax china* 70% ethanol extracts. HaCaT cells viability was measured by MTT reagent. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assay. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by t-test (significant as compared to control. \* $p < 0.05$ ).

이 ferrous로 전환되는 과정을 분석함으로써 시료 내의 항산화력을 측정하는 방법으로 낮은 pH에서 환원제에 의하여 3가 철이 2가 철로 환원이 되는 원리를 기초하여 고안되어진 방법이다[15]. 고량강, 유백피, 토복령의 추출물에 존재하는 FRAP값은 ascorbic acid(Vit.C) 비교 물질로 하여 측정하였다(Fig. 3). 3가지 한약재 추출물을 측정된 결과 고량강, 유백피, 토복령 각각 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 9.4, 9.7, 12.4  $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mg}$ 로 측정되었으며, 토복령은 비교물질인 Vit.C와 유사한 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

### 3.4. Human keratinocyte(HaCaT)의 생존율 확인

HaCaT세포를 이용하여 고량강, 유백피, 토복령 추출물에 대한 세포생존율을 평가하고자 MTT assay를 수행하였다. 추출물을 농도별(5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ )로 처리한 결과 3가지 한약재 추출물에서 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 HaCaT 세포 생존율에 큰 영향을 나타내지 않았으나, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에는 세포 생존율이 90% 이하로 감소되는 것을 확인할 수 있어 유백피, 토복령 추출물들을 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리 시 세포독성에 유의해야 함을 확인할 수 있었으며, 이후 실험에서는 50  $\mu\text{g/ml}$  이하 농도에서 실험을 진행하였다(Fig. 4).

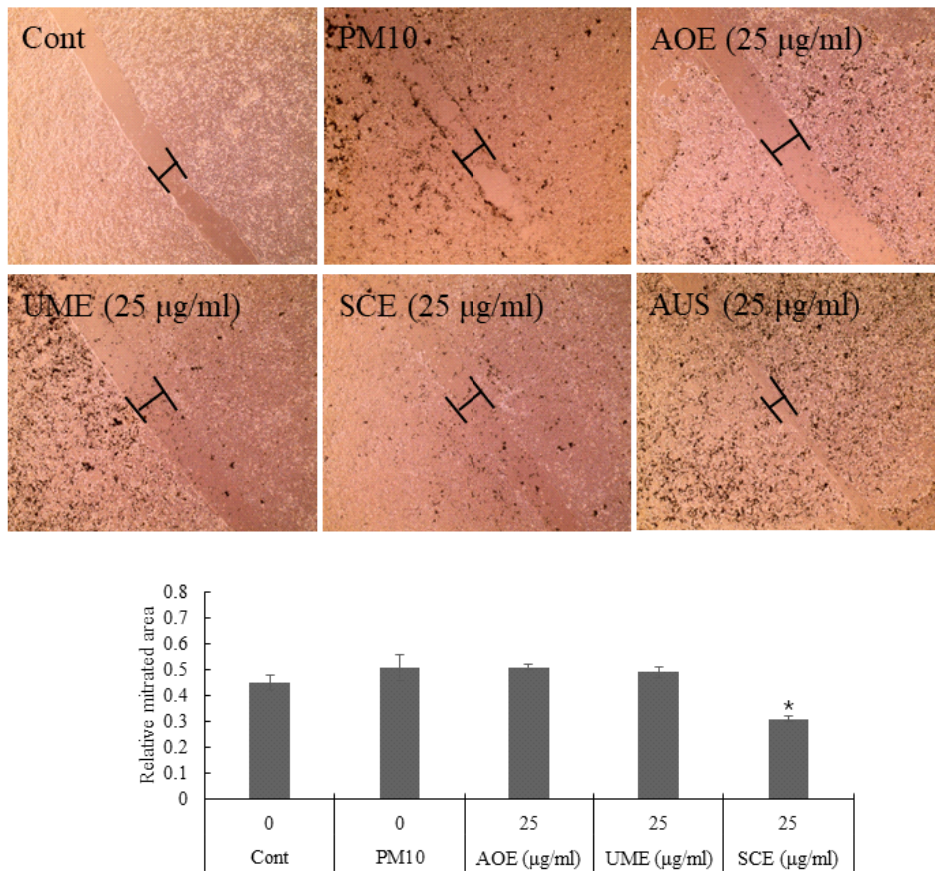


Fig. 5. Increased cell proliferation and migration activities of extracts human keratinocytes (HaCaT) cells. HaCaT cells were scratched using a yellow tip. Migration levels of HaCaT cells were observed using an microscope. HaCaT cells were treated with various concentrations of extracts 25  $\mu\text{g/ml}$  for 24 h. Extracts treatment leads to increase in migration of HaCaT cells. Cont : Control group (not PM10), PM10 : PM10 100  $\mu\text{g/ml}$  (not treated extracts), AOE, *Alpinia officinarum* 70% ethanol extracts; UME, *Ulmus macrocarpa* 70% ethanol extracts; SCE, *Smilax china* 70% ethanol extracts. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by t-test (significant as compared to control. \* $p < 0.05$ ).

### 3.5. 피부재생 효과

HaCaT 세포에 창상을 유도하게 되면 세포의 증식과 이동이 활성화되어 손상된 부분을 회복하며 이러한 과정은 피부 재생 및 상처 치유과정에서 중요하다[16-18]. 추출물의 피부재생 효과를 관찰하기 위해 HaCaT에서 scratch 유도 후 wound healing을 평가하였다. 상처를 유도한 HaCaT 세포에 추출물을 농도별로 처리하였으며, 시료를 처리하지 않은 대조군, PM10 단독처리군

과 비교하여 관찰하였다. 그 결과 토복령 추출물 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 군에서 HaCaT 세포가 창상 부위로 이동하여 창상 간격이 좁혀진 것을 확인하였다.

### 3.6. Hyaluronic acid 및 filaggrin 생성 촉진 효과

피부를 구성하는 기질의 주요 구성 물질로 보습 장벽의 역할을 하는 HA는 생성량이 감소할때

피부 탄력이 감소하여 피부의 조기노화, 건선 및 피부질환을 일으킬 수 있으므로[19] 피부노화 억제 및 피부질환 개선을 위해서는 HA의 함량 보유가 중요한 것으로 사료된다. 각질형성세포는 표피 상단으로 올라갈수록 점점 납작해져서 결국 핵이 없는 각질 세포로 변형된다. 또한 표피에 있는 과립층과 유극층 상부에서 involucrin [20,21], 표피의 과립층과 각질층에 loricrin, 피부 보습에 중요한 filaggrin 등이 분화를 촉진하여 [22,23], 각질 내에 keratin filament를 응집시켜 단단하고 평편한 구조인 각질층을 형성, 피부에 강력한 물리적인 장벽 기능에 기여하게 된다[24]. 이러한 이론을 바탕으로 피부보습에 중요한 역할을 하는 HA와 filaggrin의 활성을 측정하고자 고

량강, 유백피, 토복령 추출물을 PM10 처리 후 농도별로 처리한 결과 HA와 filaggrin 모두 PM10 처리군에 비해 농도 의존적으로 발현량이 증가함을 확인할 수 있었다. 특히, 토복령 추출물의 경우 HA와 filaggrin에서 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 PM10 단독 처리군에 비해 각각 19%, 18%의 발현량을 나타내어 고량강, 유백피 추출물보다 높은 활성을 나타냄을 확인하였다.

### 3.7. MMP-1 저해활성

MMP-1저해활성 평가를 수행하였으며, PM10을 HaCaT 세포에 처리한 경우 MMP-1의 양이 증가하였다. 반면 추출물을 처리한 군에서는 MMP-1의 수준은 PM10 단독 처리군에 비해 농

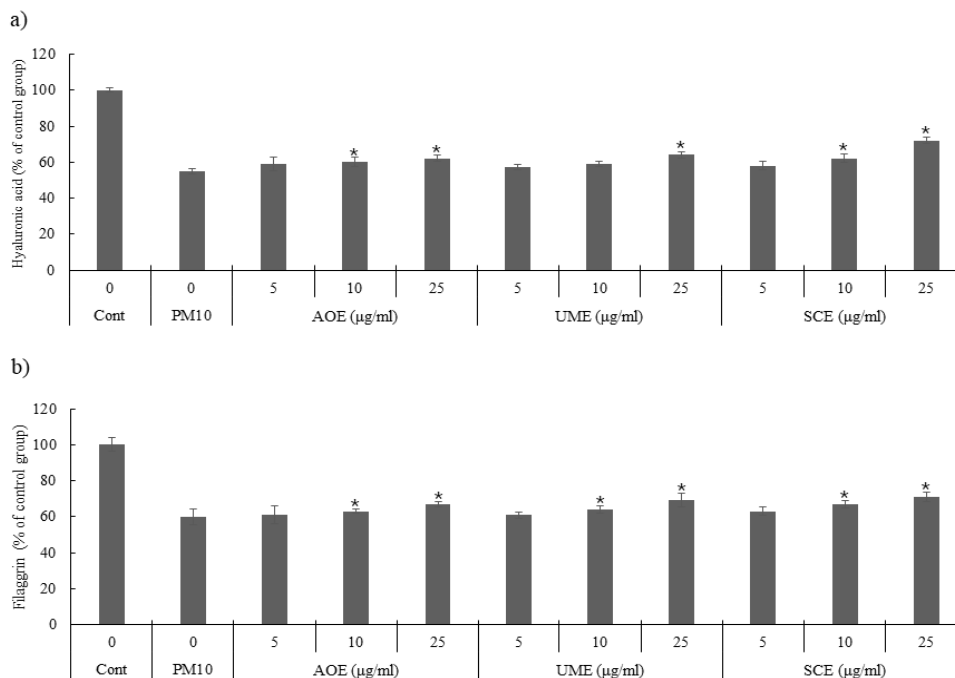


Fig. 6. Effect of extracts on Hyaluronic acid and filaggrin synthesis. The supernatant was collected from each well and HA and filaggrin were determined by ELISA kit. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assay. Cont : Control group (not PM10), PM10 : PM10 100  $\mu\text{g/ml}$  (not treated extracts), AOE, *Alpinia officinarum* 70% ethanol extracts; UME, *Ulmus macrocarpa* 70% ethanol extracts; SCE, *Smilax china* 70% ethanol extracts. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assay. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by t-test (significant as compared to control. \* $p < 0.05$ ).



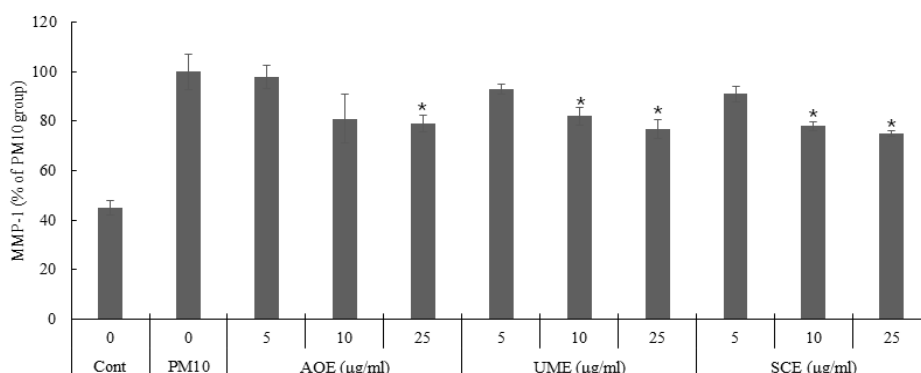


Fig. 7. Effect of extracts on MMP-1 expression. Hacat cells were incubated for 24 hr. MMP-1 level was determined by ELISA kit. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assays. Cont : Control group (not PM10), PM10 : PM10 100  $\mu$ g/ml (not treated extracts), AOE, *Alpinia officinarum* 70% ethanol extracts; UME, *Ulmus macrocarpa* 70% ethanol extracts; SCE, *Smilax china* 70% ethanol extracts. The values shown represent mean  $\pm$  SEM of three different assay. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by t-test (significant as compared to control. \* $p < 0.05$ ).

도의존적으로 억제되었다. MMP-1 농도는 음성 대조군에 비해 PM10 단독 처리군에서 55% 이상 높았다. 대조적으로, 추출물 25  $\mu$ g/mL 처리군에서는 MMP-1 수준이 10% 이상으로 유의하게 감소하였다(Fig. 7). 따라서 본 결과는 추출물이 미세먼지로 인해 증가하는 피부세포의 MMP-1 발현을 억제하고 주름 형성을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

### 3.8. 제브라피쉬 배아에서 ROS 생성 저감 효과

PM10으로 유도된 제브라피쉬의 ROS 측정은 DCFH-DA가 세포내로 투과된 후 아세틸기가 유리된 2',7'-dichlorofluorescein의 형태에서 ROS와 반응하여 형광물질을 생성하는 성질을 이용하였다[25]. 고량강, 유백피, 토복령 추출물을 처리한 제브라피쉬 배아의 형광을 측정된 결과 토복령, 유백피 추출물의 경우 모두 미세먼지만 처리한 양성대조군보다는 농도의존적으로 형광의 세기가 감소하는 것을 확인하였고 특히 토복령 추출물의 25  $\mu$ g/ml 농도를 처리한 제브라피쉬 배아는 음성대조군과 유사한 형광의 세기가 나타나 PM10에 의한 ROS의 생성이 유의적으로 감소하였다. 외부 스트레스로부터 피부에 생성된 ROS는 세포막에서 지질 과산화를 시작하여 일련의 산화 반응을 통해 세포를 손상으로 이어진다. ROS는 정상 세포에서도 항산화 인자와 균형 있

게 존재하나, ROS가 과잉되거나 항산화 인자가 부족하면 세포내의 산화력이 증가된다. 과도한 ROS는 DNA, 단백질, 지질 등 세포 구성 요소를 손상시키며 MMPs의 발현을 촉진하고 콜라겐 및 엘라스틴 섬유를 분해해 피부 노화를 가속화한다. 따라서 ROS 억제 활성을 가진 물질은 피부 노화를 억제할 수 있다.

## 4. 결론

본 연구는 선별된 한약재 추출물을 이용하여 미세먼지로 자극을 유도한 각질형성세포의 손상 방어능, 항산화, 항염에 유효 효능을 확인하였으며 이를 통해 미세먼지로부터 손상된 피부를 개선할 수 있는 화장품 소재를 발굴하고자 하였다. HaCaT 세포에 PM10 300  $\mu$ g/ml를 처리하여 세포손상을 유도한 후 한약재 추출물을 농도별로 처리하여 hyaluronic acid 및 filaggrin 생성 촉진 효과를 평가하였다. 그 결과 PM10 단독처리군에서는 hyaluronic acid 및 filaggrin 생성이 감소한 반면에 고량강, 유백피, 토복령 추출물을 처리한 군에서는 증가하여 피부장벽개선 효과를 나타내는 것으로 판단되었다. MMP-1저해활성 평가에서는 PM10을 HaCaT 세포에 처리한 경우 MMP-1의 양이 증가하였다. 반면 추출물을 처리

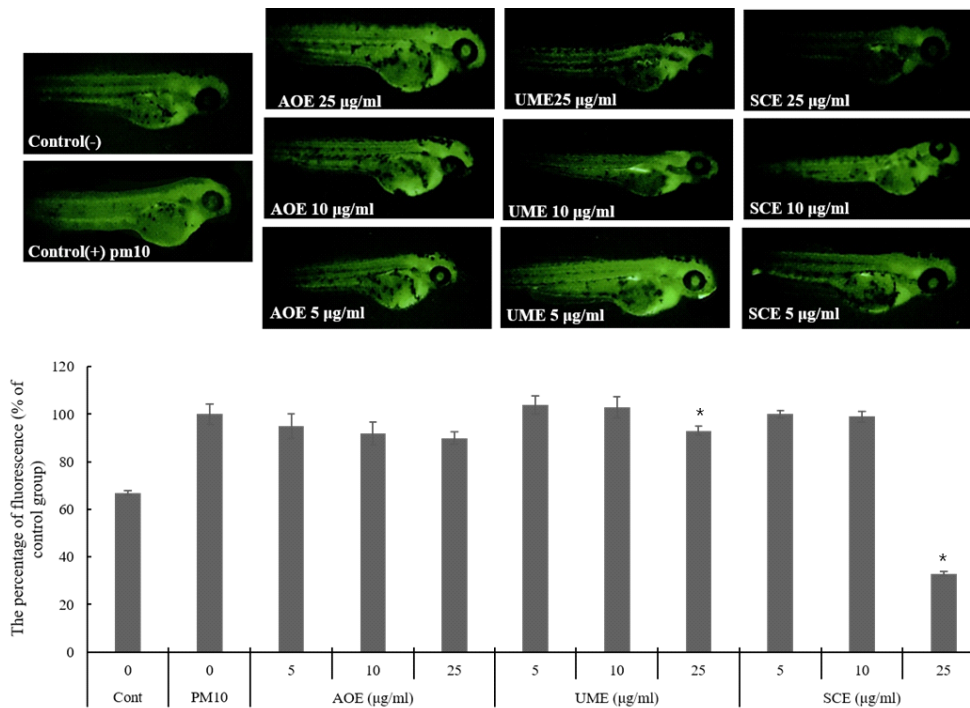


Fig. 8. Protective effect of extracts against PM10-induced ROS generation in zebrafish. Zebrafish embryos were exposed to PM10(100 µg/ml) and treated with various concentrations(5, 10, 25 µg/ml) extracts. After incubation, zebrafish embryos were stained with DCFH-DA. Intracellular ROS were detected by fluorescence microscopy. Significantly different from only PM10-exposed zebrafish embryo. Cont : Control group (not PM10), PM10 : PM10 100 µg/ml (not treated extracts), AOE, *Alpinia officinarum* 70% ethanol extracts; UME, *Ulmus macrocarpa* 70% ethanol extracts; SCE, *Smilax china* 70% ethanol extracts. The values shown represent mean ± SEM of three different assay. \**p*<0.05 compared with absence of extracts.

한 군에서 MMP-1의 수준은 PM10 단독 처리군에 비해 농도의존적으로 감소하였다. 제브라피쉬 배아에서 ROS 생성 저감 효과를 측정된 결과 토복령, 유백피 추출물을 처리하였을 때 PM10 단독 처리군보다 형광의 세기가 감소하는 것을 확인하였고 특히 토복령 추출물의 25 µg/ml에서 음성대조군과 유사한 형광의 세기가 나타나 ROS의 생성이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 본 연구를 통하여 선별된 한약재 소재인 곶감, 유백피, 토복령은 미세먼지로부터 피부를 보호하거나 개선할 수 있는 소재로서의 가능성을 제안한다.

### References

1. Mukherjee A, Agrawal M. World air particulate matter: Sources, distribution and health effects”, *Environ. Chem. Lett*, Vol.15, pp. 283-309, (2017).
2. Ngoc LTN, Park D, Lee Y, Lee YC, “Systematic Review and Meta-Analysis of Human Skin Diseases Due to Particulate Matter”, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, Vol.14, pp. 1458-1469, (2017).

3. Kim KE, Cho D, Park HJ, "Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases" *Life Sci.* Vol.152 pp. 126-34, (2016).
4. Hye Jin Kim, Mi Young Yoo, Hyun Ki Kim, Byung Ho Lee, Kwang-Suk Oh, Ho Won Seo, Gyu Hwan Yon, Odontuya Gendaram, Dae Young Kwon, Young Sup Kim and Shi Yong Ryu, "Vasorelaxation Effect of the Flavonoids from the Rhizome Extract of *Alpinia officinarum* on Isolated Rat Thoracic Aorta", *Kor. J. Pharmacogn.* Vol.37, No.1 pp. 55-58, (2006).
5. Myoung Lae Cho<sup>1</sup>, Yu-Na Oh, Jin-Gyeong Ma, Su-Jin Lee, Young-Hee Choi, Dong-Hwa Son, Jang Eun Hee, Jong-Yea Kim, "Effect of extract temperature and duration on antioxidant activity and sensory characteristics of *Ulmus pumila* bark extract", *Korean J. Food Preserv.* Vol.23M No.7 pp. 995-1003, (2016).
6. Tae-Won Jang, Chang-Gun Oh, Jae-Ho Park, "Antioxidant activity and protective effects on oxidative DNA damage of *Smilax china* root", *J Appl Biol Chem.* Vol.61, No.2 pp. 109-117, (2018).
7. Shu XS, Gao ZH, Yang, "XL Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract", *J Ethnopharmacol.* Vol.103, pp. 327-332, (2006).
8. Cheng DS, Hua XL, "Today's research of *Smilax china*", *J Chin Med Tradit Chin Med.* Vol.29, pp. 90-93, (2006).
9. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW, "A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome invitro anticancer effects on human cancer cell lines", *J Ethnopharmacol.* Vol.113, pp. 115-124, (2007).
10. Myeong-Wook Kim, Eun-Ho Lee, Ye-Jin Kim, Tae-Soon Park, Young-Je Cho, "Beauty food activities of wild-cultivated Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) ground par", *J Appl Biol Chem.* Vol.61, No.1 pp. 33-38, (2018).
11. Jae-Bum Jo, Hye-Jin Park, Eun-Ho Lee, Jae-Eun Lee, Su-Bin Lim, Shin-Hyub Hong, Young-Je Cho, "Whitening and anti-wrinkle effect of *Pinus koraiensis* leaves extracts according to the drying technique" *J Appl Biol Chem.* Vol.60, No.1 pp. 73-78, (2017).
12. Eun-Young Hwang, Dong-Hee Kim, Hui-Jeong Kim, Jo-Young Hwang, Tae-Soon Park, In-Sun Lee, and Jun-Ho Son, "Antioxidant Activities and Nitric Oxide Production of Medicine Plants in Gyeongsangbukdo (*Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*, *Paeonia lactiflora*)", *J. Appl. Biol. Chem.* Vol.54, No.3 pp. 171-177, (2011).
13. Min-Jung Kim and Eunju Park, "Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Samples", *J Korean Soc Food Sci Nutr.* Vol.40, No.7 pp. 1053-1062, (2011).
14. Lee SE, Seong NS, and Bang JK, "Antioxidative activities of Korean medicinal plants", *Korean J Medicinmal Crop Sci* Vol.11, pp. 127-134, (2003).
15. Benzie IFF and Strain JJ, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" The FRAP assay", *Anal Biochem.* Vol.239, pp. 70-76, (1996).
16. Jung Im Lee, Jung Hwan Oh, So Young Park, Hye Ran Kim, Kyung Im Jung, Byung-Jin Jeon, "Dongmin Kim, Chang-Suk Kong, UV-induced Photodamage-attenuating Properties of Water Extract from *Lentinula edodes*", *Journal of Life Science.* Vol.30. No.10 pp. 877-885, (2020).
17. Kim, G. Y., Lee, S. J., Jeon, M. J., Kim, B. M., Kim, G. T., Kang, S. M., Lee, K.

- Y., Shin, E. J., Kim, S. Y. and Kim, Y. M, "Anti-wrinkle and skin turnover improvement effects of niacinamide-dipeptide convergence", *Asian J. Beauty Cosmetol.* Vol.16 pp. 243-254, (2018).
18. Kim, J. and Lee, C. M. "Anti-inflammatory effects and influence on fibroblast growth of astaxanthin-cyclodextrin nanoparticle", *J. Chitin Chitosan*, Vol.23, pp. 170-175, (2018).
  19. Hak Yin Yu, In Jun Yang, V.R Lincha, In Sik Park, Dong-Ung Lee, Heung Mook Shin, "The Effects of the Fruits of *Foeniculum vulgare* on Skin Barrier Function and Hyaluronic Acid Production in HaCaT Keratinocytes", *Journal of Life Science*, Vol.25, No.8 pp. 880-888, (2015).
  20. Dong-Hee Kim, Tae-Soon Park, Jun-Ho Son, "Anti-inflammatory effects of the *Rubus occidentalis* seed extracts on UV-B induced inflammation in HaCat cells," *J Appl Biol Chem*, Vol.59, No.3 pp. 247-253, (2016).
  21. Elias PM, Wood LC, Feingold KR, "Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses", *Am J Contact Dermat*, Vol.10, pp. 119-126, (1999).
  22. Fuchs E, "Epidermal differentiation and keratin gene expression". *J Cell Sci*, Vol.17, pp. 197-208, (1993).
  23. Steinert PM, Marekov LN, "The proteins elatin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope", *J Bio Chem*, Vol.270, pp. 17702-17711, (1995).
  24. Tatiieb, "A Hypothesis: from epidermal barrier dysfunction to atopic disorders", *Contact Dermatitis*, Vol.41, pp. 177-180, (1999).
  25. Vera Mugoni, Annalisa Camporeale, Massimo M. Santoro, "Analysis of Oxidative Stress in Zebrafish Embryos", *J Vis Exp*. Vol.89 pp. 513-528. (2014).