

머위추출물의 항산화와 항염증 효과

김진화†·나영·심관섭·이범천·표형배

한불화장품(주) 기술연구소
(2006년 11월 17일 접수, 2006년 11월 27일 채택)

Antioxidative and Anti-inflammatory Effects of *Petasites japonicus*

Jin Hwa Kim[†], Young Na, Gwan Sub Sim, Bum Chun Lee, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk, 369-834, Korea

(Received November 17, 2006; Accepted November 27, 2006)

요약: 태양광선과 산소는 피부세포에 자유라디칼(free radical)과 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시켜 세포막 지질의 과산화와 염증을 유발한다. 본 연구는 자외선에 의한 피부손상에 대한 머위추출물의 피부 보호효과에 대한 것으로 UVB가 조사된 각질형성세포에서의 항산화 및 염증관련 사이토카인의 억제효과를 측정하였다. 라디칼에 의한 지질과산화에 대한 억제효과는 100 µg/mL에서 70.1%로 우수하게 나타났으며, 세포내에서 ROS에 의해 형광을 띠는 물질로 전환되는 CM-H₂DCFDA를 이용하여 ROS의 양을 측정된 결과 자외선에 의해 증가된 세포내 ROS의 양이 머위추출물을 처리함으로써 500 µg/mL 농도에서 45% 이상의 우수한 소거효과를 나타냈다. 또한 각질형성세포에서 UVB에 의해 생합성이 증가되는 IL-1 α 및 PGE₂의 생합성 억제효과는 100 µg/mL에서 각각 25.7%, 59.3%를 저해하는 것으로 우수한 효과를 나타내었다. 따라서 머위추출물은 각질형성세포에서 자외선 조사에 의한 피부손상에 대한 보호효과를 가진 화장품에서 우수한 소재로 적용될 수 있다.

Abstract: Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Petasites japonicus* extract were evaluated. *P. japonicus* extract showed 70.1% inhibition on peroxidation of linoleic acid. In the experiment using the cell permeable dye, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) as an indicator of reactive oxygen species (ROS) generation, intracellular oxidative stress in UVB-irradiated keratinocytes was shown to be decreased by *P. japonicus* extract. Also, UVB-induced production of interleukin-1 α and prostaglandin E₂ in human HaCaT keratinocytes was reduced in a dose-dependent manner by treatment with *P. japonicus* extract. All these results suggest that *P. japonicus* extract can be effectively used for prevention of UV-induced adverse skin reactions such as radical production and inflammation.

Keywords: *Petasites japonicus*, antioxidation, inflammation, keratinocyte, cytokine

1. 서 론

태양의 자외선은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 유발하여 홍반, 수종, 일광화상, 광노화 및 피부암 같은 질병을 일으킨다. Superoxide anion (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), 그리고 hydroxy radical 등을 포함하는 ROS는 호흡 및 대사과정을 통해 지속적으로 생성되는 것으로, 체내에서는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpxes), catalase와 같은 효소를 이용하여 ROS에 의한 손상을 막는다. 그러나 태양광선에

의한 과량의 ROS 발생은 생체내의 항산화적 방어능력을 초과하게 되어 산화적 스트레스가 발생한다. 즉, DNA, 세포막 및 단백질 등과 반응하여 세포나 조직에 손상을 유발하고, 이는 각종 염증질환, 파킨슨병, 광노화, 암 발생 등을 촉진하는 것으로 알려져 있다[1-3].

자외선 조사에 의한 염증반응의 기전은 정확히 규명되어 있지는 않으나, 혈류량 및 혈관투과성의 변화 등 혈관반응이 매우 중요하며 이에 프로스타글란딘(prostaglandins, PGs), 히스타민(histamine), 브라디키닌(bradykinin) 등 여러 생물학적 물질이 관여한다고 알려져 있다. 이중 PGs는 세포막 구성성분인 arachidonic acid를 기질로 하여 cyclooxygenase (COX)라는 효소에 의해 합성되는데, COX-2

† 주 저자 (e-mail: jinhwa29@hotmail.com)

는 정상적인 조직에서는 거의 발현이 되지 않다가 UV, ROS, 염증성 인자, 발암원 및 종양 촉진인자 등에 의해 유도되어 다량의 PGs를 순간적으로 생성시킴으로써 발열, 동통 등 각종 염증 반응을 일으킨다. 또한, 여러 암세포에는 COX-2가 과다하게 발현되어 암세포의 증식 및 전이를 촉진하고 apoptosis를 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다[4-6].

여러가지의 질병, 노화, 염증반응 및 암발생과정에 밀접한 연관이 있는 ROS 및 PGs, interleukin (IL) 등을 조절함으로써 각종 질환의 치료제 또는 예방제로 이용할 수 있는 물질을 개발하고자, 기존의 물질을 구조 변형을 통해 효과가 개선된 새로운 물질을 합성하거나 천연물 및 각종 식품류에서 새로운 물질을 탐색하는 방향으로 다양한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 특히 천연물은 의약품에 비해 안전하고 친숙하게 접할 수 있다는 장점 때문에 암을 비롯한 각종 질환의 예방 목적으로 각광을 받고 있으며, 실제로 차류의 polyphenol, 콩류의 isoflavone, curcumin, sulforaphane, resveratrol 등 식품 및 천연물 유래의 물질들이 항산화, 항염, 노화 및 암예방 등을 위한 치료제 및 예방제로서 이용되고 있다.

머위(*Petasites japonicus*)는 햇볕이 잘 드는 산비탈의 숲이나 계곡 주변의 습지에서 자생하는 국화과(Compositae)에 속하는 다년초 식물로 한방에서는 꽃봉오리를 관동화라 하여 한약재로 사용한다. 민간에서는 진해, 거담, 건위의 효과로 사용되고 또 진정, 소종, 이뇨, 풍한 등의 치료에 오랫동안 사용되어 왔다[7]. 머위의 주요성분으로는 꽃으로부터 angelic acid, lignan, quercetin 배당체를[8], 잎과 줄기에서는 petasin, isopetasin 및 triterpenoid 배당체인 rosamutin, pedunculoid 등이 분리되었다[9]. 약리학적인 연구로는 *in vitro*에서 머위 추출물의 항알레르기 효과[10], 병리학적인 관찰 등이 보고되었다[11].

본 연구는 머위 추출물의 라디칼 소거 효과, 지질과산화 억제 효과 및 각질형성세포에서의 IL-1 α , PGE₂ 억제 효과를 연구하여 화장품에서 노화 및 자극 완화 소재로 이용하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 머위(*Petasites japonicus*)는 국내 약초시장에서 구입하였다. 그늘진 곳에서 건조한 머위 100 g을 분쇄하여 70% 에탄올 1 L로 환류하면서 3 h씩 2회 반복 추출하였다. 이를 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 실험에 사용하였다.

세포내 free radical 확인을 위해 5-(6-)chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluoresceindiacetate (CM-H₂DCFDA)

는 Molecular Probe사 (Eugene, OR, USA)에서 구입하였고, 형광스펙트로포토미터(luminescence spectrophotometer, Perkin Elmer, UK)로 측정하였다. Anti-human interleukin-1 α , anti-rabbit IgG conjugated with horse radish peroxidase (HRP)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하였으며(St. Louis, MO, USA), PGE₂ 정량은 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)의 enzyme immunoassay kit를 사용하였다.

2.2. 지질과산화 억제효과

Linoleic acid model system을 이용하여 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 법으로 지질과산화 억제효과를 측정하였다[12]. Linoleic acid (2.85 mg/mL)와 tween 20 (2.85 mg/mL)을 40 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 첨가하여 반응기질로 사용하였다. 과산화 유도는 기질용액과 시료를 혼합하여 80°C에서 120 rpm으로 7 h 반응시켰다. 과산화가 유도된 시료에 산화정지를 위해 3.6% BHA용액과 600 μ L TBA-TCA 용액(thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid, 0.25 N HCl)를 첨가한 후 boiling water bath에서 30분간 발색 반응시킨다. 냉각 후 chloroform을 첨가하여 진탕시키고, 3000 rpm에서 5 min간 원심분리하여 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

2.3. 세포 배양

HaCaT 사람 각질형성세포주는 American Type Culture Collection으로부터 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, BioWhittaker, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, MD, USA), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 세포를 실험에 이용하였다.

2.4. 세포내 항산화 효과

각질형성세포(HaCaT keratinocytes)를 96 well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주하여 배양한다. 자외선(UVB) 조사 전에 배양 배지를 제거한 후 HEPES-buffered control salt (HCSS: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 2.3 mM CaCl₂, 15 mM glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거하였다. 4 μ M CM-H₂DCFDA in HCSS with 0.1% pluronic F-127 (Molecular Probe)를 빛이 들어가지 않도록 주의하여 처리한다. 37°C, 30 min 반응시킨 후 UVB 20 mJ/cm² (UVB G15T8E, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. 모든 시료를 처리 후 37°C에서 반응시켜 luminescence spectrophotometer를 사용하여 DCF (Ex= 488 nm; Em=

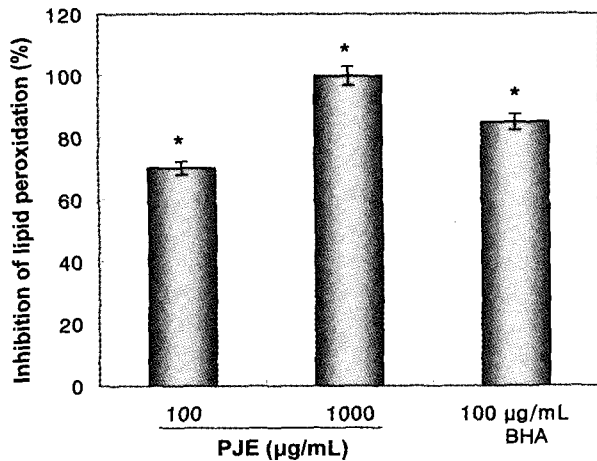


Figure 1. Inhibition of lipid peroxidation of *Petasites japonicus* extract (PJE). Amounts of dried extract were present in 5 mL of linoleic acid emulsion (0.04 M, pH 7.4). The control was the linoleic acid emulsion without extract. BHA was used as a positive control. The results are mean of triplicate samples with S.D. *p < 0.05 compared with control.

525 nm)에 의한 세포내 형광값을 측정하였다[13,14].

2.5. 자외선에 의해 유도된 염증관련 사이토카인(IL-1 α)의 발현 저해 효과

각질형성세포(1×10^5 cells/ml)를 UVB 10 mJ/cm² 세기로 조사한 후 serum free DMEM 배지를 500 μ L 첨가하고 머위추출물 시료를 농도별로 첨가하였다. 24 h 동안 배양 후 배양상등액을 well plate에 4 $^{\circ}$ C에서 코팅한다. 3% BSA로 37 $^{\circ}$ C 2 h 동안 blocking하고 primary antibody (anti-human IL-1 α) in PBS-T를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 90 min 동안 반응시킨다. 세척 후 secondary antibody (goat antirabbit IgG conjugated with peroxidase)를 첨가하고 90 min 동안 37 $^{\circ}$ C 반응시킨 후 o-phenylene diamine이 함유된 기질용액을 첨가하여 발색시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였다[15].

2.6. 자외선 조사 후 PGE₂ 생성 저해효과

각질형성세포(HaCaT keratinocytes)를 well plate에 각각 5×10^4 cells/mL씩 넣고 24 h 동안 부착하였다. 각 well을 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 2회 세척 후 500 μ L의 인산완충용액(PBS)을 첨가하였다. 이 각질형성세포에 UVB 램프(model: F15T8, UVB15W, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 UVB를 10 mJ/cm²를 조사한 후, 배양배지로 교환하여 시료처리 하였다. 24 h 후 상층액을 회수하여 상층액에 유리된 PGE₂의 양을 효

소면역분석법(Cayman Chemical, MI, USA)으로 정량하였다[4].

2.7. 자료분석 및 통계처리

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 student's t-test로 하였으며 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 지질과산화 억제효과

산소 유리기에 의한 세포손상에서 지질과산화 반응은 중요한 손상 기전이다. 체내의 세포, 막 또는 지단백질의 지질은 활성산소의 유리기에 의해 연쇄반응을 일으켜 산화적 손상을 받아 지질 유동성의 감소, 막 투과성의 변질 등이 일어나며, 또한 수명이 길고, 독성이 있는 malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal 같은 과산화물을 만들어 급성조직장애 및 세포노화를 유도하여 각종 성인병 및 발암의 원인이 된다. 이러한 지질의 과산화억제효과를 측정하기 위하여 2-thiobarbituric acid (TBA)법을 이용하여 머위추출물의 지질과산화 억제효과를 평가하였다. 머위를 100, 1000 μ g/mL의 농도로 처리한 경우 각 지질과산화 억제효과는 70.1, 93.8%로 우수한 지질과산화 억제효과를 나타내었다. 양성대조군인 BHA는 100 μ g/mL에서 84.5%의 지질과산화 억제효과를 나타내었다(Figure 1).

3.2. 세포내 항산화 효과

DCFH의 산화로 생성된 DCF의 형광값을 측정한 실험으로 세포내에 생성된 과산화수소나 산화적 스트레스를 실험하였다. DCFH는 hydroxyl radical, nitrogen oxide radical (NO₂⁻), thiyl radical, bicarbonate radical anion 등에 의해 산화된다. DCFH는 apoptosis 동안 세포내 산화적 스트레스를 평가하는데 사용되어져 왔으며, H₂O₂나 자외선에 의해 생성된 라디칼 및 세포내 신호전달과 관련된 연구에 최근 사용되고 있다. 형광스펙트로포토미터를 이용하여 세포가 well plate에 부착되어 살아있는 상태에서의 형광값을 측정한 결과, 세포가 없는 CM-H₂DCFDA 용액 상태의 형광값이 약 50 AU 정도의 값으로 나타났으며, 각질형성세포를 배양함으로써 세포자체의 생리작용에 의한 기본적인 형광값이 120 ~ 140 AU 정도의 값으로 높아졌으며, 자외선(UVB 20 mJ/cm²) 조사 결과 420 AU 정도로 급격히 증가하였다. 이러한 조건에서 머위추출물을 농도별로 처리한 결과 자외선에 의해 높아졌던 형광값이 농도 의존적으로 다시 감소하였으며, 이 결과로 자외선 조사군과 비교하여 프리라디칼 소거효과를 분석한 결과 500 μ g/mL의 농도에서 45% 이상의 효

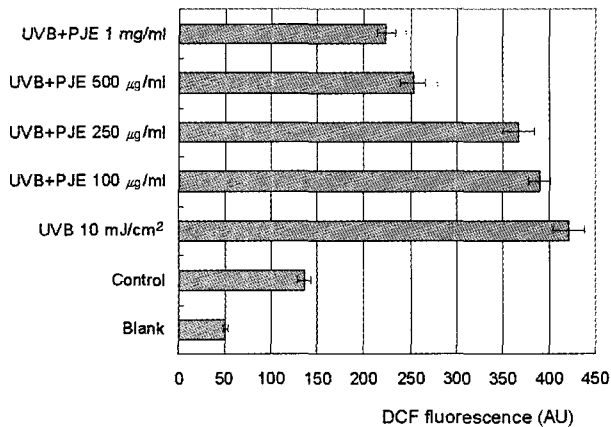


Figure 2. Effect of *Petasites japonicus* extract (PJE) on the production of intracellular ROS in HaCaT keratinocytes. The cells were incubated with 4 µM CM-H₂DCFDA for 20 min, and irradiated by UVB 20 mJ/cm². ROS generation was assessed by luminescence spectrophotometer. The results are mean of triplicate samples with S.D. *p < 0.05 compared with control.

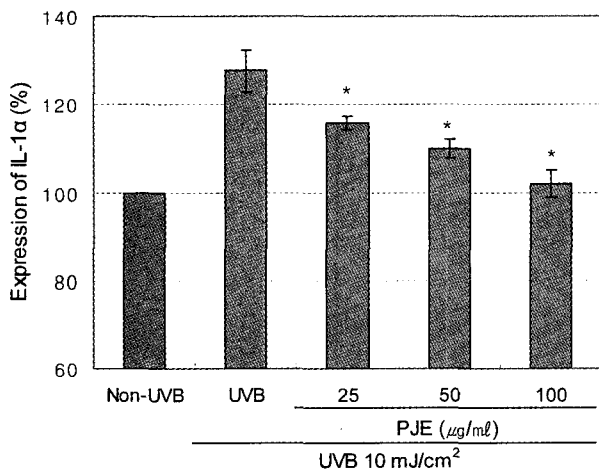


Figure 3. Effect of *Petasites japonicus* extract (PJE) on the production of IL-1α in HaCaT keratinocytes. The cells were treated with various concentration of the extract for 24 h. The results are mean of triplicate samples with S.D. *p < 0.05 compared with control.

과가 나타났다(Figure 2).

머위로부터 분리한 성분인 lignan 및 quercetin 배당체의 DPPH 라디칼 소거효과가 확인된 바 있으며[8], 이러한 플라보노이드 성분이 함유되어 있어 세포내 ROS 소거 효과가 나타난 것으로 사료된다.

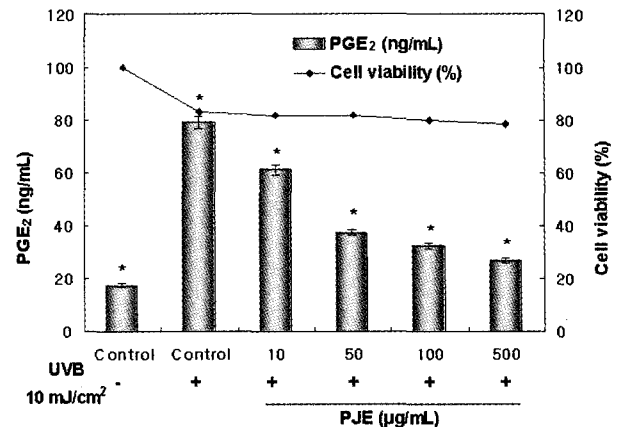


Figure 4. Effect of *Petasites japonicus* extract (PJE) on the production of prostaglandin E₂ in the UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes. The cells were treated with various concentration of the extract for 24 h. The results are mean of triplicate samples with S.D. *p < 0.05 compared with control.

3.3. 자외선에 의해 유도된 염증관련 사이토카인(IL-1α)의 발현 저해 효과

피부 이상 반응을 유발인자에는 화학물질, 세정제, 자외선 등 여러가지가 있으며, 이에 대한 피부보호 작용을 평가하기 위해 자외선에 의해 유도된 염증관련 사이토카인인 IL-1α의 생성량을 측정된 결과 UVB에 의해 유발된 염증관련 사이토카인인 IL-1α의 생성율은 머위추출물 100 µg/mL에 의해 25.7% 정도 감소되는 것으로 나타났다(Figure 3).

3.4. 자외선 조사 후 PGE₂ 생성 저해효과

UV나 ROS에 의해 발현되는 염증성 사이토카인인 PGE₂의 양을 경쟁적 효소 면역분석법으로 정량하였다. 세포자체의 생리작용에 의한 기본적인 PGE₂의 농도는 17.9 ng/mL였고, 자외선(UVB 20 mJ/cm²) 조사에 의해 79.2 ng/mL에 정도로 증가하였다. 머위추출물을 농도별로 처리한 결과 자외선에 의해 높아졌던 PGE₂ 생성량이 농도 의존적으로 다시 감소하였으며, 소거효과를 분석한 결과 100 µg/mL의 농도에서 59.3%의 우수한 PGE₂ 생성 억제 효과를 나타내었다(Figure 4). 머위의 주성분으로는 염증억제효과를 갖는 sesquiterpen류인 petasin과 isopetasin이 함유되어 있다고 알려져 있으며[9], 이러한 성분을 함유하여 우수한 PGE₂ 발현억제 효과를 갖는 것으로 사료된다. 향후 고기능성 제품에 적용하여 안전하고 다양한 자극 완화 효과를 가지는 천연화장품 개발에 적용할 수 있을 것이라 생각된다.

4. 결 론

머위추출물의 항산화 효과 및 항염증 효과에 대한 연구를 하였다. 머위추출물의 지질과산화 억제효과는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 70.1%로 지질과산화 억제효과도 우수하게 나타났다. 세포 내에서 ROS에 의해 형광을 띠는 물질로 전환되는 CM-H₂DCFDA를 이용하여 ROS의 양을 측정할 결과 자외선에 의해 증가된 세포내 ROS의 양이 머위추출물을 처리함으로써 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 45% 이상의 우수한 소거효과를 나타냈다. 또한 각질형성세포에서 UVB에 의해 생합성이 증가되는 IL-1 α 및 PGE₂의 생합성 억제효과는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 25.7%, 59.3%를 저해하여 우수한 효과를 나타내었다.

머위추출물은 라디칼 소거효과, 지질과산화 억제효과, UVB에 의한 세포내 ROS 소거 및 IL-1 α , PGE₂ 생합성 저해 효과를 갖는 것으로 보아, 자외선 및 외부자극에 의해서 발생할 수 있는 피부손상을 효과적으로 보호하고 염증을 완화할 수 있는 화장품 소재로써 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. B. N. Ames, M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen, Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging, *Proc. Natl. Sci. USA*, 90, 7915 (1993).
2. D. Dreher and A. F. Junod, Role of oxygen free radicals in cancer development, *Eur. J. cancer*, 32A, 30 (1998).
3. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, and C. E. Cross, Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?, *J. Lab. Clin. Med.*, 119, 598 (1992).
4. A. J. Dannenberg, N. K. Altorki, J. O. Boyle, C. Dang, L. R. Howe, B. B. Weksler, and K. Subbarmaiah, Cyclooxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer, *Lancet Oncol.*, 2, 544 (2001).
5. M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsujii, H. Sawaoka, M. Hori, and R. N. Dubois, Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells, *Cell*, 93, 705 (1998).
6. H. Sheng, H. Shao, J. D. Morrow, R. D. Beachamp, and R. N. Dubois, Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells, *Cancer Res.*, 58, 362 (1998).
7. T. Soka, *In Dictionary of Chinese Drugs* 1st ed. Shanghai Science Technology, Shogakukan Press, Tokyo (1985).
8. B. S. Min, H. S. Cui, H. K. Lee, D. E. Sok, and M. R. Kim, A new furofuran lignan with antioxidant and antiseizure activities from the leaves of *Petasites japonicus*, *Arch. Pharm. Res.*, 28(9), 1023 (2005).
9. M. H. Bang, Development of biologically activity compound from edible plant sources-XY. Isolation of triterpenoid glycosides from the leaf of *Petasites japonicus*, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, 48(4), 421 (2005).
10. O. B. Choi, Anti-allergic effects of *Petasites japonicus*, *Korean J. Food Nutr.*, 15, 382 (2002).
11. C. S. Lee and Y. H. Jee, Pathological changes of rat and mice fed with *Petasites japonicus* Maxim, *Korean J. Vet. Res.*, 36, 417 (1996).
12. A. M. Romero, M. M. Dobal, M. A. Sturla, and M. A. Judis, Antioxidant properties of polyphenol-containing extract from soybean fermented with *Saccharomyces cerevisia*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106, 424, (2004).
13. S. Y. Seo, E. Y. Kim, H. Kim, and B. J. Gwang, Neuroprotective effect of high glucose against NMDA, free radical and oxygen-glucose deprivation through enhanced mitochondrial potentials, *J. Neurosci.*, 19(20), 8849 (1999).
14. I. D. Trayner, A. P. Rayner, G. E. Freeamn, and R. Farzaneh, Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) or dihydrorhodamine 123 (H₂R123), *J. Immunological Methods*, 186, 275 (1995).
15. B. Tebbe, S. Wu, C. C. Geilen, J. Eberle, V. Kodelja, and C. E. Orfanos, L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1 alpha and IL-6 in cultured human keratinocytes *in vitro*, *J. Invest. Derm.*, Vol. 108, 302 (1997).