

관중(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai) 추출물의 *Propionibacterium acnes*에 대한 항균 효과

김 현 주 · 임 혜 원 · 최 신 욱 · 윤 창 순[†]

(주)래디안

(2006년 8월 17일 접수, 2006년 9월 1일 채택)

Antimicrobial Effect of Ethanol Extract of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai on *Propionibacterium acnes*

Hyun Ju Kim, Hye Won Lim, Shin Wook Choi, and Chang-Soon Yoon[†]

Radiant Inc. Bioindustry Foundation, 198-53, Hupyung-dong, Chunchon-si, Gangwon-do, 200-160, Korea,
(Received August 17, 2006; Accepted September 1, 2006)

요약: 본 연구는 예로부터 민간요법 및 한방에 유용한 약재로 사용되어지고 있는 관중(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)을 이용하여 *Propionibacterium acnes*에 대한 항균활성을 평가하고, 이를 토대로 여드름 억제 및 치료에 관련된 화장품 소재를 개발하는데 그 목적이 있다. *P. acnes*에 대한 관중 crude 추출물 및 헥산분획물의 minimum inhibitory concentration (MIC) 및 paper disk diffusion assay로 항균 효과를 측정하였으며, 추출물에 대한 온도 및 pH 변화에 따른 안정성을 평가하였다. 추출물을 이용한 *P. acnes*에 대한 MIC 값은 관중 crude 추출물은 0.008 mg/mL, 헥산추출물은 0.001 mg/mL로 측정되었으며, 이는 대조군으로 사용한 항생제인 triclosan의 MIC 값(0.004 mg/mL)과 비교했을 때 시료가 관중 crude 추출물 및 헥산 분획물임을 고려하면 매우 항균활성이 높은 것으로 평가되었다. 추출물에 대한 paper disk diffusion assay를 수행한 결과, 대조군으로 사용한 triclosan과 대비, 높은 활성을 나타내는 것으로 측정되었으며, HaCaT 세포에 대한 독성은 20 µg/mL 이하의 농도에서는 나타나지 않았다. 관중추출물의 온도, pH 안정성을 평가한 결과, 25, 70, 80, 90, 100, 121°C 등 다양한 온도 조건과 pH 2 ~ pH 11의 변화에 있어서도 그 효능이 변하지 않고 안정된 상태로 유지되는 것으로 관찰되었다.

Abstract: *Propionibacterium acnes* have been recognized as pus-forming bacteria triggering an inflammation in acne. The present study was conducted to evaluate antimicrobial activities of *Dryopteris crassirhizoma* Nakai against these etiologic agents of acne vulgaris and application possibility as a cosmetic resource. *D. crassirhizoma* crude extract and hexane fraction was prepared and its anti-acne effect against *Propionibacterium acnes* was investigated with minimum inhibitory concentration (MIC) and paper disk diffusion method. The MIC of *D. crassirhizoma* crude extract and hexane fraction was 0.008 mg/mL and 0.001 mg/mL, respectively. This implies that *D. crassirhizoma* extract may be an efficient anti-acne ingredient for cosmetics, as a crude extract. The paper disk diffusion assay showed that its anti-acne effect was similar to that of triclosan. The cytotoxic effect of *D. crassirhizoma* extract was determined by a colorimetric MTT assay using HaCaT cell line and *D. crassirhizoma* extract exhibited lower cytotoxic effects. Finally, we examine the stability of *D. crassirhizoma* extract to temperature and pH. The *D. crassirhizoma* extract was very stable to high temperatures (25 ~ 121 °C) and to wide pH range (pH 2 ~ 11), suggesting its utilization for cosmetics.

Keywords: *dryopteris crassirhizoma nakai*, antibacterial, MIC, *propionibacterium acnes*, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: cro@eradiant.co.kr)

1. 서 론

여드름은 다양한 피부 병변 및 발병원인에 의한 모낭 피지선(pilosebaceous follicle)의 염증성 질환으로 얼굴, 목 등의 피부에서 발생한다. 여드름의 발생 원인으로는 피지 분비의 증가, 피지선의 비정상적인 각질화, *Propionibacterium acnes*의 다량 증식 및 염증반응 등이 있다 [1].

정상피부의 pilosebaceous unit에는 그람양성, coagulase 음성, 호기성 세균인 *Staphylococci*, *Micrococci*와 lipophilic yeast들인 *Pityrosporum ovale* 및 *Pityrosporum orbiculare* (이들 *Pityrosporum species*는 *Malassezia furfur* 및 *Malassezia species*로 재분류), 혐기성 균주인 *P. acnes*, *P. granulosum* 등이 상재하며, 이들 균주들의 활성에 의해 여드름으로 발전하게 되는데, 특히 혐기성 균주인 *P. acnes*에 의해 피지선 및 모낭의 염증반응이 유도된다[2].

피지선의 비정상적인 각질화에 의해 피지 생성이 증가하게 되면 *P. acnes*가 colony를 형성하게 되고 증식한 *P. acnes*는 lipase를 분비하여 모낭피지선에서 중성지방을 지방산으로 분해하여 염증을 일으키며, 또한 *P. acnes*는 leukocyte chemotactic 인자들을 생성 분비하여 이들 인자에 의해 모낭피지선으로 들어온 leukocyte에 의해 모낭 세포가 파괴되고, 최종적으로 진피의 염증반응을 유도하게 된다. *Staphylococcus epidermidis* 같은 호기성 균주들은 염증의 원인이 되지는 않지만 염증이 생긴 후의 2차 요인으로 작용하여 여드름을 더 악화시키는 역할을 하게 된다. 따라서 *P. acnes*가 염증성 여드름에 의한 구진, 농포, 낭종, 결절 및 반흔을 형성하게 하는 가장 중요한 역할을 하고 있다[3].

염증성 여드름의 발병에는 생리적 및 환경적 측면 등 다양한 병인을 가지고 있기 때문에, 다양한 유형으로 발병하는 여드름에 대한 알맞은 치료에는 어려움이 있는 실정이다. 이 중 *P. acnes*의 반응에 의해 최종적으로 생성된 염증은 세포손상 등 여러 가지 부작용을 일으키게 되므로, *P. acnes*의 억제를 여드름 치료의 주요 목적으로 할 경우에는 항균 및 항염 효능을 함께 나타낼 수 있는 물질을 사용하는 것이 효과적일 것으로 여겨진다. 일반적으로 염증성 여드름의 치료에는 염증을 억제하거나 또는 염증을 유도하는 *P. acnes*에 대한 살균효과를 갖고 있는 항생제가 가장 많이 사용되고 있는 실정이다. 현재 주로 사용되는 항생제들은 benzoyl peroxide, retinoid, triclosan, tetracycline, clindamycin, erythromycin 등이 있지만, 이들 항생제에 대한 내성균의 출현이나 조직, 장기 손상, 과민반응 등과 같은 부작용이 큰 문제로 대두되고 있는 실정이다[4-6]. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 최근에는

독성이나 부작용이 없으면서 강력한 항균 활성 및 항염 효능을 함유하고 있는 천연물들을 규명하기 위한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있는 추세이다. 현재 여드름 치료를 위한 항균 및 항염 효과를 갖고 있는 천연추출물에 대한 연구는 감초, 목련, 호두나무, 황련, 버드나무, 삼백초, 계피, 등 다양한 목초본류를 이용하여 국내외 여러 연구자들에 의해 진행되고 있거나 제품화되고 있는 실정이다[7-11]. 저자들은 선학초(*Agrimonia pilosa*) 추출물이 *P. acnes*에 대해 강한 항균활성을 갖고 있음을 보고한 바 있으며[12], 이 성분이 포함된 여드름 관련 화장품에 대한 개발이 진행 중에 있다.

관중(*Dryopteris crassirhizoma* Nakai)은 고사리목 면마과(Aspidiaceae)에 속하는 다년생 속근성 양치류로서 한국, 일본, 중국 등의 각지의 산속이나 그늘지고 습한 땅에서 자란다. 오래 전부터 한약재로 사용되어 온 관중의 주요 성분 중의 하나인 filmarone은 구충효과가 있는 것으로 밝혀졌으며, plavaspidic acid AB와 plavaspidic acid PB는 충치원인균에 대한 항균작용이 강하며, wogonin, baicalin 등 flavonoid계의 성분들이 함유되어 있고[13], 또한 관중의 열수추출물에서의 항 *Herpes simplex virus* type-1에 대한 효능[14] 및 항산화 효능[15]이 알려졌다. 그러나 관중에는 독성 및 자궁 수축 작용이 있어 간염이나 급성위염 환자 및 임신부에게는 처방하지 않는 것으로 보고되고 있다[16].

본 연구에서는 일부 세균에 대해 우수한 항균 효능을 갖고 있는 것으로 밝혀진 관중 crude 추출물이 여드름 억제 효능을 갖는 화장품 원료로 사용할 수 있는지의 가능성을 조사하고자 하였다. 여드름 생성의 중요한자인 *P. acnes*에 대한 항균 활성 효능을 검토하였으며, 이들 추출물이 *P. acnes*에 의해 생성된 여드름 억제제로서 우수한 효능이 있음을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시 료

한국생명공학연구원의 한국식물추출물은행(<http://extract.pdcrc.re.kr>)에서 95% ethanol을 사용하여 추출한 관중 crude extract를 구입하여 실험에 사용하였다.

2.2. 세포주 및 배양

한국세포주은행(Korean cell line bank, <http://cellbank.snu.ac.kr>)에서 분양받은 human keratinocyte-like cell line인 HaCaT 세포를 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA)이 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GibcoBRL, USA)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2.3. 사용균주 및 배양

Propionibacterium acnes KCTC3314를 한국생명공학 연구원의 유전자 은행(Korean collection for type cultures, <http://kctc.kribb.re.kr>)에서 분양받아 사용하였다. *P. acnes*는 reinforced clostridial (RC)배지(Merck, Germany)에서 배양하였으며, *P. acnes*는 master plate를 만들어 4°C에 보관하면서 실험 3일전에 활성화시켰다. 균을 RC 배지에 접종한 후, anaerobic jar에서 Gaspack system (Merck, Anaerocult® Gaspack system, Germany)을 이용하여 밀봉하고 37°C incubator에서 3일 동안 혐기성 배양하였다.

2.4. 관중 추출물의 헥산 분획

관중 에탄올 추출물을 냉각콘덴서가 달린 증류장치를 이용하여 47°C에서 증발되어 나오는 용매를 회수하면서 rotary vacuum evaporator에서 농축하여 분말 형태로 시료를 얻었다. 이를 등근 바닥 플라스크에 넣고 증류수로 채워 잘 섞어서 완전히 용해시켜 수용액을 만든 다음, 이 용액을 분별깔때기에 넣고 동량의 헥산(n-hexane)을 첨가하였다. 두 용매 사이에 emulsion이 생기는 것을 줄이기 위하여 포화 식염수를 넣어주고, 헥산층에 물질이 충분히 추출될 수 있도록 잘 흔들어 주었다. 이를 수회 반복하여 헥산층을 분리, 회수한 다음 회전 감압 농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하여 분말형태로 회수하고 DMSO에 녹인 후 필요한 실험에 사용하였다.

2.5. 항균 활성 평가

관중 crude 추출물 및 헥산 분획물에 대한 항균 활성 평가는 paper disk diffusion 법을 적용하였다. *P. acnes* 균주를 RC 액체배지에서 3일간 배양하여 활성화시킨 후, 균 현탁액을 일정한 농도(620 nm에서 optical density 0.5)로 조절하여 희석 한 후, 미리 멸균하여 준비한 RC배지 4.5 mL에 희석한 균액 0.5 mL을 첨가하여 RC agar plate에 접종해 주었다. 균액이 포함된 RC 배지가 plate 표면에서 굳은 후, paper disk (ϕ 8 mm, Adevntec, USA)를 균주를 접종한 plate 표면 위에 올려놓고, 각 시료를 DMSO를 이용하여 농도별로 희석하여 disk 당 최종 농도를 15.625 ~ 500 μ m/disk씩 흡수시켰다. 각 시료가 처리된 RC agar plate를 anaerobic jar에서 Gaspack system을 이용하여 3일간 배양한 후, disk 주위의 생육 억제환의 크기로 항균활성을 측정하였다. 양성 대조군으로는 현재 여드름 균에 대한 항생제로 사용하고 있는 triclosan에 대해 같은 방법으로 효능을 비교하였다.

2.6. 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC) 평가

MIC 평가는 96-well plate를 이용한 broth dilution법을 일부 변형하여 수행하였다. *P. acnes* 균주를 RC 액체배지에서 3일간 배양하여 활성화 시킨 후, McFarland standard 0.5의 값으로 조절하여 약 1.5×10^8 bacterial cells/mL이 되도록 배양 배지를 이용하여 희석하였다. 희석한 균액을 배양 배지 160 μ g가 들어 있는 96-well plate의 각 well에 20 μ L씩 접종해 주었다. DMSO에 녹인 관중 crude 추출물 및 헥산 분획물(20 mg/mL)을 RC 액체 배지를 이용하여 2배수씩 희석(two-fold serial dilution)하여 농도별로 균주와 배지가 들어있는 96-well plate에 20 μ L씩 넣어 주고 잘 섞어 주었다. 음성대조군으로 시료가 들어 있지 않은 DMSO를 사용하여 시료를 용해하는데 사용한 DMSO의 영향을 함께 평가해 주었으며, 양성대조군으로는 triclosan을 사용하였다. 희석한 균액 및 시료를 접종한 96-well plate를 Anaerocult® Gaspack system을 이용하여 3일간, 37°C incubator에서 배양한 후 균의 생육이 나타나지 않는 최소 농도를 MIC로 결정하였다.

2.7. 미생물의 생육 억제 평가

미생물 생육 억제 정도는 killing curve assay를 일부 변형하여 수행하였다. *P. acnes*를 RC 액체 배지를 사용하여 3일간 전 배양하여 활성화시킨 후, McFarland standard 0.5의 값으로 조절하여 1.5×10^8 bacterial cells/mL로 배양 배지를 이용하여 희석하였다. 희석한 균액을 15 mL conical tube에 0.5 mL 접종하고 4 mL의 RC 액체 배지를 넣어주었다. 균액이 접종된 각 tube에 음성대조군으로는 시료가 첨가되지 않은 DMSO를 넣어주고 시험군에는 DMSO에 희석된 관중 crude 추출물 및 헥산 분획물의 최종 농도가 1.9 ~ 15.6 μ g/mL이 되도록 첨가해 주었으며, 양성대조군으로는 triclosan을 사용하였다. 혐기성 배양을 위하여 Anaerocult® Gaspack system을 이용하여 37°C incubator에서 배양하면서 12 h 간격으로 흡광 값을 측정하여 배양 시간의 경과에 따른 농도별 균 생육 억제 정도를 측정하였다.

2.8. 세포 독성 평가

96-Well plate에 well 당 2×10^5 cells/mL의 HaCaT 세포를 24 h 배양 후, 배지를 제거하고 적당한 농도로 희석된 관중 crude 추출물이 함유된 serum-free 배지를 첨가하여 24 h 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 각 well에 첨가하고 4 h 배양한 후, 관중 crude 추출물과 MTT 시약이 함유된 배지를 제거하고 acid iso-propanol을 첨가하여 반응시킨 후 570 nm에서 흡광 값을 측정하였다.

2.9. 추출물의 온도 및 pH 안정성 평가

2.9.1. 온도

관중 crude 추출물을 10 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹인 후, 1.5 mL microfuge tube 에 넣어 주고, 25, 70, 80, 90, 100°C의 항온수조에서 70 min간, autoclave (121°C)에서 15 min간 정치한 후, 이들 시료를 이용하여 paper disk diffusion method를 수행하였다.

2.9.2. pH

관중 crude 추출물을 10 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹인 후, 15 mL conical tube에 넣어주고 pH를 2 ~ 11의 범위로 조절하여 30 min간 정치한 후, 다시 원래의 시료의 pH인 5.4로 되돌린 것을 시료로 하여, paper disk diffusion method를 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항균 활성 평가

Paper disk diffusion 방법으로 관중 crude 추출물 및 핵산 분획물을 염증성 여드름 생성에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 *P. acnes*에 적용시켜 항균 활성을 평가하였으며, 양성대조군으로는 triclosan을 사용하였다. *P. acnes*에 대한 관중 crude 추출물(Table 1) 및 핵산 분획물(Table 2)의 항균 활성은 강하게 나타났으며 특히 핵산 분획물은 양성대조군으로 사용한 triclosan (Table 3)과 거의 비슷한 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

저자들은 선학초에 대한 항균 효능 평가에 의해 선학초가 우수한 항균효능이 있음을 보고하였고[12], 이에 대한 후속실험으로 선학초를 에탄올로 추출한 후 이 추출물을 이용하여 다양한 분획물을 얻고, 이를 이용하여 각 분획물에 대한 항균활성을 시도한바 있다(data not shown). 선학초 추출물에 대한 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올 분획을 순차적으로 얻은 후 항균 효능을 평가한 결과, 핵산 분획물이 가장 우수한 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며, Han[17] 등의 연구에서도 핵산 분획물이 우수한 항균 활성이 있음을 보고하였다.

Table 2에서 보는 것처럼 실험에 사용한 관중의 핵산 분획물이 15.6 µg/disk 농도에서도 양성대조군인 triclosan의 비슷한 항균 활성을 보였으며, 농도의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 핵산 분획물의 항균 효과가 우수한 것은 항균 작용을 하는 유효 성분들이 1차 분획 용매인 핵산층에서 모두 용출되었기 때문인 것으로 여겨지며, 클로로포름 등 2차 분획 용매에서는 이미 핵산층에서 대부분이 용출되었기 때문에 항균 효능이 약한 것으로 추정할 수 있다.

Table 1. The Size of Inhibition Zone of *P. acnes* by *D. crassirhizoma* Crude Extract

Compound	Concentration (µg/disk)	Inhibition zone (mm)
<i>Dryopteris crassirhizoma</i> crude extract	15.625	20
	31.25	22
	62.5	23
	125	28
	250	33
500	40	

Table 2. The Size of Inhibition Zone of *P. acnes* by Hexane Extract

Compound	Concentration (µg/disk)	Inhibition zone (mm)
<i>Dryopteris crassirhizoma</i> hexane fraction	15.625	30
	31.25	31
	62.5	33
	125	36
	250	40
500	48	

Table 3. The Size of Inhibition Zone of *P. acnes* by Triclosan

Compound	Concentration (µg/disk)	Inhibition zone (mm)
Triclosan	15.625	31
	31.25	33
	62.5	35
	125	37
	250	40
500	42	

3.2. 최소억제 농도(MIC) 평가

*P. acnes*에 대해 강한 항균 활성을 나타내는 관중 crude 추출물 및 핵산분획물에 대해 2배수 희석법에 의한 최소억제농도(MIC)를 평가하였으며, 양성대조군은 triclosan을 사용하였다. Table 4에서 보는 것처럼 각 시료들이 *P. acnes*의 성장을 억제하는 최소농도는 양성대조군인 triclosan은 4 µg/mL, 관중 crude 추출물은 8 µg/mL, 그리고 핵산 분획물은 0.9 µg/mL로 측정되었으며, 따라서 이들 농도들이 각 시료들의 MIC (IC₅₀)임을 확인하였다.

관중 crude 추출물 및 핵산 분획물의 *P. acnes* 균에 대한 최소억제농도 평가에서 우수한 효능이 있음을 알 수

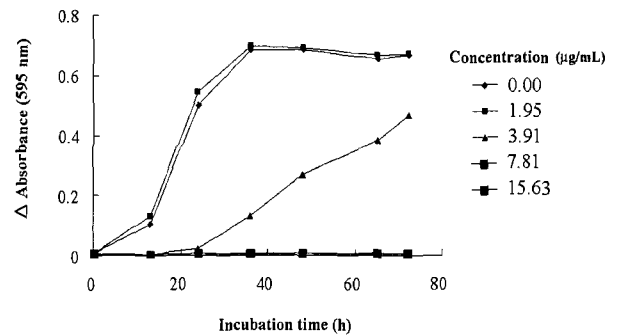
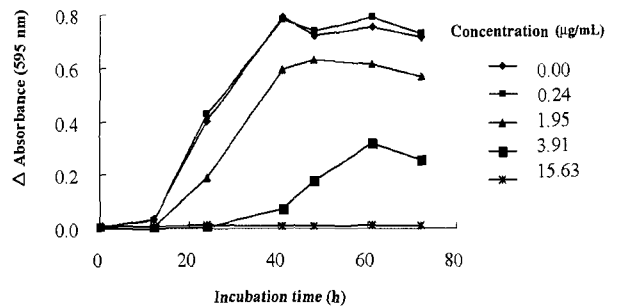
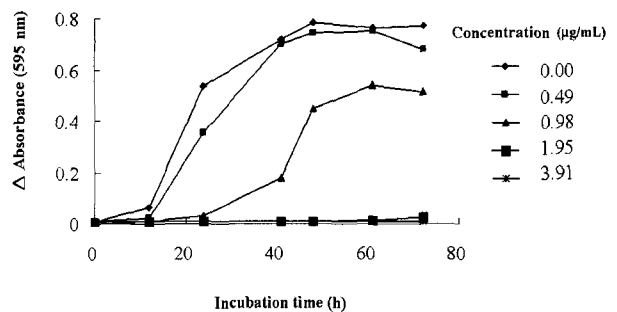
Table 4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Triclosan and *D. crassirhizoma* Extract

Compounds	MIC (IC ₅₀ : $\mu\text{g/mL}$)
Triclosan	4
<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	
Crude extract	8
Hexane fraction	0.9

있는데, 양성대조군으로 사용한 triclosan과 거의 비슷한 억제 효과가 있음을 확인하였다. 앞서 언급한 바와 같이 다양한 세균들이 피부에 상재하고 있는데 그중 호기성 피부 상재 균주의 주된 종류인 *Staphylococci*들은 여드름의 염증 반응을 일으키는데 있어서 중요한 역할을 하지 못하는 것으로 알려져 있다[18]. 하지만 일부 보고[19]에 의하면, *Staphylococci* 등의 호기성 피부 상재균들은 단독으로는 염증반응을 일으키지 못하지만 피부에 *P. acnes*에 의해 유발된 염증이 생겼을 경우에 이차감염을 일으켜 증상을 악화시키는 것으로 알려져 있다. 관중 crude 추출물 및 hexan 분획물은 호기성 균주들에게도 역시 강한 항균활성을 나타내는 것으로 보고되고 있기 때문에[17], 이들 추출물 및 분획물을 여드름 억제 및 치료를 위한 목적으로 사용하게 되면 *P. acnes*에 의한 염증 억제 효과 및 *Staphylococci*에 의한 이차 감염 억제 효과까지도 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

3.3. *P. acnes*에 대한 관중추출물의 증식 억제

*P. acnes*에 대한 triclosan, 관중 crude 추출물 및 hexan 분획물의 증식 억제 효과를 killing curve assay를 이용하여 수행하였다. Triclosan 및 관중 crude 추출물 및 hexan 분획물을 일정한 농도별(1.9 ~ 15.6 $\mu\text{g/mL}$)로 RC 배지에 첨가하고, *P. acnes* 균을 접종하여 3일간 배양하면서 12 h 간격으로 균주의 성장 정도를 측정하여 triclosan, 관중 crude 추출물 및 hexan 분획물의 *P. acnes*에 대한 억제 효과를 평가하였다. 음성대조군으로는 *P. acnes*균과, 시료를 희석할 때 사용한 DMSO와 *P. acnes*균을 섞어서 측정하였는데, 이들 대조군 모두 배양 10 h 후부터 균이 기하급수적으로 증식하기 시작하였으며, 약 40 h 배양하면 대수기(log phase)에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다. 양성대조군인 triclosan을 처리하여 보면 4 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 저농도에서는 약 60 h 배양 후에도 균이 증식하였지만 7 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 균의 증식이 완전히 억제되는 것을 확인하였다(Figure 1). 관중 crude 추출물은 시료를 농도별로 처리하여 보면 약 15 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 균의 증식이 억제되었으며(Figure 2), hexan분획에서는 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도에서도 균의 생육이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3).

**Figure 1.** Effect of triclosan on the growth of *P. acnes*.**Figure 2.** Effect of *D. crassirhizoma* crude extract on the growth of *P. acnes*.**Figure 3.** Effect of hexane fraction the growth of *P. acnes*.

여드름은 만성 질환의 일종으로 다양한 병인에 의해 미세면포(microcomedos)가 생성되기 시작한 후 구진, 낭포, 결절 등의 증상으로 발전해 가는 양상을 보인다. 여드름의 치료에 대한 문제점 중의 하나가 여드름 발생 후 치료를 지속적으로 하다 중단하게 되면 재발의 가능성이 높기 때문에 지속적인 치료 및 관리가 필요하게 된다. 여드름의 발병에 관여하는 요인 중의 하나인 *P. acnes*를 사멸시키거나 증식을 억제하기 위해서 항생제를 여드름 치료제로서 가장 많이 사용하고 있는 실정이지만, 장기적으로 항생제를 사용함에 따른 여러 가지 부작용들이 문제점으로 대두되고 있다. 특히 benzoyl peroxide, azelaic

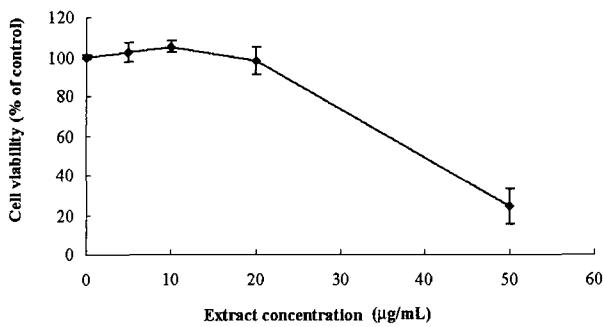


Figure 4. Effect of *D. crassirhizoma* crude extract on the viability of HaCaT cell line.

acid 및 sodium sulfacetamide 등의 국소 도포제를 과다 처치했을 때 진피건조증, 피부 자극성, 접촉성 피부염 및 과민반응 등의 부작용이 나타나고, erythromycin, tetracycline 및 doxycycline 등의 경구용 항생제를 오랫동안 복용하게 되면 내성균의 출현과 간 조직 등 기관의 손상 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다[4-6]. 항생제 내성균의 출현은 erythromycin이 약 54%, clindamycin이 약 46% oxytetracycline이 약 24%, 그리고 이들 항생제를 복합적으로 사용할 경우 약 63%가 내성균으로 변형되고 있는 것으로 보고되고 있다[20]. 이를 위해 직접적인 여드름 치료제 이외에도 보조적이며 지속적으로 사용하여 *P. acnes*에 의한 생성되는 여드름을 억제하기 위한 천연물 질 들이 다양하게 연구되고 있다. 일부 연구에 의하면, 여러 종의 세균에 대한 항균 효능을 갖는 비누를 지속적으로 사용함으로써 여드름 관련 피부 상재균의 증식을 억제하여 여드름 치료 및 염증을 예방하는 효과가 있음이 보고되었다[21].

본 연구 결과에서 보는 것처럼 관중 crude 추출물이나 핵산 분획물은 적은 농도 범위(2 ~ 152 µg/mL) 내에서도 장시간 *P. acnes* 균의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이들을 사용하여 여드름 생성 억제 및 예방의 목적으로 사용하기 위한 화장품 등 다양한 제품의 원료로 사용한다면, 일반적인 항생제의 처리에 의해 얻게 되는 항균효과보다 더 좋은 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

3.4. HaCaT 세포에 대한 관중 Crude 추출물의 독성 평가

관중 crude 추출물에 대한 독성평가는 human keratinocyte-like cell line인 HaCaT 세포주를 사용하여 MTT assay를 수행하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이 시료 농도가 저농도인 10 µg/mL 이하의 농도에서는 거의 독성을 보이지 않았으나 20 µg/mL의 농도에서는 약 5 ~ 10% 정도의 세포치사율을 보이기 시작하였으며, 30 µg/

Table 5. Temperature Stability of *D. crassirhizoma* Extract

Temperature (°C)	25	70	80	90	100	121
Inhibition zone (mm)	37	38	38	39	38	38

Table 6. pH Stability of *D. crassirhizoma* Extract

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Inhibition zone (mm)	34	36	37	38	38	36	38	35	36	38

mL에서 30%, 40 µg/mL에서 50%의 치사율을 보였으며 50 µg/mL의 농도에서는 거의 대부분의 세포들이 사멸하는 것을 알 수 있었다. Triclosan의 경우에는 약 5 µg/mL에서 50%의 치사율을 보였으며, 10 µg/mL의 농도에서는 모든 세포들이 사멸하는 것을 확인하였다(data not shown).

관중 crude 추출물이나 핵산 분획물들이 *P. acnes*에 대한 강한 항균 활성을 갖고 있기 때문에 여드름 치료를 위한 therapeutic agent에 적용할 수 있는 가능성을 갖고 있음을 언급하였지만, 이들을 therapeutic agent로서 인체 피부에 적용했을 때 피부 세포에 독성을 나타내지 말아야 할 것이다. 따라서 관중 crude 추출물이나 핵산 분획물들이 인간유래 피부 세포에 독성이 있는가를 확인하여 본 결과 일정 농도에서는 전혀 독성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 즉 약 20 µg/mL 이하의 농도에서는 전혀 독성을 나타내지 않았는데, 그 농도에서의 *P. acnes*에 대한 항균 활성 역시 강한 것으로 확인되었기 때문에 관중 crude 추출물이나 핵산 분획물을 인체에 적용하는 데는 전혀 문제가 없을 것으로 사료된다. 따라서 관중 crude 추출물이나 핵산 분획물은 triclosan처럼 항균 효과를 포함하는 화장품 등에 우수한 active ingredient로써 사용할 수 있으며, 또한 여드름 치료 및 억제를 위한 topical therapeutic agents로서 적용할 수 있을 것으로 기대된다. 뿐만 아니라 이들에 대한 안전성 등 여러 조건들을 보다 더 충족시켜 주기 위해서는 앞으로 동물실험, patch test 등 다양한 실험이 계속 되어야 할 것으로 여겨진다.

3.5. 관중 추출물의 온도 및 pH에 대한 안정성 평가

관중 추출물이 온도 및 pH의 변화에 안정성이 있는지를 확인하여 보았다. 다양한 범위로 온도(25, 70, 80, 90, 100, 121°C)나 pH (2 ~ 11)를 변화시켜서 시료를 반응시킨 후, paper disk diffusion 법에 의해 항균활성을 측정할 결과, 이들 추출물은 온도(Table 5) 및 pH (Table 6)의 변화에 높은 안정성을 보여주는 것으로 나타났으며 이 결과는 관중 추출물이 화장품 원료로 개발할 수 있을 것으로 여겨진다.

4. 결 론

본 연구에서는 여드름 생성에 중요한 역할을 하는 *P. acnes*에 대한 항균 활성물질을 탐색하기 위하여 예로부터 민간 의학 및 한방 약재로서 사용되어 온 관중을 이용하여 *P. acnes*에 대한 항균 활성을 평가하여 보았다.

관중 crude 추출물 및 핵산 분획을 이용한 paper disk diffusion법에서 *P. acnes*에 대해 높은 항균활성을 보였으며, *P. acnes*에 대한 MIC 값은 0.008 mg/mL 및 0.001 mg/mL로 측정되었으며, 시료가 관중에 대한 crude 추출물 및 핵산 분획임을 고려하면 매우 항균활성이 높은 것으로 평가되었다. 저농도 범위(2 ~ 15 µg/mL)에서도 *P. acnes*의 성장을 강하게 억제하는 것을 확인하였으며, HaCaT 세포를 이용한 세포독성 실험에서도 20 µg/mL 이하의 농도에서는 독성이 거의 나타나지 않았다. 관중 crude 추출물 및 핵산 분획물의 온도, pH 안정성을 평가한 결과 25, 70, 80, 90, 100, 121°C 등 다양한 온도 조건과 pH 2 ~ pH 11의 변화에 있어서도 그 효능이 변하지 않고 안정된 상태로 유지되는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 관중 추출물은 여드름 생성 관련 병인 중의 하나인 *P. acnes*에 대한 억제 및 치료제에 관련된 기능성 화장품 원료 및 topical therapeutic agents로서의 개발 가능성이 높은 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. W. J. Cunliffe and H. Gollnick, Acne: diagnosis and management, Dunitz Ltd., London (2001).
2. C. G. Burkhardt, C. N. Burkhardt, and P. F. Lehmann, Classic diseases revisited: Acne: a review of immunologic and microbiologic factors, *Postgrad. Med. J.*, **75**, 328 (1999).
3. A. M. Layton, A review on the treatment of acne vulgaris, *Int. J. Clin. Pract.*, **60**, 64 (2006).
4. J. Park, J. Lee, E. J. Y. Park, K. Kim, B. Park, K. J. E. Park, J. Kim, and D. Park, *In vitro* anti-bacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against *Propionibacterium* sp., *Europ. J. Pharmacol.*, **496**, 189 (2004).
5. E. Eady, Bacterial resistance in acne. *Dermatology*, **196**, 59 (1998).
6. M. Wawruch, L. Bozekova, S. Kremery, and M. Kriska, Risks of antibiotic treatment, *Bratisl Lek. L.*, **103**, 270 (2002).
7. A. Zesch, Adverse reactions of externally applied drugs and inert substances (benzoyl peroxide/retinoid-skin irritation), *Dermatol. Beruf. Umw.*, **36**, 128 (1988).
8. C. Nam, S. Kim, Y. Sim, and I. Chang, Anti-acne effects of oriental herb extracts: a novel screening method to select anti-acne agents, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **16**, 84 (2003).
9. M. T. Chomnawang, S. Surassmo, V. S. Nukoolkarn, and W. Gritsanapan, Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria, *J. Ethnopharmacol.*, **101**, 330 (2005).
10. S. Higaki, S. Morimatsu, M. Morohashi, T. Yamagishi, and Y. Hasegawa, Susceptibility of *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to 10 Kampo formulations, *J. Int. Med. Res.*, **25**, 318 (1997).
11. F. Qadan, A. J. Thewaini, D. A. Ali, R. Afifi, A. Elkhawad, and K. Z. Matalaka, The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to cane-developing organism, *Am. J. Clin. Med.*, **33**, 197 (2005).
12. H. J. Kim, H. W. Lim, B. H. Kim, H. S. Kim, S. W. Choi, and C. S. Yoon, Studies on the anti-acne effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb, *J. Soc. Cosmet.*, **32**, 53 (2006).
13. K. H. Bae, The Medicinal Plants of Korea, 25, Kyo Hak Pub. Co., Ltd., Seoul, Korea (2000).
14. B. J. Kang, K. S. Park, and M. H. Kim, Screening of antiviral activities of Korean medicinal herbs and traditional prescriptions against Herpes simplex virus type-1, *J. Korean Soc. Virology*, **27**, 227 (1997).
15. S. M. Lee, M. K. Na, R. B. An, B. S. Min, and H. K. Lee, Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma*, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1354 (2003).
16. R. J. Im, Encyclopedia of Chosun Medicinal Plant III, 148, Hankukmoonwhasa, Seoul, Korea (1997).
17. J. S. Han, J. Y. Lee, N. I. Baek, and D. H. Shin, Isolation and antimicrobial action of growth inhibitory substance on food-borne microorganisms from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **33**, 611 (2001).
18. J. Y. Yoo, S. H. Park, I. A. Hwang, S. J. Jo, C. H. Huh, S. W. Youn, and K. C. Park, A clinical study on the effect of a cream containing *Ramulus mori* extract and tea tree oil an acne vulgaris and aerobic skin flora, *Korean J. Dermatol.*, **41**, 1136

- (2003).
19. A. E. Till, V. Goulden, W. J. Cunliffe, and K. T. Holland, The cutaneous microflora of adolescent, persistent and lateonset acne patients does not differ, *Br. J. Dermatol.*, **142**, 885 (2000).
 20. E. A. Eady, C. E. Jones, K. J. Gardner, J. P. Taylor, J. H. Cove, and W. J. Cunliffe, Tetracyclin resistant propionibacteria from acne patients are cross resistant to doxycycline but sensitive to minocycline, *Br. J. Dermatol.*, **128**, 556 (1993).
 21. J. B. Wikinson, R. J. Moore, *Antiseptics-Harry's cosmetology*, 7th ed. 91, Chemical publishing Co., New York Washinton, D.C. (1982).