

## 榆白皮 추출물이 인간의 피부 세포 재생 및 악성 흑색종 세포에 미치는 영향

한진근 · 박수연 · 김종한 · 최정화  
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

### Effects of Cortex *Ulmi pumilae* on Human HaCaT keratinocyte and its antioxidant and anti-cancer effect

Jin-Geun Han · Su-Yeon Park · Jong-Han Kim · Jeong-Hwa Choi

**Objective** : Cortex of *Ulmi pumilae*(CUP) has been used to treat several diseases including boil, swelling, and scabies etc. Recently, CUP was known to have wrinkle care and whitening actions. But, It's exact mechanisms are unclear.

**Methods** : The present study was designed to investigate effects of CUP on Human HaCaT keratinocyte and malignant melanoma cells such as SK-MEL-2 and B16F10 in terms of cell viabilities, proliferations, DPPH free radical scavenging activities, oxygen free radical productions and inhibitory action on elastase activities.

**Results** : CUP accelerated proliferation of HaCaT keratinocytes in the lower concentration. CUP also prevented cell death of HaCaT induced by Hydrogen peroxide, which products oxygen free radicals. On the contrary, CUP did not affect proliferations of SK-MEL-2 or B16F10. Futhermore, CUP showed inhibitory action against SK-MEL-2 proliferation at the concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In addition, CUP was shown to have DPPH free radical scavenging activities and also have inhibitory effects on elastase activities too. On the fluorescent examinations, the present author knows that CUP elevated production levels of oxygen free radicals in malignant melanoma cell, SK-MEL-2.

**Conclusions** : These results suggest that CUP has possibilities of usage for functional cosmetics which have wrinkle care and whitening activities and related mechanisms are involved in inhibition of elastase action and acceleration of oxidative stress in melanoma cell.

---

**Key word** : Cortex *Ulmi pumilae*, anti-cancer effect

---

교신저자: 최정화, 광주광역시 남구 월산2동 377-13  
동신대학교 부속한방병원 안이비인후피부과학교실  
(Tel : 062-350-7280, E-mail : mininng32@hanmail.net)  
• 접수 2007/10/23 • 수정 2007/11/20 • 채택 2007/12/04

## I. 서 론

榆白皮(CUP, *Cortex ulmi pumilae*)는 느릅나무과(*Ulmaceae*)에 속하는 느릅나무(*Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai)의 코르크층을 벗긴 樹皮 또는 根皮를 말하며 우리나라 각지의 산야에 자생한다. 性味는 甘 平 無毒하고 利水通淋, 消腫 등의 효능이 있다<sup>1,2)</sup>.

榆白皮에 대한 최초의 기록으로 《神農本草經》<sup>3)</sup>에 “主大小便不通, 利水道, 除邪氣”라 하였고, “利竅 滲濕熱 行津液 消癰腫의 효능이 있다”라고 하였다. 그리고 榆白皮의 피부외과학적인 효능인 消腫解毒을 활용하여 《千金要方》<sup>4)</sup>에서는 風熱腫毒, 癰癤 등의 병증에 槐白皮, 赤小豆, 大麥, 桑白皮 등을 榆白皮 배합하여 外貼하도록 되어있고, 《太平惠民和劑局方》<sup>5)</sup>에는 癰疽發背의 경우 榆白皮를 清水洗하여 爛搗해서 外貼하도록 기록되어 있다.

榆白皮 연구로는 감별, 성분 및 약리 효과 연구<sup>6-8)</sup>와 진통, 소염, 항균 작용이 있어 위궤양, 치주 질환, 염증 등에 응용한 연구<sup>2,8-16)</sup>가 있다. 또한, 주름 억제 효과로 이<sup>17)</sup>의 연구와 콜라겐(Collagen)의 합성 촉진과 콜라겐분해효소(Collagenase)의 활성을 억제하는 작용이 우수하다는 연구<sup>18)</sup>가 보고되었다. 그러나 榆白皮 추출물에 대한 정상 피부 각질 세포와 피부 암세포에 대한 반응의 비교 연구는 아직까지 접할 수 없었다.

이에 본 저자는 榆白皮의 산화적 스트레스로부터 정상 세포를 보호하는 능력과 암세포의 증식을 억제하는 효능을 확인하기 위하여 榆白皮가 인간 유래 정상 피부 각질 세포인 HaCaT 세포주의 증식에 직접적으로 미치는 영향과 산화적 스트레스를 가한 이후, 세포 사멸을 방지하는 효과를 확인하고, 악성 흑색종 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약제의 준비

본 실험에서 榆白皮로는 참느릅나무(*Ulmus parvifolia*)의 코르크층을 벗긴 樹皮를 조합법인 전남 생약(화순, 한국)으로부터 구입하여 사용하였다.

#### 2) 세포주

인간 유래 정상 피부 각질 세포(Keratinocyte)인 HaCaT 세포주는 서울대학교 의과대학 피부과학교실에서 제공 받아 실험에 사용하였다. 인간 유래 악성 흑색종 세포주인 SK-MEL-2와 생쥐 유래 악성 세포주 B16F10 은 한국 세포주 은행(서울, 한국)으로부터 냉동상태로 구입하여 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

세포내 자유 산소라디칼 생성 양상 관찰을 위한 약물인 2,7-dichloro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), 엘라스틴 분해 효소 1(PPE1, Elastase, Pancreatic type 1 from porcine pancreas)과 4(PPE4, Elastase type IV from porcine pancreas) 및 N-Succ-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 및 Tris-HCl 등의 기타 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)제품을 구입하였다. 측정을 위해 사용된 기기는 분광광도계(U-2800, Hitachi, Japan), Micro-plate reader(Bio-rad, CA), 분쇄기(DIAX 600, Heidolph, Germany), 원심 분리기(VS-15000CFN, Vision, 한국), 형광 현미경(Olympus, Japan) 등 이었다.

### 2. 방법

#### 1) 열수 추출물 조제

榆白皮 100 g을 증류수 1,300 ml과 함께 전

기약탕기(대웅, 한국)를 이용하여 3시간 동안 전탕한 후, 減壓 加溫法을 이용하여 건조 분말을 제조하였다. 얻어진 분말은 실험에 사용하기 위하여 3차 증류수에 다시 녹여진 후, 2000 rpm에서 15분간 원심분리로 얻어진 상층액은 와트만 지로 거른 다음 최종적으로 0.22  $\mu\text{m}$  크기의 필터(Syringe filter, Whatman)로 걸러 멸균을 대신하였다.

## 2) 세포주 배양 환경

HaCaT 세포주의 생육 배지로는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco LOT. NO. 1006842)와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )을 첨가하여 사용하였고, 악성 흑색종(melanoma) 세포주인 SK-MEL-2와 B16F10 세포주의 생육 배지로는 Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma, R4130) 배지를 사용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )을 첨가하였다. 모든 세포주는 5% CO<sub>2</sub>가 공여되는 배양기 속에서 37°C를 유지하며 배양되었다.

## 3) 세포 생존율 측정

HaCaT Cell line 및 SK-MEL-2, B16F10 Cell line의 세포 생존율은 트리판 블루 배제 시험법(Trypan blue exclusion assay)<sup>19)</sup>을 사용하여 측정하였다. 먼저 측정에 사용하고자 하는 세포주를 세포 배양용 6-well plate(TPP, Netherlands)에 각 well당  $5 \times 10^4$ 개의 분량으로 분주하고, 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 楡白皮 추출물을 최종 농도 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 24시간이 지난 후, 세포계수기(Hematocytometer, Marienfeld, Germany)를

이용하여 생존, 사멸 세포의 개수를 측정하였다.

## 4) 세포 증식률 및 세포 독성 측정

Highly water-soluble tetrazolium salt를 사용하여 살아있는 세포를 정량하는 방법<sup>20)</sup>을 사용하였다. 먼저 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를  $5 \times 10^3$ 개의 분량으로 분주 하고, 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 楡白皮 추출물을 최종 농도 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10  $\mu\text{l}$ 의 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Japan) 용액을 첨가하고 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader (Bio-rad, CA)를 이용하여 450 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 5) 산화적 스트레스에 대한 HaCaT 세포주의 반응성 측정

과산화수소(Hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 사용하여 HaCaT 세포주의 산화적 스트레스에 대한 반응성을 측정<sup>21)</sup>하였다. 먼저 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 well당  $5 \times 10^3$ 개의 분량으로 분주 하고, 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 과산화수소를 최종 농도 50  $\mu\text{M}$ 과 100  $\mu\text{M}$  농도가 되도록 배양액에 희석하여 투여하고, 각각 30분, 60분, 120분, 240분 동안 반응시킨 다음, 각 well당 10  $\mu\text{l}$ 의 CCK-8 용액을 첨가하고 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader(Bio-rad, CA)를 이용하여 450 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

6) 산화적 스트레스에 대한 약물의 HaCaT 세포주 보호 효과 측정

榆白皮 추출물이 과산화수소(Hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의한 산화적 스트레스로 인하여 HaCaT 세포의 사멸을 방지 할 수 있는지를 관찰하기 위하여 O'Toole 등<sup>22)</sup>의 방법을 응용하여 실험을 진행하였다. 먼저 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 well당 5×10<sup>3</sup>개의 분량으로 분주하고, 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 최종 농도 125 μg/ml, 250 μg/ml로 희석된 榆白皮 추출물을 HaCaT 세포주에게 투여하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝나고, 榆白皮 추출물이 함유된 배양액을 깨끗이 제거 한 후, 최종 농도 100 μM의 과산화수소를 함유한 배양액을 투여하고 2시간 동안 방치 하였다. 2시간이 지난 후, 과산화수소가 함유된 배양액을 깨끗이 제거하고, 각 well당 10 μl의 CCK-8 용액을 첨가하고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader(Bio-rad, CA)를 이용하여 450 nm파장에서 흡광도를 측정하였다. 인간 유래 정상 피부 각질 세포에 대한 榆白皮 추출물의 산화적 스트레스 방지에 대한 실험의 개요를 Fig. 1.에 개괄적으로 제시하였다.

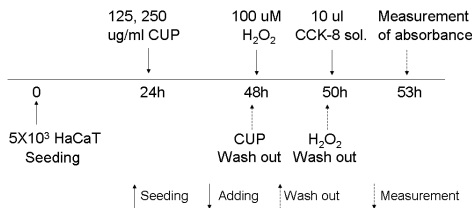


Fig. 1. Experimental schedule for protective effects of CUP against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human HaCaT keratinocytes.

7) DPPH(α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능 측정

榆白皮 추출 분말을 에탄올에 녹인 다음, 원하는 농도로 희석하면서 자유 산소기 제거 효과를 측정하였다<sup>23)</sup>. 100 μM 농도의 DPPH와 농도별 추출물을 각각 100 μl씩 취하여 혼합하여, 30분간 빛을 차단하고 방치한 후 잔존 radical 농도를 ELISA Reader(Bio-RAD, USA)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(Scavenging activity)으로 표시하며, RC<sub>50</sub> (Reduce Concentration 50%)은 DPPH 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양(μg)으로 나타내었으며 항산화 물질로 잘 알려진 Vitamin C(ascorbic acid)와 비교하여 활성을 나타내었다. 계산 공식은 다음과 같다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = \frac{(\text{Ac-As})/\text{Ac} \times 100}{\text{Ac-As}/\text{Ac} \times 100}$$

Ac : 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도  
As : 시료를 첨가한 실험군의 흡광도

8) 엘라스틴 분해효소 저해 활성 측정

엘라스틴 분해효소(Elastase) 저해 활성은 James 등<sup>24)</sup>의 방법으로 측정하였다. 먼저 0.2 M의 Tris-HCl (Sigma, USA) buffer를 pH 8.0으로 적정하여 만든 후, 600 μl를 tube에 옮긴 후, 3.3 μM로 희석한 Succ-Ala-Ala-Ala -p-nitroanilide 250 μl를 첨가하고, 거기에 농도별로 희석된 榆白皮 추출물 60 μl를 넣어준 후, 1 μg/ml로 희석된 Porcine pancreatic elastase 제 1형과 4형을 각각 10 μl씩 넣어주고, 실온에 15분간 방치한 후, p-nitroanilide의 생성량을 micro-plate reader를 이용하여 410 nm 파장에서 측정하였다. Elastase 저해 활성은 다음 식에 따라 계산되며, IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration 50%)은 Elastase의 기

질을 50% 저해하는데 요구되는 시료의 농도 ( $\mu\text{g/ml}$ )로 표시하였다.

$$\text{Elastase inhibition (\%)} = [1 - \{(B - C)/(A - D)\}] \times 100$$

- A: 시료 대신 증류수를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도
- B: 효소를 첨가하여 반응한 후의 시료의 흡광도
- C: 효소 대신 증류수를 첨가하여 반응한 후의 시료의 흡광도
- D: 시료와 효소 대신 각각 증류수를 첨가해 반응한 후의 흡광도

### 9) 악성 흑색종 세포의 자유 산소 라디칼 생성 양상 관찰

악성 흑색종 세포주인 SK-MEL-2를 세포 배양용 8 well permanox slide (w/cover, NUNC)에  $5 \times 10^4$ 개씩 분주하고, 4시간 동안 37°C에서 배양하여 세포를 부착 시켰다. 세포의 부착이 끝난 후, Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma)에 녹여진 2',7'-dichloro -dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma)를 최종 농도 50  $\mu\text{M}$ 로 각각의 well에 분주하고 45분간 배양하여 DCFH-DA가 세포 내로 흡수되도록 하였다<sup>25)</sup>. 45분간의 배양이 끝난 다음, 배양액을 제거하고 PBS로 수세한 후, 약물을 최종 농도 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 2000  $\mu\text{g/ml}$ 로 각 well에 처리하고 30분간 배양 하였다. 30분간의 배양이 끝난 후, 배양액을 제거하고, Phosphate Buffered Saline (PBS)로 수세하였다. 자유 산소 라디칼의 생성양상은 2',7'-dichlorodihydrofluorescein에서 수소(H<sup>+</sup>)기가 떨어져 나간 DCF가 발하는 녹색의 형광을 형광 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

### 3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS(The SAS System for Windows, ver. 6.12,

SAS Institute, U.S.A.)를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 각 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's t-test로 검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## III. 성 적

### 1. HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향

HaCaT에 대한 楡白皮 추출물의 세포 독성은 고농도인 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 처음으로 관찰되었다. 500  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서는 모든 군에서 90%가 넘는 세포 생존율을 보여 유의한 세포 독성은 없는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

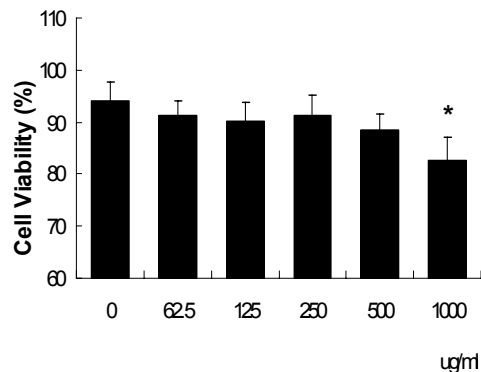


Fig. 2. Effects of CUP on cell viability in HaCaT keratinocyte

$5 \times 10^4$  HaCaT cells were seeded in 6-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, CUP was added into each well in various concentration and cells were incubated for 24 hr again, then live and dead cell numbers were measured using Trypan blue exclusion assay. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three experiments which were carried out independently.

\* :  $P < 0.05$  as compared to non-treated group.

## 2. HaCaT 세포의 증식률에 미치는 영향

楡白皮 추출물은 저농도인 125  $\mu\text{g/ml}$ 에서 HaCaT 세포의 증식률을 통계적으로 유의한 수준으로 향상시켰다. 250  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 향상되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다. 고농도인 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 HaCaT 세포의 증식률이 감소하였다 (Fig. 3).

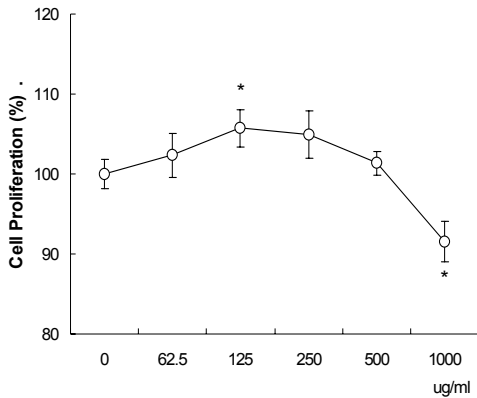


Fig. 3. Effects of CUP on proliferation of HaCaT keratinocyte

$5 \times 10^3$  HaCaT cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, CUP was added into each well in various concentration and cells were incubated for 24 hr again, then Optical Density of each wells were measured using micro-plate reader. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three experiments which were carried out independently.

\* :  $P < 0,05$  as compared to non-treated group.

## 3. HaCaT 세포주에 산화적 스트레스가 미치는 영향

최종 농도 50  $\mu\text{M}$ 의 과산화수소를 처리한 경우, 처리한 시간에 관계없이 HaCaT 세포의 생존율은 영향을 받지 않았다. 그러나 최종 농도 100  $\mu\text{M}$ 의 과산화수소를 2시간 이상 처리한 경우 통계적으로 유의한 세포 생존율의 감소가 관찰되었다. 최종 농도 100  $\mu\text{M}$ 의 과산화수소를 30분 또

는 60분 동안 처리한 경우에도 HaCaT 세포주에 대한 특별한 세포독성을 관찰 할 수 없었다(Fig. 4).

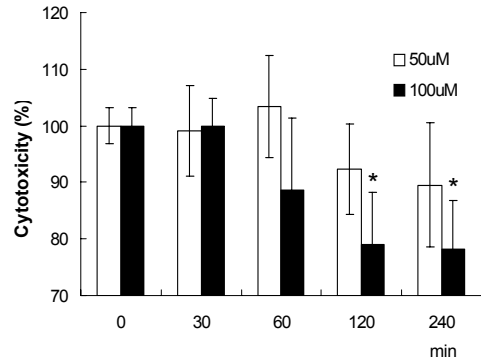


Fig. 4. Cytotoxic effects of Hydrogen peroxide as a pro-oxidant on HaCaT keratinocyte

$5 \times 10^3$  HaCaT cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, Hydrogen peroxide was added into each well in indicated concentration and cells were incubated for various times, then Optical Density of each wells were measured using micro-plate reader. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three experiments which were carried out independently.

\* :  $P < 0,05$  as compared to non-treated group.

## 4. 산화적 스트레스에 의한 HaCaT 세포주 사멸 보호 효과

125  $\mu\text{g/ml}$ 의 楡白皮 추출물만을 처리한 경우에는 약물을 처리하지 않은 경우에 비하여 경미하게 증식률을 증가시켰다. 楡白皮 추출물을 처리하지 않고 과산화수소만을 처리한 군은 약물을 처리하지 않은 군에 비하여 살아있는 세포의 개수가 22%정도 감소된 것으로 나타났다. 125  $\mu\text{g/ml}$ 의 楡白皮 추출물은 과산화수소에 의한 HaCaT 세포주의 사멸을 효과적으로 보호하지 못하였다(Fig. 5A). 이와 달리, 250  $\mu\text{g/ml}$  농도로 楡白皮 추출물을 처리한 경우는 통계적으로 유의할 만한 세포 사멸 보호 효과가 관찰되었다(Fig. 5B).

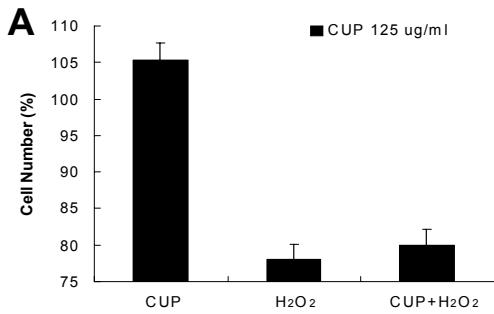


Fig. 5A. Protective effects of CUP against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human HaCaT keratinocytes

$5 \times 10^3$  HaCaT cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, 125  $\mu\text{g/ml}$  of CUP was added in each well and re-incubated for 24 hr. After washing, 100  $\mu\text{M}$  of Hydrogen peroxide was added and cells were incubated for 2 hr, then Optical Densities were measured using micro-plate reader. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three experiments which were carried out independently.

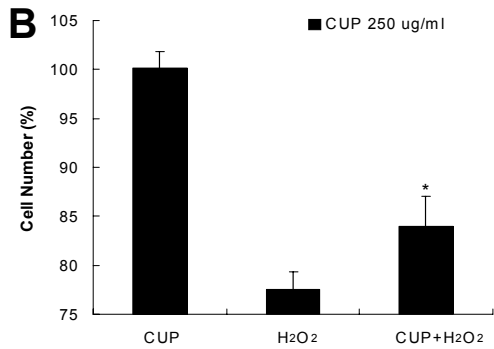


Fig. 5B. Protective effects of CUP against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in human HaCaT keratinocytes

$5 \times 10^3$  HaCaT cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, 250  $\mu\text{g/ml}$  of CUP was added in each well and re-incubated for 24 hr. After washing, 100  $\mu\text{M}$  of Hydrogen peroxide was added and cells were incubated for 2 hr, then Optical Densities were measured using micro-plate reader. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three experiments which were carried out independently.

\* :  $P < 0.05$  as compared to non-treated group.

### 5. SK-MEL-2의 증식에 미치는 영향

楡白皮 추출물을 농도별로 SK-MEL-2 세포에 처리 한 결과 500  $\mu\text{g/ml}$  이상의 고농도에서 통계적으로 유의한 증식률 감소가 관찰되었다. 500  $\mu\text{g/ml}$  와 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 모두 정상군에 비하여 10% 이상의 증식률 감소를 보였다. 250  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서는 SK-MEL-2 세포의 증식률에 특별한 영향을 미치지 못하였다(Fig. 6).

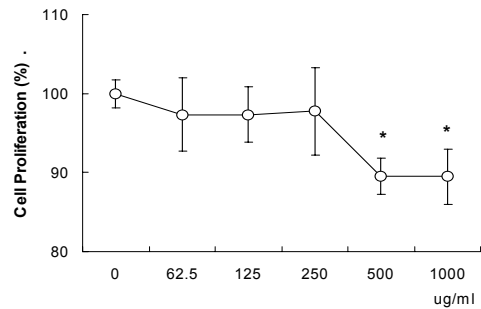


Fig. 6. Effects of CUP on proliferation of melanoma cell, SK-MEL-2

$5 \times 10^3$  SK-MEL-2 cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, CUP was added into each well in various concentration and cells were incubated for 24 hr again, then Optical Density of each wells were measured using micro-plate reader. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three experiments which were carried out independently.

\* :  $P < 0.05$  as compared to non-treated group.

### 6. B16F10의 증식에 미치는 영향

생쥐에서 유래한 악성 흑색종 세포인 B16F10에 대하여 楡白皮 추출물을 각각의 농도별로 1000  $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 결과 모든 농도에서 통계적으로 유의한 증식률의 감소 또는 증가는 관찰되지 않았다. 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 楡白皮 추출물을 처리한 군의 증식률은 아무것도 처리하지 않은 군의 증식률의 98% 수준이었다 (Fig. 7).

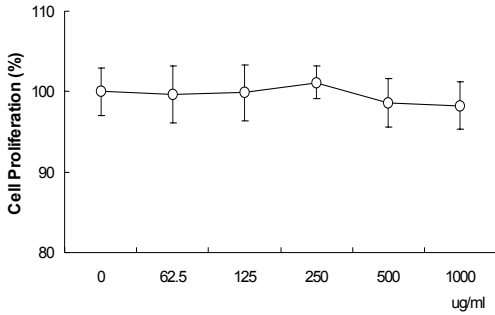


Fig. 7. Effects of CUP on proliferation of melanoma cell, B16F10

$5 \times 10^3$  B16F10 cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, CUP was added into each well in various concentration and cells were incubated for 24 hr again, then Optical Density of each wells were measured using micro-plate reader. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three experiments which were carried out independently.

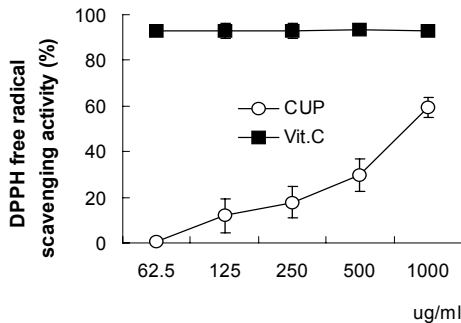


Fig. 8. DPPH free radical scavenging activity by CUP

CUP was extracted in ethanol at room temperature for 4 hr. Diluted samples were added in DPPH solution dissolved in ethanol respectively. Free radical scavenging activities by CUP were measured using micro-plate reader at 517 nm wavelength. Optical densities were calculated indicated formular as described in materials and methods. To compare the scavenging ability, Vitamin C, known as anti-oxidant, was used as positive control. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

## 7. DPPH 자유 라디칼 소거능

최고 농도 1000  $\mu\text{g/ml}$  에서부터 1/2 희석법을 적용하면서 DPPH 자유 라디칼의 제거 효과를 살펴본 결과 농도에 비례하여 DPPH 자유 라디칼 소거능이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.  $\text{RC}_{50}$  값은 842.7로 비교적 고농도를 처리하여야 도달할 수 있었다. 대조군으로 사용한 Vitamin C는 최소 농도인 62.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서도 90%가 넘는 DPPH 자유 라디칼 소거능을 보였다(Fig. 8).

## 8. 제 1형 Elastase 저해 활성에 미치는 영향

榆白皮 추출물의 제 1형 엘라스틴 분해효소에 대한 저해능은 62.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 500  $\mu\text{g/ml}$ 까지 모든 처리군에서 30%정도의 경미한 저해 활성을 보였다.  $\text{RC}_{50}$ 값은 구할 수 없었다 (Fig. 9).

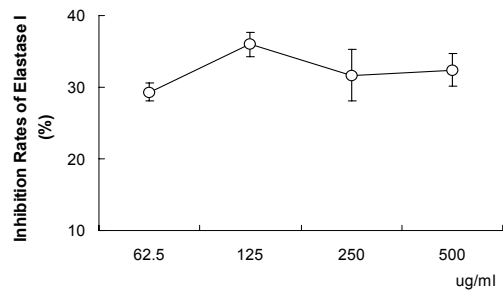


Fig. 9. Inhibitory Effects of CUP on type I elastase activity

CUP was added into elastase I in indicated concentrations. Inhibition rates of elastase I by CUP were measured as production of p-nitroanilide using micro-plate reader at 410 nm wavelength. Optical densities were calculated indicated formular as described in materials and methods. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

## 9. 제 4형 Elastase 저해 활성에 미치는 영향

제 4형 엘라스틴 분해효소에 대한 저해능은 제 1형 엘라스틴 분해효소에 대한 작용에 비해 더 뛰



어란 활성을 보였다. 62.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 40%의 저해 활성을 보였고, 농도에 비례하여 증가되는 저해 활성을 보였다. 제 4형 Elastase에 대한 저해활성의  $\text{RC}_{50}$ 값은 294.4  $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 10).

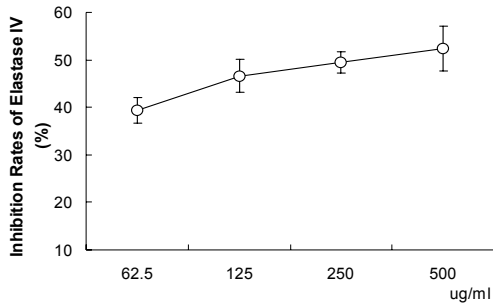


Fig. 10. Inhibitory Effects of CUP on type IV elastase activity

CUP was added into elastase IV in indicated concentrations. Inhibition rates of elastase IV by CUP were measured as production of p-nitroanilide using micro-plate reader at 410 nm wavelength. Optical densities were calculated indicated formular as described in materials and methods. Values are represented as mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

### 10. SK-MEL-2의 자유산소라디칼 생성량에 미치는 효과

楡白皮를 처리하지 않은 대조군에서는 악성 흑색종 세포의 생존에 필요한 기본적인 소량의 자유

산소 라디칼 생성이 관찰 되었다. 여기에 楡白皮를 처리한 결과 楡白皮 추출물의 농도에 비례해서 자유 산소 라디칼의 생성이 증가 되었다 (Fig. 11, 12).

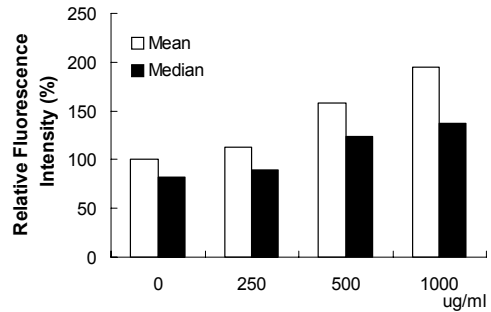


Fig. 12. Effects of CUP on fluorescent intensity by oxygen free radical production in melanoma cells

After  $5 \times 10^4$  cells were suspended in culture medium and were attached in 8 well slide, 50 mM of 2,7-dichloro-fluorescein diacetate was added for 45min. After incubation, CUP was added into each well at concentration of 0, 250, 500 and 1000  $\mu\text{l/ml}$  for 30 min. Fluorescence were observed using fluorescence microscopy. (A) None treated group, (B), 250  $\mu\text{l/ml}$  of CUP treated group, (C) 500  $\mu\text{l/ml}$  of CUP treated group, (D) 1000  $\mu\text{l/ml}$  of CUP treated group.

### IV. 고찰

느릅나무는 낙엽교목으로서 잎은 광립형 또는

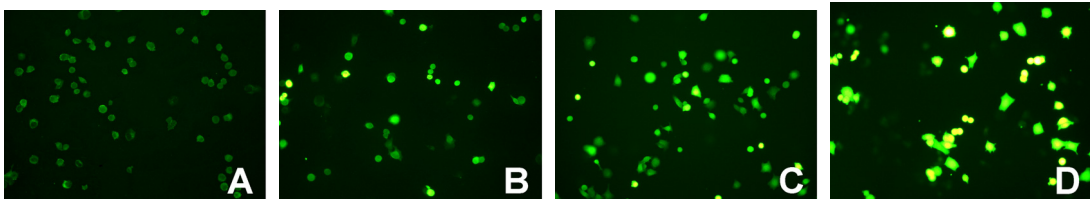


Fig. 11. Effects of CUP on oxygen free radical production in melanoma cells

After  $5 \times 10^4$  cells were suspended in culture medium and were attached in 8 well slide, 50 mM of 2,7-dichloro-fluorescein diacetate was added for 45min. After incubation, CUP was added into each well at concentration of 0, 250, 500 and 1000  $\mu\text{l/ml}$  for 30 min. Fluorescence were observed using fluorescence microscopy. (A) None treated group, (B), 250  $\mu\text{l/ml}$  of CUP treated group, (C) 500  $\mu\text{l/ml}$  of CUP treated group, (D) 1000  $\mu\text{l/ml}$  of CUP treated group.

타원형이며 밑은 썩기 모양이고 길이는 3~12 cm로 끝은 뾰족하며 톱니가 있다. 대황록색의 작은 꽃이 4~5월에 피며 과실은 翼果로서 편평한 막질이며 열매에 털이 없다. 동속식물로는 왕느릅나무 (*Ulmus macrocarpa* Hance), 큰잎느릅나무(*Ulmus macrocarpa* var. *macrocarpa*), 난티나무(*Ulmus laciniata*), 비술나무(*Ulmus pumila* L.) 또는 참느릅나무(*Ulmus parvifolia*) 등이 있다<sup>1-3,9)</sup>. 榆白皮(CUP, *Cortex ulmi pumilae*)는 느릅나무과 (*Ulmaceae*)에 속하는 느릅나무(*Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai)의 코르크층을 벗긴 樹皮 또는 根皮를 말한다<sup>1,2)</sup>.

榆白皮의 異名으로 零榆, 榆皮, 榆根皮가 있다. 생김새는 管狀 또는 板狀으로 바깥면은 흑갈색으로 반점이 있고 코르크층이 있다. 껍은 면은 거칠고 얇은 갈색이며, 섬유상의 가는 무늬가 뚜렷하고 질은 단단하며 흑황색의 가루가 있다. 낭유경엽은 여름 또는 가을에 채취한다. 참느릅나무의 어린잎과 껍질은 식용으로 사용되기도 하며, 수피 또는 근피를 榔榆皮, 莖葉은 榔榆莖이라 하여 약용하기도 한다<sup>1-3)</sup>.

榔榆皮의 수피에는 전분, 점액질, tannin, stigmasterol 등의 phytosterol이 함유되어 있고 cellulose 22.3%, hemicellulose 10.56%, lignin 25.17%, pectin 8.0%, 油脂 7.75%가 함유되어 있다<sup>2)</sup>. 性味는 甘平 無毒하며, 小腸·膀胱·胃 三經에 작용한다. 榆白皮는 利水通淋, 消腫등의 효능이 있어, 小便不利, 排尿痛, 血尿에 사용한다. 또한 腫氣, 惡瘡, 疥癬 등에 內服, 外用하며, 민간에서 암 치료제로 사용한다는 것이 보고되었다<sup>1,2,7-9)</sup>.

榆白皮에 대한 기록은 《神農本草經》<sup>3)</sup>에 처음으로 “主大小便不通, 利水道, 除邪氣”의 용도로 사용하였고, 利竅 滲濕熱 行津液 消癰腫의 효능이 있다. 그리고 榆白皮의 피부외과학적인 효능인 消腫解毒을 활용하여 《千金要方》<sup>4)</sup>에는 風熱腫毒, 癰癤 등의 병증에 槐白皮, 赤小豆, 大麥, 桑白皮

등을 榆白皮 배합하여 外貼하도록 되어있고, 《太平惠民和劑局方》<sup>5)</sup>에는 癰疽發背의 경우 榆白皮를 清水洗하여 爛搗해서 外貼하도록 기록되어 있다. 최근에는 榆白皮가 피부 재생 및 미백, 보습등의 기능성이 있는 것으로 알려져 있어 임상에서 다용하고 있으며, 기능성 화장품의 원료로서의 가능성이 많은 한약재 중 하나이다<sup>2,16)</sup>.

榆白皮에 대한 현대적인 연구는 1990년 홍 등<sup>6)</sup>이 榆白皮의 성분에 대하여 연구하여 발표 한 이후로 각종 피부 관련 연구뿐만 아니라, 항염증 작용, 항산화 효과에 대하여서도 다각적인 연구가 계속되고 있다. 榆白皮가 항염증 작용이 있음은 1992년 이 등<sup>8)</sup>에 의하여 밝혀졌고, 노 등<sup>11)</sup>과 박 등<sup>12)</sup>에 의하여서도 광범위한 항균작용이 보고되었다. 이 등<sup>13)</sup>은 2000년에 榆白皮가 항산화 활성을 가지고 있음을 학계에 최초로 보고 하였다. 이 외에도 榆白皮 추출물로 조제된 약침이 LPS로 유발된 관절염에 미치는 영향<sup>14)</sup>과 榆白皮 추출물이 위 궤양에 미치는 영향<sup>15)</sup>등의 연구 결과가 보고되어 있다. 이 등<sup>16)</sup>은 연구 보고서에서 榆白皮 추출물과 sorbitol을 matrix형태로 처방화한 압력 감응형 점착성 하이드로겔 패치는 얼굴의 주름을 치료하는 새로운 국소제제로써 약제학적 응용 가능성이 높은 것으로 평가 하였다. 하지만 榆白皮 추출물의 피부 조직 유래의 정상 및 암세포에서의 반응성을 비교한 연구는 현재까지 찾아볼 수 없다.

이에 본 저자는 榆白皮의 산화적 스트레스로부터 정상 세포를 보호하는 능력과 암세포의 증식을 억제하는 효능을 확인하기 위하여 榆白皮가 인간 유래 정상 피부 각질 세포인 HaCaT 세포주의 증식에 직접적으로 미치는 영향과 산화적 스트레스를 가한 이후, 세포 사멸을 방지하는 효과를 확인하고, 악성 흑색종 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 본 연구를 기획하였다.

본 연구에서 사용한 세포주는 HaCaT cell, SK-MEL-2, B16F10으로 이 중, HaCaT 세포는 인

간 유래 정상 피부 각질 세포 (Keratinocyte)<sup>26)</sup>이며, SK-MEL-2는 인간 유래 악성 흑색종 세포이다<sup>27)</sup>. 또한, B16F10은 생쥐로부터 발생한 악성 흑색종 세포이다<sup>28)</sup>.

楡白皮 추출물의 HaCaT 세포 보호 효과를 관찰하기 위하여, 楡白皮 추출물이 인간 유래 정상 피부 각질 세포의 생존율에 특별한 영향을 미치지 않고 어떤 특정한 효과를 기대할 수 있는 적정 용량을 찾기 위하여 Trypan Blue exclusion assay를 시행 하였다. 그 결과 1000  $\mu\text{g/ml}$  이상의 고농도가 되어야 HaCaT 세포주의 생존율에 영향을 미침을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 楡白皮 추출물의 HaCaT 세포에 대한 적정 용량은 500  $\mu\text{g/ml}$  이하임을 알 수 있었다. 그러나 楡白皮 추출물 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서의 세포 생존율은 통계적으로 유의하지는 않지만, 楡白皮 추출물을 처리하지 않은 군의 생존율의 95%에 못 미치는 생존율을 보여 세포의 생존율에 경미한 영향을 미칠 수 있다고 판단하여 최종적으로 楡白皮 추출물의 125  $\mu\text{g/ml}$ 과 250  $\mu\text{g/ml}$  용량을, 이후 HaCaT 세포를 이용한 실험에 사용하였다 (Fig. 2).

이러한 결과를 바탕으로 楡白皮 추출물이 HaCaT 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보았다. 결과를 보면, 비교적 저 농도의 楡白皮 추출물은 인간 유래 정상 피부 각질 세포의 증식을 도와주는 현상을 보였고, 세포 생존율에 미치는 영향과 유사하게 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 세포 증식이 떨어지는 결과를 나타내었다(Fig. 3). 사실상, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 은 매우 고농도로서 약제학적 농도 (pharmacological concentration)에 해당하지만, 실제 생체 내 농도(physiologic concentration)와는 거리가 있다. 따라서 생체 내에서 楡白皮 추출물이 그러한 고농도로 존재할 확률은 거의 없다고 판단된다. 이러한 결과로 楡白皮 추출물이 정상 피부 각질세포의 증식을 도와 줄 수 있다고 판단하였다.

산화적 스트레스 (Oxidative stress)와 활성 산소

(Reactive Oxygen Species)는 인체에서 발생하는 거의 모든 병의 발생과 진행에 관여한다. 특히 피부 세포의 노화, 유전적 변형에는 가장 중요한 병리적 요소로 알려져 있다<sup>29)</sup>. 실제로 실험을 통하여 UV조사에 의하여 인간 피부 세포로부터 활성 산소가 발생하고, 몇가지 기전을 거쳐 DNA에 손상을 미치는 것이 알려져 있다<sup>30)</sup>. 인간 유래 정상 피부 각질 세포의 산화적 스트레스에 대한 楡白皮 추출물의 보호효과를 확인하기 위하여, HaCaT 세포주에 적절한 산화적 스트레스를 가하기 위하여 과산화수소의 용량과 시간에 따른 HaCaT 세포주의 반응성을 살펴보았다. 연구의 결과에서 과산화수소 100  $\mu\text{M}$  이상의 농도를 2시간 이상유지 해줘야 HaCaT 세포주의 생존율에 영향을 미칠 수 있음을 확인 하였고, 이러한 결과로 HaCaT 세포주에 대해 가장 적절한 산화적 스트레스 유발을 위한 농도와 시간은 100  $\mu\text{M}$ 의 2시간 처치라 판단하였다(Fig. 4).

이러한 판단을 근거로 楡白皮 추출물이 과산화수소에 의하여 발생하는 산화적 스트레스로부터 인간 유래 정상 피부 각질 세포를 보호 해 줄 수 있는지 알아보기 위하여 이전의 실험을 통해 결정된 125  $\mu\text{g/ml}$  및 250  $\mu\text{g/ml}$  농도의 楡白皮 추출물을 각각 전 처리하고, 100  $\mu\text{M}$ 의 과산화수소를 2시간 동안 처리한 후, 세포 생존율을 관찰하였다. 산화적 스트레스에 의한 세포 생존율 저하는 비교적 고농도의 楡白皮 추출물 (250  $\mu\text{g/ml}$ )에서 통계적으로 유의하게 방지함을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과로부터 楡白皮 추출물은 인간 정상 피부 각질 세포의 증식을 돕고 산화적 스트레스에 의한 손상을 방지해 줄 수 있음을 확인하였다 (Fig. 5B).

자유 산소라디칼은 생체 내의 산화적 스트레스를 일으키는 주요 원인 중 하나이다<sup>31)</sup>. 이러한 자유 산소라디칼에 대한 제거 효과는 궁극적으로 피부 미백, 노화 방지뿐만 아니라 정상 세포의 사멸

을 보호하는 효과를 가지게 된다<sup>30)</sup>. 榆白皮 추출물 자체가 가지는 DPPH 자유 라디칼 소거능을 알아본 실험의 결과에서 Vitamin C 보다는 훨씬 못 미치는 결과를 보였지만, Vitamin C는 단일 성분의 추출물임을 감안할 때, 복합 성분인 榆白皮 추출물은 상당한 수준의 항산화 기능이 있어 피부 미백, 노화 방지, 정상 세포의 사멸을 보호하는 효과가 있을 것이라 생각된다(Fig. 8).

또한, 榆白皮 추출물이 HaCaT 세포의 증식을 활성화하고 산화적 스트레스를 방지하는 이러한 현상이 피부 유래 암세포에서도 동일하게 발생하는지를 확인하기 위하여 인간 및 생쥐로부터 유래한 악성 흑색종 세포에 대하여 반응성을 관찰하였다. 먼저 인간 유래 악성 흑색종 세포인 SK-MEL-2에 대한 결과를 살펴보면, HaCaT 세포에서 보이던 증식 항진 효과가 나타나지 않았다(Fig. 6). 또한, HaCaT 세포에서는 통계적으로 유의한 증식률 억제 효과를 보이지 않았던 500  $\mu\text{g/ml}$  용량에서도 통계적으로 유의한 증식의 억제작용을 나타내고 있어 榆白皮 추출물은 정상 세포에 대하여는 약간의 증식 항진 작용을 가지지만 고농도에서는 암세포의 증식을 억제하는 작용도 가질 수 있음을 알 수 있었다.

榆白皮 추출물 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도는 구강 투여 등의 생리학적 방법으로는 도달하기 힘든 농도이기는 하나, 榆白皮 약침액 등을 개발한다면 국소 부위에서 도달 가능성은 충분히 보인다. 따라서 榆白皮 약침액의 개발 등을 통하여 정상 세포에는 영향을 미치지 않으면서 암세포는 사멸시킬 수 있는 적정 농도에 대한 연구가 계속 되어야 한다고 생각한다.

생쥐 유래 악성 흑색종 세포에 대한 榆白皮 추출물의 작용 결과, B16F10세포에 대해 특별한 독작용이나 증식 항진 작용을 나타내지 않았다(Fig. 7).

Elastase는 엘라스틴을 분해하는 효소이며<sup>32)</sup>, 진피

내에서 피부 탄력을 유지 하는데 매우 중요한 역할을 하는 단백질의 일종이다<sup>33)</sup>. 또한, Elastase는 피부 주름 억제, 피부 탄력 유지에 또 하나의 중요한 요소인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이기도 하다<sup>34)</sup>. 따라서 Elastase의 저해는 피부 주름 억제 및 피부 탄력 유지의 작용을 나타낸다고 할 수 있으며<sup>35)</sup>, 대표적인 저해제로는 Ursolic acid가 알려져 있다<sup>36)</sup>. 본 연구에서는 몇 가지 Elastase 중 가장 중요한 제 1형과 제 4형 Elastase에 대하여 榆白皮 추출물의 활성 억제효과를 관찰하였다. 본 연구의 결과에서 榆白皮 추출물은 Elastase type 1에 대하여 매우 경미한 억제 효과를 나타내는데 그쳤으나(Fig. 9), Elastase type 4에 대하여는 일정한 수준의 활성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 10). 이러한 결과로 榆白皮는 피부 주름억제 효과 및 피부 탄력유지의 가능성이 있고, 추후 이러한 가능성은 여러 가지 추출법과 다양한 제형을 통하여 다각적으로 연구되어야 할 것이라 생각된다.

산화적 스트레스는 정상 세포 및 각종 암세포에 세포 독작용을 일으킨다<sup>37-39)</sup>. 특히 자유 산소 라디칼은 인간의 악성 흑색종 세포에 산화적 스트레스를 유발하여 세포 사멸을 일으킨다는 사실이 알려져 있다<sup>40)</sup>. 따라서 榆白皮 추출물의 악성 흑색종 세포에 대한 세포 사멸 기전이 이와 유사한 산화적 스트레스에 의한 것인지 확인하기 위하여 추출물을 처리한 후, 악성 흑색종 세포의 자유 산소 라디칼 생성 양상을 관찰하였다. 자유 산소 라디칼 생성 양상은 형광 현미경으로 관찰하였는데, 그 결과 榆白皮 추출물의 처리 농도에 비례하여 자유 산소 라디칼의 생성이 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 榆白皮 추출물이 악성 흑색종 세포의 사멸에 관여하는 기전은 산화적 스트레스의 유발과 관련 있다는 사실을 확인하였다(Fig. 11). 이상의 결과들을 정리하면 榆白皮 추출물은 인간 유래 정상 피부 각질 세포의 증식률을 높이고 산

화적 스트레스에 의한 손상을 방지 해줌으로써 피부 재생의 효능에 대한 가능성을 보였고, 또한 엘라스틴 분해효소의 작용을 억제함으로써 피부 주름억제와 피부 탄력 유지에 대한 가능성을 보였다. 이에 부가해서, 악성 흑색종 세포에는 125  $\mu\text{g/ml}$ 의 榆白皮 추출물을 HaCaT세포에 처리한 경우에서 보이던 증식 향진 작용이 나타나지 않았으며, HaCaT세포에 유의한 세포 독작용을 보이지 않았던 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리에 의해서는 세포 사멸을 유도 하였고, 기전은 산화적 스트레스의 유발과 관련 있음을 아울러 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로 본 저자는 榆白皮가 피부 재생, 피부 탄력 유지와 항산화 기능이 있어 피부 미백, 노화 방지, 정상 세포의 사멸을 보호 등의 피부과적 활용에 대한 가능성을 확인하였고, 추후 이러한 가능성은 여러 가지 추출법과 다양한 제형을 통하여 다각적으로 연구되어야 할 것이라 생각된다.

또한, 고농도에서 암세포의 증식을 억제하는 작용도 가질 수 있음을 알 수 있어서 榆白皮 약침액의 개발 등을 통하여 정상 세포에는 영향을 미치지 않으면서 암세포는 사멸 시킬 수 있는 적정 농도에 대한 연구가 계속 되어야 한다고 생각한다.

## V. 결 론

榆白皮 추출물이 인간 유래 정상 피부 각질 세포(HaCaT) 및 악성 흑색종 세포(SK-MEL-2와 B16F10)에 미치는 영향을 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HaCaT의 생존율에 영향을 끼치지 않았다.
2. 125  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 HaCaT의 증식률을 유의성 있게 증가시켰다.
3. 125  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 산화적 스트레스에 의한 HaCaT의 사멸을 방지하지 못하였다.
4. 250  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 산화적 스트레스에 의한

HaCaT의 사멸을 유의성 있게 방지하였다.

5. DPPH 자유 라디칼의 소거능은 농도에 따라 증가하였다.
6. SK-MEL-2에서는 500  $\mu\text{g/ml}$ 과 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 증식률을 유의성 있게 억제하였다.
7. B16F10의 증식률에는 영향을 미치지 못하였다.
8. 제 1 형 Elastase에 대한 저해 효과는 미미하였지만, 제 4 형 Elastase에 대하여서는 저해 효과를 보였다.
9. SK-MEL-2에서 자유 산소라디칼의 생성을 증가시켰다.

## 참고문헌

1. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 2000;668-9.
2. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 중약대사전. 서울:정담. 1997;3348-50.
3. 沈連生. 神農本草經 中藥彩色圖譜. 北京:中國中醫藥出版社. 1996;150-1.
4. 孫思邈. 備急千金要方(影印本). 서울:大成出版社. 1992;201.
5. 陳師文 編. 太平惠民和劑局方(影印本). 旋風出版社. 192.
6. 김형철, 임덕형, 이형중. 榆白皮와 刺榆皮의 形態 鑑別에 관한 研究. 대한본초학회지. 2004; 19(2):169-79.
7. 홍남두, 노영수, 김남재, 김진식. 榆白皮의 성분 분에 관한 연구. 생약학회지. 1990;21(3): 201-4.
8. C.M. Kim, M.K. Shin, D.K. Ahn and K.S. Lee. Dictionary of Chinese Medicines, Seoul:Jeong Dam Press. 1998;4319-21.
9. B.H Son, J.H. Park and O.P. Jee. Catechin glycoside from ulmus davidiana, The pharm. Soc, Kor. 1989;193.
10. N.D. Hong, Y.S.Rho, N.J. Kim and J.S.

- Kim, A study on efficacy of ulmi cortex, Kor, J. Pharmacogn. 1990;217-22.
11. 이홍용, 김치경, 성태경, 문택규, 임치주. General Microbiology, Physiology and Metabolism; Antibacterial Activity of *ulmus pumila* L. Extract. 산업미생물학회지. 1992;20(1):1-5.
  12. 노석선. 榆白皮가 항염작용에 미치는 영향. 한의학논문집. 1998;7(1):837-52.
  13. 박주성, 심창주, 정재홍, 이규희, 성장근, 오만진. 榆白皮 (Ulmi cortex) 의 항균활성. 한국식품영양과학회지. 1999;28(5):1022 -8.
  14. 이경행, 전은경, 유시영, 오만진. 榆白皮 (Ulmi cortex) 추출물의 항산화 활성. 한국식품저장유통학회지. 2000;7(4):373-9.
  15. 도원석, 김경호, 김갑성. 榆白皮, 계지, 우슬, 봉독 및 우황, 응답, 사향 복잡제제 약침이 mouse 의 LPS 유발 관절염의 혈액학적 변화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001;18(1):157-69.
  16. 임종필, 최훈. 榆白皮 물 추출물이 흰쥐의 위 궤양에 미치는 영향. 한국약용작물학회지. 2002;10(3):177-80.
  17. 이태완, 김상년, 지웅길, 황성주. 榆白皮 추출물을 함유한 하이드로겔 패치의 주름 억제 효과 J. Kor. Pharm. Sci., 2004;34(3):193-9.
  18. S.S. No. Experimental study on the anti-inflammatory and wound healing effect of *ulmus parvifolia*, Research Institute of Korean Medicine Thesis Collection, Taejeon University. 1998;837-52.
  19. Cowan JD, Von Hoff DD, Neuenfeldt B, Mills GM, Clark GM. Predictive value of trypan blue exclusion viability measurements for colony formation in a human tumor cloning assay. Cancer Drug Deliv. 1984; 95-100.
  20. Roslev P, King GM. Application of a Tetrazolium Salt with a Water-Soluble Formazan as an Indicator of Viability in Respiring Bacteria. Appl Environ Microbiol. 1993;2891-6.
  21. Takeda M, Shirato I, Kobayashi M, Endou H. Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. Nephron. 1999;234-8.
  22. O'Toole EA, Goel M, Woodley DT. Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. Dermatol Surg. 1996;525-9.
  23. Atsumi T, Iwakura I, Kashiwagi Y, Fujisawa S, Ueha T. Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. Antioxid Redox Signal. 1999; 537-46.
  24. James, A.E.K, Timothy, D.W., and Gorden, L. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic tyrosin inhibitors. Bio-chemistry. 1996;9090-6.
  25. Afri M, Frimer AA, Cohen Y. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichloro -dihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydro -fluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. Chem Phys Lipids, 2004;131(1):123-133.
  26. Park HJ, Kim HJ, Lee JY, Cho BK, Gallo RL, Cho DH. Adrenocorticotropin hormone

- stimulates interleukin-18 expression in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):1210-6.
27. Choi HJ, Yee SB, Park SE, Im E, Jung JH, Chung HY, Choi YH, Kim ND. Petrotetrayndiol A induces cell cycle arrest and apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells through cytochrome c-mediated activation of caspases. *Cancer Lett*. 2006;232(2):214-25.
28. Yu B, Chang TM. Polyhemoglobin-tyrosinase, an oxygen carrier with murine B16F10 melanoma suppression properties : a preliminary report. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2004;32(2): 293-302.
29. Sander CS, Chang H, Salzman S, Muller CS, Ekanayake Mudiyanse -lage S, Elsner P&Thiele JJ. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2002;618-25.
30. Peus D & Pittelkow MR. Reactive oxygen species as mediators of UVB-induced mitogen activated protein kinase activation in keratinocytes. *Curr Probl Dermatol*. 2001;114-27.
31. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
32. Kyung Hwan Jung, Hyun Joo Kim. Development of an Agar Diffusion Method to Measure Elastase Inhibition Activity Using Elastin-Congo Red. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 16(8):1320-4.
33. Jeong Sup Song, Kyung Sook Cho, Hyung Kyu Yoon, Hwa Sik Moon, Sung Hak Park. Neutrophil Elastase Causes MUC5AC Mucin Synthesis Via EGF Receptor, ERK and NF-kB Pathways in A549 Cells. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2005;20(4):275-83.
34. 부희정, 함영민, 김정미, 이선주, 현진원, 이남호, 감태(Ecklonia cava)에서 분리한 Phlorotannin 성분의 Elastase 저해활성 및 Hyaluronidase 저해활성. *생약학회지*. 2006;37(2):92-6.
35. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation : implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem Photobiol*. 2001;74(2):283-90.
36. Ying QL, Rinehart AR, Simon SR, Cheronis JC. Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. *Biochem J*. 1991;277(1):521-6.
37. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:143-83.
38. Chikutei K, Oyama TM, Ishida S, Okano Y, Kobayashi M, Matsui H, Horimoto K, Nishimura Y, Ueno SY, Oyama Y.. An anesthetic possessing neuroprotective action against oxidative stress, promotes the process of cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat thymocytes. *Eur J Pharmacol*. 2006;18-23.
39. Verrax J, Cadrobbi J, Marques C, Taper

H, Habraken Y, Piette J, Calderon PB, Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death, *Apoptosis*, 2004;9(2):223-33.

40. Rudolf E, Cervinka M, Depletion of endogenous zinc stores induces oxidative stress and cell death in human melanoma cells, *Acta Medica*, 2004;47(2):91-6.