

연교를 함유한 처방단 추출물들의 항염증 효과

김 미 진[†] · 임 경 란 · 윤 경 섭

(주)사임당화장품 기술연구소

(2009년 10월 6일 접수, 2009년 11월 26일 수정, 2009년 12월 14일 채택)

Anti-inflammatory Effects of Prescription Extracts Containing *Forsythia viridissima* L.

Mi Jin Kim[†], Kyung Ran Im, and Kyung-Sup Yoon

R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., 493-1, Daeheung-dong, Jung-gu, Daejeon 301-803, Korea

(Received October 6, 2009; Revised November 26, 2009; Accepted December 14, 2009)

요약: 본 연구는 연교를 함유한 한방처방단을 이용하여 항염 소재를 개발하여 피부 진정 및 여드름, 아토피용 한방화장품 소재를 개발하고자 하였다. 한방에서 염증 질환 치료에 이용되고 있는 연교를 함유한 처방단을 기성한의서를 바탕으로 조사하였다. 그 중 아토피 증상과 가장 연관이 있을 것으로 판단되는 연교승마탕(連翹升麻湯), 연교음(連翹飲), 청열소독음(淸熱消毒飲), 회춘양격산(回春涼膈散)의 처방단을 추출하여 항산화 및 항염 관련 효능을 알아보았다. 연교 함유 처방단들의 자유라디칼 소거활성과 superoxide dismutase 유사활성을 알아보았으며, lipoxygenase 활성 저해 효과와 대식세포주에서의 LPS 처리에 의해 유도되어지는 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성을 저해하는 효능을 확인하였다. 그 결과 연교 함유 처방단들의 우수한 항산화효과와 lipoxygenase 활성 저해 효과를 확인하였다. 특히, 연교승마탕과 회춘양격산의 NO와 PGE₂의 생성 억제 효과를 확인하였다. 또한, 인체 피부 일차자극시험 결과 무자극으로 나타났다. 이로써, 연교를 함유한 처방단들은 항염 효능을 이용한 피부 자극 완화제로서의 개발 가능성을 확인하였다.

Abstract: *Forsythia fructus* has been shown to have antioxidative, anti-inflammatory, antiviral, antitumor, anti-bacterial, antipyretic and anti-aging activities. This work was carried out to investigate the anti-inflammatory effects of the Korean traditional medicinal prescriptions containing *Forsythia viridissima* extract. The prescriptions containing *Forsythia fructus* were evaluated for antioxidative effects, inhibitory effects on lipoxygenase activity and on LPS-induced NO and PGE₂ production. In human irritation test, they did not show any adverse effect. Based on these results, we suggest that the se prescriptions hold great promise for application as an anti-inflammatory agent for trouble skins such as atopic dermatitis and acne.

Keywords: prescription extracts containing *Forsythia viridissima*, anti-inflammatory effect, antioxidative effect, prostaglandin E₂, nitric oxide

1. 서 론

연교(連翹, *Forsythia* fruit)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 의성개나리(*Forsythia viridissima* Lindl.)의 열매로 신농본초경에 기재되어 있으며, 한방과 민간에서 종창, 임질, 통경, 이뇨, 치질, 결핵, 나력, 음, 해독

등에 널리 사용되고 있다[1]. 연교에 함유되어 있는 성분에는 lignan류(phillygenin, pinosresinol, arctigenin, matairesinol), lignan glucoside류(phillyrin, pinosresinol-D-glucose, arctiin, matairesinoside), flavonoid (rutin) 및 3,4-dihydroxyphenethyl alcohol의 caffeoyl glycoside류(forsythiaside, acteoside, suspensaside 및 hydroxyacteoside) 등이 있다[2]. 연교의 생리활성작용에 대해서는 *in vitro*에서 우수한 항산화 활성[3-5], 항바이러스성

[†] 주 저자 (e-mail: kimmj@saimdang.co.kr)

[6], 항염증효과[7], 항균작용[8], 혈압강화작용[9], 주름개선효과[10] 등의 보고가 있다. 또한 연구는 LPS로 염증을 유도한 Raw 264.7 대식세포에서의 항염증 반응 조절에 대한 보고가 있다[11].

라디칼이 인체에 존재하는 원인은 여러 가지가 있는데, 이 라디칼은 세포를 파괴 또는 피부 진피층의 결합조직을 절단 및 교차결합을 일으키므로 주름형성, 피부암, 세포살상, 류마티스성 관절염, 아토피성 피부염, 여드름 등 여러 문제를 발생시킨다. 라디칼이 생성되는 원인으로서는 백혈구의 식작용, 미토콘드리아에서의 ATP 생산과정 중 전자 전달계, 자외선, 담배, 정상적인 대사 과정, 스트레스, 공해 물질 등을 들 수 있다. 라디칼 증가는 진피의 결합조직인 콜라겐, 엘라스틴, 히알루론산 등을 파괴하여 피부의 일정 부위 침하 현상(주름)을 일으키며, 세포막의 지질 부분을 산화시켜 세포의 파괴 현상을 일으켜 피부염, 여드름, 피부암 등의 질병을 유발한다. 염증은 해로운 주위 환경, 즉 세균과 같은 외부 이물질의 침입과 기계적 손상으로부터 생체를 보호하는 생리적인 반응이다.

염증의 억제제는 크게 phospholipase 저해제, lipoxxygenase 저해제 및 cyclooxygenase (COX) 저해제로 나눌 수 있다. 이 eicosanoids의 생합성 과정 중 염증 반응은 COX에 의해 진행되며 두 종류의 이성효소를 가지고 있는데, 여러 생체 내 장기의 항상성 유지 및 보호 작용들은 COX-1에 의하며, 염증성과 유도성 효과들은 주로 COX-2에 의한 것이다[12]. COX-2에 의해 생성되는 PGE₂ 합성은 비스테로이드성 항염증약에 의해 억제되나 소화성궤양이나 신장 기능 이상 등의 부작용으로 사용이 제한되어, 독성이 낮고 부작용이 없는 새로운 약물이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 기성한의서를 바탕으로 항염증 효과가 있는 연교를 함유한 처방단 중 피부 염증과 관련 있는 처방단 추출물을 이용하여 화장품 원료로의 적용 가능성을 확인하기 위하여 항산화 및 항염 효능을 알아 보았다.

2. 재료 및 실험

2.1. 실험 재료 및 기기

세포주는 Raw 264.7 세포(한국 세포주 은행; Korean cell line bank, Korea)와 normal human fibroblast (CoseedbioPharm Co., LTD.)를 각각 분양 받아 사용하였다. 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone Lab., USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone Lab., USA) 배지로 5 % CO₂, 37 °C

에서 배양하였다. 실험에 사용된 시약들은 dimethyl sulfoxide (DMSO), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), xanthine, xanthine oxidase, lipoxxygenase, linolenic acid, lipopolysaccharide (LPS), 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였고, nitric oxide (NO) detection kit는 iNtRON Biotechnology (Korea), prostaglandin E₂ (PGE₂)와 TNF- α immunoassay kit는 각각 R&D system (USA), eBioscience (USA)에서 구입하였다. 그 외 시약 및 용매는 분석 또는 HPLC 등급을 사용하였다.

2.2. 연교 함유 처방단 추출물 제조

기성한의서 11종을 바탕으로 문헌적으로 검색하여 아토피 및 피부 질환과 가장 연관이 있을 것으로 판단되는 연교 함유 처방단 4종: 연교승마탕(yeongyoseungmatang : YGSMT), 연교음(yeongyoeum : YGE), 청열소독음(cheongyeolsodokeum : CYSDE), 회춘양격산(hoechunyanggyeoksan : HCYKS)을 선정하였다(Table 1). 4가지 연교 함유 처방단을 각 총 50 g을 정량하여 추출기에 넣은 후, 25, 50, 75, 100 % 에탄올(EtOH) 및 정제수를 사용하여 4 h 씩 2회 반복 환류 냉각·추출하였다. 추출여액을 여과지로 여과하고 회전식 증발 건조기로 감압·농축하여 에탄올 및 열수추출물을 얻었다. 이 중 75 % EtOH 수용액 추출물에 증류수 및 10 % EtOH 수용액을 가하여 가용화한 후 동량의 에틸아세테이트(EtOAc), 메틸렌클로라이드(CH₂Cl₂)를 첨가하여 용매분획을 실시하여 분획물을 얻었다.

2.3. 항산화효과

2.3.1. 자유라디칼 소거 효과 측정

자유라디칼 소거 활성 시험은 안정한 자유라디칼 DPPH를 사용하는 방법으로[13] 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액에 시료 각각의 농도를 메탄올에 녹여 혼합하고, 실온에서 10 min 동안 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 메탄올을 넣었으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 하기의 식에 따라 계산하였으며, 그 결과는 자유라디칼을 50 % 소거할 수 있는 농도(IC₅₀)로 나타내었다.

$$\text{소거율(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

Table 1. The Composition of Prescription Containing *Forsythia viridissima*

Prescription	Herbal name	Amount (g)
YGSMT	<i>Forsythia viridissima</i> fruit	11.64
	<i>Cimicifuga dahurica</i> root	8.14
	<i>Pueraria lobata</i> root	8.14
	<i>Platycodon grandiflorum</i> root	8.14
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> root	8.14
	<i>Paeonia japonica</i> root	5.80
YGE	<i>Forsythia viridissima</i> fruit	3.38
	<i>Paeonia lactiflora</i> root	3.33
	<i>Angelica gigas</i> root	3.33
	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> stem	3.33
	<i>Peucedanum japonicum</i> root	3.33
	<i>Arctium lappa</i> fruit	3.33
	<i>Cnidium officinale</i> root	3.33
	<i>Gardenia jasminoides</i> fruit	3.33
	<i>Scutellaria baicalensis</i> root	3.33
	<i>Dianthus chinensis</i> root	3.33
	<i>Akebia quinata</i> stem	3.33
	<i>Rehmannia glutinosa</i> root	3.33
	<i>Trichosanthes kirilowii</i> root	3.33
	<i>Liriope platyphylla</i> root	3.33
<i>Glycyrrhiza glabra</i> root	3.33	
CYSDE	<i>Forsythia viridissima</i> fruit	4.38
	<i>Lonicera japonica</i> flower	8.70
	<i>Paeonia lactiflora</i> root	6.52
	<i>Cnidium officinale</i> root	6.52
	<i>Rehmannia glutinosa</i> root	6.52
	<i>Angelica gigas</i> root	4.34
	<i>Coptis chinensis</i> root	4.34
	<i>Gardenia jasminoides</i> fruit	4.34
<i>Glycyrrhiza glabra</i> root	4.34	
HCYKS	<i>Forsythia viridissima</i> fruit	7.40
	<i>Scutellaria baicalensis</i> root	4.26
	<i>Gardenia jasminoides</i> fruit	4.26
	<i>Platycodon grandiflorum</i> root	4.26
	<i>Coptis chinensis</i> root	4.26
	<i>Mentha arvensis</i> leaf	4.26
	<i>Angelica gigas</i> root	4.26
	<i>Rehmannia glutinosa</i> root	4.26
	<i>Poncirus trifoliata</i> fruit	4.26
	<i>Paeonia lactiflora</i> root	4.26
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> root	4.26

2.3.2. 활성산소 소거 효과 측정

활성산소(superoxide anion) 소거 활성 평가는 Noro 등의 방법을[14] 활용하여 xanthine / xanthine oxidase 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT)의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃, 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, bovine serum albumin (BSA), 0.75 mM NBT 및 시료를 넣고 잘 혼합하여 25 °C에서 10 min 동안 정치하였다. Xanthine oxidase를 넣고 25 °C

에서 20 min 동안 반응시킨 후에 6 mM CuCl₂를 넣어 반응을 정지시키고 UV-Vis spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 정제수를 넣으며, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색보정값을 얻었다. 소거율은 DPPH radical 소거율에 사용된 식에 따라 계산하였으며, 그 결과는 활성산소를 50% 소거할 수 있는 농도(IC₅₀)로 나타내었다.

2.4. 항염 효과

2.4.1. Lipoxygenase 활성 저해 효과

1 mM Linolenic acid, 시료, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 50,000 U/mL lipoxygenase를 넣어 잘 혼합하였다. 25 °C의 수욕조에서 10 min 동안 반응시킨 후, 20 % (w/v) trichloroacetic acid를 넣어 반응을 종결시켰다. 0.6 % (w/v) thiobarbituric acid를 넣은 후, 끓는 물에서 10 min 동안 발색시켰다. 그 후 얼음 물에 2 min 간 냉침시키고, *n*-butanol을 넣고 진탕 혼합하였다. 3,000 rpm으로 15 min 동안 원심분리하여 상층을 취하여 UV-Vis spectrophotometer로 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. Lipoxygenase 활성 저해율은 다음 식에 따라 계산하였다

$$\text{활성저해율}(\%) = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.4.2. 세포 생존력에 미치는 영향

Raw 264.7 세포와 정상 사람 섬유아세포를 각각 96 well plate에 well 당 5 × 10⁴, 2 × 10⁴의 세포가 되도록 분주하여 5 % CO₂, 37 °C 조건하에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 각각 처방단들의 75 % EtOH 수용액 추출물들을 농도별로 무혈청 배지에 희석하여 교체한 후 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 MTT assay를 통해 정상 사람 섬유아세포에서의 생존력을 알아 보았다. 연교를 함유한 처방단 중 연교승마탕과 회춘양격산의 75 % EtOH 수용액 추출물들과 분획물들을 농도별로 무혈청 배지에 희석하여 교체한 후, Raw 264.7 세포의 생존력을 알아보았다.

2.4.3. Total NO 생성 억제 효과

24 well plate에 well 당 5 × 10⁵의 Raw 264.7 세포를 넣고 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 연교 함유 처방단 중 연교승마탕과 회춘양격산의 75 % EtOH 수용액 추출물 및 분획물들을 희석

하여 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 lipopolysaccharide (LPS)를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 24 h 동안 배양 후 배양액을 NO detection kit를 이용하여 NO의 생성 정도를 측정하였다.

2.4.4. PGE₂ 생성 저해 효과

24 well plate에 well 당 5×10^5 의 Raw 264.7 세포를 넣고 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 연교 함유 처방단 중 연교승마탕과 회춘양격산의 75 % EtOH 수용액 추출물 및 분획물들을 희석하여 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 PGE₂ ELISA kit를 이용하여 PGE₂ 생성 정도를 측정하였다.

2.4.5. TNF- α 생성 저해 효과

24 well plate에 well 당 5×10^5 의 Raw 264.7 세포를 넣고 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, 무혈청 배지에 연교 함유 처방단 중 연교승마탕과 회춘양격산의 75 % EtOH 수용액 추출물 및 분획물들을 희석하여 처리한 후 염증 반응 유도 인자인 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 TNF- α ELISA kit를 이용하여 TNF- α 생성 정도를 측정하였다.

2.5. 연교 함유 처방단 추출물의 HPLC 분석

처방단 개개 약재의 주요성분을 조사하여 항염 활성이 알려진 화합물에 대한 분석을 위해 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 행하였다. HPLC 분석 조건은 Agilent Technologies의 1,200 series HPLC, 칼럼은 Luna C₁₈ (0.5 μm , 46 mm LD \times 250 mm), 검출기는 자외부흡광광도계로 측정파장은 280 nm로 하였다. HPLC 분석 조건으로 유속은 0.8 mL/min이며, 이동상은 용매 A (0.1 % acetic acid를 포함한 acetonitrile 수용액)와 용매 B (0.1 % acetic acid를 포함한 수용액)의 기울기용리로 하여 Table 2의 조건에 따라 실시하였다.

2.6. 인체 피부 일차자극시험

연교를 포함한 처방단 추출물에 대한 피부 안전성, 즉 피부반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 한국식품의약품안전청 기준 피부안전성 검사법에 따라 인체 피부 일차자극시험을 실시하였다.

Table 2. Gradient Elution Condition for HPLC Analysis

Time (min)	0.1% Acetic acid in acetonitrile	0.1% Acetic acid in H ₂ O
0	0	100
5	10	90
15	20	80
30	30	70
35	40	60
45	60	40
60	100	0
65	0	100

피험자로 18세 이상으로 선정기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 여성 30명을 선정하였다. 첩포시험은 피험자의 등 부위에 시험물질을 도포하여 48 h와 72 h 후 제거하였으며, 제거 30 min 후와 24 h 후 관찰하였다. 판정은 Frosch & Kligman[15]와 Fragrance Association (CTFA)[16] 가이드라인을 반영한 Table 3의 기준에 따라 시행하였다.

첩포 부착 후 48 h와 72 h에 판독한 결과의 피부반응도를 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{피부반응도}(\%) = \frac{\sum(\text{가중치}) \times (\text{반응인원수})}{\text{최대가중치} \times \text{전체인원수}} \times 100$$

2.7. 자료 분석 및 통계처리

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 SPSS를 이용한 Student's *t*-test로 하였으며 *p*값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 효과

3.1.1. 자유라디칼 소거 효과

연교음 75 % EtOH 수용액 추출물의 DPPH 라디칼 소거 효과가 IC₅₀ 값이 $49.2 \pm 4.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 상대적으로 가장 우수하게 나타났다. 연교음의 열수추출물을 제외한 대부분의 추출물에서 유사하게 양호한 DPPH 라디칼 소거 효과를 보였다(Figure 1a).

연교승마탕과 회춘양격산의 75 % EtOH 수용액 추출물을 EtOAc와 CH₂Cl₂로 분획한 분획물들은 앞선 추출물에

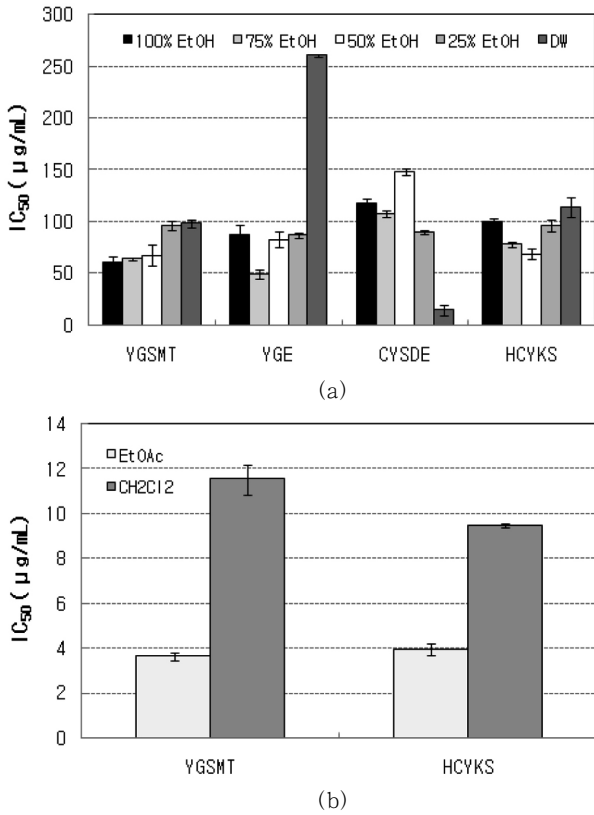


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of extracts (a); and fractionations (b) from prescription containing *Forsythia fructus*.

Table 3. Recording of Patch Test Reactions

Response Grade	Interpretation creatia
+	1 Slight erythema, either spotty or diffuse
++	2 Moderate uniform erythema
+++	3 Intense erythema with edema
++++	4 Intense erythema with edema & vesicles

비해 상대적으로 강한 DPPH 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 회춘양귀산의 EtOAc 및 CH₂Cl₂ 분획물은 IC₅₀ 값이 각각 3.9 ± 0.3, 9.5 ± 0.1 µg/mL로 추출물보다 약 9, 20배 강한 DPPH 라디칼 소거 효과를 보였다(Figure 1b).

3.1.2. 활성산소 소거 효과

연교음 75 % EtOH 수용액 추출물의 활성산소 소거 효과는 IC₅₀ 값이 516.4 ± 10.5 µg/mL로 상대적으로 가장 우수하게 나타났다. 연교음의 열수추출물을 제외한 연교음 추출물들이 전반적으로 우수한 활성산소 소거 효과를 보였으며, 회춘양귀산과 연교승마탕 추출물에서도

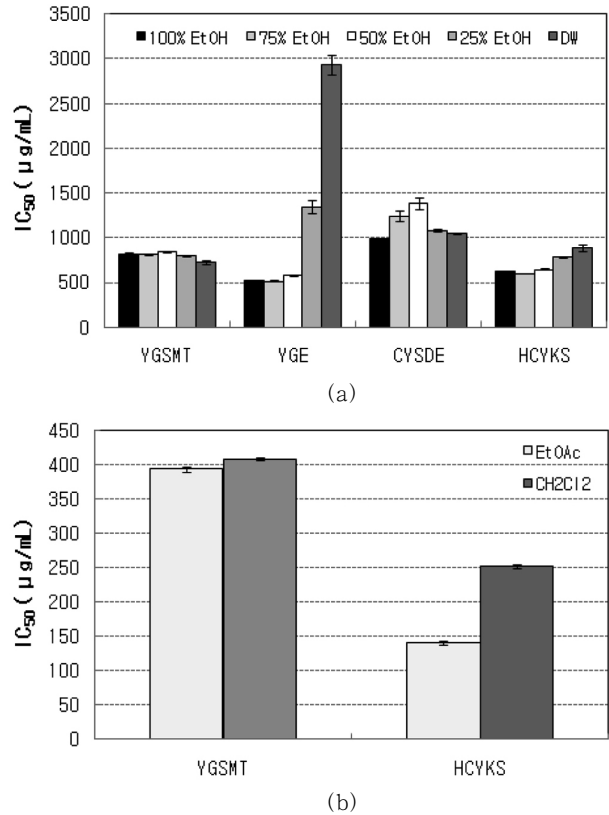


Figure 2. SOD-like activity of extracts (a); and fractionations (b) from prescription containing *Forsythia fructus*.

양호한 활성산소 소거 효과를 볼 수 있었다(Figure 2a).

연교승마탕과 회춘양귀산의 75 % EtOH 수용액 추출물을 EtOAc와 CH₂Cl₂로 분획한 분획물들은 앞선 추출물에 비해 상대적으로 강한 활성산소 소거 효과를 나타내었다. 회춘양귀산의 EtOAc 및 CH₂Cl₂ 분획물은 IC₅₀ 값이 각각 140.7 ± 2.4, 252.6 ± 2.6 µg/mL로 추출물보다 약 2 ~ 4배 강한 활성산소 소거 효과를 보였다(Figure 2b).

3.2. 항염 효과

3.2.1. Lipoxygenase 활성 저해 효과

각각 동량의 추출물에 대한 lipoxygenase 활성 저해 효과를 알아본 결과, 연교승마탕 75 % EtOH 수용액 추출물의 lipoxygenase 활성 저해 효과가 65.9 ± 5.8 %로 상대적으로 가장 우수하였다. 연교승마탕 100% EtOH 추출물, 청열소독음 75 % EtOH 수용액 추출물, 회춘양귀산 100 % EtOH 추출물에서 각각 57.1 ± 4.7, 54.6 ± 3.9, 52.8 ± 5.0 %로 lipoxygenase 활성 저해 효과를 나타내었다. 반면, 연교음 75 % EtOH 수용액 추출물과 청열소독

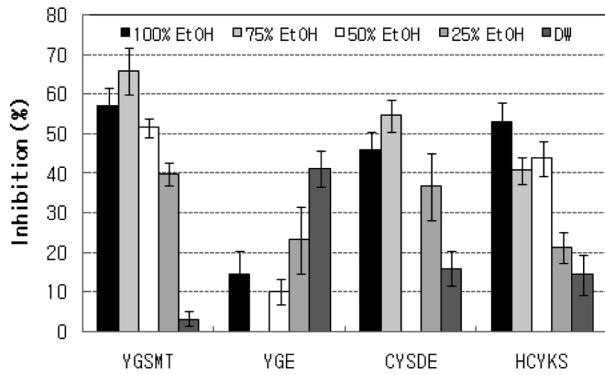


Figure 3. Inhibitory effect of lipoxygenase activity from prescription extracts containing *Forsythia fructus*.

음 50 % EtOH 수용액 추출물에서는 lipoxygenase 활성 저해 효과가 나타나지 않았다(Figure 3).

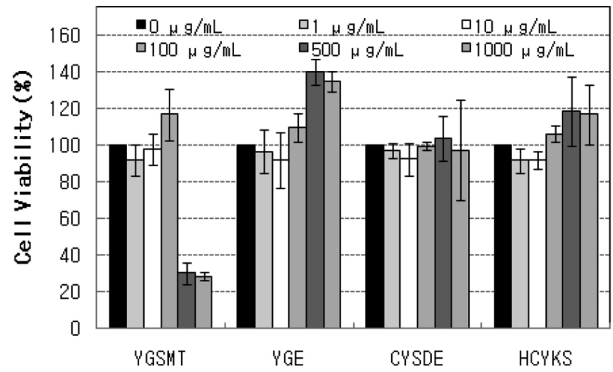
3.2.2. 세포 독성

연교를 포함한 처방단들이 화장품 소재로 사용되었을 시 안전한 소재임을 평가하기 위하여 섬유아세포의 생존력을 평가하였다. 항산화 효과와 lipoxygenase 활성 저해 효과에서 양호하게 평가되었던 각각 처방단들의 75 % EtOH 수용액 추출물에 대해 알아보았다. 4종의 처방단 모두에서 50 µg/mL의 농도까지 세포생존력이 약 90 % 이상으로 나타났으며, 연교음과 회춘양격산의 75 % EtOH 수용액 추출물에서는 세포증식 효과도 볼 수 있었다(Figure 4a).

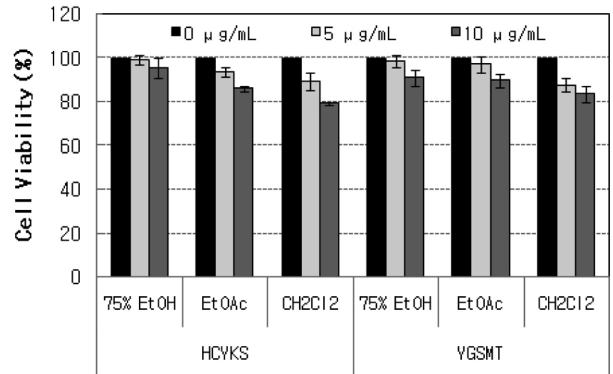
4종의 처방단 중 항산화 효과와 lipoxygenase 활성 저해 효과에서 상대적으로 우수하게 평가된 연교승마탕과 회춘양격산의 75 % EtOH 수용액 추출물과 분획물의 Raw 264.7 세포에 대한 생존력을 평가한 결과 10 µg/mL 농도까지 약 80 %의 생존력을 나타내었다. 이후 연교를 포함한 처방단의 항염 효과 평가는 1 ~ 10 µg/mL의 범위 내에서 실시하였다(Figure 4b).

3.2.3. Total NO 생성 억제 효과

4종의 처방단 중 연교처방단과 회춘양격산 추출물의 항염 효능을 평가하기 위하여 Raw 264.7 세포에 LPS를 처리하여 주고 세포배양 배지 내에 존재하는 NO의 생성량을 NO detection kit로 측정하였다. LPS 처리시 NO 생성량이 약 10배 증가하는 것을 확인하였다. 연교승마탕[17]과 회춘양격산의 EtOAc 및 CH₂Cl₂ 분획물에서 유의성 있게 NO 생성이 감소하였으며, 회춘양격산 CH₂Cl₂ 분획물은 10 µg/mL의 농도에서 33.7 ± 3.1 %의 NO 생성 저해 효과를 나타내었다(Figure 5). Nitric oxide (NO)



(a)



(b)

Figure 4. Cell viability of from prescription extracts containing *Forsythia fructus* in normal human dermal fibroblast (a); and Raw 264.7 (b).

는 무기 저분자 라디칼로서 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압 조절 기능, 암세포에 대한 면역 기능 등의 역할이 알려져 있다. 그러나 과도한 NO는 오히려 자가면역질환이나 만성염증의 원인이 되기도 한다. 염증과정의 중요한 매개체로 작용하는 NO 생성의 저해함으로써 처방단 추출물들의 항염증 효과를 알아 볼 수 있었다.

3.2.4. PGE₂ 생성 저해 효과

연교승마탕과 회춘양격산 추출물의 NO 생성 저해능을 확인하고 또 다른 염증 유발 매개체인 PGE₂의 생성 억제 효능을 평가하였다. LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포에서 PGE₂의 생합성이 급격히 증가함을 확인하였다. 연교승마탕과 회춘양격산 추출물의 효능을 확인한 결과 농도 의존적으로 PGE₂ 생성이 억제됨을 볼 수 있었다. 회춘양격산 CH₂Cl₂ 분획물은 10 µg/mL의 농도에서 약 96.5 ± 0.3 % PGE₂ 생성 억제 효과를 나타냄으로써, 앞선 연구의 연교승마탕[17]에 비해 상대적으로 유의성 있는 양호한 결과를 보였다(Figure 6). 과량의 NO는

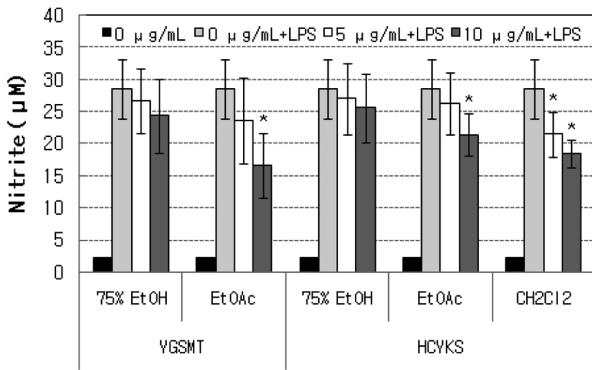


Figure 5. Inhibitory effects of by YGSMT and HCVKS extracts on NO release from Raw 264.7 cells induced by LPS. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS alone treated group.

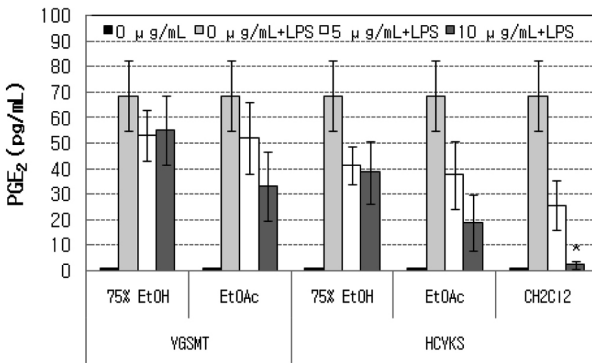


Figure 6. Inhibitory effects of by YGSMT and HCVKS extracts on PGE₂ release from Raw 264.7 cells induced by LPS. * $p < 0.05$ indicates a significant difference from the LPS alone treated group.

cyclooxygenase (COX)의 활성을 촉진시켜 prostaglandin 등의 합성을 유도하여 염증반응을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 처방단 추출물의 PGE₂ 생성 저해는 NO 생성을 저해함으로써 COX의 활성을 억제시킨 결과로 사료되어지며, COX의 발현 및 활성에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

3.2.5. TNF- α 생성 저해 효과

Raw 264.7 세포에서 LPS로 염증반응을 자극하여 유도시킨 TNF- α 의 생성량에 미치는 연교승마탕과 회춘양격산 추출물의 영향에 대해 알아보았다. 회춘양격산 추출물은 TNF- α 생성에 거의 영향을 주지 않았다. 반면, 연교승마탕의 EtOAc 및 CH₂Cl₂ 분획물에서 TNF- α 생성 효과가 나타났다(Figure 7)[17].

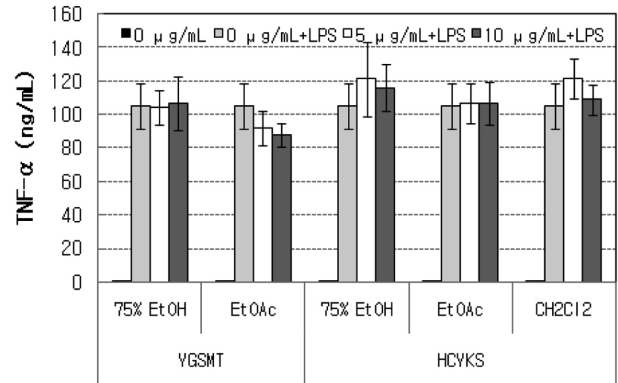


Figure 7. Inhibitory effects of by YGSMT and HCVKS extracts on TNF- α release from Raw 264.7 cells induced by LPS.

3.3. 연교 함유 처방단 추출물의 HPLC 분석

연교승마탕과 회춘양격산 처방에 공통으로 함유된 연교, 작약, 감초, 길경의 주요성분 중 항염 작용을 하는 glycyrrhizin, paeoniflorin, baicalin, berberrin와 주 약제 연교의 성분인 matairesinol, matairesinoside, arctigenin, arctiin, forsythiaside, acetoside의 함량을 측정하였다. Table 2의 실험 조건에서 측정결과 glycyrrhizin, paeoniflorin, forsythiaside, acetoside는 함량이 측정되지 않았다. 각각의 추출물들은 75% EtOH 수용액 추출물에 비해 분획물에서 성분들의 함량이 높게 측정되었다. 연교승마탕의 CH₂Cl₂ 분획물에서는 arctigenin과 matairesinol을 6% 이상 함유하고 있었다. 회춘양격산의 분획물은 baicalin과 berberrin 성분도 함유하고 있었다(Table 4).

3.4. 인체 피부 일차자극시험

피험자 30명에 대하여 실시한 인체 피부 일차자극시험 결과에 근거하여 계산된 피부 반응도를 Table 5에 나타내었다. 시험 결과 연교를 포함한 처방단 추출물들에 대한 피부반응도는 판정기준에 의하여 무자극으로 안전한 소재임을 알 수 있었다.

4. 결 론

연교의 항산화 활성[3-5], 항염증 효과[7] 및 주름개선 효과[10]에 대한 생리활성은 알려진 바 있다. 이에 기성하의서 11종을 바탕으로 연교를 포함한 처방단 중 피부염과 관련 있는 4종의 처방단을 선정하여 피부 자극 완화를 위한 화장품 소재로서의 가능성에 대해 평가하였다. 연교를 포함한 처방단 추출물들 대부분에서 항산화 효과가 있음을 확인하였으며, 연교승마탕, 청열소독음,

Table 4. Quantity of Major Compounds in Prescription Extracts Containing *Forsythia fructus* (YGSMT and HCYKS)

Extracts	Quantity of indicator compounds (%)					
	Arctiin	Arctigenin	Matairesinol	Baicalin	Berberin	
YGSMT	75% EtOH	0.984	0.085	0.660	-	-
	EtOAc	2.801	4.260	5.178	-	-
	CH ₂ Cl ₂	3.484	6.757	6.975	-	-
HCYKS	75% EtOH	0.747	0.340	0.394	0.559	0.245
	EtOAc	3.122	3.192	3.751	1.085	-
	CH ₂ Cl ₂	2.280	3.104	4.541	0.991	2.049

Table 5. Results of Human Skin Primary Irritation Test

Extracts	No. of responder	48 h			72 h			Mean score		
		+	++	+++	+	++	+++	48 h	72 h	Mean
YGSMT	100% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	75% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	50% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	25% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	Deionized water	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	EtOAc	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	CH ₂ Cl ₂	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
YGE	100% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	75% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	50% EtOH	1	-	-	-	1	-	0.0	0.8	0.4
	25% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	Deionized water	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	EtOAc	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	CH ₂ Cl ₂	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
CYSDE	100% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	75% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	50% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	25% EtOH	1	-	-	-	1	-	0.0	0.8	0.4
	Deionized water	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	EtOAc	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	CH ₂ Cl ₂	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
HCYKS	100% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	75% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	50% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	25% EtOH	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	Deionized water	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	EtOAc	1	-	-	-	1	-	0.0	0.8	0.4
	CH ₂ Cl ₂	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
Control	Deionized water	0	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0
	1,3-BG	2	2	-	-	-	-	1.6	0.0	0.8

회춘양격산 추출물에서 lipoxygenase 저해 효과를 알 수 있었다. Raw 264.7 세포를 이용한 항염 효능을 평가한 결과 연교승마탕 추출물의 우수한 NO 생성 저해 효과와 회춘양격산 추출물의 강한 PGE₂ 생성 저해 효과를 확인하였다. 또한, 인체 피부 일차자극 시험 결과 처방단 추출물들은 무자극으로 판정되었다. 따라서 이와 같은 연교를 함유한 처방단 추출물들의 항산화 및 항염 효능을 이용하여 피부 자극 완화를 위한 소재로 이용될 수 있음을 확인하였으며, 우수한 항산화 효과와 섬유아세포 증식 효과를 보인 회춘양격산은 피부 노화 방지를 위한 소재로의 이용도 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2007년 중소기업청 기술혁신개발사업의 연구비 일부에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. T. J. Kim, Korean resources plants, *Seoul National University Pub.*, 262 (1991).
2. E. B. Lee and H. J. Keum, Pharmacological studies on *Forsythia fructus*, *Kor. J. Pharmacogen.*, **19**, 262 (1998).
3. Y. S. Rim, Y. M. Park, M. S. Park, K. Y. Kim, M. J. Kim, and Y. H. Choi, Screening of antioxidant and antimicrobial activity in native plants, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **8**, 342 (2000).
4. D. K. Lim, U. Choi, and D. H. Shin, Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **8**, 342 (2000).
5. G. R. Schinella, H. A. Tournier, J. M. Prieto, D. Moduiovich, and J. L. Rios, Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts, *Life Sci.*, **70**, 1023 (2002).
6. W. Mazur, T. Fotsis, K. Wahala, S. Ojala, A. Salakka, and H. Adlercreutz, Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol and lignans in food samples, *Anal. Biochem.*, **233**, 169 (1996).
7. Y. Ozaki, J. Rui, and Y. T. Tang, Antiinflammatory effect of *Forsythia suspensa* V (AHL) and its active principle, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 365 (2000).
8. Z. X. Li, X. H. Wang, J. H. Zhao, J. F. Yang, and X. Wang, Investigation on antibacterial activity of *Forsythia suspense* Vahl *in vitro* with Mueller-Hinton agar, *China Journal of Chinese Materia Medica*, **25**, 742 (2000).
9. E. B. Lee and H. J. Keum, Pharmacological studies on *Forsythia fructus*, *Kor. J. Pharmacogen.*, **19**, 262 (1988).
10. M. J. Kim, J. Y. Kim, T. K. Jung, S. W. Choi, and K.-S. Yoon, Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**(6), 444 (2006).
11. B. J. You, Ph. D. Dissertation, *Semyung Univ.* (2007).
12. B. D. Golden and S. B. Abramson, Selective cyclooxygenase-2 inhibitor, *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, **25**(2), 359 (1999).
13. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
14. T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984 (1983).
15. P. J. Frosch and A. M. Kligman, The soap chamber test. A new method for assessing the irritancy of soaps, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1**(1), 35 (1979).
16. M. J. Kim, K. R. Im, and K.-S. Yoon, Anti-inflammatory effects of YeongyoSeungma-tang, *J. Ethnopharmacol.*, **126**(3), 377 (2009).