

石斛, 石榴의 항산화, 항염증, 주름, 미백에 미치는 영향

황보민¹⁾ · 노석선²⁾ · 서형식¹⁾

¹⁾ 부산대학교 한의학전문대학원 한방안이비인후피부과교실

²⁾ 대전대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과교실

Effects of *Dendrobii herba* and *Punica granatum* Extract on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening

Min Hwang-bo · Seok-Sun Roh · Hyeong-Sik Seo

Objective : The aim of this study is to determine the effects of *Dendrobii herba* extract and *Punica granatum* extract on skin disease and skin beauty.

Methods : To investigate in vitro anti-oxidant activity assay, ethanol extracts of medicinal plants tested by DPPH radical, xanthine oxidase activity. In the next experiment, to investigate anti-inflammatory activity assay, examined by relations in NO synthesis, IL-1 β , IL-6, TNF- α , NF- κ B, COX-2, MAP kinase.

To study Skin wrinkle formation effect, we were examined by tyrosinase activities, melanin synthesis in MNT-1 cell.

- Results** : 1. In an anti-oxidant test, *Dendrobii* and *Punica granatum* extract showed high radical scavenging activity.
2. In an anti-inflammatory test, *Dendrobii herba* and *Punica granatum* extract weakly inhibited the lipopolysaccharide(LPS)-induced nitric oxide(NO) release from RAW 246.7 macrophage cells. *Dendrobii herba* and *Punica granatum* extract also inhibited LPS-induced IL-1 β and COX-2 expressions. The inhibitory effect of *Dendrobii herba* and *Punica granatum* extract on macrophage activation were via the inhibition of NF- κ B, evidenced by transient transfection assay. however, *Dendrobii herba* and *Punica granatum* extract did not have any effects about activation of Jun-N-terminal kinase(JNK) and inhibition of p38 MAP kinase in RAW 264.7 cells.
3. In the skin wrinkle formation assay, *Dendrobii herba* and *Punica granatum* extract weakly inhibited collagenase and elastase, however it was not statistically significant.
4. In the skin whitening assay, *Dendrobii herba* and *Punica granatum* extract weakly inhibited tyrosinase activity, however, it was not statistically significant. They did not have any effect on melanin synthesis, indicating that they could not be applicable for skin whitening.

Conclusion : Dendrobii herba extract and Punica granatum extract may play a significant role in skin disease and skin beauty.

Key words : *endrobii herba* extract, *Punica granatum* extract, skin disease, skin beauty, anti-inflammatory, collagenase, elastase, tyrosinase, MAP kinase

1. 서 론

피부와 점막은 외부로부터 유입되거나 또는 내부에서 생겨난 유해한 인자들로부터 개체를 보호하는 임무를 수행하고 있으며, 특정 원인에 의해 피부 방어체계가 붕괴되면 여러 피부질환이 유발되는 것으로 알려져 있다¹⁾. 즉, 피부와 점막은 가장 외부에 존재하며 다양한 외부의 변화에 반응하고 내부의 변화를 직접적으로 밖으로 드러내 보이는 기관이다.

인체 내에서 활성산소는 정상세포의 대사과정 중의 여러 산화반응의 부산물로 만들어지며, 여러 긍정적인 역할과 더불어 생체조직을 공격해 각종 염증질환과 암, 간장장애, 동맥경화, 위염 등 많은 질병을 일으키는 원인의 하나로 알려져 있으며, 궁극적으로는 노화의 한 원인인 것으로 알려져 있다²⁾.

활성산소가 원인이 되는 여러 질환 중 염증성 반응은 피부 영역에서 뿐 아니라 암과 Alzheimer 씨 병³⁾에 이르기까지 많은 질병이 연루되어 있다. 최근에는 고령화와 식생활의 변화에 따라 급성 및 만성 염증성질환이 증가하고 있으며 이에 따라 항염증성 물질에 대한 관심이 높아지고 있다. 염증반응에 의한 腫瘡 등의 양상과 비슷한 내용을 韓醫學에서는 주로 癰疽의 분야에서 구체적으로 다루고 있다. 염증반응에 의한 腫瘡 등의 양상과 비슷한 내용을 韓醫學에서는 주로 瘡瘍의 범주에서 볼

수 있다. 廣義의 瘡瘍은 체표의 淺部에 유형의 병증으로 나타나는 모든 외과질환의 총칭이며 狹義의 瘡瘍은 감염성 질환으로 발생하는 염증성 병변으로 해석된다⁴⁾.

피부는 또한 미용의 핵심으로 인식되고 있는데¹⁾, 최근 피부 미용의 연구로는 피부의 주름 생성억제, 피부 흑화 방지, 그리고 피지분비 조절기능과 탈모 억제기능 등을 들 수 있다⁵⁻¹⁰⁾.

미백효과에 대한 연구는 tyrosinase 활성억제, DOPA 산화억제, 각질층 제거 촉진 및 자외선 차단 등에 대해서 이루어지고 있는데, 미백소재의 미백효과를 검증하기 위해서는 멜라닌 형성을 억제하는지 여부가 중요하다¹¹⁾.

나이가 들면서 자연적으로 발생하는 주름에 대해 최근에는 자외선에 의해 피부 내 콜라겐의 양의 감소와 엘라스틴의 변성이 유발되는 광노화에 의한 주름에 더 많은 초점이 모아지고 있다¹²⁾. 따라서 지금까지의 주름개선 연구는 Collagenase과 elastase의 작용을 억제하는 물질개발이 중심이 되어왔다.

한의학에서 피부의 상태는 외부 요인에 의한 질병 뿐 만 아니라 인체의 각종 내재 요인에 의해 영향을 받는 것으로 보고 있다. 특히 피부와 관련된 色澤의 변화는 五臟의 氣血 盛衰를 표현하는 중요한 인자로 인식되어 왔다. 또한 피부 미용분야는 인체의 노화와 밀접한 관련을 가지고 있으며 이러한 노화도 한의학적 측면에서 보면 五臟의 氣血 盛衰의 영향을 받게 된다¹³⁾.

石斛은 난초과(蘭科 ; Orchidaceae)에 속한 *Dendrobium nobile* Lindl. 또는 기타 동속근연식물의 지상부를 건조한 것으로 性味는 甘寒하며 益

교신저자 : 황보민, 경남 양산시 물금읍 범여리 부산대학교 한방병원
한방안이비인후피부과교실(Tel : 055-360-5633,
Fax : 055-360-5519, E-mail : dubo97@hanmail.net)
• 접수 2010/10/28 • 수정 2010/11/24 • 채택 2010/12/09

胃生津, 滋陰清熱하는 효능이 있어 熱病傷津, 口乾煩渴, 病後虛熱, 目暗不明 등의 증상에 사용할 수 있다. 石榴는 석류과(石榴科;Punicaceae) 석류나무 *Punica granatum* L.의 성숙한 과실을 건조한 것으로 石榴皮는 性味는 溫酸澁하며 收斂澁腸시키는 효능이 있어 久瀉久痢證에 적용한다¹⁴⁾.

최근 연구동향을 살펴보면 石斛의 골다공증, 항산화 작용 등에 대한 연구 결과가 발표된 바 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 석류는 국내외에서 다양한 연구들이 발표되고 있는데 만성질환에 대한 예방효과, 항산화작용, 항노화작용, 항균작용, 면역증진, 체지방 감소 효과 등이 보고되고 있다¹⁸⁻²²⁾. 그렇지만, 石斛과 石榴의 항염, 항산화 이외에 주름, 미백에 대해 연구한 예가 부족한 실정이다.

이에 저자는 실험에 사용한 한약재 2종이 피부에 어떤 생물화화학적 기능을 하는 지를 규명하기 위해 항산화력, 항염을 비롯하여 피부 주름발생 억제, 피부 미백과 관련된 효소 및 멜라닌 세포에 미치는 영향 및 세포독성 등을 관찰한 결과, 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 실험재료

1) 약물 및 검액의 제조

본 실험에 사용된 石斛과 石榴는 우리물산(대전)에서 구입하였다(Table 1). 실험에 사용된 모든 약재는 1.2kg의 분량을 한약재분쇄기를 이용해 100-200메쉬 크기로 분쇄시킨 후 ethanol을 약 1,200ml(약 1:10 weight/volume)을 가하여 5일간 냉침하여 추출하였다. 추출한 약재는 Whatman filter paper No. 4를 사용해 고형분을 제거한 후, rotary evaporator를 이용해 감압 농축시키고, 70% ethanol을 이용해 5% 용액으로 제조한 후

희석해 실험에 사용하였다.

Table 1. Medicinal plants tested

한약명	학 명	원산지
石斛	<i>Dendrobium nobile</i> Lindley	중 국
石榴	<i>Punica granatum</i> Linne	중 국

2) 시약, 초자 및 실험기기

세포배양을 이용한 실험에는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum, Antibiotic-Antimycotic (Penicillin G Sodium, Streptomycin sulfate, Amphotericin B), Trypsin-EDTA (이상 Gibco BRL, USA), Sodium Bicarbonate, Lipopolysaccharide, GRIESS (이상 Sigma, USA), 등을 사용하였으며, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction 시약 으로는 M-MLV Reverse Transcriptase, Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs), Random Hexamer (이상 Promega, USA), HiPi Thermostable DNA Polymerase, 100bp DNA Ladder Marker (이상 엘피스바이오텍, 한국), Easy blue(Intron, 한국), Chloroform, Isopropanol (이상 Sigma, USA) 등을 사용하였다. 항산화실험, 효소 실험 등의 시약으로는 1,1-diphenyl- 2-picryl-hydrazyl(DPPH), Elastase, Suc-(Ala)3-PNA, Mushroom tyrosinase, 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, synthetic melanin, L-DOPA, dimethyl sulfoxide, phenylmethylsulfonyl fluoride, Xanthine, Tween 80, arachidonic acid, Tris, Sodium chloride, Calcium chloride, Zinc chloride, Brij35, trichloroacetic acid (이상 Sigma, USA), Collagenase와 DABYCL-γ-Abu-Pro- Gln-Gly-Leu-Glu(EDANS)-Ala-Lys-NH2 (Bachem, Swiss),

Xanthine oxidase (Roche, Deutschland), Lipofectamin(Invitrogen, 한국), Luciferase Assay buffer (Promega, USA), COX-2 ELISA Kit (Amersham, USA), TNF- α ELISA Kit (Biosource, USA) 등을 사용하였다.

본 실험에 사용한 초자로는 세포배양실험을 위해 Tissue culture dish (30mm, 60mm, 100mm), Tissue culture plate (6well, 12well, 24well), Tissue culture flask (이상 Falcon, USA) 등을 사용하였으며, RT-PCR에는 MicroAmp Reaction Tube, MicroAmp Caps (Applied Biosystems, USA), Eppendorf tube (Sarstedt, Germany)을 사용하였다.

실험기기로는 GeneAmp PCR System, Luminometer, Fluorimeter (이상 Perkin Elmer, USA), Spectrophotometer, Refrigerated High Speed Centrifuge, pH Meter (Beckman, USA), ELISA Reader (Bio-TeK, USA), Polaroid camera (Polaroid, U.K.), Microcentrifuge, Refrigerated Microcentrifuge (이상 한일과학, 한국), Electrophoresis System (Hoefer, USA), Transilluminator (Vilber Lourmat, France), Inverted Microscope, Camera (이상 Nikon, Japan), Clean Bench (수공양행, 한국), CO2 Incubator (Forma 3546, USA), Rotary Evaporator System (BCHI, Swetzerland), Incubator (제이오텍, 한국) 등을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 항산화력 평가

① Free radical scavenging activity (DPPH 법)

무수에탄올로 0.01과 0.001%로 희석한 실험물질 50 μ l에 ethanol로 녹인 4 \times 10⁻⁴M 1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl(DPPH) solution (518nm에서의 흡광도: 0.94-0.98) 450 μ l를 가한 후, 518nm에서 10

분간 흡광도를 측정하였다²³⁾. 양성대조군으로는 free radical scavenging 효과가 우수한 물질로 잘 알려진 vitamin E를 이용하였다. 항산화력(free radical scavenging activity)은 아래의 식을 이용하였으며, 모든 실험은 triplicate로 실시하였다.

$$\text{Radical Scavenging Activity (\%)} = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100}{Abs_{control}} \right\}$$

② Xanthine oxidase activity assay

희석액(ethanol 1%, Tween 80 0.1%)으로 최종 농도가 10, 100 μ g/ml가 되도록 희석한 시료 500 μ l에 60mM phosphate buffer(PH7.5) 1.3ml과 xanthine oxidase enzyme solution을 가하고 30°C에서 10분간 incubation하였다. 여기에 substrate solution(xanthine) 1.5ml을 가한 후 spectrophotometer를 활용해 295nm 흡광도에서 10분 동안 측정하였다²⁴⁾. Xanthine oxidase 활성 억제력은 아래의 식을 활용해 계산하였다.

$$\text{inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\Delta A / \text{min}_{test}}{\Delta A / \text{min}_{blank}} \right) \times 100$$

2) 항염효과 평가

① Nitric oxide (NO) 형성 억제력 평가

RAW264.7 세포주 (ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS 법으로 nitric oxide 형성억제력 실험을 실시하였다. 10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW264.7 cell을 24 well plate에 2 \times 10⁴ cells/ml의 농도로 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS free media로 12시간 starvation시킨 후, phenol red가 첨가되지 않은 배지에 희석한 실험물질을 100 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도로 가해 15

분간 처리하였다. Lipopolysaccharide를 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 가하여 16시간 배양한 후, 상층액을 100 μl 씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100 μl 씩 가해 상온에서 15분간 반응시키고, ELISA reader로 540nm에서의 흡광도를 측정하였다^{25,26}.

② Interleukin-1 β 와 interleukin-6 유전자 발현 억제력 평가를 위한 역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction : RT-PCR)

Interleukin-1 β 와 interleukin-6의 유전자 발현을 평가하기 위해 RT-PCR를 수행 하였다. Monolayer를 형성한 RAW264.7 세포를 배양용기에서 떼어내고, 1 \times 10⁵ cells/ml의 농도로 희석시킨 후 12well dish에 넣어 90% 정도까지 성장할 때까지 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 세포배양액을 교체하고, ethanol로 희석한 실험물질을 dish당 100ppm과 10ppm의 농도로 가하여 16시간동안 처리하였다. 이때 대조군으로는 ethanol을 사용하였다.

㉞ Total RNA 분리

RAW264.7 세포로부터 total RNA를 분리하는 과정은 guanidinium thiocyanate-phenol chloroform법에 준하여 실시하였다²⁷. 즉 시료를 처리한 배지를 제거한 후 Easy blue 1ml을 가하여 녹인 후 micropipet으로 잘 섞고 eppendorf tube로 옮겼다.

Chloroform을 200 μl 가하여 1분간 세차게 흔든 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 방치하고 원심분리(14,000rpm, 15분, 4 $^{\circ}\text{C}$)하고, 상층액 400 μl 를 취하여 새 eppendorf tube에 옮겼다. Isopropanol을 동량을 가하여 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 방치시킨 후 원심분리 (14,000rpm, 15분, 4 $^{\circ}\text{C}$)하여 상층액을 제거하고 침전물을 cold 80% ethanol로 1회 세척한 후, DEPC처리된 이온교환수 30 μl 을 가하여 녹였다. 이중 일부를 취하여 spectrophotometer로 260과 280nm에서 흡광도를 측정해 total RNA를 정량하였다.

㉟ RT-PCR

분리한 total RNA 4 μg 를 eppendorf tube에 넣고 random hexamer (10pmol/20 μl)를 첨가하여 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 여기에 반응액 (1 \times buffer, 100uM dNTPs, 200unit RTase)을 가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후, 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 처리하여 reverse transcription 반응을 종료시켰다.

Polymerase chain reaction은 상기한 RT 반응액을 PCR tube에 가하여 PCR machine에서 94 $^{\circ}\text{C}$ /30초, 58 $^{\circ}\text{C}$ /1분, 72 $^{\circ}\text{C}$ /1분의 조건으로 각각 24회 증폭하였다. 본 실험에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 2와 같다. RT-PCR 결과는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, UV illuminator 위에서 polaroid

Table 2. Nucleotide sequence of the primers and expected size of PCR products

Primer		Sequence	Size
IL-1 β	Sense	5'-tct ttg aag ttg acg gac cc-3'	486
	Anti-sense	5'-agg cca cag gta ttt tgt cg-3'	
IL-6	Sense	5'-gga aat tgg ggt agg aag ga-3'	421
	Anti-sense	5'-ccg gag agg aga ctt cac ag-3'	
GAPDH	Sense	5'-acc aca gtc cat gcc atc ac-3'	451
	Anti-sense	5'-tcc acc acc ctg ttg ctg ta-3'	

camera를 이용해 사진 촬영하였으며, 그 결과는 densitometer를 이용해 판정하였다.

③ TNF- α assay

10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW264.7 cell을 24 well plate에 2×10^4 cells/ml의 농도로 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS free DMEM media로 12시간 starvation시킨 후, phenol red가 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 실험물질을 10 μ g/ml의 농도로 가해 15분간 처리하였다. Lipopolysaccharide를 0.5 μ g/ml의 농도로 가하여 16시간 배양한 후, 상층액을 취해 ELISA Kit를 이용해 TNF- α 를 정량하였다.

④ Cyclooxygenase-2(COX-2) 활성억제력

96 well plate에 RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 seeding한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양하여 부착시킨 후 배양액을 제거하였다. PBS로 세척 후 3% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 well당 200 μ l씩 첨가하고, arachidonic acid를 가하여 18시간 배양하였다. 대식세포를 활성화시키는 lipopolysaccharide와 한약 재추출물을 10 μ g/ml의 농도로 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 18시간 배양한 후, 상층액을 취해 ELISA Kit를 이용해 prostaglandin E2를 정량하였다²⁸⁾.

⑤ NF- κ B luciferase assay

10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW264.7 cell을 24 well plate에 5×10^4 cells/ml의 농도로 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS free DMEM media로 12시간 starvation시킨 후 lipofectamin 1 μ l와 NF- κ B reporter gene 2 μ g/well을 가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 16시간동안 transfection 시키고, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 으로 배지를 교환하여 8시간 다시 배양하였다. 시료를 30분간 전 처리하고 lipopolysaccharide

가 500ng/ml의 농도가 되도록 처리하여 24시간 incubation한 후 Luciferase Assay buffer를 이용하여 세포를 용해시키고 luminometer를 이용해 발광 정도를 측정하였다²⁹⁾.

⑥ MAP kinase assay

10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW264.7 cell을 6 well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 seeding한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 16시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS free DMEM으로 8시간 starvation시킨 후 실험약제를 함유한 새로운 FBS free DMEM으로 교체시켜 주었다. 15분 후 LPS (100 μ g/ml)을 well당 2.5 μ l씩 가하고 20분간 배양하고, PBS로 washing한 후 Proprep을 well당 80 μ l씩 가하여 lysis시킨 다음 eppendorf tube로 옮겨 원심분리(12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 20min)하였다. 50 μ g을 취해 SDS-PAGE 전기영동을 실시한 후 methanol로 activation시킨 PVDF membrane로 transfer시킨 후, 3% skim milk로 30분간 처리하고 각각의 total antibody와 phospho antibody에서 2시간동안 반응시켰다. 0.1% Tween 20 - PBS을 이용해 washing하고 rabbit Poly IgG에 1시간 반응시킨 후, 다시 washing하고 Western을 이용해 실험결과를 관찰하였다³⁰⁾.

3) 피부 주름억제에 미치는 영향 평가

① Collagenase 활성억제력 평가

실험시료를 DMSO로 녹인 후 collagenase assay buffer (150mM Tris, 10mM NaCl, 5mM CaCl₂, 1mM ZnCl₂, 0.01% Brij35)를 이용해 실험하고자 하는 농도로 희석하였다. Test solution 5 μ l, buffer 125, 500uM 기질(DABYCL- γ -Abu-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu(EDANS)-Ala-Lys-NH₂) 5 μ l, 효소(125ppm)을 혼합하여 5분간 잘 섞고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 0.5M EDTA 10 μ l를 넣어 반응을 종료시키고 Fluorimeter(340nm/520nm)에서 결

과를 측정하였다. 반응 억제율은 아래의 식을 활용하여 계산 하였다³¹⁾.

$$\text{반응억제율}(\%) = \left[\frac{(\text{기질} + \text{효소}) - (\text{기질} + \text{효소} + \text{시료})}{(\text{기질} + \text{효소}) - (\text{기질})} \right] \times 100$$

② Elastase 활성억제력 평가

실험시료는 무수에탄올을 이용해 실험할 농도로 희석하였다. 준비된 test solution 50 μ l에 0.4M Hepes buffer(PH6.8) 330 μ l, Suc-(Ala)3-PNA 100 μ l를 혼합하고 25 $^{\circ}$ C에서 3분 40초간 pre-incubation한 후, elastase 20 μ l(0.5unit)를 첨가하고 spectrophotometer에서 410nm 흡광도로 1분간 측정하였다³²⁾. Blank로는 추출물이 포함되지 않은 HEPES buffer를 사용하였으며, 효소 억제율은 아래의 식을 활용하여 계산하였다.

$$\text{inhibition}(\%) = \left(1 - \frac{\Delta A / \text{min}_{\text{test}}}{\Delta A / \text{min}_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

4) 피부 미백효능 평가

① Tyrosinase 활성 억제력 평가

시료는 5% DMSO에 녹이고 100mM sodium phosphate buffer로 희석하였다. 각각의 실험물질 100 μ l와 기질(4mM L-Dopa용액) 100 μ l를 혼합한 후, 새롭게 제조한 mushroom tyrosinase(2mg/ml)용액 2 μ l를 첨가하고 mix한 후 472nm에서 흡광도를 spectrophotometer를 활용하여 2분간 측정하여 반응경사도로 구하였다³³⁾. 용매로 사용한 DMSO의 저해효과를 보정하기 위하여 측정하고자 하는 시료의 양에 해당하는 DMSO용액을 가하여 대조군으로 하였다.

② MNT-1 cell를 활용한 멜라닌 생성억제력 평가
본 실험에 사용한 human melanoma cell line인 MNT-1은 미국 National Cancer Institute의

Vincent J. Hearing 박사로부터 공여 받은 것을 사용하였다. MNT-1 세포주를 100mm culture dish에 5 \times 10⁵개의 농도로 seeding한 후, 1일 뒤에 시료를 처리하고 3일간 더 배양 하였다. PBS(pH 7.4)로 세척한 후 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 세포를 배양용기로부터 떼어내고, 원심분리한 후 pellet을 육안관찰하고 사진촬영 하였다. 육안관찰과 사진촬영 결과 멜라닌 생성억제력이 확인된 결과물은 5% trichloroacetic acid 용액 1ml을 가해 교반 하였다. 이를 2,500 rpm으로 원심분리한 후, 분리된 멜라닌을 PBS로 세척하고 ether와 ethanol(1:3) 용액을 첨가 한 후 멜라닌 pellet을 원심분리 하였다. Ethyl ether 1ml로 멜라닌을 세척하고 건조시키고, 건조된 멜라닌에 1N KOH를 가하여 1 시간 동안 56 $^{\circ}$ C 항온수조(water bath)에서 incubation 한 후, 470nm에서 흡광도를 측정하였다^{33,34)}.

5) 세포독성 평가

V-79 세포주(ATCC CCL-93)를 이용하여 MTT법으로 세포독성을 평가하였다. 10% FCS가 첨된 DMEM으로 전 배양한 V-79 cell을 96 well plate에 5 \times 10⁵cells/ml의 농도로 seeding하고 5% CO2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FCS를 첨가되지 않은 배지에 희석한 시료를 첨가하고 24시간 배양시킨 후, 배지를 제거하고 MTT용액을 1 μ g/ml의 농도로 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시켰다. 미반응된 MTT를 제거하고 ethanol 100 μ l를 가해 형성된 반응물을 용해시키고, ELISA reader로 550nm에서의 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다³⁵⁾.

6) 통계처리

각 결과의 통계적 유의성 검정은 Student's T-test로 검사하였다.

III. 실험결과

1. 항산화력 평가

1) Free radical scavenging activity에 미치는 영향

DPPH법으로 측정된 石斛과 石榴추출물의 항산화력은 0.01와 0.001%에서 각각 73.5와 25.8%, 97.7와 48.0%로 radical scavenging activity를 지닌 것으로 평가되었다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Radical scavenging activities of herbal extracts

Group	Concentration	Absorbance ₅₁₆ ^{a)}	Radical Scavenging Activity
Control		0.9680±0.0524	-
A	0.01%	0.0002±0.0002*	100.0%
	0.001%	0.6195±0.0164*	36.1%
B	0.01%	0.2541±0.0292*	73.5 %
	0.001%	0.7123±0.0421*	25.8 %
C	0.01%	0.0221±0.0036*	97.7 %
	0.001%	0.4990±0.0360	48.0 %

a) Mean ± SD

Control : untreated group

A : teated with Vitamin E

B : teated with Dendrobium nobile

C : teated with Punica granatum

Statistically significant value compared with control group by T test.

(* P < 0.05)

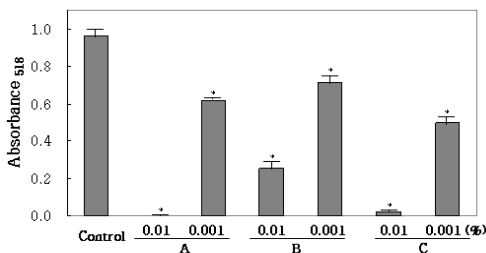


Fig. 1. Radical scavenging activities of herbal extracts

Statistically significant value compared with control group by T test.

(* P < 0.05)

2) Xanthine oxidase activity에 미치는 영향

Xanthine oxidase 활성억제력을 평가한 결과 石斛과 石榴추출물은 100µg/ml와 10µg/ml의 농도에서 각각 64.8와 52.5%, 그리고 67.6와 14.6% 억제시켰다(Table 4).

Table 4. Inhibition of xanthine oxidase activities by herbal extracts

	Concentrations	Absorbance _{295nm}		Inhibition Rate
		0 min	10 min	
A	Blank	0.1105	0.2828	-
	100µg/ml	0.9823	1.0430	64.8%
	10µg/ml	0.1971	0.2797	52.5%
B	Blank	0.1230	0.3056	-
	100µg/ml	0.9100	0.9691	67.6%
	10µg/ml	0.2012	0.3571	14.6%

A : *Dendrobium nobile*, B : *Punica granatum*

2. 항염효과 평가

1) Nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향

石斛과 石榴추출물이 100µg/ml과 10µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 98.9와 19.4%, 그리고 73.4와 33.1% 억제시켰다(Table 5, Fig. 2).

2) IL-1β 와 IL-6 유전자 발현

石斛 추출물은 100µg/ml의 농도에서 IL-1β와 IL-6 유전자의 발현을 각각 18.4%, 45.7% 억제시켰다. 10µg/ml의 농도에서는 IL-1β와 IL-6 유전자의 발현을 각각 10.2%, 34.7% 억제시켰다.

石榴 추출물은 100µg/ml의 농도에서 IL-1β와 IL-6 유전자의 발현을 각각 40.6%, 55.9% 억제시켰다. 10µg/ml의 농도에서는 IL-1β와 IL-6 유전자의 발현을 각각 32.8%, 58.3% 억제시켰다(Table 6, Fig. 3).

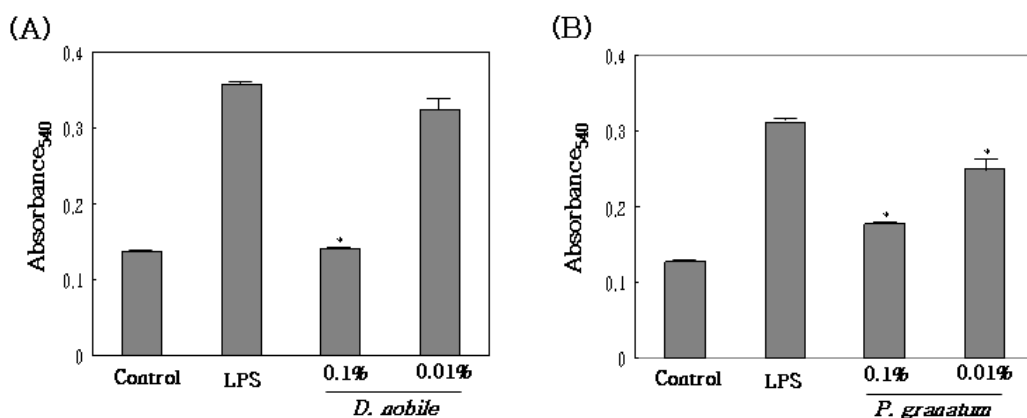


Fig. 2. Effects of the herbal extracts on NO synthesis in RAW264.7 cells

(A) : *Dendrobium nobile*, (B) : *Punica granatum*

Statistically significant value compared with control group by T test.

*P < 0.05

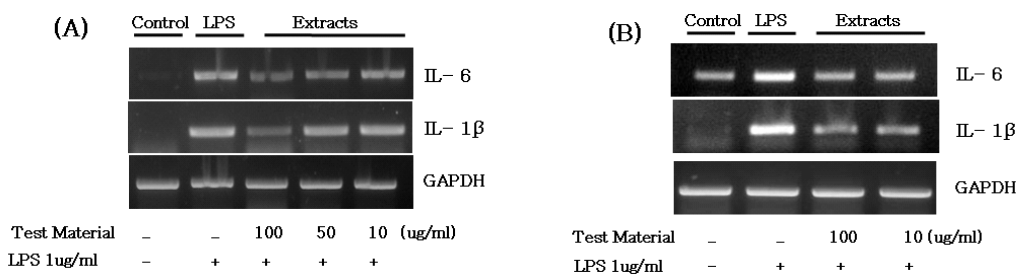


Fig. 3. Effects of the herbal extracts on the mRNA levels of IL-1 β and IL-6 in the cultured RAW 264.7 cells by RT-PCR

(A) : *Dendrobium nobile* , (B) : *Punica granatum*.

Table 5. Effects of the herbal extracts on NO synthesis in RAW264.7 cells

		Control ^{a)}	LPS ^{b)}	Concentrations ^{c)}	
				100 μ g/ml	10 μ g/ml
<i>Dendrobium nobile</i>	Absorbance	0.1371 ± 0.0285	0.3569 ± 0.0174	0.1396 $\pm 0.0064^*$	0.3243 ± 0.0266
	Reduction Rate	-	-	98.9%	19.4%
<i>Punica granatum</i>	Absorbance	0.1273 ± 0.0074	0.3123 ± 0.0148	0.1765 $\pm 0.0095^*$	0.2511 $\pm 0.0208^*$
	Reduction Rate	-	-	73.4%	33.1%

a) Non-treated group

b) Lipopolysaccharide(LPS) treated group

c) LPS + medicinal plant treated group

Statistically significant value compared with control group by T test.

*P < 0.05

Table 6. Effects of the herbal extracts on the mRNA levels of IL-1 β and IL-6 in the cultured RAW 264.7 cells by RT-PCR

(A) *Dendrobium nobile*

		Control ^{a)}	LPS ^{b)}	Concentrations ^{c)}		
				1000 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
IL-6	Densitometer	203	786	198	476	513
	Inhibition Rate	-	-	74.8%	45.7%	34.7%
IL-1 β	Densitometer	173	2,052	826	1,675	1,842
	Inhibition Rate	-	-	59.8%	18.4%	10.2%

(B) *Punica granatum*

		Control ^{a)}	LPS ^{b)}	Concentrations ^{c)}	
				100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
IL-6	Densitometer	200	1,746	769	729
	Inhibition Rate	-	-	55.9%	58.3%
IL-1 β	Densitometer	605	1,233	667	754
	Inhibition Rate	-	-	40.6%	32.8%

a) Non-treated group

b) LPS treated group

c) LPS + medical plant treated group

3) TNF- α 분비량에 미치는 영향

石榴科 石榴추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 48.8%와 22.3%, 18.6%와 2.7% 억제시켰다(Table 7, Fig. 4).

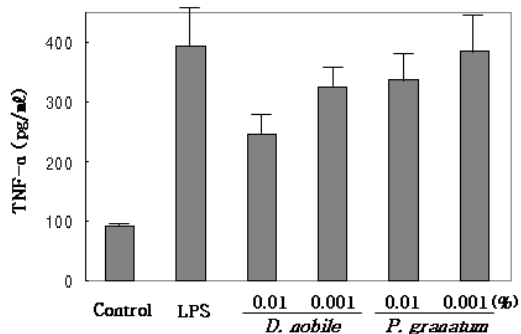


Fig. 4. Effects of the herbal extracts on TNF- α production in RAW264.7 cells determined by ELISA

Table 7. Effects of the Herbal extracts on TNF- α production in RAW264.7 cells determined by ELISA

		TNF- α (pg/ml)	Inhibition Rate
Control ^{a)}		92 \pm 8.5	-
Lipopolysaccharide ^{b)}		393 \pm 62	-
<i>Dendrobium nobile</i> ^{c)}	100 $\mu\text{g/ml}$	246 \pm 25	48.8%
	10 $\mu\text{g/ml}$	326 \pm 24	22.3%
<i>Punica granatum</i> ^{c)}	100 $\mu\text{g/ml}$	337 \pm 45	18.6%
	10 $\mu\text{g/ml}$	385 \pm 81	2.7%

a) Non-treated group

b) LPS treated group

c) LPS + medicinal plant treated group

4) Cyclooxygenase-2 활성억제에 미치는 영향

石斛과 石榴추출물은 LPS의 자극으로 RAW 264.7 세포에서 활성화되는 COX-2 효소 활성을 10 μ g/ml의 농도에서 각각 71.4와 23.1% 억제시켰다(Table 8, Fig. 5).

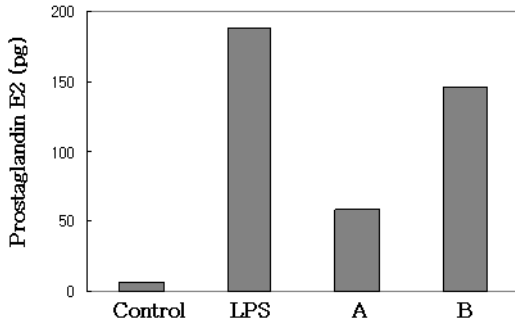


Fig. 5. Effects of the herbal extracts on COX-2 activities in RAW264.7 cells stimulated by LPS (A) : *Dendrobium nobile*, (B) : *Punica granatum*

Table 8. Effects of the herbal extracts on COX-2 activities in RAW264.7 cells stimulated by LPS

		PGE2* (pg/well)	Inhibition Rate
Control ^{a)}		6	-
LPS ^{b)}		188	-
<i>Dendrobium nobile</i> ^{c)}	10 μ g/ml	58	71.4%
<i>Punica granatum</i> ^{c)}	10 μ g/ml	146	23.1%

- a) Non-treated group
- b) LPS treated group
- c) LPS + medicinal plant treated group
- * Prostaglandin E2

5) NF- κ B 활성억제에 미치는 영향

石斛과 石榴추출물이 NF- κ B에 미치는 영향을 평가한 결과 10 μ g/ml의 농도에서 각각 91.4와

96.3% 억제시켰다(Table 9, Fig. 6).

Table 9. Effects of the herbal extracts on NF- κ B in RAW264.7 cells transiently transfected with NF- κ B gene

	Relative Light Unit	Inhibition Rate
Control	123 \pm 29 ^{a)}	-
A	5,974 \pm 210	-
B	624 \pm 115*	91.4%
C	339 \pm 51*	96.3%

- A : NF- κ B transfection+LPS(0.5 μ g/ml)
- B : NF- κ B transfection+LPS(0.5 μ g/ml) + *Dendrobium nobile*(10 μ g/ml)
- C : NF- κ B transfection+LPS(0.5 μ g/ml) + *Punica granatum* (10 μ g/ml)
- a) : Mean \pm SD
- Statistically significant value compared with control group by T test.
- (*: P < 0.05)

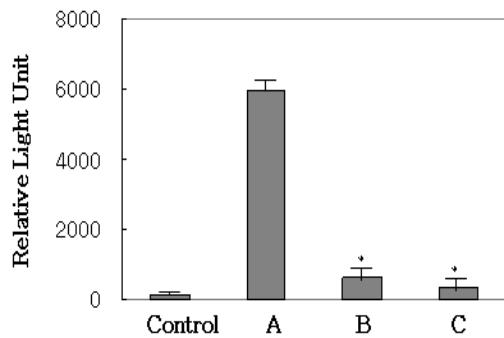


Fig. 6. Effect of the herbal extracts on NF- κ B in RAW264.7 cells transiently transfected with NF- κ B gene

- A : NF- κ B transfection+LPS(0.5 μ g/ml)
- B : NF- κ B transfection+LPS(0.5 μ g/ml) + *Dendrobium nobile*(10 μ g/ml)
- C : NF- κ B transfection+LPS(0.5 μ g/ml) + *Punica granatum* (10 μ g/ml)
- Statistically significant value compared with control group by T test.
- (*: P < 0.05)

6) MAP kinase에 미치는 영향

石斛과 石榴추출물이 MAP kinase에 미치는 영향을 western blot으로 평가한 결과 10 μ g/ml의 농도에서 두 추출물 모두 Jun-N-terminal kinase (JNK)와 p38에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 7).

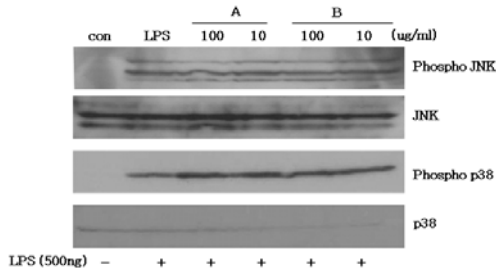


Fig. 7. Effects the herbal extracts on MAP kinase in RAW264.7 cells determined by western blot (A) : *Dendrobium nobile*, (B) : *Punica granatum*

3. 피부 주름 발생 억제 효능 평가

1) Collagenase 활성억제에 미치는 영향

石斛과 石榴추출물이 collagenase 효소의 활성억제능이 있는지의 여부를 조사한 결과 100 μ g/ml의 농도에서 石斛은 22.7%, 石榴추출물은 44.2%의 효소활성억제력을 지닌 것으로 평가되었다 (Table 10, Fig. 8).

Table 10. Effects of the herbal extracts on collagenase activities

Sample	Concentration	Absorbance	Reduction Rate
Substrate only		13,133 ± 540 ^{a)}	-
Substrate + Enzyme		131,714 ± 3,647	-
<i>Dendrobium nobile</i>	100 μ g/ml	104,752 ± 5,169*	22.7 %
<i>Punica granatum</i>	100 μ g/ml	129,235 ± 3,048	44.2 %

a) : Mean ± SD
 Statistically significant value compared with control group by T test.
 (*: P < 0.05)

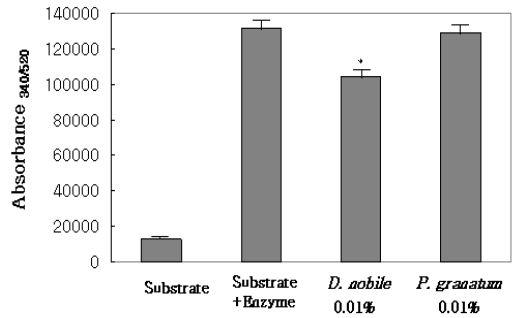


Fig. 8. Effects of the herbal extracts on collagenase activities

Statistically significant value compared with control group by T test.

*: P < 0.05

2) Elastase 활성억제에 미치는 영향

石斛과 石榴추출물이 elastase 효소의 활성억제능이 있는지의 여부를 조사한 결과 50 μ g/ml의 농도에서 石斛은 77.5%, 石榴추출물은 74.9%의 효소활성억제력을 지닌 것으로 평가되었다 (Table 11).

Table 11. Effects of the herbal extracts on elastase activities

Samples	Concentration	Absorbance		Reduction Rate
		0 min	10 min.	
Control (Enzyme+Substrate)		0.0571	0.2310	-
<i>Dendrobium nobile</i>	50 μ g/ml	0.1136	0.1449	77.5%
<i>Punica granatum</i>	50 μ g/ml	0.0782	0.1131	74.9%

4. 피부 미백효능 평가

1) Tyrosinase 활성억제에 미치는 영향

石斛과 石榴추출물이 tyrosinase 효소에 미치는 영향을 평가한 결과 10 μ g/ml의 농도에서 石斛이 58.6%, 石榴추출물이 63.2% 억제시켰다(Table 12).

Table 12. Effects of the herbal extracts on tyrosinase activities

	Concentration	Absorbance ₄₇₂		Reduction Rate
		0 min.	5 min.	
Control ¹⁾		0.2365±0.0229 ^{a)}	0.5874±0.0080	-
Ethanol ²⁾		0.1942±0.0407	0.5045±0.0319	11.6%
<i>Dendrobiu nobile</i>	10µg/ml	0.4355±0.0146	0.5806±0.0190	58.6%
<i>Punica granatum</i>	10µg/ml	0.4494±0.0374	0.5786±0.0078	63.2%

1) Non-treated group 2) LPS treated group
a) : Mean ± SD

2) 멜라닌 합성 저해능에 미치는 영향

MNT-1 세포를 대상으로 석곡과 석류추출물의 멜라닌 생성 억제능을 평가한 결과 두 약제 모두 멜라닌 합성 억제능이 없는 것으로 평가되었다 (Table 13, Fig. 9).

Table 13. Effects of the herbal extracts on melanin synthesis in MNT-1 cells

Sample	Concentration	Absorbance ₄₇₀
Control*		0.1139
<i>Dendrobiu nobile</i>	10µg/ml	0.1273
<i>Punica granatum</i>	10µg/ml	0.1385

* : Non-treated group

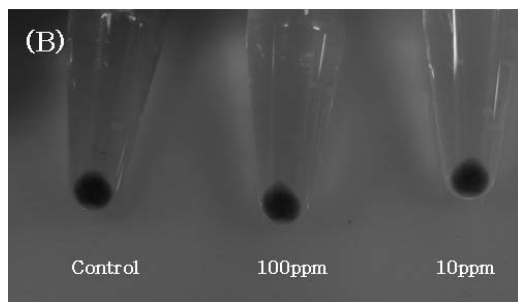
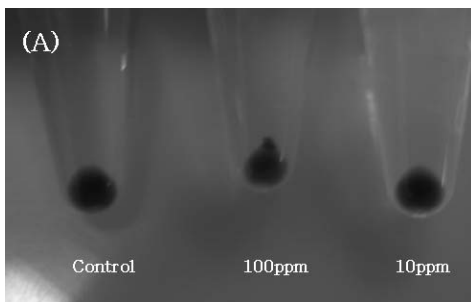


Fig. 9. Effects of the herbal extracts on melanin synthesis in MNT-1 cells
(A) : *Dendrobiu nobile*, (B) : *Punica granatum*

5. 세포독성 평가

V79-4 세포를 이용한 MTT법으로 세포독성을 평가한 결과 石斛과 石榴추출물은 실험의 최고 농도인 100µg/ml에서 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 10).

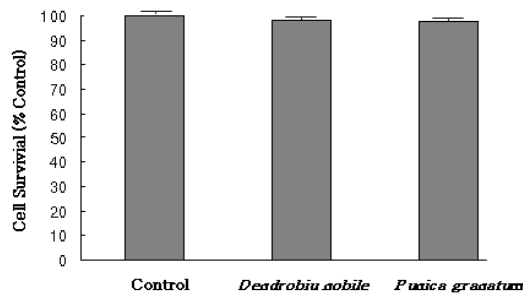


Fig. 10. Cytotoxicities of the herbal extracts at a concentration of 100µg/ml

Ⅳ. 고 찰

피부와 점막은 해부학적으로 외부와의 경계부에 위치하여 외부로부터 유입되거나 또는 내부에서 생겨난 유해한 인자들로부터 개체를 보호하는 임무를 수행하고 있다. 또한 개체를 방어 유지하는 임무의 대부분이 면역반응과 직접 또는 간접적으로 관련되어 있다¹⁾.

피부질환을 일으키는 원인은 무수히 많으나 첫째, 세균, 진균, 바이러스와 같은 생물성 원인, 둘째, 외상, 열, 방사능 같은 물리적 원인, 셋째, 내인성 또는 외인성 화학물질에 의한 화학적 원인, 넷째, 항원항체 반응에 관련되는 면역학적 원인으로 크게 대별된다³⁶⁾.

본 실험에서 사용된 약제는 민간에서 强壯劑로 알려진 石斛과 최근 항노화 작용 및 여성 질환에 대한 효능으로 다양한 분야에서 활용되고 있는 石榴이다.

石斛은 난초과(蘭科;Orchidaceae)에 속한 다년생 부생 초본인 金釵石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 또는 기타 동속근연식물의 지상부를 개화 전에 채취한 것으로 甘寒한 性味를 가지고 있으며 주로 熱病 후기에 津液口渴, 夜熱早冷, 舌絳少津 등의 증상으로 치료한다. 石斛의 효능은 주로 養胃陰, 淸虛熱 하는데, 鮮石斛은 淸熱生津작용이 강하여 熱病傷津, 舌絳煩渴한 증상에 응용되고, 藿石斛은 滋陰生津 작용이 강하여 병후에 陰虛津虧하여 虛熱이 不退한 證에 응용될 수 있다. 아울러 强壯劑로서의 石斛은 益精補精작용을 하며, 治風劑로서의 石斛은 風痺를 치료하므로 中風半身不隨, 神經障礙 등에 응용할 수 있다. 약리학 상 중요성분으로 dendrobine, dendramine, nobilonine, dendroxine, dendrine, 6-hydro-xydendroxine, 점액질과 전분 등이 함유되어 있다¹⁴⁾.

石斛의 효능에 관한 연구는 크게 많지 않은데, 국내에서는 한 등¹⁵⁾이 石斛이 폐경기 이후 여성의

골다공증의 예방 및 치료에 효과적으로 응용될 수 있음을 보고하였고, 김 등¹⁶⁾은 石斛의 물 및 메탄올 추출물이 조직 손상의 방지에 유효한 효과가 있음을 밝혔으며, 국외에서는 Mizue 등¹⁷⁾이 반응성 산소기의 발생을 강력하게 억제함으로써 산화적 손상으로 인한 노화 또는 노화와 관련된 신경계 질환들을 예방하거나 관리하는데 효율적으로 이용될 수 있음을 보고한 바 있다.

石榴는 석류과(石榴科;Punicaceae)에 속한 낙엽 소교목인 석류나무 *Punica granatum* L. 의 성숙한 과실을 건조한 것으로 韓方에서는 과실의 果皮를 수집하여 曬乾하여 石榴皮로 사용하였다. 石榴皮는 性은 溫하고 味는 酸澁하며, 歸經은 大腸經이다. 오로지 收斂澁腸시키는 효능이 있어 久瀉久痢證에 적용하고, 石榴根皮는 性味와 효능이 石榴皮와 같으나 단 殺蟲시키는 효과가 비교적 강하여 條蟲과 蛔蟲을 驅蟲하는 효과가 있다. 약리학 상 주요성분으로 tannin 10.4-21.3%, 납 0.8%, 수지 4.5%, mannitol 1.8%, 점액질 0.6%, 당 2.7%, 식물고무 3.2%, inulin 1.0%, gallate 4.0%, 사과산, pectin, 수산갈슘, isoquercetin이 함유되어 있다¹⁴⁾.

石榴에 대해서는 비교적 다양한 연구들이 발표되고 있다. 국외에서 석류에 대한 연구에서 암, 심혈관질환, 골다공증 등의 만성질환에 대해서 예방 효과가 있다고 보고되고 있다¹⁸⁾. 또한 항산화작용, 면역증진, 체지방 감소에도 효과가 있다고 보고되었다¹⁹⁾. 국내에서는 심 등²⁰⁾이 석류의 암세포 증식 억제에 대한 연구와 한²¹⁾의 장내균총조절에 대한 효과, 고¹⁹⁾ 등의 석류씨 추출물에 대한 항산화 및 항균효과에 대한 보고, 노²²⁾의 석류추출물의 항산화와 항노화작용에 대한 보고 등이 있다.

활성산소는 이온의 상태가 불안하여 다른 물질과 결합해 안정화되려는 성질, 즉 강한 반응성을 지니는 특성을 가진 산소를 말한다. 이러한 활성산소는 인체 내의 정상세포의 대사과정 중의 여러

산화반응의 부산물로 만들어지며, 식세포에 의해 만들어져 감염반응을 조절하는 긍정적인 역할을 하는 반면, 이온화 방사선, 자외선, 환경공해, 심한 운동을 할 경우에 만들어져, 생체조직을 공격해 각종 염증질환과 암, 간장애, 동맥경화, 위염 등 많은 질병을 일으키는 원인의 하나로 알려져 있으며, 궁극적으로는 노화의 한 원인인 것으로 알려져 있다²⁾.

본 연구에서는 石斛과 石榴 추출물이 활성산소를 제거하는 radical scavenger로서의 작용을 하는지의 여부를 조사하기 위해 항산화실험법 중 가장 널리 이용되는 DPPH법을 이용해 실험을 실시하였으며, 그 결과, 石斛추출물은 0.01과 0.001%에서 각각 73.5와 25.8%을, 石榴추출물은 0.01과 0.001%에서 각각 97.7과 48.0%로 나타났다(Table 3, Fig. 1). 또한 Xanthine oxidase 활성억제력을 평가한 결과 石斛추출물은 100 μ g/ml와 10 μ g/ml에서 각각 64.8과 52.5%를, 石榴추출물은 100 μ g/ml와 10 μ g/ml에서 각각 67.6과 14.6%의 항산화 효능이 확인되었다(Table 4). 그러므로 상기 처방 및 약재들은 향후 염증 치료 및 억제를 위한 항산화물질로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

염증은 한의학적으로 瘡瘍의 범주로 볼 수 있다. 즉, 瘡瘍은 넓은 의미로는 氣血이 稽留되어서 營衛不通되어 內에서 結하거나 또는 여러 種類의 外的인 損傷에 의하여 體表의 淺部에 有形의 病證으로 나타나는 모든 外科疾患의 總稱이며, 좁은 의미로는 感染性 疾患으로 발생되는 肌膚의 瘍, 濕潤, 糜爛, 黃水瘡, 風疹, 癩, 斑疹, 疥瘡, 凍瘡, 熱瘡 등과 같은 炎症性 병변을 말한다⁴⁾.

瘡瘍의 原因으로 陳³⁷⁾은 “外因은 六淫으로 經絡에서 나타나 臟腑로 전해지고, 內因은 七情鬱結과 臟腑가 손상되어 肢體로 나타나고, 不內外因은 飢餓, 呼吸傷氣, 虎狼毒蟲, 金瘡 등으로, 이러한 三因에 의해 발생 한다”고 하였다. 또한 《黃帝內經·靈樞》³⁸⁾에서는 “運氣學으로 歲木不及으로 炎

署 流火할 때 歲水不及으로 司天에 熱氣가 不臨할 때 發生되며 또는 寒邪가 經絡 內에 侵犯하면 血泣이 되고 血脈이 不通되면 衛氣가 循環하지 않으므로 腫이 발생하고 寒氣가 熱로 變하여 熱이 많으면 肉이 腐蝕되어 膿이 형성된다”고 하였고, 華佗³⁹⁾는 “榮衛壅塞으로 발병하거나 五臟六腑의 蓄毒이 원인이 된다”고 하였으며, 王 등^{40,41)}은 “虛邪가 犯하거나 榮衛가 經絡에 停留되거나 喜怒가 不斂하거나 飲食不節, 五臟六腑不和, 九竅不通 등으로 발생된다”고 하였다. 그리고 嚴⁴²⁾은 五臟六腑의 不和와 陰陽相滯를 원인으로 보았고, 危⁴³⁾는 冷熱不調, 喜怒不常, 飲食不節, 張은 心火上炎 등에 의해 발생된다고 하였다.

염증(inflammation)은 “균의 감염, 열, 외상, 항원 항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전”이라고 정의하고 있으며, 염증이라는 용어가 “불같은 상태”라는 어원에서 유래된 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창, 기능장애와 같은 염증의 5대 징후가 발생된다²⁾.

특히 피부염증을 일으키는 원인은 무수히 많으며 이러한 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이런 현상은 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 한다. 이러한 화학적 매개체로는 활성산소, Nitric oxide(NO), prostaglandin(PG), 염증을 유발시키는 여러 cytokine 등이 있다³⁶⁾.

NO는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내의 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NOS는 I형, II형, III형의 3종류가 있는데, 이중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 I형이나 III형과 달리 II형은 inducible

NOS(iNOS)로 cytokine이나 세균 등에서 분비되는 LPS나 calcium ionophore에 의해 일부 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. 생산된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 활성산소의 하나인 superoxide anion(O₂⁻)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 NO의 발생을 억제시켜 주는 것이 중요하다⁴⁴⁻⁴⁷⁾.

石斛과 石榴 추출물이 NO의 생성을 억제시키는 역할을 하는지의 여부를 평가하기 위해 염증실험에 널리 활용되고 있는 macrophage 세포주인 RAW 264.7 세포를 이용한 실험을 실시한 결과,石斛과 石榴 추출물이 100 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도에서 각각 98.9와 19.4%, 73.4와 33.1%의 억제효과를 보여 농도의존적인 NO 생성억제 효과를 지닌 것으로 조사되었다(Table 5, Fig. 2).

염증의 경과를 혈관의 투과성이 항진되는 1기, 백혈구가 주로 작용하는 2기, 조직의 재생 수복시기인 3기로 구분된다. 피부염증에 의한 혈관투과성 항진은 세정맥(venule) 내피 세포의 간격이 벌어져서 혈장 단백질 등의 거대분자가 혈관 외로 유출되는 현상으로 여러 화학전달물질들이 이 현상에 매개체로 관여하는 것으로 알려져 있다²⁾.

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부분 내인성 화학전달물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다. 염증 반응의 주요 화학전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류(histamine, serotonin 등)와 kinin류(bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류와 prostaglandin과 leukotriene류 등의 4군으로 분류된다. 지연형 반응에 주로 작용하는

cytokine은 30 κ D이하의 분자량을 가진 당단백으로 소량(10⁻¹⁰-10⁻¹⁵M)으로도 수용체와 결합해 강력하게 염증반응과 면역반응을 조절하는 기능을 가졌다. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 보고되고 있다⁴⁸⁾.

NO생성 억제력을 가진 것으로 평가된石斛과 石榴 추출물이 상기한 염증매개물질에 미치는 영향을 평가하기 위해 Lipopolysaccharide의 자극을 받아 RAW 264.7 세포에서 발현이 증가되는 IL-1 β 와 IL-6 유전자의 변화를 평가하기 위해 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과의石斛과 石榴 추출물이 IL-1 β 와 IL-6 유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다(Table 6, Fig. 3, 4). 또한 TNF- α 의 경우 100 μ g/ml와 10 μ g/ml의 농도에서 각각 48.8와 22.3%, 18.6와 2.7%의 억제효과를 보여 농도의존적인 TNF- α 생성억제 효과를 지닌 것으로 조사되었다.

Nuclear factor- κ B(NF- κ B)는 염증반응에 관여하는 cytokine들의 유전자의 발현을 증가시키는 전사인자로 류마티스 관절염과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 NF- κ B의 활성 조절이 가능할 경우 만성과 급성염증질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다⁴⁹⁾.

石斛과 石榴추출물이 NF- κ B에 미치는 영향을 평가한 결과 10 μ g/ml의 농도에서 각각 91.4와 96.3% 억제시켰다(Table 9, Fig. 6).

Prostaglandin은 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intracellular messenger이다. Prostaglandin은 세균의 감염에서 유래한 lipopolysaccharide 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A₂에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 cyclooxygenase(COX) 효소의 작용을 받아

PG를 합성하는데, PGE₂와 PGI₂는 혈관 투과성 향진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. Cyclooxygenase는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. I형 효소인 cyclooxygenase-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 cyclooxygenase-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다^{28,45,50}.

石斛과 石榴 추출물을 대상으로 cyclooxygenase-2 효소활성 억제력을 평가한 결과, COX-2 효소 활성을 10 μ g/ml의 농도에서 각각 71.4와 23.1% 억제시켰다(Table 9, Fig. 6).

생명체를 구성하는 각각의 세포들은 주어진 환경의 변화에 계속적으로 반응을 하는 동적인 것으로, 세포반응은 대부분의 경우 호르몬이나 사이토카인 등의 세포 밖 인자를 세포가 수용체를 통해 받아들여 그 정보를 핵으로 전하여 관련된 유전자를 발현시킴으로서 반응하게 된다. 이러한 세포 안에서 정보전달에 관여하는 대표적인 물질의 하나가 MAP kinase cascade이다. MAP kinase family는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal regulated protein kinase(ERK), c-Jun N-terminal Kinase(JNK)/stress-activated protein kinase (SAPK)와 p38, ERK5/BMK1 등으로 구성된다. 이중 MAPK는 세포분열 촉진인자에 의해 활성이 강하게 유도되는데 반해 JNK와 p38은 포유류에서 여러 가지 자외선, 산화스트레스, 엔도톡신 등 물리화학적 스트레스에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다^{49,51}. 이에 본 연구에서도石斛과 石榴 추출물이 염증유발 인자에 의해 유도되는 JNK와 p38의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였으며, 그 결과 10 μ g/ml의 농도에서 두 추출물 모두 영향을 미치지

않는 것으로 확인되었다(Fig. 7).

최근에 천연식물에 대한 관심과 더불어, 환경오염과 외부조건에 의한 피부의 손상을 억제하고자 하는 노력이 증가하고 있다. 이에 따라서 피부에서의 항산화 및 자외선 차단에 관한 관심이 증가하고 있다. 자외선에 과도하게 노출된 경우, 피부의 형태를 유지시켜주는 기질단백질인 collagen과 elastin을 분해시켜주는 효소인 collagenase의 발현이 증가되어, 피부 단백질의 손상과 광에 의한 피부노화 및 피부 주름증이 유발된다⁵².

피부노화를 분류하여 보면 크게 두 가지로 대별되는데, 첫째로 생리적인 인자에 의한 내인적 노화(intrinsic aging)와 둘째로 태양광선 등 외부적인 인자에 의해 악화되는 광노화(photoaging)가 있다. 연령의 증가에 따른 생리적인 현상인 내인적 노화를 예방할 수 있는 방법은 현재까지 문헌상으로는 과학적인 방법으로 검증된 바 없다. 다만, 악화 인자에 대한 그 역할이 어느 정도 규명된 광노화에 있어서만, 일광노출을 피하거나(avoidance) 막는 효과(protective effect)로 노화의 진행을 늦출 수 있는 방법들이 고안되고 있을 뿐이다⁵³.

나이가 들면서 자연적으로 발생하는 주름은 피부 노화에 수반되는 생리적인 현상으로 피부의 진피층에서 피부를 지탱해주고는 있는 콜라겐의 양이 감소하고 탄력섬유의 변화에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근에는 상기한 내인적 노화 이외에 자외선에 의한 유발되는 광노화에 의해 발생하는 주름에 더 많은 초점이 모아지고 있다. 자외선은 피부 진피층에서 콜라겐과 엘라스틴 등의 기질단백질을 손상시켜 피부내 콜라겐의 양을 감소시키고 엘라스틴의 변성을 유발시킨다고 주장이 있고, 실제로 자외선의 피부조사에 의해 교원질의 합성이 감소되고, 콜라겐 분해효소의 발현이 증가되어 결국 주름을 유발한다는 보고도 발표되었다⁵⁴. 따라서 지금까지의 주름개선 연구는 콜라겐을 분해하는 Collagenase의 작용과 탄력섬유를

분해하는 elastase의 작용을 억제하는 물질개발이 중심이 되어왔다.

본 연구에서도 石斛과 石榴추출물이 피부 주름 방지와 탄력유지에 효용이 있는지의 여부를 확인하기 위해 collagenase와 elastase 활성 억제력을 평가하였으며, 그 결과 collagenase에 대해 100 μ g/ml의 농도에서 石斛은 22.7%, 石榴추출물은 44.2%의 효소활성억제력을 지닌 것으로 평가되었다(Table 10, Fig. 8). 또한 elastase에 대해서는 50 μ g/ml의 농도에서 石斛은 77.5%, 石榴추출물은 74.9%의 효소활성억제력을 지닌 것으로 평가되었다(Table 11). 따라서 石斛과 石榴는 collagen이나 elastin의 분해를 억제하므로 피부재생 및 피부노화 방지에 유의성이 있는 것으로 생각된다.

피부가 자외선에 노출되어 나타나는 광노화와 연령증가에 따른 자연노화로 인한 피부색의 변화는 한의학에서 面塵⁵⁵⁾, 面黑⁵⁶⁾, 面黧黯⁵⁷⁾, 黧子⁵⁸⁾, 雀斑⁵⁹⁾ 등으로 불리우며 임상에서 흔히 볼 수 있는 기미(melasma), 주근깨(freckle), 검버섯(seborrheic keratosis) 등에 해당한다⁶⁰⁾.

사람의 피부색은 피부 내에 존재하는 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈과 같은 색소들에 의하여 좌우되는데 이중 가장 큰 영향을 미치는 것이 멜라닌이다. 멜라닌은 피부 표피의 기저층에 존재하는 melanocyte에서 tyrosine의 효소 및 비효소적 산화반응에 의하여 생성되며, 표피를 구성하고 있는 각질 세포로 전이되어 사람의 피부색을 나타내게 된다. 이 과정에서 가장 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 것이 tyrosinase이다. 따라서 지금까지의 미백제 개발 연구는 Tyrosinase의 저해제를 개발하는데 치중되어 왔다⁶¹⁻⁶³⁾.

본 연구에서도 당 연구에 사용된 약제가 tyrosinase 활성을 억제시키는지의 여부를 조사하였으며 그 결과 10 μ g/ml의 농도에서 石斛이 58.6%, 石榴추출물이 63.2% 억제시켰다(Table 12).

멜라닌의 합성은 고도로 분화된 세포인 melanocyte에서 일어나며, melanocyte 내에서도 특화된 세포내 소기관인 melanosome에서 일어난다. 따라서 melanocyte 작용억제 연구는 효소학적 접근인 tyrosinase억제제 연구보다 더 신뢰도가 높아 세계의 많은 연구기관에서 동물의 melanoma 세포를 이용한 세포수준에서의 평가가 활발히 수행하고 있다⁶⁴⁾.

이에 본 연구에서는 National Cancer Institute의 Vincent J. Hearing 박사로부터 공여 받은 human melanoma cell line인 MNT-1를 이용해 한약재의 미백효능을 검증하였으며 그 결과 두 약물 모두 효과가 없는 것으로 평가되었다.

마지막으로 본 실험에 사용된 石斛과 石榴 추출물을 대상으로 V79-4 세포를 이용한 MTT법으로 세포독성을 평가한 결과, 실험의 최고 농도인 100 μ g/ml에서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 10).

V. 결 론

石斛과 石榴 추출물이 항산화, 항염증을 비롯하여 피부 주름 발생 억제, 미백효능에 미치는 영향을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Radical scavenging activity에서 石斛 추출물은 0.01%와 0.01%에서 각각 73.5%와 25.8%로 石榴 추출물은 97.7%와 48.0% 억제시켰다.
2. Xanthine oxidase activity에서 石斛추출물은 100 μ g/ml와 10 μ g/ml에서 각각 64.8%와 52.5%를, 石榴추출물은 100 μ g/ml와 10 μ g/ml에서 각각 67.6%와 14.6%로 억제시켰다.
3. NO 생성억제력은 石斛 추출물이 100 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도에서 각각 98.9와 19.4%, 石榴추출물은 100 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도에서 73.4

와 33.1%의 억제효과를 보였다.

4. IL-1 β , IL-6 유전자의 변화를 RT-PCR로 평가한 결과, 石斛과 石榴 추출물 추출물은 IL-1 β 와 IL-6 유전자의 발현을 감소시켰다.
5. TNF- α 분비량에서 石斛 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 48.8와 22.3%로 石榴 추출물은 18.6와 2.7% 억제시켰다.
6. COX-2 활성 억제력에서 石斛 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 71.4%로 石榴 추출물은 23.1% 억제시켰다.
7. NF- κ B 활성 억제력에서 石斛 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 91.4%로 石榴 추출물은 96.3% 억제시켰다.
8. MAP kinase에서는 石斛과 石榴 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 두 추출물 모두 Jun-N-terminal kinase(JNK)와 p38에 영향을 미치지 않았다.
9. Collagenase 활성 억제력은 石斛 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 22.7%로 石榴 추출물은 44.2% 억제시켰다.
10. Elastase 활성 억제력에서 石斛 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 77.5%로 石榴 추출물은 74.9% 억제시켰다.
11. Tyrosinase 활성 억제력에서 石斛 추출물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 58.6%로 石榴 추출물은 63.2% 억제시켰다.
12. MTT법으로 세포독성을 평가한 결과, 石斛과 石榴 추출물은 실험의 최고 농도인 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포독성을 나타내지 않았다.

이상의 실험결과 石斛과 石榴은 매우 우수한 항산화력과 양호한 NO 생성 억제력, 뚜렷한 IL-1 β , IL-6, TNF- α 유전자의 발현 억제력, 우수한 collagenase 및 elastase 활성억제력 등을 보인 점을 종합적으로 고려할 때 피부 염증질환의 치료와 예방에 유용한 처방인 것으로 사료되며, 아울러 피

부노화로 발생하는 주름 발생 억제 및 예방 효과가 크므로 임상에서 더욱 광범위한 활용가치가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 대한피부과학회 교과서편찬위원회 편저. 皮膚科學 개정4판. 서울:麗文閣. 2000:45.
2. 박광균. 구강생화학. 서울:군자출판사. 1999: 318-25.
3. Ehab E. Tuppo, Hugo R. Arias. The role of inflammation in Alzheimer's disease. The international Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2004;37:289-305.
4. 盧石善. 原色皮膚科學, 서울:아이비씨기획. 2006:111-21, 653, 739.
5. Chung JH. Photoaging in Asians. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2003;19:109-21.
6. 정진호, 조윤희. 미용관련 기능성 실험, 건강기능식품 시험가이드 한국보건공정서연구회. 2003:821-58.
7. Deyama T., Nishibe S., Nakazawa Y. Constituents and pharmacological effects of Eucommia and Siberian ginseng. Acta Pharmacol Sin. 2001;22:1057-70.
8. Randall, V. A. Androgen and human hair growth. Clin. Endocrinol. 1994;40:439-57.
9. Russel D.W., Wilson, J.D. Steroid 5 α -reductase. two genes/two enzymes. Annu.Rev.,Biochem. 1993;63:25-61.
10. Rhodes L, Harper J, Uno H, Gaito G, Kurata S, Berman C, Primka R, and Dikounis B. The effects of finasteride on hair growth, hair cycle, and serum

- testosterone and dihydrotestosterone in adult male and female stump-tailed macaques (*Macaaca arctoides*). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994;79:991-6.
11. 조재훈, 김혜정, 김운범. 鹽 醋 香油의 미백효과에 관한 연구. *대한안ibi인후피부과학회지*. 2003;16(2):79-95.
 12. Jung JH. Photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003;19:109-21.
 13. 原案徵中醫學院. 中醫臨床手冊. 서울:성보사. 1983:1-4.
 14. 全國韓醫科大學 本草學教室 共編書. 本草學. 서울:영림사. 1995:650-2, 681-2.
 15. 한홍준, 김종환, 조한백, 최규섭. 석곡이 난소적출로 골다공증이 유발된 흰쥐에 미치는 영향. *대한한방부인과학회지*. 2000;13(2):120-35.
 16. 김영균, 양기호, 조수인. 석곡의 항산화 효과. *대한본초학회지*. 2005;20(4):53-60.
 17. Mizue O, Wenzhe F, Koji H, Quanbo X, Yasuhiro T, Katsuko K, Tsuneo N, Tomohro S, Kenji T and Shigetoshi K. Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing-tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999;67(1):1111-9.
 18. 최원균, 정교순, 조규성, 황명오, 유영숙. 이란산 흑석류 농축액과 그 제품의 성분 및 함유된 Phyto 에스트로겐류에 관한 연구. *한국식품영양학회지*. 2002;15(2):119-25.
 19. 고중호, 황명오, 문주수, 황성연, 손종연. 석류씨 추출물의 항산화 및 항균활성. *한국조리과학회지*. 2005;21(2):171-9.
 20. 심선미, 최상원, 배송자. 석류 추출물이 암세포 증식 억제와 Quinone Reductase 유도활성에 미치는 효과. *한국식품영양과학회지*. 2001;30(1):80-5.
 21. 한복진. 장내 균총조절에 유효한 소재의 탐색 및 목통, 석류, 치커리의 평가. *한양대학교 대학원:식품영양학과*. 1995.
 22. 노보경. 석류 추출물의 항산화 및 항노화 작용. *중앙대학교 대학원:향장품학과*. 2005.
 23. Blos, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*. 1958;191:1199.
 24. Sweeney AP, Wyllie SG, Shalliker RA, Markham JL. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *J Ethnopharmacol*. 2001;75:273-7.
 25. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem. Biol. Interact*. 2001;137:43-58.
 26. Hinz B, Brune K, Rau T, Pahl A. Flurbiprofen enantiomers inhibit inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 macrophages. *Pharm. Res*. 2001;18:151-6.
 27. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.
 28. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. *생약학회지*. 1998;42:558-66.
 29. Kim SN, Son SC, Lee SM, Kim CS, Yoo DG, Lee SK, Hur GM, Park JB, Jeon BH. Midazolam inhibits proinflammatory mediators in the lipopolysaccharide-activated macrophage. *Anesthesiology*.

- 2006;105:105-10.
30. 강준, 송호섭. 봉약침액과 Melittin에 RAW 264.7細胞의 NO, iNOS 및 MAPK에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1994;21(3):107-19.
 31. Beekman B, Drijfhout JW, Bloemhoff W, Ronday HK, Tak PP, te Koppele JM. Convenient fluorometric assay for matrix metalloproteinase activity and its application in biological media. FEBS Lett. 1996;390:221-5.
 32. 부회정, 함영민, 김정미, 이선주, 이남호. 감태에서 분리한 Phlorotannin 성분의 Elastase 저해활성 및 Hyaluronidase 저해 활성. 생약학회지. 2006;37:92-6.
 33. Roh JS, Han JY, Kim JH, Hwang JK. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. Biol Pharm Bull. 2004;27:1976-8.
 34. Shryer DP, Lukoff H, King T, Calabresi P. The effect of Taurolidine on adherent and floating subpopulations of melanoma cells. Anticancer Drugs. 2003;14:295-303.
 35. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Immunol,Methods. 1986;89:271-7.
 36. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1995: 71-104.
 37. 陳實功. 外科正宗. 天津:天津科學技術出版社. 1993:47.
 38. 楊維傑. 黃帝內經解釋. 서울:成輔社. 1997:147, 210, 299, 349, 456.
 39. 華 陀. 中藏經:劉河間三六書. 서울:成輔社. 1976:82.
 40. 王 燾. 外臺秘要. 北京:人民衛生出版社. 1982: 107, 625-31.
 41. 薛 己. 薛己醫案. 서울:成輔社. 1976:349-55.
 42. 嚴用和. 濟生方. 서울:東洋醫藥大學. 1965:61-8.
 43. 危亦林. 得效方. 서울:東洋醫藥大學. 1965:613.
 44. 김룡규, 신경민, 천상국, 지사영, 서성훈, 박희준, 최종원, 이경태. 넙취 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과. 약학회지. 2002;46(5):343-9.
 45. 서영준. 발암과정에 있어서 cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. 분자세포생물학뉴스. 2002;13:8-17.
 46. Lee B.G., Kim S.H., Zee O.P., Lee K.R., Lee H.Y., Han J.W. and Lee H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophage by two β -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. European J. Pharmacol. 2000;406:301-9.
 47. Kim E.J., Jin H.K., Kim K., Lee H.Y., Lee S.Y., Lee K.R., Zee O.P., Han J.W. and Lee H.W. Suppression by a sesquiterpene lactone from *Carpesium divaricatum* of inducible nitric oxide synthase by inhibiting nuclear factor- κ B activation. Biochem. Pharmacol. 2001;61: 903-10.
 48. Aeberli D., Oertle S., Mauron H., Reichenbach S., Jordi B. and Villiger P. Inhibition of the TNF-pathway: use of infliximab an etanercept as remission-inducing agents in case of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. Swiss Med. Wkly. 2002;132:414-22.
 49. 오세관, 오역수 역(아마모토 타다시, 센바 켄 편집). 키워드로 해석하는 세포신호전달 일러

- 스트 맵. 서울:월드사이언스. 2006:21-2, 29-31.
50. 문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱. 천연물로부터 COX-2 저해제 검색. 약학회지. 1998;42:214-9.
51. 최인장 역(일본 생화학회 편집). 세포운명과 세포기능을 조절하는 구조 정보 전달 제6장 MAP 카이나제. 서울:월드사이언스. 2006: 93-104.
52. 김경동. 한방 천연식물의 항산화 및 자외선 흡수에 관한 연구. 한국미용학회지. 2004; 10(2):145-53.
53. 강원형. 피부질환 아틀라스. 서울:한미의학. 2003;8, 137, 259-60, 289-93, 337-40, 369-71, 381-4.
54. Jung JH., Photoaging. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2003;19:109-21.
55. 程士德. 素問注釋匯粹. 北京:人民衛生出版社. 1982:395-6.
56. 李 梴. 編註醫學入門. 서울:대성문화사. 1990: 29, 224.
57. 趙 佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1987: 1763.
58. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울:대성문화사. 1990:97-8, 308-9.
59. 祁 坤. 外科大成. 臺北:文光圖書有限公司. 1980:211-2.
60. 박호순, 김혜정, 김윤범. 가미귀비탕의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2004;17(2):48-58.
61. Pawelek JM, Korner AM. The biosynthesis of mammalian melanin. Am Sci. 1982; 70:136-45.
62. Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Tsukamoto K, Brewington T, Imokawa G, Potterf B, Hearing VJ. DHICA oxidase activity of TRP 1 and interactions with other melanogenic enzymes. Pigment Cell Res. 1994;7:227-34.
63. Korner AM, Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. Science. 1982; 217:1163-5.
64. Seiji M, Shima K, Birneck MS, Fitzpatrick TB. Subcellular localization of melanin biosynthesis. Ann NY Acad Sci. 1963;100:497-533.