

## 蘆薈(알로에), 紫花地丁의 항산화, 항염증, 주름, 미백에 미치는 영향

김창훈<sup>1)</sup> · 정현아<sup>1)</sup> · 노석선<sup>1)</sup> · 홍석훈<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 대전대학교 한의과대학 외관과학교실

<sup>2)</sup> 원광대학교 한의과대학 외관과학교실

### Effects of Aloe and *Violae herba Extract* on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening

Chang-Hun Kim · Hyeon-A Jung · Seok-sun Roh · Seok-Hoon Hong

**Objective** : This study was performed to assess the effects of *Aloe and Violae herba extracts* on skin disease and skin beauty.

**Methods** : Anti-oxidant effects were measured by the scavenging for DPPH radical, xanthine oxidase activity. Anti-inflammatory effects were examined by relations in NO synthesis, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF-kB, COX-2, MAP kinase. The skin wrinkle formation effects were measured by collagenase and elastase activities. The whitening effects were examined by tyrosinase activities, melanin synthesis in MNT-1 cell.

- Results** : 1. In an anti-oxidant test, *Aloe and Violae herba extracts* showed high radical scavenging activity.  
2. In an anti-inflammatory test, *Aloe and Violae herba extracts* strongly inhibited the lipopolysaccharide(LPS)-induced nitric oxide(NO) release from the RAW 246.7 macrophage cells. *Aloe and Violae herba extracts* also inhibited the LPS-induced IL-1 $\beta$  and COX-2 expressions. The inhibitory effects of *Aloe and Violae herba extracts* on macrophage activation were via the inhibition of NF-kB, evidenced by transient transfection assay. Furthermore, *Aloe and Violae herba extracts* weakly inhibited the activation of Jun-N-terminal kinase(JNK) but they did not have any effects on p38 MAP kinase in RAW 264.7 cells.  
3. In the skin wrinkle formation assay, *Aloe extract* strongly inhibited collagenase and elastase, whose activity are tightly related with the wrinkle formation.  
4. In the skin whitening assay, *Aloe and Violae herba extracts* weakly inhibited tyrosinase activity, however, it was not statistically significant. Besides they did not have any effects on melanin synthesis, indicating that they could not be applicable for skin whitening.

**Conclusion** : This study show that *Aloe and Violae herba extracts* may play a significant role in skin disease and skin beauty.

**Key words** : *Aloe extracts*, *Violae herba extracts*, skin disease and skin beauty, collagenase, elastase, tyrosinase, NF- $\kappa$ B, MAP kinase

## I. 서 론

피부와 점막은 해부학적으로 외부와의 경계부에 위치하여 개체에 손상을 줄 수 있는 미생물, 화학물질 뿐만 아니라 열, 한냉, 자외선 및 기계적 자극과 같은 물리적 인자들에 항상 노출되어 있어서 외부로부터 유입되거나 또는 내부에서 생겨난 유해한 인자들로부터 개체를 보호하는 임무를 수행하고 있고, 개체를 보호하는 임무의 대부분이 면역반응과 직접 또는 간접적으로 관련되어 있다<sup>1)</sup>.

염증성 피부질환을 한의학에서는 瘡瘍의 범주로 분류하며, 瘡瘍의 원인은 크게 暑, 火, 情志不和, 勞倦으로 나누어 볼 수 있으며,<sup>2)</sup> 치료에 있어서는 변증에 따라 解表, 清熱, 解毒, 利濕, 理血, 內托, 補益 등의 치법을 활용하고 있다. 《素問·至真要大論》<sup>3)</sup>에서는 “諸痛痒瘡 皆屬於心”이라 하였고, 《靈樞·癰疽篇》<sup>4)</sup>에서는 “大熱不止 熱極則腐肉”이라 하여서 血絡이 灼傷하여 피부에 潮紅, 灼熱, 腫痛, 斑疹, 出血 등이 유발한다고 보았는데, 이러한 염증성 질환은 實證으로 변증하여 치료에 있어서는 清熱解毒法이 주를 이룬다.

또한 피부는 체온조절, 감각기능, 흡수기능 등 다양한 기능을 수행하고 있어서 최근에는 자외선 등 해로운 외부환경으로부터 피부를 보호하는 피부내의 광 방어기작, 특히 피부흑화와 주름발생에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>1)</sup>. 노화현상이 진행됨에 따라 안면부의 피부색이 불균일해지거나 건조한 각질이 많아지고 피부가 위축되거나 처지는 등 주름이 증가하게 된다. 한의학 이론에서는 선천의 腎精을 滋養하지 못하거나 여러 가지 원인에 의하여

臟腑의 영양 공급에 이상이 초래되면 인체는 정상적으로 성장발육하지 못하는 것으로 인식되고 있어서<sup>5)</sup>, 최근 이런 노화의 예방 및 방지책으로 한방 원료를 이용한 한방 기능성 제품들의 연구개발이 진행되고 있다<sup>6)</sup>.

性味가 苦寒하여 瀉下通便시키고 또한 清肝火시키는 효능이 있는 알로에<sup>7)</sup>는 박<sup>8)</sup>, 박<sup>9)</sup>, 정<sup>10)</sup>, 하<sup>11)</sup> 등에 의해 당뇨병, 간장질환, 지질대사에 효과가 입증되었으며, 한<sup>12)</sup>에 의해 미백효과가 있음이, 윤등<sup>13)</sup>에 의해 급성기 아토피피부염 환자에게 효과가 있음을 발표된 바 있다. 그럼에도 최근 무절제한 건강식품으로 과용하면서 과민반응도 속출하고 있다<sup>14,15)</sup>. 性味가 苦寒하여 清熱解毒하고 涼血消腫시키는 효능이 있는 紫花地丁<sup>7)</sup>은 진통 및 소염작용에 연구<sup>16)</sup>과 면역억제에 대한 연구<sup>17)</sup>가 발표된 바가 있다. 그러나, 蘆薈와 紫花地丁의 항염 이외의 항산화, 주름, 미백에 대해 연구한 예가 부족한 실정이다.

이에 저자는 피부질환에 다용하는 蘆薈와 紫花地丁의 피부질환 및 피부미용에 대한 생물학적 효능을 입증하기 위하여 항산화력, 항염을 비롯하여 피부 주름발생 억제, 피부 미백과 관련된 효소 및 멜라닌 세포에 미치는 영향, 세포독성 등을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 처방 내용 및 검액의 제조

본 실험에 사용된 蘆薈와 紫花地丁은 우리물산(대전)에서 구입하였다(Table 1). 실험에 사용된 모든 약재는 1.2 kg의 분량을 한약재분쇄기를 이용

교신저자 : 김창훈, 충남 아산시 보건소 한방진료실  
(Tel : 041-537-3443, E-mail : sunnymun@korea, kr)  
• 접수 2010/02/28 • 수정 2010/03/27 • 채택 2010/04/02

해 100-200 mesh 크기로 분쇄시킨 후 ethanol을 약 1,200 ml (약 1:10 weight/volume)을 가하여 5일간 냉침하여 추출하였다. 추출한 약제는 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. Herbal Extracts for Experiments

한 약 명	학 명	원 산 지
蘆 薈	<i>Aloe ferox</i> Miller	중 국
紫花地丁	<i>Viola mandshurica</i> Baker	중 국

## 2) 시약, 초자 및 실험기기

세포배양을 이용한 실험의 시약으로는 Dulbecco's Modified Eagle Medium, Fetal Bovine Serum, Antibiotic-Antimycotic (Penicillin G Sodium, Streptomycin sulfate, AmpHotericin B), Trypsin-EDTA (이상 Gibco BRL, U.S.A.), Sodium Bicarbonate, LPS, GRIESS (이상 Sigma, U.S.A.)을 사용하였으며, RT-PCR 시약으로는 M-MLV Reverse Transcriptase, Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs), Random Hexamer (이상 Promega, U.S.A.), HiPi Thermostable DNA Polymerase, 100bp DNA Ladder Marker (이상 엘피스바이오텍, 한국), Easy blue, Proprep, Westzol (이상 Intron, 한국), Chloroform, Isopropanol (이상 Sigma, U.S.A.)을 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, U.S.A.), Collagenase와 DABYCL- $\gamma$ -Abu-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu(EDANS)-Ala-Lys-NH<sub>2</sub> (Bachem, Swiss), Xanthine oxidase (Roche, Deutschland), Lipofectamin(Invitrogen, 한국), Luciferase Assay buffer (Promega, U.S.A.), COX-2 ELISA Kit (Amersham, U.S.A), TNF- $\alpha$  ELISA Kit (Biosource, U.S.A), MNT-1 (National Cancer Institutem U.S.A) 을 사용하였다.

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

실험기기로는 GeneAmp PCR System, Luminometer, Fluorimeter (이상 Perkin Elmer, U.S.A.), Spectrophotometer, Refrigerated High Speed Centrifuge, pH Meter (Beckman, U.S.A.), ELISA Reader (Bio-TeK, U.S.A), Polaroid camera (Polaroid, U.K.), Microcentrifuge, Refrigerated Microcentrifuge (이상 한일과학, 한국), Electrophoresis System (Hoefer, U.S.A.), Transilluminator (Vilber Lourmat, France), Inverted Microscope, Camera (이상 Nikon, Japan), Clean Bench (수공양행, 한국), CO<sub>2</sub> Incubator (Forma 3546, U.S.A.), Rotary Evaporator System (BCHI, Swetzerland), Incubator (제이오텍, 한국)을 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 항산화력 평가

- ① Free radical scavenging activity(DPPH법)  
 무수에탄올로 0.01%와 0.001%로 희석한 실험물질 50  $\mu$ l에 ethanol로 녹인  $4 \times 10^{-4}$  M 1,1-diphenyl-2-picryl-hyrazyl(이하 DPPH) solution (518 nm에서의 흡광도: 0.94-0.98) 450  $\mu$ l를 가한 후, 518 nm에서 10분간 흡광도를 측정하였다. 18 양성대조군으로는 free radical scavenging 효과가 우수한 물질로 잘 알려진 vitamin E를 이용하였다. 항산화력은 아래의 식을 이용하였으며, 모든 실험은 triplicate로 실시하였다.

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 최종농도가 100  $\mu$ g/ml과 10  $\mu$ g/ml가 되도록 희석한 시료 500  $\mu$ l에 60 mM phosphate buffer(pH 7.5) 1.3 ml와 xanthine oxidase enzyme solution을 가하고 30°C에서 10분간 배양하였다. 여기에 xanthine (substrate solution) 1.5 ml을 가한 후 spectrophotometer를 활용하여 295 nm 흡광도에서 10분 동안 측정하였다<sup>19)</sup>. Xanthine oxidase 활성억제력은 아래의 식으로 계산하였다.

inhibition (%) =

$$\left( 1 - \frac{\Delta A / \min_{test}}{\Delta A / \min_{blank}} \right) \times 100$$

### 2) 항염효과 평가

- ① Nitric oxide (이하 NO) 형성 억제력 평가  
 RAW 264.7 세포주 (ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS 법으로 NO 형성 억제력 실험을 실시하였다. 10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 파종하여 5% CO2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS free media로 12시간 starvation시킨 후, phenol red를 첨가되지 않은 배지에 희석한 실험물질을 100  $\mu$ g/ml와 10  $\mu$ g/ml의 농도로 가해 15분간 처리하였다. Lipopolysaccharide(이하 LPS)를 0.5  $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 16시간 배양한 후, 상층액을 100  $\mu$ l씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100  $\mu$ l씩 가해 상온에서 15분간 반응시키고, ELISA reader로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다<sup>20),21)</sup>.
- ② IL-1 $\beta$ 와 IL-6 유전자 발현 평가를 위한 역전사 중합효소 연쇄반응 (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction : 이하 RT-PCR)  
 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 유전자 발현을 평가하기 위해 RT-PCR를 수행 하였다. Monolayer를 형성한 RAW 264.7 세포를 배양용기에서 떼어내고,  $1 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 희석시킨 후 12 well dish에 넣어 90% 정도까지 성장할 때까지 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 세포배양액을 교체하고, ethanol로 희석한 실험물질을 dish당 100 ppm과 10 ppm의 농도로 가하여 16시간 동안 처리하였다. 이때 대조군으로는 ethanol을 사용하였다.
- ③ Total RNA 분리  
 RAW 264.7 세포로부터 total RNA를 분

리하는 과정은 guanidinium thiocyanate-phenol chloroform법에 준하여 실시하였다<sup>22)</sup>. 즉, 시료를 처리한 배지를 제거한 후 Easy blue(Intron, Korea) 1 ml을 가해 녹여 micropipet으로 섞고 eppendorf tube로 옮겼다. 여기에 Chloroform을 200  $\mu$ l 가하여 1분간 세차게 흔든 후 4°C에서 15분간 방치하고 원심분리(14,000 rpm, 15분, 4°C)하고, 상층액 400  $\mu$ l를 취하여 새 eppendorf tube에 옮겼다. Isopropanol을 동량을 가하여 -20°C에서 1시간 방치시킨 후 원심분리(14,000 rpm, 15분, 4°C)하여 상층액을 제거하고 침전물을 cold 80% ethanol로 한번 씻은 후, DEPC처리된 이온교환수 30  $\mu$ l을 가하여 녹였다. 이중 일부를 취하여 spectrophotometer로 260 nm과 280 nm에서 흡광도를 측정해 total RNA를 정량하였다.

⑥ RT-PCR

분리한 total RNA 4  $\mu$ g를 eppendorf tube에 넣고 random hexamer (10 pmol/20  $\mu$ l)를 첨가하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 여기에 반응액(1×buffer, 100 uM dNTPs, 200 unit RTase)을 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 65°C에서 10분간 처리하여 RT 반응을 종료시켰다.

PCR은 상기한 RT 반응액을 PCR tube에 가하여 PCR machine에서 94°C/30초, 58°C/1분, 72°C/1분의 조건으로 각각 24 회 증폭하였다. 본 실험에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 2와 같다. RT-PCR 결과는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, UV illuminator 위에서 polaroid camera를 이용해 사진 촬영하였으며, 결과는 densitometer를 이용해 판정하였다.

③ TNF- $\alpha$  assay

10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전배양한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 24 well plate에 파종하여 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS free DMEM media로 12시간 starvation시킨 후, phenol red를 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 실험 물질을 10  $\mu$ g/ml의 농도로 가해 15분간 처리하였다. LPS를 0.5  $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 16시간 배양한 후, 상층액을 취해 ELISA Kit(Biosource, USA)를 이용해 TNF- $\alpha$ 를 정량하였다.

④ Nuclear factor-kB(이하 NF-kB) luciferase assay

10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전배양한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 6 well plate에 파종하여

Table 2. Nucleotide Sequence of the Primers and Expected Size of PCR Products

Primer		Sequence	Size
IL-1 $\beta$	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'	

5% CO2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS free DMEM media로 12시간 starvation시킨 후 lipofectamin 1  $\mu$ l와 NF-kB reporter gene 2  $\mu$ g/well을 가하여 37°C, 5% CO2 incubator에서 16시간 동안 transfection시키고, FBS가 첨가되지 않은 DMEM으로 배지를 교환하여 8시간 다시 배양하였다. 시료를 30분간 전 처리하고 LPS가 500 ng/ml의 농도가 되도록 처리하여 24시간 배양한 후 luciferase assay buffer를 이용하여 세포를 용해시키고 luminometer를 이용해 발광 정도를 측정하였다<sup>23)</sup>.

- ⑤ Cyclooxygenase-2(이하 COX-2) 활성억제력  
96 well plate에 RAW 264.7 세포를 1×105 cells/well의 농도로 파종한 후 37°C, 5% CO2 incubator에서 4시간 배양하여 부착시키고 배양액을 제거하였다. PBS로 세척 후 3% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 well당 200  $\mu$ l씩 첨가하고, arachidonic acid를 가하여 18시간 배양하였다. 대식세포를 활성화시키는 LPS와 한약재 추출물을 10  $\mu$ g/ml의 농도로 첨가하고 37°C, 5% CO2 incubator에서 18시간 배양한 후, 상층액을 취하고 ELISA Kit를 이용해 prostaglandin E2를 정량하였다<sup>24)</sup>.

- ⑥ JNK와 p38에 미치는 영향  
10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW 264.7 cell을 6 well plate에 1×105 cells/well의 농도로 파종한 후 37°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  $\mu$ g/ml)을 well당 2.5  $\mu$ l씩 가하여 20분간 배양하고, PBS로 씻어 proprep을 well당 80  $\mu$ l씩 가하여 용해시킨

다음 eppendorf tube로 옮겨 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 20min)하였다. 50  $\mu$ g을 취해 SDS-PAGE 전기영동을 실시하고 methanol로 활성화시킨 PVDF membrane로 transfer시킨 후, 3% skim milk로 30분간 처리하고 각각의 total antibody와 phospho antibody에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.1% Tween 20- PBS을 이용해 씻고 rabbit Poly IgG에 1시간 반응시킨 후, 다시 씻고 Westsol을 이용해 실험결과를 관찰하였다.

### 3) 피부 주름억제에 미치는 영향 평가

- ① Collagenase 활성억제력 평가  
시료를 DMSO로 녹인 후 collagenase assay buffer (150 mM Tris, 10 mM NaCl, 5 mM CaCl2, 1 mM ZnCl2, 0.01% Brij35)를 이용해 희석하였다. Test solution 5  $\mu$ l, buffer 125, 500  $\mu$ M 기질(DABYCL- $\gamma$ -Abu-Pro-Gln-Gly-Leu-Glu(EDANS)-Ala-Lys-NH2) 5  $\mu$ l, 효소 125 ppm을 혼합하여 5분간 잘 섞고, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5 M EDTA 10  $\mu$ l를 넣어 반응을 종료시키고 Fluorimeter(340 nm/520 nm)에서 결과를 측정하였다. 반응 억제율은 아래의 식을 활용해 계산 하였다<sup>25)</sup>.

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  
시료는 무수에탄올을 이용해 희석하였다. 준비된 test solution 50  $\mu$ l에 0.4 M Hepes buffer(pH6.8) 330  $\mu$ l, Suc-(Ala)3-PNA 100  $\mu$ l를 혼합하고 25°C에서 3분 40초간 전배양

하고, elastase 20  $\mu$ (0.5 unit)를 첨가하여 spectrophotometer에서 410 nm 흡광도에서 1분간 측정하였다<sup>26)</sup>. Blank로는 추출물이 포함되지 않은 HEPES buffer를 사용하였으며, 효소 억제율은 아래의 식을 활용해 계산하였다.

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

#### 4) 피부 미백효능 평가

##### ① Tyrosinase 활성 억제력 평가

시료는 5% DMSO에 녹이고 100 mM sodium phosphate buffer로 희석하였다. 각각의 실험물질 100  $\mu$ 와 기질(4 mM L-Dopa용액) 100  $\mu$ 를 혼합한 후, 새롭게 제조한 mushroom tyrosinase(2 mg/ml)용액 2  $\mu$ 를 첨가하여 혼합한 후 472 nm에서 흡광도를 spectrophotometer로 2분간 측정해 반응경사도로 구하였다<sup>27)</sup>. 용매로 사용한 DMSO의 저해효과를 보정하기 위하여 측정하고자 하는 시료의 양에 해당하는 DMSO 용액을 가하여 대조군으로 하였다.

##### ② MNT-1 Cell를 활용한 멜라닌 생성억제력 평가

MNT-1 세포주를 100 mm culture dish에  $5 \times 10^5$ 개의 농도로 파종한 뒤, 다음날 시료를 처리 하고 3일간 더 배양 하였다. PBS(pH 7.4)로 세척하여 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 세포를 배양용기로부터 떼어내고, 원심분리하여 pellet을 육안관찰한 후 사진촬영하였다. 육안관찰과 사진촬영 결과 멜라닌 생성억제력이 확인된 결과물은 5% trichloroacetic acid 용액 1 ml을 가해 혼합하였다. 이를 2,500 rpm으로 원심분리한 후, 분리된 멜라닌을 PBS로 세척하고 ether와

ethanol을 1:3으로 섞은 용액을 첨가 한 후 멜라닌 pellet을 원심분리 하였다. Ethyl ether 1 ml로 멜라닌을 세척하여 건조시키고, 건조된 멜라닌에 1 N KOH를 가하여 1시간 동안 56°C 항온수조(water bath)에서 배양한 후, 470 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>27),28)</sup>.

#### 5) 세포독성 평가

V-79 세포주 (ATCC CCL-93)를 이용해 MTT법으로 세포독성을 평가하였다. 10% FCS가 첨된 DMEM으로 전 배양한 V-79 cell을 96 well plate에  $5 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 파종하고 5% CO2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FCS를 첨가되지 않은 배지에 희석한 시료를 첨가하고 24시간 배양시킨 후, 배지를 제거하고 MTT용액을 1  $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 37°C에서 3시간 반응시켰다. 미반응된 MTT를 제거하고 ethanol 100  $\mu$ 를 가해 형성된 반응물을 용해시키고, ELISA reader로 550 nm에서의 흡광도를 측정해 세포독성을 확인하였다<sup>29)</sup>.

#### 6) 통계처리

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

### III. 실험 결과

#### 1. 항산화력 평가

##### 1) DPPH 법

蘆薈 추출물은 0.01%와 0.001%의 농도에서 각각 97.6%와 95.7%, 紫花地丁 추출물은 0.01%와 0.001%의 농도에서 각각 95.5%와 38.4% 억제시키는 것으로 나타났다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Radical Scavenging Activities of the Herbal Extracts

Group	Concentration	Absorbance <sub>518nm</sub>	Radical Scavenging Activity
Control		0.9600±0.0079 <sup>a)</sup>	-
A	0.01%	0.0005±0.0005 <sup>*</sup>	100%
	0.001%	0.6195±0.0064 <sup>*</sup>	36.1%
B	0.01%	0.0235±0.0009 <sup>*</sup>	97.6%
	0.001%	0.0416±0.0009 <sup>*</sup>	95.7%
C	0.01%	0.0717±0.0027 <sup>*</sup>	95.5%
	0.001%	0.6299±0.0142 <sup>*</sup>	38.4%

a) Mean ± SD

control : untreated group

A : treated with Vitamin E

B : treated with *Aloe ferox* 50 µl

C : treated with *Viola mandshurica* 50 µl

Statistically significant value compared with control group by T test.

(\* : P < 0.05 )

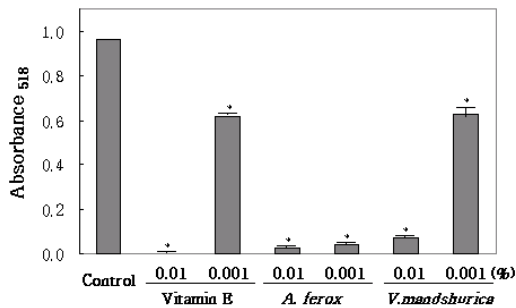


Fig. 1. Radical scavenging activities of the herbal extracts

Statistically significant value compared with control group by T test.

(\* : P < 0.05 )

## 2) Xanthine oxidase activity에 미치는 영향

蘆薈 추출물은 100µg/ml와 10µg/ml의 농도에서 각각 59.1%와 17.0%, 紫花地丁 추출물은 100µg/ml와 10µg/ml의 농도에서 각각 59.1%와 17.0%의 억제효과가 나타났다(Table 4).

Table 4. Inhibition of Xanthine Oxidase Activities by the Herbal Extracts

	Concentrations	Absorbance <sub>295nm</sub>		Inhibition Rate
		0 min.	10 min.	
A	Blank	0.1105	0.2828	-
	100µg/ml	1.0758	1.1461	59.1%
	10µg/ml	0.1718	0.3148	17.0%
B	Blank	0.1306	0.2985	-
	100µg/ml	0.3996	0.4988	40.9%
	10µg/ml	0.1720	0.2916	26.1%

A : *Aloe ferox*, B : *Viola mandshurica*

## 2. 항염 효과

### 1) NO 생성에 미치는 영향 평가

蘆薈 추출물이 100µg/ml과 10µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 72.7%와 57.9% 억제시켰으며, 紫花地丁 추출물도 100µg/ml과 10µg/ml의 농도에서 각각 90.1%와 58.4% 억제시켰다(Table 5, Fig. 2).



Table 5. Inhibitory Effects of NO Synthesis by the Herbal Extracts

Samples		Control1)	LPS2)	Concentrations3)	
				100 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
<i>Aloe ferox</i>	Absorbance <sub>540nm</sub>	0.1273 $\pm 0.0074a$	0.3123 $\pm 0.0148$	0.1778 $\pm 0.0311^*$	0.2051 $\pm 0.0101^*$
	Reduction Rate	-	-	72.7%	57.9%
<i>Viola mandshurica</i>	Absorbance <sub>540nm</sub>	0.1273 $\pm 0.0074$	0.3123 $\pm 0.0148$	0.1456 $\pm 0.0119^*$	0.2043 $\pm 0.0173^*$
	Reduction Rate	-	-	90.1%	58.4%

a) Mean  $\pm$  SD

1) Non-treated group

2) LPS treated group

3) LPS + medicinal plant treated group

Statistically significant value compared with control group by T test.

(\* : P < 0.05 )

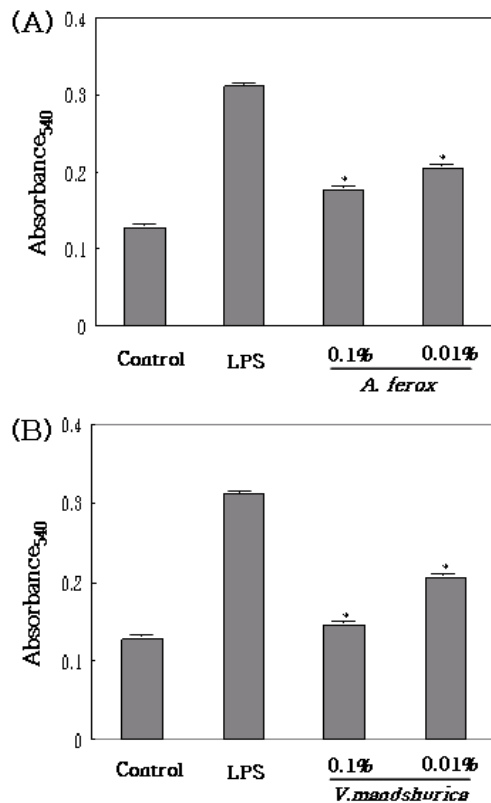


Fig. 2. Inhibitory effects of NO synthesis by the herbal extracts

(A), *Aloe ferox* and (B), *Viola mandshurica*

Statistically significant value compared with control group by T test.

(\* : P < 0.05 )

2) IL-1 $\beta$  와 IL-6 유전자 발현에 미치는 영향

蘆薈 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 유전자의 발현을 각각 90.7%, 87.9% 억제시켰다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 IL-1 $\beta$  유전자의 발현을 82.5% 억제시켰다. 紫花地丁 추출물은 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 유전자의 발현에 영향을 주지 못하였다 (Table 6, Fig. 3).

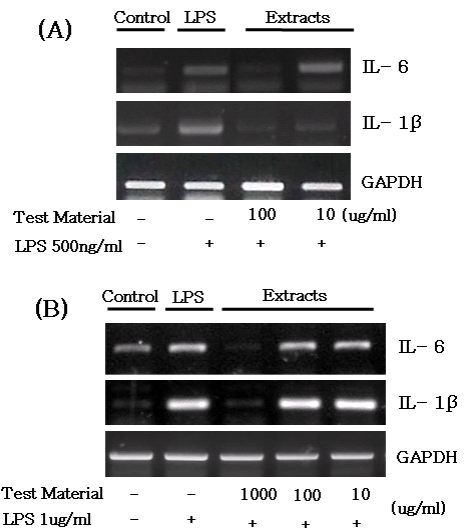


Fig. 3. Effects of the herbal extracts on the mRNA Levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 in the cultured RAW 264.7 cells by RT-PCR

(A) *Aloe ferox* and (B) *Viola mandshurica*

Table 6. Effects of the Herbal Extracts on the mRNA Levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 in the Cultured RAW 264.7 Cells by RT-PCR

(A) *Aloe ferox*

		Control <sup>1)</sup>	LPS <sup>2)</sup>	Concentrations <sup>3)</sup>	
				100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml
IL-6	Densitometer	227	810	75	1,294
	Inhibition Rate	-	-	90.7%	-59.7%
IL-1 $\beta$	Densitometer	1,104	1,745	211	305
	Inhibition Rate	-	-	87.9%	82.5%

(B) *Viola mandshurica*

		Control <sup>1)</sup>	LPS <sup>2)</sup>	Concentrations <sup>3)</sup>		
				1000 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml
IL-6	Densitometer	1,481	2,460	208	2,356	2,199
	Inhibition Rate	-	-	91.5%	4.2%	10.7%
IL-1 $\beta$	Densitometer	459	3,891	319	4,101	4,275
	Inhibition Rate	-	-	91.8%	-5.4%	-9.9%

1) Non-treated group

2) LPS treated group

3) LPS + medicinal plant treated group

Table 7. Effects of the Herbal Extracts on TNF- $\alpha$  Production in RAW 264.7 Cells Determined by ELISA

	Control <sup>1)</sup>	LPS <sup>2)</sup>	<i>Aloe ferox</i>		<i>Viola mandshurica</i>	
			100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	92 $\pm$ 8.5 <sup>a)</sup>	393 $\pm$ 62	90 $\pm$ 2*	275 $\pm$ 37	290 $\pm$ 43	327 $\pm$ 61
Inhibition Rate	-	-	100%	39.2%	34.2%	21.9%

1) Non-treated group

2) LPS treated group

a) Mean  $\pm$  SD

Statistically significant value compared with control group by T test.

( \* : P < 0.05 )

3) TNF- $\alpha$  활성 억제력 평가

蘆薈 추출물은 100 $\mu$ g/ml와 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 100%와 39.2% 억제시켰으나, 紫花地丁 추출물은 100 $\mu$ g/ml와 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 34.2%와 21.9% 억제시켰다(Table 7, Fig. 4).

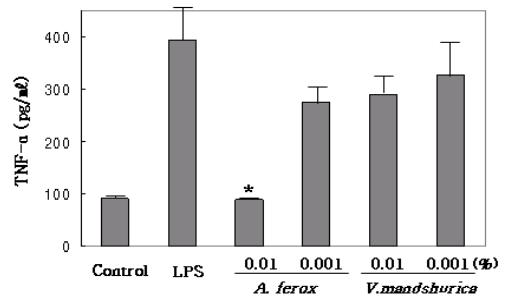


Fig. 4. Effects of the herbal extracts on TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells determined by ELISA

Statistically significant value compared with control group by T test.

( \* : P < 0.05 )

4) NF- $\kappa$ B luciferase assay

蘆薈 추출물은 NF- $\kappa$ B를 10  $\mu$ g/ml의 농도에 53.2%을 억제시켰으며, 紫花地丁 추출물은 NF- $\kappa$ B를 10  $\mu$ g/ml의 농도에서 35.7% 억제시켰다(Table 8, Fig. 5).

Table 8. Effects of the Herbal Extracts on NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 Cells Transiently Transfected with NF- $\kappa$ B Gene

	Relative Light Unit	Inhibition Rate
Control	123 $\pm$ 29 <sup>a)</sup>	-
A	5,974 $\pm$ 210	-
B	2,863 $\pm$ 456*	53.2%
C	3,884 $\pm$ 301*	35.7%

control : Non-treated group  
 A : NF- $\kappa$ B transfection+LPS(0.5 $\mu$ g/ml)  
 B : NF- $\kappa$ B transfection+LPS(0.5 $\mu$ g/ml)+Aloe ferox Ext.(10 $\mu$ g/ml)  
 C : NF- $\kappa$ B transfection+LPS(0.5 $\mu$ g/ml)+Viola mandshurica Ext.(10 $\mu$ g/ml)  
 a) : Mean  $\pm$  SD  
 Statistically significant value compared with control group by T test.  
 (\* : P < 0.05 )

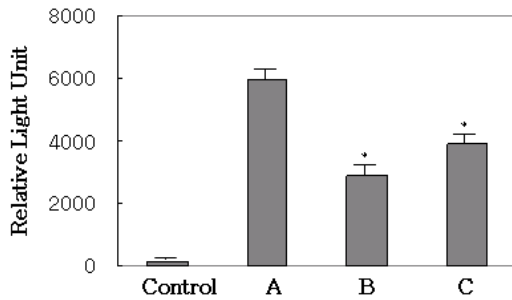


Fig. 5. Effects of the herbal extracts on NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells transiently transfected with NF- $\kappa$ B gene

A : NF- $\kappa$ B transfection+LPS (0.5 $\mu$ g/ml)  
 B : NF- $\kappa$ B transfection+LPS (0.5 $\mu$ g/ml)+Aloe ferox Ext. (10 $\mu$ g/ml)  
 C : NF- $\kappa$ B transfection+LPS(0.5 $\mu$ g/ml)+Viola mandshurica Ext. (10 $\mu$ g/ml)  
 Statistically significant value compared with control group by T test.  
 (\* : P < 0.05 )

5) Cyclooxygenase-2 활성억제력 평가

蘆薈와 紫花地丁 추출물은 LPS의 자극으로 RAW 264.7 세포에서 활성화되는 COX-2 효소의 활성을 13.2%, 75.8% 억제시켰다(Table 9, Fig. 6).

Table 9. Effects of the Herbal Extracts on COX-2 Activities in RAW 264.7 Cells Stimulated by LPS

		PGE2* (pg/well)	Inhibition Rate
Control <sup>1)</sup>		5	-
LPS <sup>2)</sup>		188	-
<i>Aloe ferox</i>	10 $\mu$ g/ml	164	13.2%
<i>Viola mandshurica</i>	10 $\mu$ g/ml	50	75.8%

\* Prostaglandin E2  
 1) Non-treated group  
 2) LPS treated group

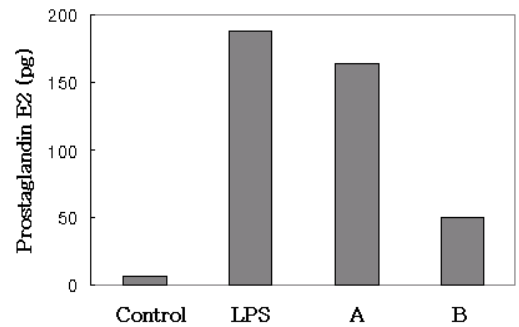


Fig. 6. Effects of the herbal extracts on COX-2 activities in RAW 264.7 cells stimulated by LPS

(A), *Aloe ferox* and (B), *Viola mandshurica*

6) JNK와 p38에 미치는 영향

蘆薈와 紫花地丁 추출물 모두 Jun-N-terminal kinase(JNK)를 약간 억제시켰으나 p38에는 영향을 미치지 못했다(Fig. 7).

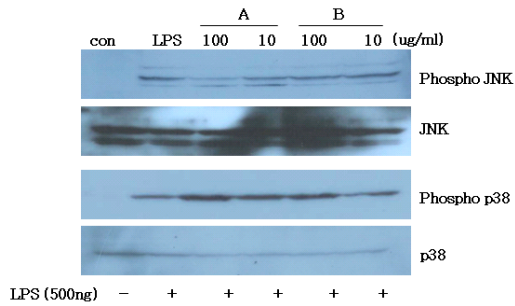


Fig. 7. Effects of the herbal extracts on MAP kinase in RAW 264.7 cells determined by Western Blot  
(A), *Aloe ferox* and (B), *Viola mandshurica*

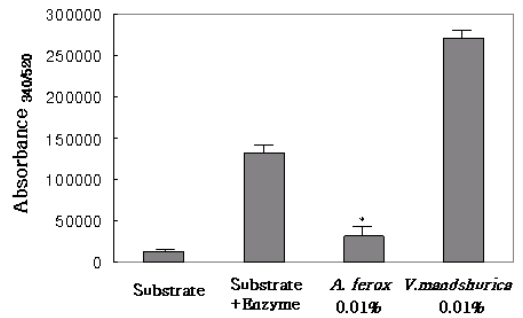


Fig. 8. Effects of the herbal extracts on Collagenase activities  
Statistically significant value compared with control group by T test.  
(\* : P < 0.05)

### 3. 피부 주름 발생 억제

#### 1) Collagenase 활성억제력 평가

100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 蘆薈추출물은 84.1%의 Collagenase 효소의 활성 억제력을 보였으나, 紫花地丁 추출물은 효소의 활성을 거의 억제시키지 못하였다(Table 10, Fig. 8).

#### 2) Elastase 활성억제력 평가

50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 蘆薈 추출물이 elastase 효소의 활성을 79.4% 억제시켰으며, 紫花地丁 추출물은 elastase 효소의 활성을 47.9% 억제시켰다 (Table 11).

Table 10. Effects of the Herbal Extracts on Collagenase Activities

Sample	Concentration	Absorbance <sub>340nm/520nm</sub>	Reduction Rate
Substrate only		13,133 ± 540 <sup>a)</sup>	-
Substrate + Enzyme		131,714 ± 3,647	-
<i>Aloe ferox</i>	100 $\mu\text{g/ml}$	31,982 ± 2,717	84.1 %
<i>Viola mandshurica</i>	100 $\mu\text{g/ml}$	271,541 ± 6,674	-117 %

a) : Mean ± SD

Statistically significant value compared with control group by T test.

(\* : P < 0.05)

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>Aloe ferox</i>	50 $\mu\text{g/ml}$	0.0694	0.0981	79.4%
<i>Viola mandshurica</i>	50 $\mu\text{g/ml}$	0.1578	0.2304	47.9%

#### 4. 미백 효능 평가

##### 1) Tyrosinase 활성 억제력 평가

蘆薈 추출물은 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 tyrosinase 효소의 활성을 55.9% 억제시키고, 紫花地丁 추출물은 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 tyrosinase 효소의 활성을 40.1% 억제시켰다(Table 12).

##### 2) 멜라닌 합성 저해능 평가

MNT-1 세포를 대상으로 한 실험에서 蘆薈와 紫花地丁추출물 모두 멜라닌 생성 억제능이 없는 것으로 나타났다(Table 13, Fig. 9).

#### 5. 세포독성 평가

蘆薈와 紫花地丁 추출물은 최고 농도인 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 10).

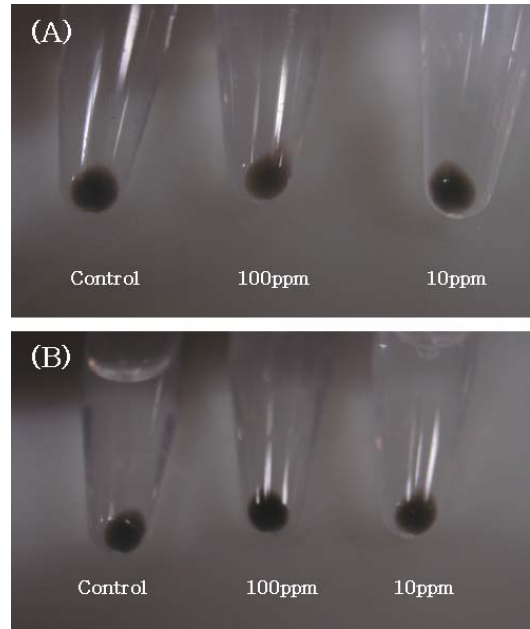


Fig. 9. Effects of the herbal extracts on melanin Synthesis in MNT-1 cells  
(A), *Aloe ferox* and (B), *Viola mandshurica*

Table 12. Effects of the Herbal Extracts on Tyrosinase Activities

	Concentration	Absorbance <sub>472nm</sub>		Reduction Rate
		0 min.	5 min.	
Control <sup>1)</sup>		0.2365±0.0229 <sup>a)</sup>	0.5874±0.0080	-
Ethanol <sup>2)</sup>		0.1942±0.0407	0.5045±0.0319	11.6%
<i>Aloe ferox</i>	10 $\mu\text{g/ml}$	0.4710±0.0118	0.6258±0.0742	55.9%
<i>Viola mandshurica</i>	10 $\mu\text{g/ml}$	0.3197±0.0138	0.5298±0.0332	40.1%

1) Non-treated group

2) LPS treated group

a) : Mean  $\pm$  SD

Table 13. Effects of the Herbal Extracts on Melanin Synthesis in MNT-1 Cells

Sample	Concentration	Absorbance <sub>470nm</sub>
Control*		0.1139
<i>Aloe ferox</i>	10 $\mu\text{g/ml}$	0.1149
<i>Viola mandshurica</i>	10 $\mu\text{g/ml}$	0.1364

\* : Non-treated group

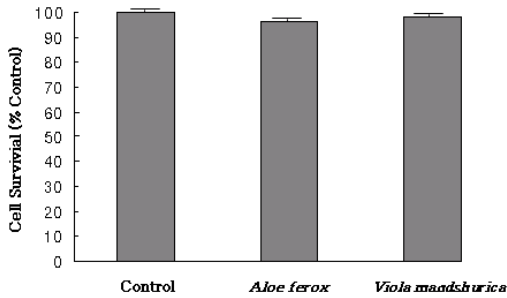


Fig. 10. Cytotoxicities of the herbal extracts at a concentration of 100 µg/ml

#### Ⅳ. 고 찰

蘆薈는百合科(백합과; Liliaceae)에 속한 다년생 초본인 알로에 *Aloe vera* L. 또는 동속 근속식물의 葉汁을 건조한 것으로 性은寒 無毒하고 味는苦하며, 肝, 大腸에 歸經한다. 瀉下通便시키고 清肝火시키는 효능이 있어 습관성 변비와 熱性便秘, 頭暈頭痛과 煩燥易怒, 癩癬를 치료하는데 효과가 있다. 이 외에도 殺蟲시키는 효능이 있어서 蟲積腹痛으로 面色이 萎黃하고 消瘦한 小兒의 疳積를 治療하고, 또한 外用하여 癬瘡를 치료하는데, 약리학상 주요 성분으로는 aloin (barbaloin), isobarbaloin, β-barbaloin 및 樹脂를 함유하고 있다<sup>7)</sup>.

蘆薈에 대해서는 다양한 연구가 이루어져 왔는데<sup>8-11)</sup>, 최근 비의료인의 권유에 따른 알로에 과민 반응에 의한 부작용에 국내외에서 보고되고 있다<sup>14,15)</sup>. 반면 한의계에서는 알로에의 피부 미백에 대한 효과<sup>12)</sup>와 蘆薈 Dressing을 활용한 급성기 아토피피부염 환자 치험 8례를 보고<sup>13)</sup>하면서 피부염이 지속적인 재발하거나, 경구투여를 통한 약물치료에 반응하지 않는 환자들에게 대안적인 치료법으로 발표하였다.

紫花地丁은 堇菜科(제비꽃과; Violaceae)에 속한 다년생 초본인 호제비꽃 *Viola yedoensis* MAK.의 帶根한 全草를 건조한 것으로 性은寒 無毒하고

味는苦辛하며, 心, 肝에 歸經한다. 清熱解毒하고 涼血消腫시키는 效能이 있어 血熱이 壅滯되어 나타나는 紅腫熱痛의 疔癰瘡癤을 治療한다. 약리학상 주요성분으로 진초에는 配糖體, flavonoid, 蠟(cerotin 酸 및 不飽和酸 등의 ester類로 구성된다)이 함유되어 있으며, 꽃에는 蠟이 함유되어 있고, 그 속에는 飽和酸(주로 cerotin 酸) 34.9%, 不飽和酸 5.8%, 알콜類 10.3%, 炭化水素 약 47%가 포함되어 있다<sup>7)</sup>.

紫花地丁에 대한 연구로는 진통 및 소염작용에 관한 연구<sup>16)</sup>와 IL-1β와 TNF-α로 유발된 cytokine의 억제 효과연구<sup>17)</sup>가 진행되어 발표되었다.

활성산소는 이온의 상태가 불안하여 다른 물질과 결합해 안정화되려는 성질, 즉 강한 반응성을 지니는 특성을 가진 산소를 말하는데, 이는 인체 내의 정상세포의 대사과정 중의 여러 산화반응의 부산물로 만들어진다. 활성산소는 식세포에 의해 만들어져 감염반응을 조절하는 긍정적인 역할을 하는 반면, 이산화 방사선, 자외선, 환경공해, 심한 운동을 할 경우에 만들어져, 생체조직을 공격해 각종 염증질환과 암, 간장 장애, 동맥경화, 위염 등 많은 질병을 일으키는 원인의 하나로 알려져 있으며, 궁극적으로는 노화의 한 원인인 것으로 알려져 있다. 이러한 활성산소의 피해로부터 생체조직을 보호하기 위해서는 이미 존재하는 유리가 다른 분자와 반응하기 전에 인체에 무해한 형태로 바꾸고, 다른 분자들로부터 자유 유리의 형성을 억제시키는 항산화제의 사용이 일반적이다<sup>30)</sup>.

蘆薈와 紫花地丁 추출물이 염증반응과정에서 중요한 역할을 하고 있는 활성산소를 제거하는 radical scavenger로서의 활성도를 조사하기 위해 DPPH법을 이용하여 항산화력 실험을 실시한 결과, 蘆薈 추출물은 0.01%와 0.001%의 농도에서 각각 97.6%와 95.7%, 紫花地丁 추출물은 0.01%와 0.001%의 농도에서 각각 95.5%와 38.4% 억제

시키는 것으로 나타났다(Table 3, Fig. 1).

Xanthine oxidase 활성 억제력을 평가한 결과 蘆薈 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$ 와 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 59.1%와 17.0%, 紫花地丁 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$ 와 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 59.1%와 17.0%의 억제효과가 나타났다(Table 4). 이는 향후 염증 치료 및 억제를 위한 항산화물질로의 역할이 있다고 볼 수 있다.

염증은 한의학적으로 瘡瘍의 범주에 속하며, 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으로 癰, 疽, 疔, 癤, 疥, 癬, 疖, 毒, 風, 癩癧, 癭瘤, 流痰, 痘疹, 疔, 瘰, 疔, 疔, 疔 등을 포함하는 개념이며, 좁은 의미로는 感染性疾患으로 발생하는 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 病變을 말한다<sup>2)</sup>.

瘡瘍의 原因으로 陳<sup>31)</sup>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 飲食飢飽, 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》<sup>32)</sup>에서는 “運氣學的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 변하여 熱이 많으면 肉이 腐蝕되어 膿이 형성된다”고 하였고, 華佗<sup>33)</sup>는 “榮衛壅塞으로 발병하거나 五臟六腑의 蓄毒이 원인이 된다”고 하였으며, 王 등<sup>34,35)</sup>은 “虛邪가 犯하거나 榮衛가 經絡에 停留되거나 喜怒가 不節하거나 飲食不節, 五臟六腑不和, 九竅不通 등으로 발생된다”고 하였다. 그리고 嚴<sup>36)</sup>은 五臟六腑의 不和와 陰陽相滯를 원인으로 보았고, 危<sup>37)</sup>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 전통적으로 “균의 감염, 열, 외상, 항원항체반응 등 생체조직의 기질변화를 초래하는 침습에 대한 생체의 방어 기전”라고 정의되지만, 현재에는 염증을 신체 국소에서 일어나는 상해에 대한 생체조직의 방어반응이라고도 정의되고 있다. 즉, 각종 유해한 자극에 응답하여, 자극에 대한 상해를 제거하여 원래의 상태로 회복하려는 생체방어반응이 염증반응이다. 염증(炎症)이라는 용어가 “불 같은 상태”라는 어원에서 유래된 것과 같이 염증이 발생한 부위는 발적, 발열, 동통, 종창과 같은 징후가 발생된다<sup>30,38,39)</sup>.

수많은 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이 변화는 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 한다. 이러한 화학적 매개체로는 활성산소, 산화질소(NO), prostaglandin(이하 PG), 염증을 유발시키는 여러 cytokines 등이 있다<sup>40)</sup>.

NO는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내의 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관질염을 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(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite(ONOO<sup>-</sup>)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화되어 암 형성과 진행에 중요한 역

할을 하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 NO의 발생을 억제시켜 주는 것이 중요하다<sup>41-44</sup>.

蘆薈와 紫花地丁 추출물이 LPS에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는 역할을 하는지의 여부를 평가하기 위해 염증실험에 널리 활용되고 있는 대식세포 세포주인 RAW 264.7를 이용한 실험을 실시한 결과, 蘆薈 추출물이 100 $\mu$ g/ml과 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 72.7%와 57.9%, 紫花地丁 추출물도 100 $\mu$ g/ml과 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 90.1%와 58.4% 억제시켰다(Table 5, Fig. 2).

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부분 내인성 화학전달 물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다. 염증반응을 주요 화학 전달 매개물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류(histamine, serotonin등)와 kinin류(bradykinin등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류와 PG과 IL류 등의 4군으로 분류된다<sup>30</sup>. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine중 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 각종 염증질환의 발생과 진행에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 특히 염증반응에 관여하는 세포 중에서 대식세포는 각종 cytokine을 분비하여 대식세포의 유주, T 세포의 활성화와 증식억제, 혈관신생작용 등을 나타내어 염증반응을 조절한다고 인식되고 있다는데, 이들 cytokine중 염증반응의 초기단계에 작용하는 것으로는 상기한 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 가 가장 잘 알려져 있다. 이들은 arachidonic acid를 유주시키고, COX를 활성화시킴으로서 PG의 생성을 유발시키는 것으로 보고되고 있다<sup>39</sup>.

蘆薈와 紫花地丁 추출물이 상기한 염증매개물질에 미치는 영향을 평가하기 위해 RAW 264.7세포에서 LPS에 자극에 의해 생성되는 IL-1 $\beta$ , IL-6의

유전자 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 평가하였으며, 그 결과 蘆薈 추출물은 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 유전자의 발현을 각각 90.7%, 87.9%, 10 $\mu$ g/ml의 농도에서는 IL-1 $\beta$  유전자의 발현을 82.5% 억제시켰으나, 紫花地丁 추출물은 이들 유전자의 발현에 영향을 주지 못하였다(Table 6, Fig. 3). 또한 TNF- $\alpha$ 의 분비량 검사에서는 蘆薈 추출물은 100 $\mu$ g/ml와 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 100%와 39.2% 억제시켰으나, 紫花地丁 추출물은 100 $\mu$ g/ml와 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 34.2%와 21.9% 억제시켰다(Table 7, Fig. 4).

NF-kB는 염증반응에 관여하는 cytokine들의 유전자의 발현을 증가시키는 전사인자로 류마티스 관절염과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 NF-kB의 활성 조절이 가능할 경우 만성과 급성염증질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다<sup>47</sup>. 蘆薈와 紫花地丁 추출물을 평가한 결과 NF-kB를 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 53.2%와 35.7% 억제시켰다(Table 8, Fig. 5).

PG는 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intracellular messenger로 세균의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분인 phospholipase A<sub>2</sub>에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉, arachidonic acid는 COX 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE<sub>2</sub>와 PGI<sub>2</sub>는 혈관 투과성 항진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. 이는 오래 전부터 발열, 발적, 동통 등을 치료하는데 널리 사용되어온 aspirin이 이러한 PG를 합성하는데 핵심적인 작용을 하는 COX의 작용을 억제시키기 때문인 것에서 확인할 수 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. I형 효소인 COX-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 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다<sup>30,42)</sup>. 따라서 항염증제의 개발을 위해 COX-2의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쏟고 있다<sup>45,46)</sup>. 蘆薈와 紫花地丁 추출물이 LPS의 자극으로 RAW 264.7 세포에서 활성화되는 COX II 효소의 활성을 억제시키는 지를 평가한 결과 13.2%, 75.8% 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 발현시킴으로써 반응하게 된다. 이러한 세포 안에서 정보전달에 관여하는 대표적인 물질의 하나가 MAP kinase cascade이다. 이중 MAPK는 세포분열 촉진인자에 의해 활성이 강하게 유도되는데 반해 JNK와 p38은 포유류에서 여러 가지 자외선, 산화스트레스, 엔도톡신등 물리화학적 스트레스에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다<sup>47,48)</sup>. 蘆薈와 紫花地丁 추출물을 평가한 결과 모두 염증유발인자에 의해 유도되는 JNK를 약간 억제시켰으나 p38의 유전자 발현에는 영향을 미치지 못했다(Fig. 7).

나이가 들면서 자연적으로 발생하는 주름은 피부 노화에 수반되는 생리적인 현상으로 피부의 진피층에서 피부를 지탱해주는 것은 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 양

을 감소시키고 엘라스틴의 변성을 유발시킨다고 주장이 있고, 실제로 자외선의 피부조사에 의해 교원질의 합성이 감소되고, collagen 분해효소의 발현이 증가되어 결국 주름을 유발한다는 보고가 있다<sup>49)</sup>. 따라서 지금까지의 주름개선 연구는 콜라겐을 분해하는 Collagenase의 작용과 탄력섬유를 분해하는 elastase의 작용을 억제하는 물질개발이 중심이 되어왔다.

蘆薈와 紫花地丁 추출물의 피부 주름방지과 탄력유지에 효용이 있는 지의 여부를 확인하기 위해 collagenase와 elastase 활성 억제력을 평가한 결과 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 蘆薈 추출물은 84.1%의 collagenase 효소의 활성 억제력을 보였으나, 紫花地丁 추출물은 효소의 활성을 거의 억제시키지 못하였다(Table 10, Fig. 8). 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 蘆薈와 紫花地丁추출물이 elastase 효소의 활성을 각각 79.4%와 47.9% 억제시켰다(Table 11).

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. Tyrosinase는 분자량이 약 75,000인 glycoprotein으로 3가지 이상의 촉매 기능이 있다고 알려져 있으며 그중 tyrosine을 Dihydroxy phenylalanine(dopa)로 만들어 주는 tyrosine hydroxylase 기능과 dopa를 dopaquinone으로 만드는 dopaoxidase의 기능이 멜라닌 생성에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 지금까지의 미백제 개발 연구는 tyrosinase 저해제를 개발하는데 치중되어 왔다<sup>50-52)</sup>.

蘆薈와 紫花地丁 추출물의 tyrosinase 활성을 억

제 효과에 대한 실험 결과 蘆薈와 紫花地丁 추출물은 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 tyrosinase 효소의 활성을 각각 55.9%와 40.1% 억제시켰다(Table 12).

멜라닌의 합성은 고도로 분화된 세포인 melanocyte에서 일어나며, melanocyte 내에서도 특화된 세포내 소기관인 melanosome에서 일어난다. 따라서 melanocyte 작용억제 연구는 호소학적 접근인 tyrosinase억제제 연구보다 더 신뢰도가 높아 세계의 많은 연구기관에서 동물의 melanoma 세포를 이용한 세포수준에서의 평가가 활발히 수행하고 있다<sup>52)</sup>. MNT-1 세포를 대상으로 한 실험에서 蘆薈와 紫花地丁 추출물 모두 멜라닌 생성 억제능이 없는 것으로 나타났다(Table 13, Fig 9). 마지막으로 본 실험에 사용된 蘆薈와 紫花地丁 추출물을 대상으로 V79-4 세포를 이용한 MTT법으로 세포독성을 평가한 결과, 최고 농도인 100 $\mu$ g/ml에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 10).

이상의 실험결과 蘆薈는 매우 우수한 항산화력과 양호한 NO 생성 억제력, 뚜렷한 IL-1 $\beta$ , COX-2, IL-6 유전자의 발현 억제력, MAP kinase 억제력, 우수한 collagenase 및 elastase 활성억제력, 경미한 tyrosinase 억제능 등을 보이며, 紫花地丁은 우수한 항산화력, 뚜렷한 COX-2 억제력, 약간의 elastase 및 tyrosinase 활성 억제력이 있어 항산화, 염증 및 피부노화로 발생하는 주름 발생 억제 및 예방 효과로 임상에서 더욱 광범위한 활용 가치가 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

蘆薈와 紫花地丁 추출물이 항산화, 항염증을 비롯하여 피부 주름 발생 억제, 미백효능에 미치는 영향을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

### 1. Radical scavenging activity 부문에서 蘆薈와

紫花地丁 추출물은 Vitamin E 보다 뛰어난 항산화력 효과가 나타났다.

2. Xanthine oxidase activity 부문에서 蘆薈와 紫花地丁 추출물은 농도의존적으로 산화억제력이 있음이 나타났다.
3. NO 생성 억제력 부문에서 蘆薈와 紫花地丁 추출물이 농도의존적으로 NO의 생성을 유의성 있게 억제시킴을 알 수 있었다.
4. 蘆薈 추출물은 IL-1 $\beta$ 와 IL-6 유전자의 발현을 억제시켰으나, 紫花地丁 추출물은 이들 유전자의 발현에 영향을 주지 못하였다. 그러나, 유의성은 없었다.
5. 蘆薈와 추출물은 TNF- $\alpha$ 의 발현을 유의성 있게 억제시켰으며, 紫花地丁 추출물은 TNF- $\alpha$ 의 발현을 감소시켰으나, 유의성은 없었다.
6. 蘆薈와 紫花地丁 추출물은 NF-kB를 유의성 있게 억제시켰다.
7. 蘆薈와 紫花地丁 추출물은 COX-2 효소의 활성을 억제시켰으나, 유의성은 없었다.
8. 蘆薈와 紫花地丁 추출물 모두 Jun-N-terminal kinase(JNK)를 약간 억제시켰으나 p38에는 영향을 미치지 못했다.
9. 蘆薈 추출물은 collagenase 효소의 활성 억제력을 보였으나, 紫花地丁 추출물은 효소의 활성을 거의 억제시키지 못하였다.
10. 蘆薈와 紫花地丁 추출물이 elastase 효소의 활성을 억제시켰으나, 유의성은 없었다.
11. 蘆薈와 紫花地丁 추출물은 10 $\mu$ g/ml의 농도에서 tyrosinase 효소의 활성을 억제시켰으나 유의성은 없었다.
12. 蘆薈와 紫花地丁 추출물 모두 멜라닌 생성 억제능이 없는 것으로 나타났다.
13. 蘆薈와 紫花地丁 추출물은 최고 농도인 100 $\mu$ g/ml에서 세포독성이 나타나지 않았다.

## 참 고 문 헌

1. 대한피부과학회. 피부과학. 여문각. 2001:1-29, 59.
2. 노석선. 원색피부과학. (주)아비비씨기획. 2006: 111-21.
3. 裴秉哲. 今釋 黃帝內經 素問. 成輔社. 1994: 376-83,799-851.
4. 洪元植. 黃帝內經靈樞. 전통문화연구회. 1994: 531-39,391-98.
5. 張民慶. 中醫皮膚美容方劑大全. 중국중의약출판사. 2001:34.
6. 김은주, 안성연, 남개원 등. 적송엽 함유 한방 화장품이 인체 피부 노화에 미치는 영향 연구. 대한본초학회지, 2006;21(1):25-31.
7. 全國韓醫科大學 本草學教室 共編書. 本草學. 서울, (도)영림사. 1998:203, 245.
8. 박용양, 윤여표. 당뇨병 환자의 혈당 및 임상 에 미치는 알로에의 효과에의 효과. 한국식품 위생안전성학회지. 1995;10(1):13-7.
9. 박용양, 오유진 등. 간장질환 환자의 임상 에 미치는 알로에의 효과. 한국식품위생안전성학 회지. 1995;10(4):249-254.
10. 정정철 이주영 김미정 등. 알로에 추출물이 알 클대사에 미치는 영향. 한국식품위생안전성학 회지. 1996;11(1):31-4.
11. 하배진, 알로에의 과산화지질 억제효과에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지. 1996;11(2): 159-64.
12. 한은정, 이길영, 김혜정 등. 알로에(蘆薈), 녹 차(綠茶), 꿀(蜂蜜)의 미백효과에 관한 연구. 대 한안이비인후피부과학회지. 2003;16(3):145-63.
13. 윤희성, 이길영, 김운범. 蘆薈 Dressing을 활 용한 급성기 아토피부염 환자 치험 8례. 대한 안이비인후피부과학회지. 2004;17(3):153-66.
14. 이은규, 권성호, 김상훈 등. 알로에제품 복용 후 발생한 과민반응 1례. 대한내과학회지. 2003;23(4):836-83.
15. 조용찬, 최은영, 성주영 등. 알로에 복용에 의 한 급성 간질성 신염 1예. 대한신장학회지. 2006;25(4):657-60.
16. 고운채, 신민교, 紫花地丁의 진통 및 소염작용 에 관한 실험적 연구. 생약학회지. 1987;18 (4):210-15.
17. 이병웅, 김동희. Interleukin-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 로 투발된 염증 투발 싸이토카인 발현 및 생성에 대한 紫花地丁의 억제 효과. 대한본초학회지. 2003;18(3):89-96.
18. Blos, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*, 1958;181:1199.
19. Sweeney AP, Wyllie SG, Shalliker RA, Markham JL. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *J Ethnopharmacol*. 2001;75:273-77.
20. 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.
21. Hinz B, Brune K, Rau T, Pahl A. Flurbiprofen enantiomers inhibit inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *Pharm,Res*. 2001;18: 151-6.
22. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-59.
23. 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.
24. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. *약학회지*. 1998;42:558-66.
25. 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.
26. 부희정, 함영민, 김정미, 이선주, 이남호, 감태에서 분리한 Phlorotannin 성분의 Elastase 저해활성 및 Hyaluronidase 저해 활성. *생약학회지*. 2006;37:92-6.
27. 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;27:1976-78.
28. 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.
29. 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.
30. 박광균. *구강생화학*. 서울:군자출판사. 1999:318-25.
31. 陳實功. *外科正宗*. 中國:天津科學技術出版社. 1993:47.
32. 楊維傑, 黃帝內經解釋. 서울, 成輔社. 1997:147, 210, 299, 349, 456.
33. 華 陀. *中藏經 劉河間三六書*. 서울, 成輔社. 1976:82.
34. 王 燾. *外臺秘要*. 北京, 人民衛生出版社. 1982:107, 625-31.
35. 薛 己. *薛己醫案*. 서울:成輔社. 1976:349-55.
36. 嚴用和. *濟生方*. 서울:東洋醫藥大學. 1965:61-8.
37. 危亦林. *得效方*. 서울:東洋醫藥大學. 1965:613.
38. *약품생화학분과위원회편. 분자약품생화학 제3장 염증과 생화학*. 서울, 동명사. 2003:59-71.
39. 정해영역(Toshio Hirano편저). *생명과학과 분자의학을 위한 분자생물학*. 서울, 월드사이언스. 2002:73-85.
40. *대한병리학회. 병리학*. 서울, 고문사. 1995:71-104.
41. 김룡규, 신경민, 천상국, 지사영, 서성훈, 박희준, 최종원, 이경태. 넙취 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과. *약학회지*. 2002;343-47.
42. 서영준, 발암과정에 있어서 Cyclooxygenase-2의 역할 및 그 저해를 통한 화학 암예방. *분자세포생물학뉴스*. 2001;13:8-17.
43. 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  $\beta$ -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *European J. Pharmacol*. 2000;406:301-9.
44. 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- $\kappa$ B activation. *Biochem. Pharmacol*. 2001;61:

- 903-10.
45. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준, 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998;42:558-66.
  46. 문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱, 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지. 1998;42:214-19.
  47. 오세관, 오역수 역(야마모토 타다시, 셀바 켄 편집). 키워드로 해석하는 세포신호전달 일러스트 맵 제4장 MAP kinase. 서울, 월드사이언스. 2006:21-2.
  48. 최인장 역(일본 생화학회 편집). 세포운명과 세포기능을 조절하는 구조 정보 전달 제6장 MAP 카이나제. 서울, 월드사이언스. 2006: 93-104.
  49. Jung JH. Photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003;19:109-21.
  50. Pawelek JM, Korner AM. The biosynthesis of mammalian melanin. *Am Sci* 1982; 70:136-45.
  51. 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.
  52. Korner AM, Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 1982; 217:1163-5.