

비수리 추출물의 항균 및 항산화 활성

이혜진 · 임규남 · 박민아 · 박수남*
서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학학과

Received: December 10, 2010 / Revised: January 20, 2011 / Accepted: January 24, 2011

Antibacterial and Antioxidative Activity of *Lespedeza cuneata* G. Don Extracts. Lee, Hye Jin, Gyu Nam Lim, Min A Park, and Soo Nam Park*. Department of Fine Chemistry, College of Nature and Life Science, Seoul National University of Technology and Science, Seoul 139-743, Korea – In this study, the antibacterial activity and the antioxidative effects, inhibitory effects on tyrosinase of *Lespedeza cuneata* G. Don extracts were investigated. MIC value of ethyl acetate fraction from *L. cuneata* G. Don on *P. ovale* (0.125%) showed that the antibacterial activity of the ethyl acetate fraction was higher than methyl paraben. The aglycone fraction of *L. cuneata* G. Don (14.63 µg/mL) showed the most prominent the free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC₅₀). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) of *L. cuneata* G. Don fraction on Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system were investigated using the luminol-dependent chemiluminescence assay. The aglycone fraction of *L. cuneata* G. Don (0.07 µg/mL) showed the most prominent ROS scavenging activity. The protective effects of extract/fractions of *L. cuneata* G. Don on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes were investigated. The *L. cuneata* G. Don extracts suppressed photohemolysis in a concentration dependent manner (1 ~ 50 µg/mL). The inhibitory effects (IC₅₀) of *L. cuneata* G. Don extracts on tyrosinase were determined with ethyl acetate fraction (104.83 µg/mL) and aglycone fraction (27.55 µg/mL) of *L. cuneata* G. Don extract. These results indicate that *L. cuneata* G. Don extract/fractions can function as high potential as bactericide against the pathogenic bacteria and antioxidant in biological systems, particularly skin exposed to UV radiation by scavenging ¹O₂ and other ROS, and protect cellular membranes against ROS. Extract/fractions of *L. cuneata* G. Don could be applicable to new functional cosmetics for antiaging, antioxidant, and antibacterial activity.

Key words: *Lespedeza cuneata* G. Don, antibacterial activity, antioxidative effects, tyrosinase, cosmetics

서 론

피부는 다양한 환경적 요인과 항상 접촉하고 있기 때문에 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 이러한 산화적 스트레스의 주요인은 태양 자외선(UVA 및 UVB)에의 노출이며, 공해, 화학 산화제 및 미생물, 호흡이나 염증반응[19] 등도 포함된다. 특히, 계속된 자외선의 노출로 인해 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 ¹O₂ 및 ·OH를 비롯하여 O₂^{·-}, H₂O₂, ROO·, RO·, ROOH 및 HOCl 등[4, 8]의 활성산소종으로부터 유도된 광산화적 손상을 받게 되면 피부의 효소적 및 비효소적 항산화 방어망이 위태롭게 된다[18]. 이러한 활성산소종이 야기하는 손상을 억제하기 위한 항산화 활성 물질로서 다양한 천연 항산화제들과 BHA(butylated hydroxy

anisole)와 BHT(butylate hydroxy toluene) 등의 합성 항산화제들을 많이 사용해 왔다. 하지만 합성 항산화제의 경우에는 과량 섭취 시 독성 작용을 일으키는 것으로 보고되고 있다[2, 12]. 따라서 최근에는 보다 안전하고 항산화효과가 뛰어난 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[17].

또한, 피부는 피부 상재균에 의해서 많은 피부질환이 발생되며, 대표적 피부 상재균으로는 여드름균, 비듬균 등이 있다[10]. 여드름은 일반적인 피부 질병이며 다양한 원인에 의해 발병된다. 이러한 원인 중 가장 중요한 원인은 여드름균(*Propionibacterium acnes*)의 증식이다[3, 11, 16, 23]. 비듬은 피지 분해 산화물이 혼합된 상태로 살아있는 피부 세포에서 생겨나게 되는 신진대사의 부산물을 말한다[10, 20]. 피부에 상주하는 진균의 일종인 비듬균(*Pityrosporum ovale*)이 중요한 역할을 하며 긴장이나 스트레스와 같은 정신적 장애에 의해 악화되기도 한다[21, 22]. 그 외에 잘 알려진 피부 상재균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 전 세계적으로 가장 많이 발견되는 피부 상재균이며 사람이나 동

*Corresponding author

Tel: +82-2-970-6451, Fax: +82-2-972-9585

E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

물의 표피에 다양한 질병을 야기시키고[1, 6, 9, 24], 또 다른 피부 상재균인 대장균(*Escherichia coli*)은 식중독을 일으키며 사람이나 동물의 장에서 발견된다[5, 24]. 이러한 피부 상재균 이외에도 화장품을 변질시키는 세균들이 피부에 악영향을 주고 있으며, 이를 사멸하기 위해 다양한 종류의 방부제나 항균제가 많이 사용되고 있다. 그러나 기존에 사용되고 있는 합성물질들은 피부에 알러지를 유발할 수 있으므로 비교적 인체에 무해한 물질로 대체하기 위해 많은 연구들이 진행 중이다[25].

비수리(*Lespedeza cuneata* G.Don)는 콩과(Leguminosae)의 여러해살이 초본성 아관목으로 야관문, 삼엽초 등의 여러 가지 이름으로 불리며[13], 우리나라 전국의 산야에 분포하며 일본, 중국, 대만, 인도 등지에도 분포한다. 황폐지의 지피물 조성과 지력증진 식물로 널리 이용되는 흔한 식물이지만, 예로부터 민간에서는 간과 콩팥의 기능을 보호해 주므로 유정(遺精), 유뇨(遺尿) 등을 치료하고, 폐를 강화시키므로 해수, 천식, 유방염, 종기, 시력 강화 작용에 뛰어난 효과가 있다고 알려져 있다[15]. 지금까지 비수리에 관한 연구로서는 종자의 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 활성과 미네랄, 아미노산, 비타민 분석이 보고되었으며, 잎 추출물에는 C-glycosylflavone 화합물인 isoorientin, isovitexin 등과 quercetin, kaempferol, vitexin, avicularin, juglanin 등이 보고되어 있다[7, 14].

그러나 비수리에 항균 또는 항산화 활성을 나타낼 것이라 사료되는 성분들이 많이 존재함에도 불구하고 비수리 추출물을 이용한 피부 상재균에 대한 활성이나 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화적 보호 작용, 각종 ROS(H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 등)가 생성되는 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 관한 연구는 아직 되어 있지 않다. 따라서 비수리 추출물(혹은 분획)을 제조하고 이들 추출물(혹은 분획)의 피부 상재균에 대한 항균작용, 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 보호활성과 free radical 소거활성, Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 활성산소에 대한 총항산화능, tyrosinase 활성 저해 효과를 측정함으로써 항균, 항노화 및 항산화 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian(Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co.(USA) 제품, 화학발광기는 Berthold(Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Istek(Korea)사 제품을 사용하였다.

(+)- α -Tocopherol(1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid, arbutin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), luminol,

heparin, 증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co.(Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals(Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, trizma base, HCl 그리고 ethanol(EtOH), methanol(MeOH), ethyl acetate(EtOAc), octanol 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine과 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide, 효소로 사용된 tyrosinase(9.3 mg solid, 5,370 units/mg solid), elastase(4.5 mg protein/mL, 6.5 units/mg protein)는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 비수리 재료는 2009년 4월 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

비수리의 분획 및 추출

건조된 비수리 100 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압·건조하여 파우더를 얻고 이를 실험에 사용하였다. 또한 50% 에탄올 추출물은 감압·농축한 후 물과 hexane을 이용하여 비극성 성분을 제거하고 이후 ethyl acetate 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다.

Ethyl acetate 분획으로부터 aglycone을 제조하였다. ethyl acetate 분획에서 얻은 파우더 일부는 산 가수분해 반응을 이용하여 당을 제거시킨 후 얻은 aglycone 파우더를 실험에 사용하였다. 실험 방법은 ethyl acetate 가용분 일정량에 H_2SO_4 및 acetone 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 ethyl acetate층을 분획하고 이를 감압·농축하여 실험에 사용하였다.

비수리 추출물의 항균 활성 측정

사용균주: 본 실험에서 사용한 균주는 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC6538과 *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC23736, 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ATCC6919, 비듬균인 *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) ATCC12078은 한국 미생물 보존센터에서 분양받아 사용하였다.

배지 및 배양조건: 호기성 균주인 *S. aureus*와 *E. coli*는 Mueller Hinton 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37°C incubator에서 24 h 동안 배양하면서 사용하였다. 또한 비듬균인 *P. ovale*는 Pityrosporum 배지(Malt extract agar 6%, ox-bile 2%, tween-40 1%, glycerol monooleate 0.25%)를 사용하였으며 균을 접종한 뒤 30°C에서 24 h 동안 배양하여 사용하였다. 또한 *P. acnes*의 배양 배지는 reinforced clostridial(RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4°C에서 보관하면서 실험 72 h 전에 활

성화시키고 균을 배양 배지에서 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system(Merck Anaerocult Gaspack system, Germany)을 이용하여 밀봉한 후 37°C에서 72 h 동안 혐기성 배양하였다.

최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration: MIC): 최소억제농도(MIC)는 한천배지 확산법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 각각의 분획물들을 2 mL씩 함유한 배지 20 mL를 petri dish에 주입하였고 시험균을 평판 배지 위에 0.1 mL 접종하였다. *S. aureus*는 37°C에서 24 h 후에, *P. ovale*는 30°C에서 48 h 후에, *P. acnes*는 37°C에서 72 h 후에 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 MIC로 결정하였다.

비수리 추출물의 항산화 효과 측정

DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성: Free radical은 피부노화의 원인 물질로 알려져 있는 물질이다. 따라서 DPPH를 이용하여 비수리 추출물에 대한 free radical의 소거활성을 측정하였다. 실험방법은 methanol에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다. 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다. 100₂

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[\frac{(A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}})}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능): Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 각종 ROS (O₂^{•-}, •OH 그리고 H₂O₂)를 생성시키고, 철은 이 반응의 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있는데 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 비수리 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl₃·6H₂O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온 시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료용액 대신에 에탄올을 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃·6H₂O를

첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율을 다음 식과 같이 나타내었고, 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, µg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

사람 적혈구를 대상으로 수행하는 활성산소에 의한 세포손상 및 파괴 실험은 활성산소에 의한 세포손상 모델로 적합한 점이 많다. 따라서 이 실험법을 이용하여 천연물을 대상으로 활성산소에 대한 세포보호 효과를 측정할 수 있다.

적혈구 현탁액 제조: 적혈구는 건강한 성인 남으로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄·12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄·2H₂O 1.6 mM)로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4°C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 실험은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5×10⁷ cells/mL이었다.

비수리 추출물의 광용혈 억제 효과: 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 시료용액을 첨가하였다. 추출물을 농도별로 각각 50 µL씩 첨가하고 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제 rose-bengal (12 µM) 0.5 mL를 가하고 파라필름(Whatman laboratory sealing film, UK)으로 입구를 막은 후 15 min 동안 광조사하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 모든 실험은 20°C 항온실에서 행하였다. 비수리 추출물의 광용혈에 미치는 효과는 post-incubation 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ₅₀을 구하여 비교하였다.

대조군(control)은 τ₅₀이 32 min으로 오차범위 ±1 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다.

Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min 까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 4회 반복하여 평균하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

L-Tyrosine으로부터 멜라닌 생성과정에서 전체 반응 속도를 결정하는데 작용하는 핵심효소는 tyrosinase다. 따라서 tyrosinase의 저해활성은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. L-tyrosine(0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37°C에서 10 min 동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 0.1 mL tyrosinase의 활성을 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도(inhibition concentration, IC₅₀, µg/mL)로 표기하였다.

Elastase 저해활성 측정

피부노화, 특히 주름 생성에는 활성산소에 의한 작용과 matrix metalloproteinase (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주 원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부노화 억제 평가에 대단히 중요하다.

Tris-Cl (pH 8.0) 0.12 M에 elastase 기질인 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 1,300 µL에 측정시료용액 7.5 µL와 buffer 92.5 µL를 첨가하여 25°C에서 10 min 동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 elastase 용액을 100 µL 첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25°C 수용상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 시료용액으로 사용된 용매를 100 µL 첨가하였다. Blank는 N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M tris-Cl buffer 1,300 µL를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 Student's t-test를 행하였다.

결과 및 고찰

비수리 추출물의 항균 활성

비수리 추출물의 ethyl acetate 분획의 항균 활성을 Table 1에 나타내었다. 비수리 추출물의 ethyl acetate 분획의 MIC는 0.125%로 나타났고 이것은 methyl paraben(0.13%)과 비교하였을 때 더 큰 항균활성을 나타내었다. 황색포도상구균인 *S. aureus*에 대한 비수리 추출물의 ethyl acetate 분획의 MIC는 0.25%로 나타났는데 이

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC, w/v%) of ethyl acetate fraction from *L.cuneata* G. Don against various bacteria.

Strains	<i>L.cuneata</i> G.Don extract (EtOAc fraction)	Methyl paraben
<i>S. aureus</i>	0.25	0.25
<i>E. coil</i>	0.50	0.13
<i>P. ovale</i>	0.125	0.13
<i>P. acnes</i>	0.50	0.25

것은 methyl paraben(0.25%)과 비교하여 동일한 항균활성을 나타내었다. 여드름균인 *P. acnes*와 대장균인 *E. coli*에 대한 비수리 추출물의 ethyl acetate 분획의 항균활성은 비교물질에 비해서는 낮은 활성을 나타내었지만 현재 사용되고 있는 방부제나 항균제가 평균적으로 0.2~0.4% 정도의 농도 범위 내에서 사용되고 있는 것을 감안하면 비수리 분획물은 낮은 농도에서도 천연방부제, 항균제로서의 역할을 충분히 수행할 것으로 기대된다.

비수리 추출물의 항산화 활성

DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성: 비수리(*L. cuneata* G. Don) 추출물과 비교물질인 (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성(FSC₅₀) 측정 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 비수리 추출물의 50% extract 분획의 FSC₅₀은 40.88 µg/mL, ethyl acetate 분획인 경우 20.80 µg/mL, aglycone 분획은 14.63 µg/mL으로 나타났다. 따라서 free radical 소거활성은 50% extract 분획 < ethyl acetate 분획 < aglycone 분획 순으로 증가하였다. 비교 물질로 사용한 (+)- α -tocopherol의 free radical 소거활성은 8.98 µg/mL로 나타났다.

Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능, OSC₅₀)을 Fig. 2에 나타내었다. 비수리 추출물의 ethyl acetate 분획의 활성산소 소거활성은 0.14 µg/mL이고 aglycone 분획은 0.07 µg/mL로 나타났다. 비교물질

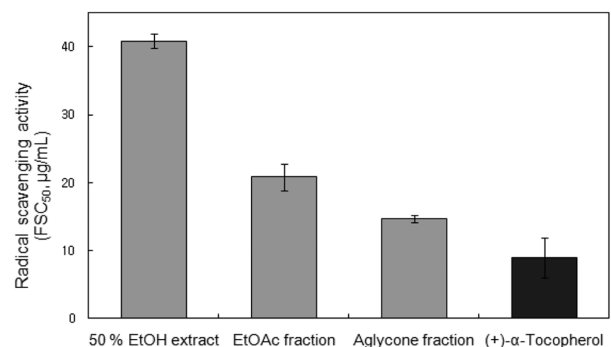


Fig. 1. Free radical scavenging activity of extracts and fraction of *L. cuneata* G. Don and references.

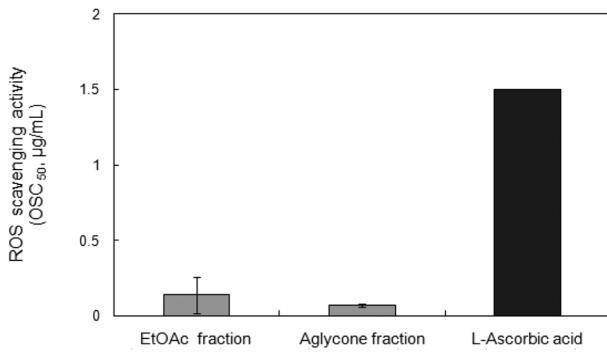


Fig. 2. Reactive oxygen species scavenging activity of *L. cuneata* G. Don extracts and reference in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

로 사용된 L-ascorbic acid의 활성산소 소거활성은 1.50 µg/mL로 나타났다. 따라서 비수리 추출물의 aglycone 분획이 ethyl acetate 분획보다 활성산소 소거활성이 보다 뛰어나고 이러한 비수리 추출물 분획들의 활성산소 소거활성은 비교 물질로 사용한 L-ascorbic acid보다 크을 알 수 있다.

¹O₂으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

비수리 추출물을 비롯한 몇 가지 항산화제들의 활성산소에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과를 Fig. 3, 4에 나타내었다. 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ₅₀)은 세포보호활성이 클수록 크게 나타난다. 비수리의 50% extract 분획의 경우 1, 10, 25, 50 µg/mL의 농도에서 각각 37.8, 51.3, 65.3, 98.1 min, ethyl acetate 분획의 경우 38.7, 51.7, 64.5, 72.2 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다. Aglycone 분획의 경우는 64.2, 108.5, 40.8, 8.6 min으로 농도가 25, 50 µg/mL에서 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 아마도 추출물의 농도가 클 때는 세포막에 대한 교란작용(계면활성제로서의 작용)을 나타낼 수 있는 물질이 존재할 가능성도 생각할 수 있다. 세포보호 효과는 10 µg/

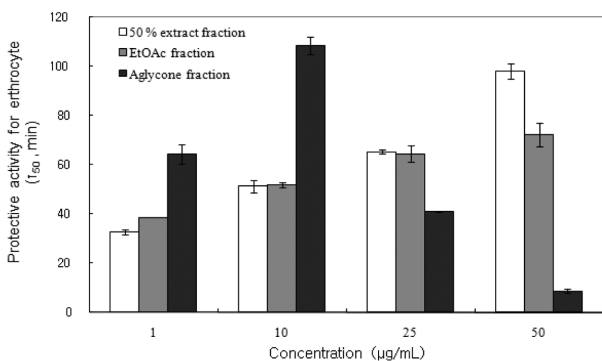


Fig. 3. Cell protective effects of *L. cuneata* G. Don extracts against ¹O₂-induced photohemolysis of human erythrocytes (Control = 32.0 ± 1.0 min).

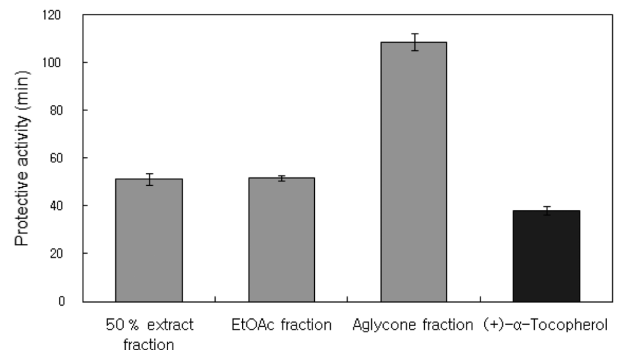


Fig. 4. The effect of extracts and fractions from *L. cuneata* G. Don and references at 10 µg/mL on the rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

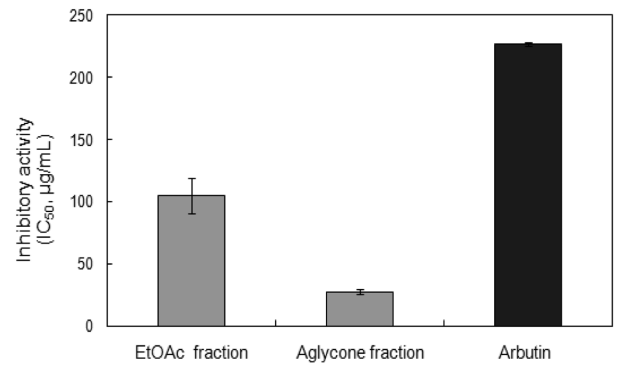


Fig. 5. The effect of extracts and fractions from *L. cuneata* G. Don and reference on tyrosinase.

mL에서 50% extract 분획 (51.3 min) < ethyl acetate 분획 (51.7 min) < aglycone 분획 (108.5 min) 순으로 증가하였다.

Tyrosinase 저해 활성

비수리 추출물 중 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획의 경우에 tyrosinase 저해활성(IC₅₀)이 각각 104.83 µg/mL, 27.55 µg/mL으로 나타났다. 비수리 추출물의 두 가지 분획 모두 비교 물질로 사용한 기능성 화장품의 미백제로 잘 알려진 arbutin의 저해 활성(226.88 µg/mL)에 비해서 큰 tyrosinase 저해활성을 나타냈다. 따라서 ethyl acetate 분획 및 aglycone 분획을 화장품에 응용할 경우 미백효과가 클 것으로 사료되며 특히 aglycone 분획의 경우 매우 큰 미백효과가 나타날 것이라고 사료된다(Fig. 5).

Elastase 저해 활성

비수리 추출물의 elastase 저해활성(IC₅₀)은 ethyl acetate 분획에서 129.45 µg/mL, aglycone 분획에서 28.33 µg/mL로 나타났다(Table 2). 따라서 비수리 추출물의 aglycone 분획은 ethyl acetate 분획에 비해 elastase 저해활성이 훨씬 뛰

Table 2. Inhibitory activity of extracts from *L. cuneata* G. Don and references compound on elastase.

Compounds	Inhibition
	(IC ₅₀ , µg/mL)
<i>L. cuneata</i> extract (EtOAc fraction)	129.45 ± 0.07
<i>L. cuneata</i> extract (aglycone fraction)	28.33 ± 1.04
Oleanolic acid	15.9 ± 1.03

어나다는 것을 알 수 있다.

요 약

본 연구에서는 비수리 추출물의 피부 상재균에 대한 항균 작용과 항산화 활성, tyrosinase 저해 효과 등에 관한 조사를 수행하였다. 피부 상재균에 대한 항균활성 측정결과, *P. ovale*에 대한 ethyl acetate 분획의 MIC는 0.125%로 나타났으며, 이는 methyl paraben보다 큰 항균활성을 나타내었다. 추출물의 free radical(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC₅₀)은 aglycone 분획(14.63 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었고, 또한 Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 비수리 추출물의 총항산화능은 aglycone 분획(0.07 µg/mL)에서 가장 큰 활성을 나타내었다. 비수리 추출물에 대하여 rose-bengal로 증감된 사람 적혈구의 광용혈에 대한 억제 효과를 측정하였고, 농도 의존적(1 ~ 50 µg/mL)으로 세포보호 효과를 나타내었다. Tyrosinase의 활성 저해 효과(IC₅₀)는 비수리 추출물의 ethyl acetate 분획과 aglycone 분획이 각각 104.83 µg/mL, 27.55 µg/mL로 나타났다. 이상의 결과들은 비수리 추출물이 ¹O₂ 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거하고, ROS에 대항하여 세포막을 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 시사한다. 또한 tyrosinase 저해활성과 피부 상재균에 대한 항균작용으로부터 항산화, 항노화 및 항균성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하였다.

REFERENCES

- Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramoto. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *THE LANCET*. **359**: 1819-1827.
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluane. *J.*

- Oil Chem. Soc.* **52**: 59-62.
- Coenye, T., E. Peeters, and H. J. Nelis. 2007. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res. Microbiol.* **158**: 386-392.
- Davies, K. J. A. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radical. *J. Biol. Chem.* **262**: 9895-9901.
- Dawson, P., I. Han, M. Cox, C. Black, and L. Simmons. 2006. Resident time and food contact time effects on transfer of *Salmonella Typhimurium* from tile, wood and carpet: Testing the five second rule. *J. Appl. Microbiol.* **102**(4): 1364-5072.
- Diekema, D. J., M. A. Pfaller, F. J. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. N. Jones, M. Beach, and the SENTRY Participants Group. 2001. Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *CID*. **32**(2): S114-132.
- Ding, J. L., I. J. Lim, H. D. Lee, and W. S. Cha. 2006. Analysis of minerals, amino acids and vitamin of *Lespedeza cuneata*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**(6): 414-417.
- Fantone, J. C. and P. A. Ward. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte dependent inflammatory reaction. *Ann. J. Path.* **107**: 397.
- Garcia-Lara, J., M. Masalha, and S. J. Foster. 2005. *Staphylococcus aureus*: the search for novel target. *DDT*. **10**(9): 643-651.
- Ha, Y. M., B. B. Lee, H. J. Bae, K. M. Je, S. R. Kim, J. S. Choi, and I. S. Choi. 2009. Anti-microbial activity of grapefruit seed extract and processed sulfur solution against human skin pathogens. *J. Life Science*. **19**(1): 94-100.
- Inui, S., MD, PhD, H. Aoshima, A. Nishiyama, and S. Itami, MD, PhD. 2010. Improvement of acne vulgaris by topical fullerene application: unique impact on skin care. *Nanomedicine*: NBM.
- Jung, S. J., J. H. Lee, H. N. Song, N. S. Seong, S. E. Lee, and N. I. Baek. 2004. Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**(1): 135-140.
- Kim, S. J. and D. W. Kim. 2007. Antioxidative activity of hot water and ethanol extracts of *Lespedeza cuneata* seeds. *Korean J. Food Preserv.* **14**(3): 332-335.
- Kim, Y. H. and S. N. Ryu. 2008. Antioxidant activity of methanol extract from aerial parts in *Lespedeza cuneata* G. Don. *Korean J. Crop Sci.* **53**(S): 121-123.
- Kwon, D. J., J. K. Kim, Y. H. Ham, and Y. S. Bae. 2007. Flavone glycosides from the aerial parts of *Lespedeza cuneata* G. Don. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**(4): 344-347.
- Leyden, J. 2003. A review of the use of combination therapies for the treatment of acne vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* **49**(3): S200-210.

17. Masaki, H., S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai. 1995. Activeoxygen scavenging activity of plants extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 162-166.
18. Park, S. N. 2003. Skin aging and antioxidants. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* **29**(1): 75-77.
19. Rahimuddin, S. A., S. M. Khoja, M. M. Zuhair, N. K. Howell, and J. E. Brown. 2007. Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**: 647-655.
20. Rovers, S. B. 1969. *Pityrosporum orbiculare* incidence and distribution in clinically normal skin. *Br. J. Dermatol.* **81**: 264-269.
21. Schmidt, A. 1997. *Malassezia furfur* : A fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders. *Cutis.* **59**: 21-24.
22. Seo, K. H., K. H. Shin, M. S. Shin, J. I. Kim, and S. H. Seo. 1998. Skin Disk Diffusion Method(SDDM) as an Effective in vitro method for measurement of Anti-dandruff activity. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* **24**(1): 100-112.
23. Sokmen, M., M. Angelova, E. Krumova, S. Pashova, S. Ivancheva, A. Sokmen, and J. Serkedjieva. 2005. *In vitro* antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. *Life Sciences.* **76**: 2981-2993.
24. Taulo, S., A. Wetlesen, R. K. Abrahamsen, J. A. Narvhus, and R. Mkakosya. 2009. Quantification and variability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cross-contamination during serving and consumption of cooked thick porridge in Lungwena rural households, Malawi. *Food Control.* **20**: 1158-1166.
25. Zhoh, C. K., B. N. Kim, S. H. Hong, and C. G. Han, 2002. The antimicrobial effects of natural aromas for substitution of parabens. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* **28**(1): 166-185.