

## 쌍화탕 추출물이 항산화효소 및 항노화관련 효소 활성에 미치는 영향

박지영<sup>1</sup>, 황재규<sup>2,3</sup>, 윤종국<sup>3</sup>, 한길환<sup>3</sup>, 도은주<sup>3</sup>, 김성옥<sup>1</sup>, 김미려<sup>1,3\*</sup>

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실 & BK21 한방신약개발연구팀

2 : 대구경북첨단의료산업진흥재단 신약개발지원센터

3 : (재)대구테크노파크 한방산업지원센터

### Effect of Ssanghwa-tang Extract on Antioxidant and Anti-aging Enzyme Activities.

Ji-Young Park<sup>1</sup>, Jaegyung Hwang<sup>2,3</sup>, Jong-Kuk Yun<sup>3</sup>, Kil-Hwan Han<sup>3</sup>, Eunju Do<sup>3</sup>, Sung Ok Kim<sup>1</sup>, Mi Ryeo Kim<sup>1,3\*</sup>

1 : Department of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine & R&D Team for the New Drug of Oriental Medicine (BK21), Daegu Haany University, Korea

2 : New Drug Development Center, Daegu Gyeongbuk High-tech Medical Industry Foundation, Daegu, Korea

3 : Daegu Technopark Oriental Medicine Industry Support Center, Daegu, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : The present study was designed to investigate effects of Ssanghwa-tang (Shuānghuā-gēng) on oxidation/reduction reaction-related and aging-related enzymes *in vitro*.

**Methods** : We performed MTT assay, collagenase inhibition assay, elastase inhibition assay, tyrosinase inhibition assay, DPPH free radical scavenging assay, SOD-like activity and xanthine oxidase (XO) inhibition assay.

**Results** : The 50% ethanol (EtOH) extract of Ssanghwa-tang (SHT) showed 55% inhibition of collagenase activity, and 42% inhibition of elastase activity at 1 mg/ml concentration. Also it's treatment showed 18% inhibition of tyrosinase activity, to relate whitening effect, at the same dose of 50% ethanol extract of SHT. Antioxidant activities were determined by DPPH radical scavenging, XO inhibiting activity and SOD-like activity. These scavenging, XO-inhibiting and SOD-like activities were measured in 80%, 75%, and 28% inhibitions, respectively, at a 1 mg/ml treated dose, compared to those of control. The inhibitory effects of 50% EtOH extract on aging and oxidation-related enzyme activities were higher than those of water extract and 95% EtOH extract.

**Conclusions** : Taken together, our findings suggest that the SHT has potential and applicable benefits for development of cosmetics to have anti-aging (anti-wrinkle and whitening) and anti-oxidation functions.

**Key words** : Ssanghwa-tang, anti-aging, anti-oxidation, collagenase, elastase, tyrosinase

## 서론

사람의 피부는 노화가 진행되면서 내적으로는 신진대사를 조절하는 호르몬의 분비가 감소되고, 외적으로는 자외선에 의해 주름증가, 탄력감소, 기미, 주근깨 등이 생성된다<sup>1)</sup>. 나이가 들어가면서 섬유아세포의 작용과 세포수가 감소하여 섬유 성분(콜라겐, 엘라스틴)의 합성량이 줄어들고 collagenase의 작용이 증가하여 콜라겐의 가교된 형태가 증가함으로써 매끄

러움, 보습, 팽팽함 등이 감소된다<sup>2)</sup>. 노화는 여러 가지 요인에 의해 발생하지만, 인체 내의 다양한 질병과 더불어 노화를 촉진하는 원인 중 하나인 활성산소 (ROS ; Reactive oxygen species)에 기인하는 것으로 밝혀져 활성산소를 제거하기 위한 기능성 식품과 화장품 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다. 활성 산소는 인체 내에서 질병과 노화를 일으키는 원인이므로 활성산소에 대한 항산화력은 노화억제 작용의 척도로 평가 될 수 있다. 천연 항산화물로서는 페놀성 화합물, 플라보

\*교신저자 : 김미려, 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실 & BK21 한방신약개발연구팀, (재)대구TP 한방산업지원센터  
· Tel: +82-53-770-2241 · Fax : +82-53-770-2241 · E-mail: mrkim@dhu.ac.kr  
· 접수 : 2012년 4월 18일 · 수정 : 2012년 4월 26일 · 채택 : 2012년 4월 28일

유도체, 아미노산, 펩타이드,  $\alpha$ -토코페롤 등이 사용되고 있으며, 합성 항산화제로는 BHA (Butylated hydroxyanisole)와 BHT (Butylated hydroxytoluene)가 있다<sup>3)</sup>. 합성 항산화제는 탁월한 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되고 있지만, 열 안정성이 떨어지고 발암 위험이 제기 되고 있다. 따라서 피부 세포를 보호할 수 있는 천연 항산화제와 피부를 구성하는 물질인 콜라겐과 엘라스틴의 분해를 억제할 수 있는 물질을 이용하여 피부노화를 완화할 수 있는 천연한방소재의 개발에 대한 관심이 고조 되고 있다.

雙和湯은 十全大補湯과 함께 우리나라에서 보편적으로 애용 되고 있는 보약 중의 하나로 東醫寶鑑<sup>4)</sup> 및 그 처방서인 方藥合編<sup>5)</sup>에 기록되어 있는 약재로 芍藥, 當歸, 川芎, 熟地黃으로 구성된 四物湯 과 芍藥, 黃芪, 甘草, 肉桂, 生薑, 大棗로 구성된 黃芪建中湯을 합방한 처방이다. 오래 전부터 혈기가 손상 되었을 때나 강정 및 피로회복, 병 후 기가 허약할 때<sup>6)</sup> 효과가 있으며 현재 한의학에서 한방처방전 뿐만 아니라 분말차, 액상 차등의 기호식품 및 건강식품으로도 이용되고 있다. 본 연구에서 사용되는 소재인 雙和湯은 芍藥, 當歸, 黃芪, 川芎, 熟地黃, 甘草, 肉桂, 生薑, 大棗로 구성되어 있다. 이 중 當歸, 肉桂, 川芎, 甘草는 한방에서 뛰어난 항산화 효과를 가진다고 보고된 바 있다<sup>7)</sup>. 雙和湯의 기초 실험연구와 임상적 효능에 대한 연구로는 항피로효과<sup>8)</sup>, 간기능 개선효과<sup>9)</sup>, 중추신경억제 및 항염증효과<sup>10)</sup>, 진통 및 항경련효과<sup>11)</sup>, 성 호르몬 분비 촉진 효과<sup>12)</sup>, 골다공증 개선효과<sup>13)</sup> 등이 보고되고 있지만 雙和湯에 대한 항산화 및 항노화 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 임상 뿐 아니라 기호식품으로도 널리 판매되는 雙和湯을 이용하여 추출 용매에 따른 항산화 효과, 주름개선 및 미백 효과를 비교하여 향장품의 천연 미용 소재로서의 그 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료의 구입 및 추출

본 실험에 사용한 雙和湯(SHT) 소재인 芍藥(국산), 當歸(국산), 黃芪(국산), 川芎(국산), 熟地黃(국산), 甘草(중국산), 肉桂(베트남산), 生薑(국산), 大棗(국산)는 대원한약국(대구)에서 구입하여 4℃ 냉장실에 보관하면서 사용하였다. 시료의 추출은 열수 추출과 에탄올 추출로 다음과 같이 추출하였다. 열수 추출물의 경우 시료에 10배 양의 증류수를 첨가하여 80℃에서 3시간 환류 냉각 추출하였으며, 에탄올 추출물의 경우 각각 50%와 95% 에탄올에 침지하여 50℃에서 48시간 방치하여 추출하였다. 실험에 사용된 SHT처방 내용은 東醫寶鑑에 의하였으며, Table 1과 같은 비율로 혼합하여 추출한 후 원심 분리하여 상층액을 취하는 과정을 3회 반복하였고, 상층액을 감압 농축하여 동결건조 후 본 실험의 시료로 사용하였다.

Table 1. The Prescription of Ssanghwa-tang

Scientific name	Herbal name	Dose (%)
<i>Paeonia lactiflora</i>	芍藥	27.99
<i>Angelica gigas</i>	當歸	11.20
<i>Astragalus membranaceus</i>	黃芪	11.20
<i>Cnidium officinale</i>	川芎	11.20
<i>Rehmannia glutinosa</i>	熟地黃	11.20

<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	甘草	8.39
<i>Cinnamomum cassia</i>	肉桂	8.39
<i>Zingiber officinale</i>	生薑	4.46
<i>Zizyphus jujuba</i>	大棗	5.97
Total (%)		100

### 2. 세포배양 및 시약

NIH3T3는 마우스의 섬유아세포주로 한국세포주은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; GibcoBRL, USA)과 gentamicin (50 mg/ml)을 첨가한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. Collagenase, elastase, tyrosinase 시약은 Sigma Chemical Co (St. Louis, USA),에서 구입하여 실험에 사용하였다.

### 3. 세포 생존율 측정

세포를 96-well plate에 8 X 10<sup>4</sup> cells/ml로 분주하여 안정화시킨 후 SHT추출물을 농도 별로 처리하여 24시간 배양하고 배지를 제거한 후 MTT 용액 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 0.5 mg/ml)을 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 CO<sub>2</sub>배양기에서 반응시키면 불용성의 결정이 생성되게 된다. 이렇게 생성된 불용성 결정을 dimethylsulfoxide (DMSO)로 완전히 녹인 다음, microplate reader (TECAN Austria GmbH, Austria)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다<sup>14)</sup>. 이렇게 측정된 값을 이용하여 세포독성을 확인하였다.

### 4. Collagenase 활성 저해 측정

피부 노화 억제 효과를 확인하기 위하여 collagenase 활성 저해 측정은 아래와 같이 측정하였다<sup>15)</sup>. 즉, 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여, 4-phenylazobenzyl

oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg (0.3 mg/ml)를 녹인 기질액 0.25 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 0.15 ml의 collagenase (0.2 mg/ml)를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 0.5 ml의 6% citric acid를 넣어 반응을 정지시킨 후 1.5 ml의 ethylacetate를 첨가하여 상등액을 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 활성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 5. Elastase 활성 저해 측정

피부 주름에 대한 개선효과를 확인하기 위하여 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide를 사용하여 37℃에서 30분간 p-nitroanilide의 생성량을 측정함으로써 porcine pancreas elastase 활성 저해를 조사하였다<sup>16)</sup>. 각 시험용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.1 ml씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 0.05 ml의 elastase, pancreatic solution (Type I: From Porcine Pancreas 유래, 0.6 Units/ml)용액을 각각 첨가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 0.1 ml의 N-succinyl-(L-Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide(1 mg/ml)을 첨가하

여 30분간 반응시키고 microplate reader를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 활성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 6. Tyrosinase 활성 저해 측정

피부에 대한 미백 효과를 확인하기 위하여 tyrosinase 활성 저해를 다음과 같이 측정하였다<sup>17)</sup>. 즉, 시험관에 0.5 ml의 1/15M sodium phosphate buffer (pH 6,8)에 0.2 ml의 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 및 0.1 ml의 시료용액을 넣은 혼합액에 0.2 ml의 110 Unit/ml mushroom tyrosinase를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시키고 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 microplate reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 7. 전자공여 활성 측정

각 시료의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여 효과로써 시료의 환원력을 측정 하였다<sup>18)</sup>. 즉, 농도별로 제조한 각 추출물 1 ml의 시료에 0.5 ml의 0.4 mM DPPH 용액을 가하고, 10초간 혼합 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 이 반응액을 microplate reader를 이용하여 517 nm 에서 흡광도를 측정 하였다.

### 8. SOD 유사 활성 측정

각 시료 0.2 ml에 3 ml의 tris-HCl buffer (50 mM tris[hydroxymethyl] aminomethane + 10 mM EDTA, pH 8,5) 와 0.2 ml의 7.2 mM pyrogallol를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1 ml의 1N HCl로 반응을 정지시킨 후 microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다<sup>19)</sup>.

### 9. Xanthine oxidase 활성 저해 측정

0.1 ml의 시료용액과 0.6 ml의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7,5)에 0.2 ml의 xanthine을 기질액으로 첨가하고 0.1 ml의 0.2 Unit/ml xanthine oxidase를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후 1 ml 의 1 N HCl를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>20)</sup>. Xanthin oxidase 활성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 10. 통계 처리

본 연구에서는 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 실험한 결과를 평균 ± 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며, p값이 0.05 미만 일 때 통계적으로 유의 하다고 판단하였다.

## 결 과

#### 1. 세포 생존율 측정

SHT 열수, 50%, 95% 에탄올 추출물의 세포 독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 추출물을 0.1, 1, 10 mg/ml의 농도로 배지에 첨가한 후 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다. NIH3T3 마우스 섬유아세포에 대한 SHT 추출물의 세포 독성을 측정한 결과, 각 추출물 모두 1 mg/ml의 농도에서 100%에 가까운 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1). 세포독성 실험결과를 바탕으로 이후 실험에서는 SHT 추출물의 농도를 독성을 갖지 않는 최대 농도로 설정하여 주름 개선 효능 평가를 실시하였다.

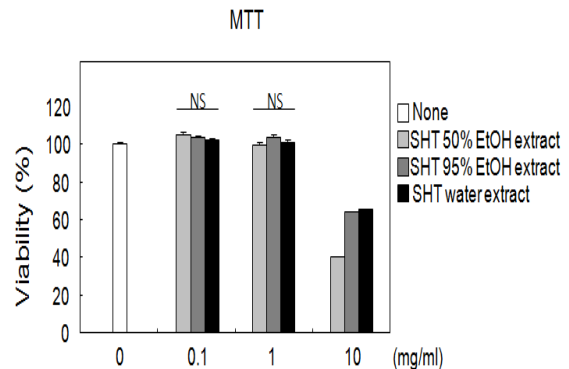


Figure 1. Effects of SHT extract on cell viabilities. The data were expressed as the mean ± S.D. (n = 3). Statistical analysis was performed by student's t-test. NS, no significance. All experiments were run in triplicate.

#### 2. Collagenase 활성 저해 측정

SHT 추출물의 collagenase 활성 저해를 측정한 결과 1 mg/ml의 SHT 50% 에탄올 추출물 농도에서 55% 이상의 collagenase 활성 저해 효과를 나타내었으며, 10 mg/ml 농도에서는 90% 이상의 유의적 collagenase 활성 저해 효과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 활성 저해가 높게 나타났다. 그리고 1 mg/ml의 collagenase 활성 저해에서 열수 추출물이나 95% 에탄올 추출물과 비교하였을 때, 50% 에탄올 추출물의 활성 저해가 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

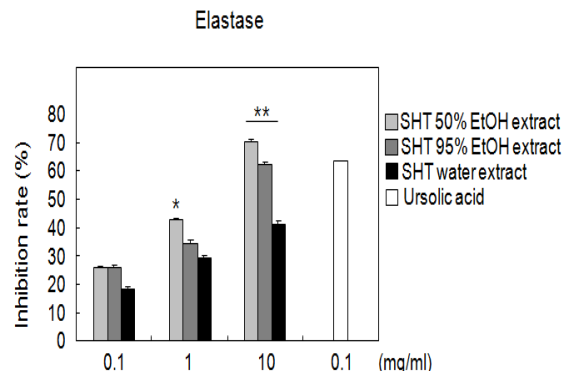


Figure 2. Effects of SHT extract on collagenase activities. The data were expressed as the mean ± S.D. (n = 3). Statistical analysis was performed by student's t-test. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with control. All experiments were run in triplicate.

#### 3. Elastase 활성 저해 측정

SHT 추출물을 이용한 elastase 활성 저해를 측정한 결과 1 mg/ml의 SHT 50% 에탄올 추출물 농도에서 42% 이상의

활성 저해를 나타내며, 10 mg/ml 농도에서는 70%이상의 활성 저해를 나타내었으며, 농도 의존적으로 활성 저해가 높게 나타났다. 그리고 collagenase 활성 저해 결과와 같이 열수 추출물이나 95% 에탄올 추출물과 비교하였을 때 50% 에탄올 추출물의 활성 저해가 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 3).

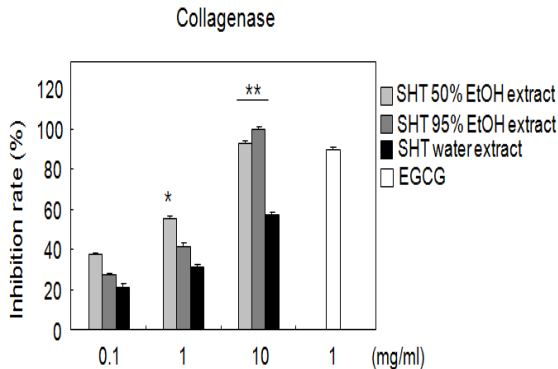


Figure 3. Effects of SHT extract on elastase activities. The data were expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Statistical analysis was performed by student's t-test. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with control. NS, no significance. All experiments were run in triplicate.

#### 4. Tyrosinase 활성 저해 측정

SHT 추출물의 tyrosinase 활성 저해를 측정한 결과 1 mg/ml의 SHT 50% 에탄올 추출물 농도에서 18% 이상의 활성 저해를 나타내었고, 10 mg/ml의 농도에서는 42% 이상의 tyrosinase 활성 저해를 나타내었다. SHT 추출물은 양성대조군인 비타민 C와 비교하였을 때 활성 저해 효과는 미약하였으나 mushroom tyrosinase에 직접적인 저해 효과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 활성 저해가 나타났다. 그리고 추출 용매에 따른 차이에서는 열수 추출물이나 95% 에탄올 추출물과 비교 하였을 때 50% 에탄올 추출물의 활성 저해가 증가하는 경향을 보였지만 유의적 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4).

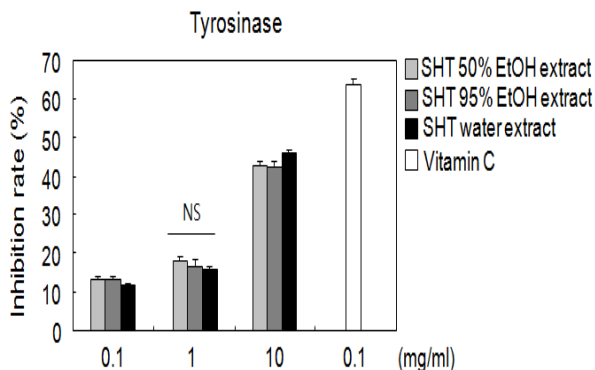


Figure 4. Effects of SHT extract on tyrosinase activities. The data were expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Statistical analysis was performed by student's t-test. NS, no significance. All experiments were run in triplicate.

#### 5. 전자공여(DPPH) 활성 측정

SHT 추출물의 항산화 작용을 확인하기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 BHA (butylated hydroxyanisole)를 이용하여 SHT 50% 에탄올 추출물의 항산화 효과를 비교

하였다. 그 결과, 1 mg/ml의 농도에서 80% 이상의 활성 저해를 나타내었고, 10 mg/ml의 농도에서는 88% 이상의 활성 저해를 나타내었다. 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈고, 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 활성 저해를 나타내었다. 그리고 추출 용매에 따른 차이에서는 열수 추출물이나 95% 에탄올 추출물과 비교 하였을 때 50% 에탄올 추출물의 활성 저해가 약간 증가하였으나 유의적 차이는 나타나지 않았다(Fig. 5).

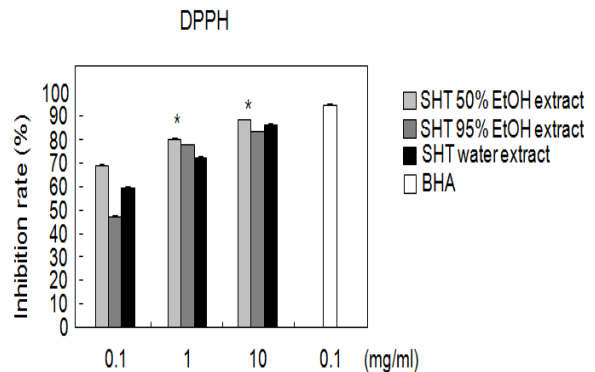


Figure 5. Effects of SHT extract on DPPH radical scavenging activities. The data were expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Statistical analysis was performed by student's t-test. \* $p$ <0.05 compared with control. NS, no significance. All experiments were run in triplicate.

#### 6. SOD 유사 활성 측정

SOD 유사 활성 측정을 위해 산화 효소인 pyrogallo과 함께 SHT 추출물을 반응시켜 측정하였다. 그 결과 농도 의존적으로 SOD 유사 활성 소거작용을 나타내었고, 1 mg/ml의 농도에서 28% 이상의 활성 저해가 나타났으며, 10 mg/ml의 농도에서는 40% 이상의 활성 저해를 나타내었다(Fig. 6). 추출 용매에 따른 유의적 차이는 나타나지 않았다.

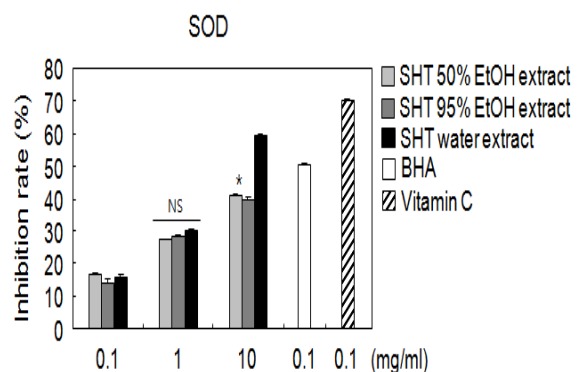


Figure 6. Effects of SHT extract on SOD-like activities. The data were expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Statistical analysis was performed by student's t-test. \* $p$ <0.05 compared with control. NS, no significance. All experiments were run in triplicate.

#### 7. Xanthine oxidase 활성 저해 측정

Superoxide radical 이나 hydrogenperoxide와 같은 산화제의 source로서 작용하는 효소인 xanthine oxidase의 활성 저해를 측정한 결과, SHT 50% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타냈으며, 1 mg/ml의 농도에서 75%이상, 10 mg/ml의 농도에서는 80%이상의

소거 효과를 나타내었다. 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 활성 저해를 나타내어 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다(Fig. 7). 추출 용매에 따른 유의적 차이는 없었다.

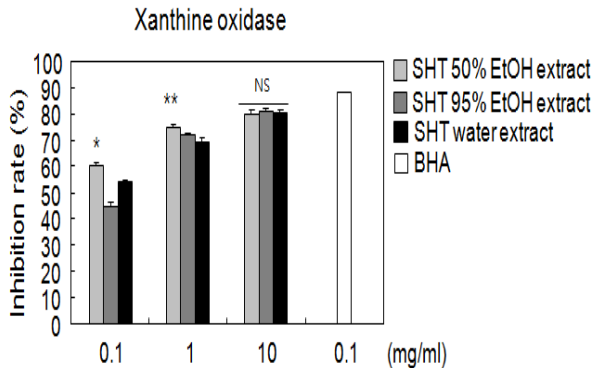


Figure. 7. Effects of SHT extract on xanthine oxidase activities. The data were expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Statistical analysis was performed by student's t-test. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with control. NS, no significance. All experiments were run in triplicate.

## 고찰

현대인들은 과학기술 문명의 급속한 발달로 인해 경제적, 시간적으로 풍요로운 삶을 누리고 있다. 그로 인해 건강뿐만 아니라 외적 아름다움에 대한 욕구가 강해지면서 피부노화에 대한 관심 또한 높아지고 있다. 피부노화는 외부 환경적 요인, 생리적 요인, 영양학적 요인, 기타 스트레스, 생활습관, 잘못된 관리습관 등에 의해 유발 될 수 있으나 피부노화의 원인으로 밝혀진 것 중 가장 크게 대두 되고 있는 것은 자외선과 호흡을 통해 생성되는 활성산소(free-radical)이다<sup>21)</sup>. 이처럼 활성산소가 피부노화의 주원인으로 밝혀짐에 따라 활성산소를 제거하여 피부노화를 예방하고 지연시킬 수 있는 항산화 및 항노화 효과를 갖는 천연한방소재 화장품 개발에 대한 관심이 고조 되고 있다. 雙和湯 처방의 이름은 氣와 血을 雙으로 조화롭게 해준다는 의미를 가지고 있다. 方藥合編 上統 31편에 따르면 노동 후, 허약해 졌거나 몸의 손상이 왔을 때, 큰 병을 앓고 난 뒤 기력이 결핍되었을 때 사용하도록 권장하고 있다<sup>22)</sup>. 본 연구에서 사용되는 소재인 雙和湯은 芍藥, 當歸, 黃芪, 川芎, 熟地黃, 甘草, 肉桂, 生薑, 大棗로 구성되어 있다. 芍藥(*Paeonia lactiflora* Pall)은 한방에서 진통, 진정작용, 항균작용, 항혈전 작용, 항종양, 면역증강작용이 있어 치료약재로 사용되어왔고, 주성분인 albiflorin과 paeoniflorin은 항산화 효과가 있으며 최근 *in vitro* 연구에서 콜라겐합성을 증가 시키는 효과가 있음이 밝혀졌다<sup>23)</sup>. 當歸(*Angelica gigas* Nakai)는 한방에서 진정, 진통작용, 항종양작용, 뇌세포 보호 작용 등을 하며 빈혈, 환활 효과가 있어 혈행 장애에 의한 부인과 질환에 사용된다. 주성분으로는 decursin, decursinol angelate, decursinol 등이 있다<sup>24)</sup>. 黃芪(*Astragalus membranaceus* Bunge)의 생리활성 작용은 항산화 효과, 간 기능 보호효과, 항바이러스효과, 항고혈압효과, 세포성장효과, 이노 강장 작용, 항염증 및 면역증강작용 등이 보고되었다<sup>25)</sup>. 주성분으로 triterpenoids, isoflavonoids, polysaccharides 등이 알려져 있으며 이 외 다양한 성분들이

포함되어있다<sup>26)</sup>. 川芎(*Cnidium officinale* Makino)은 근경을 건조한 것으로 진경, 혈관확장, 뇌세포 보호 작용, 항산화활성 및 항균활성<sup>27)</sup> 등의 작용을 하며, 함유성분으로는 ligustilide, cnidilide, neocnidilide, butylphthalide, sedanonic acid anhydride 등이 있다<sup>28)</sup>. 熟地黃(*Rehmannia glutinosa*)의 약리작용은 말초혈관 순환장애 개선, 항알러지 작용, 골 형성 촉진작용 등이 알려져 있다. 항노화작용과 관련하여 혈청 glutathione peroxidase의 활성을 증가시키고 혈청 과산화지질의 함량을 감소시켜 혈중 SOD (Superoxide dismutase)의 활성을 증가시킨다고 알려져 있으며<sup>29)</sup>, 주성분으로 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde가 있다. 甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)는 콩과(Leguminosae)에 속하는 다년생 본초로서 주성분인 glycyrrhizin, glycyrrhetic acid는 사포닌 계통으로 바이러스질환, 만성간염 및 알레르기에 효과가 입증되었고, 미량의 flavonoid는 항염증작용, 진정작용, 항궤양작용, 항균 및 항산화 효과가 보고되고 있다<sup>30)</sup>. 이처럼 몇몇 단일 소재의 항산화 및 항노화 효과에 대한 연구는 많이 이루어져 있지만 雙和湯에 대한 항산화 및 항노화 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 항산화 활성이 있을 것이라 사료되는 雙和湯을 피부에 적용한 후 열에는 안정성을 가지며, 독성이나 발암성위험이 없는 안전한 천연 항산화제로서의 효능여부를 검증하고자 하였다.

피부 노화 현상은 피부 각질층의 구조변화, 표피세포의 분화감소, 진피내 섬유아세포에 의한 단백질 및 세포간 물질의 생체합성기능 저하에 의해 발생한다<sup>31)</sup>. 세포 외 기질의 주요 구성 성분인 콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로서, 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다. 이러한 콜라겐은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다<sup>32)</sup>. 그래서 SHT 추출물의 collagenase 활성 저해를 확인해 본 결과 SHT 에탄올 추출물이 10 mg/ml 농도에서 90% 이상의 collagenase 활성 저해 효과를 나타내어 강력한 천연 항산화제로 알려져 있는 epigallocatechin gallate (EGCG) 1 mg/ml 농도와 비교해 보았을때 유사한 활성 저해를 나타내어 콜라겐의 분해를 막아 피부 노화의 대표적 징후인 주름에 효과적임을 확인하였다.

피부 진피조직 속에서는 콜라겐과 피부의 탄력성에 관련되는 엘라스틴이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 파괴되면서 내인성 피부 노화가 발생한다. Elastase 효소는 진피 내 피부탄력을 유지하는데 중요한 기질 단백질인 엘라스틴을 분해할 뿐만 아니라 콜라겐도 분해하여 피부의 탄력을 저하시킨다<sup>33)</sup>. 그러므로 피부노화의 주원인 중의 하나인 엘라스틴 분해효소인 elastase활성을 저해시킴으로써 피부 결합 조직을 유지시켜, 탄력을 유지하고 피부가 처지는 것을 예방 할 수 있는 것으로 알려져 있으며<sup>34)</sup> ursolic acid등이 elastase 저해제로 사용되고 있다. SHT 추출물을 이용한 elastase 활성 저해를 측정된 결과 특히 SHT 50% 에탄올 추출물이 10 mg/ml 농도에서 70%이상의 활성저해를 나타내어 elastase 활성 저해가 우수함을 알 수 있었다.

멜라닌은 생체 내에서 표피, 진피, 점막상피, 모낭, 망막 등 기타 조직에서도 발견되며, 특히 각질형성세포에서 분비된 여러 인자가 멜라닌 세포의 성장과 형태 및 분화에 영향을 미

치며 궁극적으로 피부의 색소침착에 영향을 미친다<sup>35)</sup>. 멜라닌은 티로신을 기질로 하여 tyrosinase 효소에 의하여 티로신에서 DOPA, DOPA에서 DOPAquinone으로 전환되고, 이는 다시 DOPAchrome, DHI, DHICA를 형성하고 최종적으로 중합반응에 의하여 멜라닌 polymer를 형성하는 것으로 알려져 있다<sup>36)</sup>. 이 과정에서 초기 두 단계의 반응이 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 일어나며, 멜라닌 세포에서의 tyrosinase 활성은 피부 멜라닌 생성에 결정적으로 영향을 미치게 되고 피부 멜라닌생성 억제제 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제제는 매우 큰 의미를 갖게 된다. 따라서 멜라닌 생성을 억제하는 효소를 찾고 연구하는 것이 피부색소 침착을 막고 미백제를 개발하는데 있어서 가장 중요한 과제라 할 수 있다<sup>37)</sup>. SHT 추출물의 tyrosinase 활성 저해를 측정할 결과 tyrosinase 활성 저해능을 갖는 양성대조군 비타민 C와 비교하였을 때 활성 저해 효과는 미약하였으나, mushroom tyrosinase에 직접적인 저해 효과를 나타내었으며, 농도 의존적으로 활성 저해가 나타났다.

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질 과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다<sup>38)</sup>. 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 DPPH의 radical을 소거시켜 보라색을 잃어 탈색되며 측정 시 그 수치도 낮아진다. 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질 과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로써 인체 기능이 저하되고 동시에 색소 침착, 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 따라서 생체 내 항산화 방어 시스템을 증가시키거나 활성산소를 조절할 수 있는 천연물 유래의 천연항산화제 개발연구의 필요성이 강조되고 있다. SHT 추출물의 항산화 작용을 확인하기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 BHA (butylated hydroxyanisole)를 이용하여 SHT 추출물의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 SHT 추출물 10 mg/ml 농도에서 80% 이상의 DPPH radical 소거작용을 나타냈고, 0.1 mg/ml 농도의 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 활성 저해를 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 SHT 50% 에탄올 추출물 자체가 항산화 작용이 높고 피부에서 흔히 일어나는 활성산소에 대한 노화 방지에 도움이 될 것으로 사료된다.

SOD (superoxide dismutase)는 항산화 효소로서 세포에 유해한 oxygen radical을 과산화수소 전환시키고 다시 catalase에 의하여 무해한 물 분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하여 산화방지와 노화 억제에 밀접한 관계가 있다<sup>40)</sup>. SOD는 분자량이 비교적 큰 단백질로서 열이나 알칼리에 약하여 이러한 단점을 보완할 수 있는 저분자물질로 체내에서 역할이 유사한 SOD 유사활성 물질에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 superoxide의 반응성을 억제하여 항산화력을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>41)</sup>. SOD 유사활성 측정을 위해 산화 효소인 pyrogallol과 함께 SHT 추출물을 반응시켜 측정할 결과 10 mg/ml 농도에서는 40% 이상의 활성 저해를 나타냄으로써 SHT 추출물의 SOD 유사활성이 산화 방지는 물론 노화억제와도 밀접한 관계가 있음을 보여준다.

Xanthine oxidase는 모든 purine의 terminal oxidation에서 rate-limiting enzyme으로 작용하며 superoxide radical이나 hydrogen peroxide와 같은 산화제의 source로서 작용하는 효소이다. 생체내 유리기 생성계의 하나인 xanthine oxidase는 비특이적 효소로서 주로 퓨린체의 대사 산물인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 uric acid를 생성하는 반응의 촉매로 작용한다. Xanthine oxidase 저해는 통풍억제 및 자유산소기의 생성억제를 유발하므로 생물학적으로 중요한 의미가 있다<sup>42)</sup>. 양성 대조군으로 BHA를 이용하여 SHT 추출물의 superoxide radical 소거효과를 비교한 결과 1 mg/ml 농도에서 70% 이상의 superoxide radical 소거효과를 나타냄으로써 0.1 mg/ml 농도의 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 활성 저해를 나타내어 우수한 superoxide radical 소거능을 나타냈음을 알 수 있었다.

실험 관찰 항목에서 SHT의 50% 에탄올 추출물에서 전반적으로 우세한 항산화 및 항노화 관련 효소의 활성 억제 효과를 보였는데, 이는 95% 에탄올 용매나 물에 추출되는 친지성, 친수성 성분이 아닌 50% 에탄올 용매에 우세하게 추출되는 유효성분들에 의한 단독 효과나 이들 성분들의 시너지 효과에 의한 것으로 추측되며, 추후 자세한 성분 및 효능 연구가 뒷받침 되어야 할 것으로 생각된다.

## 결론

최근, 천연 한방소재물을 이용한 기능성 한방화장품 개발이 지속적으로 증가하는 추세이며, 소재개발이 매우 활발하게 진행되고 있다. 따라서 雙和湯 추출물의 기능성 화장품 소재 활용 여부와 추출 용매에 따른 활성 변화를 관찰하기 위하여 열수, 50%, 95% 에탄올 추출액을 이용하여 NIH3T3 마우스의 섬유아세포에 대한 세포 생존율, 항산화 활성 효과 및 노화관련 효소에 미치는 영향을 관찰하였고, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NIH3T3 마우스 섬유아세포에 대한 복합추출물의 세포 독성은 세포 생존율에는 유의적 영향을 나타내지 않았다.
2. Collagenase 활성 저해에서, SHT 50% 에탄올 추출물에서 collagenase 활성 저해 효과를 나타내었다. 그리고 추출 용매별로 비교 하였을 때 50% 에탄올 추출물의 활성 저해가 가장 높은 것으로 나타났다.
3. Elastase 활성 저해에서, SHT 50% 에탄올 추출물은 1 mg/ml 농도에서 추출 용매별로 비교 하였을 때 50% 에탄올 추출물의 활성 저해가 가장 높은 것으로 나타났다.
4. Tyrosinase 활성 저해를 측정할 결과 SHT 50% 에탄올 추출물은 1 mg/ml의 농도에서 18% 이상의 활성 저해를 나타내었고, 10 mg/ml의 농도에서는 42% 이상의 tyrosinase 활성 저해를 나타내었다. 그리고 추출 용매에 따른 차이에서는 50% 에탄올 추출물의 활성 저해가 좋았지만 유의적 차이는 없었다.
5. DPPH radical 소거율, xanthine oxidase 저해와 SOD-like 활성을 이용하여 항산화 효과를 측정할 결과, 1 mg/ml의 농도에서 DPPH radical 소거율이 80%, xanthine

oxidase 저해효과가 75%, 그리고 SOD 유사 활성이 28%를 나타내었다. 농도 의존적으로 억제효과를 나타냈고 양성 대조군과 비교하였을 때 비슷한 활성 저해를 나타내어, 활성산소에 대한 노화를 방지하는데 밀접한 관계가 있음을 보여준다.

이상의 *in vitro* 연구 결과로 보아 雙和湯 추출물은 세포독성이 없으면서 항산화 및 항노화 효소 활성을 갖는 천연한방 소재로서, 주름개선과 미백용 한방화장품의 소재로 활용될 수 있을 것으로 생각되며, 임상 효능 평가 등의 계속적인 연구를 통해 실제로 미백 및 주름개선을 위한 기능성 향장 소재로 개발될 가능성이 매우 높다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역산업선도기술개발사업의 지원에 의해 수행된 연구과제(과제번호 : 70004130)의 일부로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Gilchrest BA. Skin aging and photoaging : an overview. *J Ame Acad Dermatol*. 1989 ; 21 : 610-3.
- Kim NM, Koo BS, Lee SK, Hwang EI, So SH, Do JH. Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-I activity in human dermal fibroblast. *J Gins Res*. 2007 ; 31 : 86-2.
- Choe SY, Yang KH. Toxicological Studies of Antioxidants, Butylated Hydroxytoluene (BHT) and Butylated Hydroxyanisole (BHA). *Korean J Food Sci Technol*. 1982 ; 13 : 233-8.
- Huh J. Donguibogam. 1nd, ed. Seoul : Namsandang. 1976 : 477.
- Hwang DY. Bangyakhappyeon. 1nd, ed. Seoul : Songwonmunhwasa. 1978 : 69.
- Cho KY. Studies on the productivity in manufacturing Ssang Wha Tang. *J Food Sci Nut*. 1995 ; 8 : 17-22.
- Nam SH, Kang MY. Screening of antioxidative activity of hot-water extracts from medicinal plants. *J Korean Soci Appl Biol Chem*. 2000 ; 43 : 141-7.
- Park WK, Park SD. Effects of Ssanghwa-tang on the antifatigue action and brain levels of norepinephrine, serotonin, 5-hydroxyindole - acetic acid and dopamine. Daegu Haany University Jehan Oriental Medical Academy. 1995 ; 1 : 130-45.
- Ann BN, Kim SK, Shim CK, Chung YB. Effects of a chinese traditional medicine, Ssang Wha Tang, on the pharmacokinetics of sulfobromophthalein in the rats of hepatic failure Induced by carbon tetrachloride. *Yakhak Hoeji*. 1984 ; 28: 207-5.
- Kim, IH, Hwang GJ. Studies on the anti-inflammatory activities of 'Ssangwha-Tang'. *Korean J Pharmaco*. 1981 ; 12 : 131-5.
- Han DS, Lee HK, Gho HJ. Analgesic and anticonvulsory effects of 'Ssanghwa-Tang'. *Korean J Pharmaco*. 1983 ; 14 : 60-3.
- Kim YB, Kwon KB, Park JS, Park KH, Kim BR, Lee HS, Ryu DK. Gugissanghwatang water extract on the sexual behavior and serum testosterone concentration in male rats. *Korean Soci Pathol*. 1999 ; 13 : 152-7.
- Lee H, Lim HH. Effect of Ssanghwa-tang (Shuanghe-tang) added to Cervi Cornu Parvum on bone density and bone biochemical marker in ovariectomized rats. *Korean J Orient Med*. 2003 ; 13 : 45-67.
- Hwang J, Lee S, Lee JT, Kwon TK, Kim DR, Kim H, Park HC, Suk K. Gangliosides induce autophagic cell death in astrocytes. *Brit J Pharmacol*. 2010 ; 159 : 586-603.
- Wuensch E, Heidrich HG. On the quantitative determination of collagenase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1963 ; 333 : 149-1.
- Cannell RJP, Kellan SJ, Owsiansk AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med*. 1988 ; 54 : 10-4.
- Yagi A, Kanbara T, Morinoby N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med*. 1986 ; 3981 : 517-9.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181 : 1199-0.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide amino radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem / FEBS*. 1974 ; 47 : 469-74.
- Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem*. 1969 ; 244 : 3855-63.
- Hong JK. A study on skin aging caused by free-radical and on efficacy of antioxidant vitamins. *Korean J Aesthetics Cosmetics*. 2009 ; 18 : 51-62.
- Ma JY, Park DH, Park KS, Do KT, Shin HK. Acute toxicity study on SsangHwaTang in mice. *Korean J Orient Med*. 2007 ; 13 : 161-4
- Jin MH, Jung MH, Lim YH, Lee SH, Kang SJ, Cho WG. Promoting synthesis of collagen from Angelica dahurica root. *Korean J Pharmaco*. 2004 ; 35: 315-9.
- Kim DS, Um YR, Yang MC, Yun NY, Ma JY. Polyphenol contents and antioxidant activities of

- fractions from Ssanghwa-tang and fermented Ssanghwa-tang. Korean J Orient Med. 2010 ; 16 : 175-8.
25. Rios JL, Waterman PG. A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*. Phytother Res, 1997 ; 11 : 411-8.
26. Lin LZ, He XG, Lindermaier M, Nolan G, Yang J, Cleaty M, Qiu SX, Cordell GA. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. J Chromatogr A. 2000 ; 876 : 87-95.
27. Do JR, Kang SN, Kim KJ, JO JH, Lee SW. Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic constituents in the water extract of medicinal plants. J Food Sci Nutr. 2004 ; 13 : 640-5.
28. Lee SY, Kim MJ, Yim DS, Chi KJ, Kim HS. Phthalide content of *Cnidium* rhizome. Korean J Pharmaco. 1990 ; 21 : 69-3.
29. Kim HC. Hanyakyakjehak, 1nd, ed. Seoul : Jipmoondang, 2001 : 467-9.
30. Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of Licorice Root(*Glycyrrhiza glabra*). Korean J Food Sci Technol. 2006 ; 38 : 584-8.
31. Wiedow O, Schröder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. J Biol Chem. 1990 ; 265 : 14791-5.
32. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999 ; 274 : 21491-4.
33. Starkey PM, Barrett AJ, Burleigh MC. The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. Biochimica et Biophysica Acta. 1977 ; 483 : 386-97.
34. Tsuji N, Moriwaki S, Suzuki Y, Takema Y, Imokawa G. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. Photochem Photobiol. 2001 ; 74 : 283-90.
35. Jo YO, Kong YH, Lee YC, Kim SS, Choi SY. Inhibitory effect of white Ginseng fraction on skin pigmentation. Korean J Med Crop Sci. 2008 ; 16 : 192-4.
36. Park YJ, Sim SS. Effect of hot-water extract from *Laminaria japonicus* on production of melanine and inflammatory mediators. The Graduate School of Food & Drug Administration, Chung-Ang University, 2004.
37. Prota G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. J Invest Dermatol. 1980 ; 75 : 122-7.
38. Luciana L, Mensor FS, Menezes GG, Leitao AS, Reis TC, Santos D, Cintia SC, Suzana GL. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytother Res. 2001 ; 15 : 127-30.
39. Jung HY. Aging, free radical, arteriosclerosis. J Life Sci. 1991 ; 1 : 2-14.
40. Kim JS, Na CS, Kim YG. The involvement of oxygen free radicals in the onset of aging. J Korean orient Med. 1997 ; 3 : 229-9.
41. Kitani K, Minami C, Amamoto T, Kanai S, Ivy GO, Carrillo MC. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders: potentials of propargylamines for human use. Ann N Y Acad Sci. 2002 ; 959 : 295-307.
42. Ra KS, Chung SH, Suh HJ, Son JY, Lee HK. Inhibitor of xanthine oxidase from onion skin. Korean J Food Sci Technol. 1998 ; 30 : 697-1.