

국산 생약 추출물의 항염증 활성 스크리닝

안 상 미[†] · 김 형 건 · 최 은 정 · 황 형 훈 · 이 은 석 · 백 지 훈 · 부 용 출* · 고 재 속

(주)더마프로 피부과학연구소, *경북대학교 의학전문대학원 분자의학교실 세포기질연구소
(2013년 10월 11일 접수, 2013년 10월 23일 수정, 2013년 12월 3일 채택)

Screening for Anti-inflammatory Activities in Extracts from Korean Herb Medicines

Sang Mi An[†], Hyoung Gun Kim, Eun Jung Choi, Hyoung Hoon Hwang, Eunseok Lee,
Ji Hwoon Baek, Yong Chool Boo*, and Jae Sook Koh

Dermapro Skin Research Center, DERMAPRO LTD., 4F Jiho B/D, Bangbaejoongang-ro 30,
Seocho-gu, Seoul 137-843, Korea

*Department of Molecular Medicine, Cell and Matrix Research Institute, BK21 Medical Education Program for Human
Resources, Kyungpook National University School of Medicine

(Received October 11, 2013; Revised October 23, 2013; Accepted December 3, 2013)

요약: 화장품은 일반인이 장기간 연용하는 제품으로 인체 피부에 대한 안전성이 매우 중요하다. 화장품에 의한 접촉피부염은 자극성 물질이 피부에 접촉 후 침투하여 유발하는 염증반응으로 활성화된 면역세포에서 염증을 매개하는 다양한 인자를 분비함으로써 시작된다. 본 연구에서는 국산 생약 추출물을 이용하여 RAW264.7 대식 세포에서 염증 관련 인자에 대한 영향을 통해 항염증 활성을 스크리닝 하였다. 51종의 국산 생약 추출물 중 측백, 측백엽(초), 향부자, 형개, 동과자, 산약, 산약(초), 상지, 송절, 택사의 에탄올 추출물 10종이 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 세포독성을 감소시키고 동시에 염증 관련 인자인 Nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α 의 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 이들 생약 추출물은 인체피부에서도 자극을 유발하지 않음을 인체 첩포시험을 통해 검증하였다. 따라서, 항염증 활성이 확인된 10종 국산 생약 추출물은 피부 자극을 예방할 수 있는 화장품 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: Cosmetics are products used over long periods by the public, and their safety is very important. Contact dermatitis induced by cosmetics is the result of an inflammatory response of the skin to direct irritancy. The initial event that this inflammatory response is observed is the release of pro-inflammatory cytokines. In this study, the anti-inflammatory activities of extracts from Korean herb medicines were investigated using RAW264.7 macrophage. Among the fifty one extracts tested, the ethanol extracts from *Biotae Orientalis Folium*, *Biotae Orientalis Folium* (roasted), *Cyperi Rhizoma*, *Nepetae Spica*, *Benincasae Semen*, *Dioscoreae Rhizoma*, *Dioscoreae Rhizoma* (roasted), *Mori Ramulus*, *Pini Ramulus* and *Alismatis Rhizoma* reduced the cytotoxicity and inhibited the productions of Nitric oxide (NO) and cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α n lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophage. Additionally, they didn't induce the skin irritation when tested the human patch test. Overall, the result of this study suggests that the extracts of the ten Korean herb medicines are useful cosmetic agents for preventing the skin irritation.

Keywords: Korean herb medicines, anti-inflammatory activities, Skin irritation, Cosmetics

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

1. 서 론

화장품과 같은 피부 외용제는 의약품과 달리 불특정 다수가 장기간 연용하는 제품으로 사용 방법이 기본적으로 사용자에게 맡겨진다는 특징을 가지고 있어 모든 가능성에 대한 안전성이 확보되어야 한다. 하지만 화장품의 소재나 제형이 급속도로 다양화되고 발전함에 따라 일반 소비자들은 다양한 제품에 노출되고 있다. 때문에 화장품에 의한 피부 이상반응 보고도 증가하는 추세이다[1-4].

화장품에 의한 피부 이상반응 중에는 접촉피부염(Contact Dermatitis)이 가장 흔하게 발생하는데 접촉피부염은 자극성 물질이 피부에 접촉하고 피부를 통해 침투하여 유발하는 염증반응으로 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 반응이다. 염증반응은 면역세포가 생체의 이물질 등을 인식하여 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증을 매개하는 많은 인자를 분비함으로써 시작된다[5-7].

Nitric oxide (NO)는 높은 반응성을 가진 생체 분자로서, NO synthase에 의해 L-argine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 lipopolysaccharide (LPS)로 자극하면 inducible NOS가 발현되어 NO를 생성하게 된다[8, 9]. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다. 또한, 외부 자극에 의해 활성화된 대식세포는 interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine을 생성하게 된다[10].

생약(生藥 Crude drugs)은 의약품의 일종으로 인체에 유익한 동식물의 본체, 뿌리, 줄기 등 천연으로 산출되는 자연물을 날로 또는 일차 가공하여 약으로 사용하는 것으로 단일 성분의 화합물로 된 의약품과는 달리 많은 종류의 성분이 혼재하고 있어 그 효과가 복합적이고 상대적으로 부작용이 적다고 알려져 있고[11], 그 활성성분은 항산화, 항암, 항균 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다[12-15]. 특히, 인체의 면역시스템 중 보체계(complement system)나 면역 관련 cytokine의 조절을 통해 생체방어 시스템을 강화하는데 많은 영향을 준다. 따라서, 본 연구에서는 국산 생약 추출물을 통해 염증 매개물질인 NO, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 억제하여 피부 자극반응을 예방할 수 있

는 화장품 소재로서 가능성을 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 생약 추출물

본 시험에 사용된 국산 생약 추출물은 한국생명공학연구원/한국식물추출물은행에서 구입하여 사용하였다. 총 51종의 식물 추출물 중 26종은 95.0% 에탄올로 45 °C에서 15 min간 초음파 처리 후 상온에서 2 h 정지시키는 과정을 하루에 10회 반복하고 이를 3일간 실시하여 추출되었다. 나머지 25종은 증류수로 전통적인 생약추출방법인 열탕추출(100 °C, 2.5 h)을 통해 추출되었다. 모든 생약시료는 추출 후 여과, 농축, 건조과정을 거쳐 조제되었다(Table 1).

2.2. 시약 및 기기

Fetal bovine serum (FBS), Antibiotic-Antimycotic, RPMI 1640, Trypsin-EDTA 등의 세포 배양용 시약들은 Life technologies (Gibco[®], USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약 중 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), Lipopolysaccharide (LPS), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Squalane은 SIGMA (USA)에서 구입하였다. Cytokine 측정을 위하여 사용된 Mouse IL-1 β ELISA Kit는 Life technologies (Invitrogen[™], USA)에서 구입하였고, OptEIA[™] Mouse IL-6 ELISA Kit과 OptEIA[™] Mouse TNF- α ELISA Kit은 BD Bioscience (USA)에서 구입하였다.

2.3. 세포배양

RAW264.7 대식세포는 ATCC (CRL-2278[™], USA)에서 구입하여 37 °C, 5% CO₂조건하에서 10% FBS와 1% Antibiotic-Antimycotic (10 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 0.25 μ g/mL amphotericin)이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

2.4. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 보라색 formazan으로 환원되는 MTT의 원리를 이용하여 분석하였다[16]. RAW264.7 세포를 24-well plate에 2 \times 10⁵ cells/mL의 농도로 접종하여 24 h 배양한 뒤 배지를 버리고 Phosphate Buffered Saline

Table 1. Lists of Korean Herb Medicines Used for This Study

Scientific name	Korean name	Chinese name	Solvent of extract
<i>Selaginellae Herba</i>	권백	卷柏	Ethanol 95.0v/v%
<i>Perillae Folium</i>	소엽	蘇葉	Ethanol 95.0v/v%
<i>Pruni Humilidis Semen</i>	옥리인	郁李仁	Ethanol 95.0v/v%
<i>Arisaematis Rhizoma</i>	남성	南星	Ethanol 95.0v/v%
<i>Massa Medicata Fermentata</i>	신곡	神曲	Ethanol 95.0v/v%
<i>Peucedani Radix</i>	전호	前胡	Ethanol 95.0v/v%
<i>Bambusae Folium</i>	죽엽	竹葉	Ethanol 95.0v/v%
<i>Cnidii Rhizoma</i>	천궁	川芎	Ethanol 95.0v/v%
<i>Biotae Orientalis Folium</i>	측백	側柏	Ethanol 95.0v/v%
<i>Biotae Orientalis Folium</i>	측백엽(초)*	側柏葉	Ethanol 95.0v/v%
<i>Gardeniae Fructus</i>	치자(초)*	梔子	Ethanol 95.0v/v%
<i>Cyperi Rhizoma</i>	향부자	香附子	Ethanol 95.0v/v%
<i>Nepetae Spica</i>	형개	荊芥	Ethanol 95.0v/v%
<i>Benincasae Semen</i>	동과자	冬瓜子	Ethanol 95.0v/v%
<i>Santali alba Lignum</i>	백단향	白檀香	Ethanol 95.0v/v%
<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	산약	山藥	Ethanol 95.0v/v%
<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	산약(초)*	山藥	Ethanol 95.0v/v%
<i>Mori Ramulus</i>	상지	桑枝	Ethanol 95.0v/v%
<i>Pini Ramulus</i>	송절	松節	Ethanol 95.0v/v%
<i>Rehmaniae Radix crudus</i>	지황	地黃	Ethanol 95.0v/v%
<i>Lycopi Herba</i>	택란	澤蘭	Ethanol 95.0v/v%
<i>Alismatis Rhizoma</i>	택사	澤瀉	Ethanol 95.0v/v%
<i>Polygoni Avicularis Herba</i>	편축	篇蓄	Ethanol 95.0v/v%
<i>Vitidis Viniferae Caulis</i>	포도등	葡萄藤	Ethanol 95.0v/v%
<i>Cartami Semen</i>	홍화자	紅花子	Ethanol 95.0v/v%
<i>Glycine Semen nigra</i>	흑두	黑豆	Ethanol 95.0v/v%
<i>Angelicae koreanae Radix</i>	강활	羌活	Distilled Water
<i>Selaginellae Herba</i>	권백	卷柏	Distilled Water
<i>Araliae Cordatae Radix</i>	독활	獨活	Distilled Water
<i>Paeoniae Radix alba</i>	백작약	白芍藥	Distilled Water
<i>Atractylodis Rhizoma alba</i>	백출	白朮	Distilled Water
<i>Paeoniae Radix rubra</i>	적작약	赤芍藥	Distilled Water
<i>Melonis Calyx</i>	과체	瓜蒂	Distilled Water
<i>Cirsii Radix</i>	대계근	大薊根	Distilled Water
<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i>	백하수오	白何首烏	Distilled Water
<i>Rubi Fructus</i>	복분자	覆盆子	Distilled Water
<i>Polygonati Officinalis Rhizoma</i>	옥죽	玉竹	Distilled Water
<i>Lonicerae Folium</i>	인동	忍冬	Distilled Water
<i>Zingiberis Rhizoma</i>	건강	乾薑	Distilled Water
<i>Angelicae tenuissimae Radix</i>	고본	藁本	Distilled Water
<i>Fagopyri Semen</i>	교맥	蕎麥	Distilled Water
<i>Cnidii Rhizoma</i>	천궁	川芎	Distilled Water
<i>Aconiti Jaluencis Tuber</i>	초오	草烏	Distilled Water
<i>Vitidis Viniferae Radix</i>	포도근	葡萄根	Distilled Water
<i>Zizyphi Fructus</i>	대추	大棗	Distilled Water
<i>Akebiae Caulis</i>	목통	木通	Distilled Water
<i>Perillae Folium</i>	소엽	蘇葉	Distilled Water
<i>Pini Pollen</i>	송화	松花粉	Distilled Water
<i>Massa Medicata Fermentata</i>	신곡	神曲	Distilled Water
<i>Astragali Radix</i>	황기	黃耆	Distilled Water
<i>Siegesbeckiae Herba</i>	희침	豨歛	Distilled Water

* The herb was roasted before the extraction.

(PBS)로 세척한 다음 FBS를 포함하지 않는 새로운 배지로 교환하였다. 세포는 LPS (200 ng/mL)로 자극시키거나 혹은 자극시키지 않은 상태에서 최종 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 각 생약 추출물을 처리하고 세포를 다시 24 h 배양 후, 0.5% MTT 용액을 각 well에 100 μL 씩 첨가하여, 4 h 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 다음 DMSO를 200 μL 씩을 넣고 10 min간 흔들어진 다음 Microplate reader (Sunrise™ TECAN, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 흡광도 값을 나누어 백분율로 나타내었다.

2.5. NO 생성 측정

NO 생성량은 Griess 시약을 이용한 Nitrite/Nitrate Assay Kit (SIGMA, USA)을 통해 세포 배양액 내 존재하는 NO의 안정된 산화물인 NO_2^- 를 측정하여 분석하였다. RAW264.7 세포를 24-well plate에 2×10^5 cells/mL의 농도로 접종하여 24 h 배양한 뒤 배지를 버리고 PBS로 세척한 다음 FBS를 포함하지 않는 새로운 배지로 교환하였다. 생약 추출물(50 $\mu\text{g/mL}$)과 LPS (200 ng/mL)를 처리하여 다시 24 h 배양하였다. 세포 배양상층액 100 μL 와 Griess 시약 100 μL 를 혼합하여 96-well plate에서 10 min 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 NaNO_2 를 이용하여 표준곡선을 구하여 정량하였다.

2.6. Cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 측정

위와 동일한 과정으로 배양한 RAW264.7 세포는 24 h 배양 후 생약 추출물(50 $\mu\text{g/mL}$)과 LPS (200 ng/mL)를 처리하여 다시 24 h 배양하였다. 24 h 후 세포 배양상층액을 회수하여 ELISA Kit을 이용하여 상층액에 포함된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 함량을 측정하였다. 측정법을 간단하게 요약하면, IL-1 β , IL-6, TNF- α 에 특이적인 단일항체로 코팅된 96-well plate에 세포 배양상층액을 첨가하여 2 h 반응시킨 후 biotin이 결합된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 단일항체와 streptavidin이 결합된 peroxidase를 차례로 넣어 검출한다. 발색기질은 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)를 사용하였고 재조합된 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 희석하여 표준곡선을 구하여 정량 하였다.

2.7. 인체 첩포시험

인체 첩포시험은 헬싱키 선언에 근거한 윤리규정 [17] 및 식품의약품안전처 화장품 인체적용시험가이드라인[18]에 따라 실시되었으며, Frosch & Kligman이 고안한 방법[19]을 응용하여 특정 피부질환 및 알레르기가 없는 20세~47세의 건강한 여성 피험자 33명(평균연령 35.4 ± 9.3 세)을 대상으로 실시하였다. 시험시료로 생약 추출물을 5%의 농도로 80% 에탄올에 녹인 후 최종 농도는 0.5%가 되도록 squalane에 희석하여 적용하였다. 먼저, 첩포부위인 등 부위를 70% 에탄올로 소독한 후 시험물질 20 μL 가 적용된 IQ chamber (Chemotechnique Diagnostics AB, Sweden)를 첩포 하였다. 48 h 후 첩포를 제거하고 skin marker (Chemotechnique Diagnostics AB, Sweden)로 시험부위를 표시하였으며, 30 min, 24 h 후에 각 시험 부위를 평가하였다. 평가 기준은 Table 2에 제시한 CTFA 가이드라인[20]의 판정기준에 따랐으며, 2회에 걸쳐 평가한 피부 반응은 다음 식을 통해 평균 반응도를 계산하였다.

$$Score = \frac{\sum(Grade \times No. of Responders)}{4(Maximum grade) \times n(Total Volunteers)} \times 100 \times \frac{1}{2}$$

2.8. 통계분석

인체 첩포시험을 제외한 모든 실험은 최소 3회 이상 반복 실험에 대한 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 SPSS version (IBM, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)를 시행하여 $p < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

3. 결 과

3.1. RAW264.7 대식세포에서 국산 생약 추출물의 세포 생존율 분석

51종의 국산 생약 추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여 RAW264.7 대식세포에 각 생약 추출물을 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고 24 h 후 세포 생존율을 측정하였다. 시험 결과, 51종 식물 추출물 중 남성과 건강의 에탄올 추출물이 세포 독성을 보였고, 그 외 나머지 49종 생약 추출물은 세포 독성을 보이지 않았다 (Table 2). 한편, LPS를 처리하여 자극시킨 RAW264.7 대식세포는 LPS에 의해 세포 생존율이 감소한다고 보

Table 2. Evaluation Criteria of Skin Reactions by CTFA Guideline

Symbol	Grade	Clinical Description
-	0	Negative reaction
+	1	Slight erythema, either spotty or diffuse
++	2	Moderate uniform erythema
+++	3	Intense erythema with edema
++++	4	Intense erythema with edema & vesicles

고되어 있다[21]. 이러한 염증성 유발 모델에서 생약 추출물의 세포 생존율에 대한 영향을 측정하였다. 시험 결과, 죽엽, 측백, 측백엽(초), 향부자, 백단향, 상지, 송절, 편축, 포도등, 흑두의 에탄올 추출물과 초오, 대추, 송화분의 증류수 추출물은 LPS에 의해 유도된 세포 독성을 억제하는 효과를 보였으며, 특히, 죽엽, 백단향, 상지, 포도등의 에탄올 추출물과 초오, 대추, 송화분의 증류수 추출물은 LPS에 의한 자극 유무에 상관없이 세포 생존율을 증가시키는 것으로 나타났다 (Table 3).

3.2. 국산 생약 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

RAW264.7 대식세포는 LPS에 의해 자극되고, 이렇게 자극된 대식세포는 염증 매개물질인 NO의 생성이 증가하게 된다[21]. 51종의 생약 추출물의 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW264.7 대식세포에 LPS를 200 ng/mL의 농도로 처리하여 자극 시킨 후, 각 생약 추출물을 50 µg/mL의 농도로 처리하였다. 시험 결과, 51종 생약 추출물 모두 NO의 생성을 증가시키지 않았다. 하지만, 죽엽, 천궁, 측백, 측백엽(초), 치자(초), 향부자, 형개, 동과자, 백단향, 산약, 산약(초), 상지, 송절, 택란, 택사, 편축, 포도등, 홍화자, 흑두의 에탄올 추출물과 강활, 권백, 백출의 증류수 추출물은 LPS에 의해 증가된 NO 생성량을 효과적으로 감소시켰다(Table 4). 특히, 죽엽, 측백, 측백엽(초), 향부자, 백단향, 상지, 송절, 편축, 포도등, 흑두의 에탄올 추출물은 RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 세포독성은 억제하고 동시에 NO의 생성은 효과적으로 감소시켜 항염증 소재로서의 가능성을 보였다(Tables 3, 4).

3.3. 국산 생약 추출물이 염증 관련 cytokine 생성에 미치는 영향

LPS에 의해 자극된 RAW264.7 대식세포는 IL-1 β, IL-6, TNF-α와 같은 pro-inflammatory cytokine의 분비를 증가시킨다[22,23]. 이 세가지 cytokine에 대한 51종 생약 추출물의 영향을 알아보기 위하여 RAW264.7 대식세포에 LPS를 200 ng/mL의 농도로 처리하여 자극 시킨 후, 각 생약 추출물을 50 µg/mL의 농도로 처리하였다. 시험 결과, 염증성 모델에서 전호, 택란, 편축, 포도등을 제외한 모든 에탄올 추출물과 옥죽, 초오, 대추, 목통의 증류수 추출물은 LPS에 의해 유도된 IL-1 β의 생성을 유의적으로 감소시켰다. 반면, 전호 에탄올 추출물은 오히려 IL-1 β의 생성을 증가시켰다. IL-6의 경우, 옥리인, 전호, 치자(초), 편축을 제외한 모든 에탄올 추출물은 LPS에 의해 유도된 IL-6의 생성을 유의적으로 감소시켰고 전호의 에탄올 추출물과 백하수오, 복분자, 교맥, 포도근의 증류수 추출물은 오히려 IL-6의 생성을 증가시켰다. TNF-α의 경우, 권백, 천궁, 측백, 측백엽(초), 향부자, 형개, 동과자, 산약, 산약(초) 상지, 송절, 지황, 택란, 택사의 에탄올 추출물이 LPS에 의해 유도된 TNF-α의 생성을 유의적으로 감소시켰고 전호의 에탄올 추출물과 복분자, 교맥의 증류수 추출물은 TNF-α의 생성을 증가시켰다(Table 4).

결과적으로, 국산 생약 추출물 51종을 대상으로 항염증 활성을 스크리닝한 결과, 측백, 측백엽(초), 향부자, 형개, 동과자, 산약, 산약(초), 상지, 송절, 택사의 에탄올 추출물 10종이 RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 세포독성을 감소시킴과 동시에 염증 매개 물질인 NO, IL-1 β, IL-6, TNF-α의 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

3.4. 인체 첩포시험에 의한 10종 국산 생약 추출물의 피부자극 평가

in vitro 항염증 활성 스크리닝 결과 효과적인 항염증 활성을 보인 10종의 생약 추출물에 대해 인체피부에서의 피부자극 정도를 평가하기 위하여 인체 첩포 시험을 실시하였다. 0.5% 농도로 적용한 생약 추출물 중 산약의 에탄올 추출물을 제외한 9종의 생약 추출물은 33명의 피험자에서 모두 음성반응을 보였다. 산약의 에탄올 추출물은 1명의 피험자에서 경미한 홍반 반응인 grade 1의 피부반응을 유도하여 반응도 0.4로

Table 3. Effect of Korean Herb Medicines on Cell Viability of RAW264.7 Macrophage

Materials	Cell viability (%)	
	without LPS	with LPS
Vehicle control (VC)	100.0 ± 0.00	62.8 ± 5.16*
<i>Selaginellae Herba</i> (권백) ^a	108.8 ± 6.36	57.1 ± 8.48
<i>Perillae Folium</i> (소엽) ^a	111.4 ± 7.50	71.6 ± 1.16
<i>Pruni Humilidis Semen</i> (옥리인) ^a	110.3 ± 7.62	62.7 ± 2.93
<i>Arisaematis Rhizoma</i> (남성) ^a	76.1 ± 2.17*	65.4 ± 3.96
<i>Massa Medicata Fermentata</i> (신곡) ^a	97.9 ± 1.34	60.7 ± 13.24
<i>Peucedani Radix</i> (전호) ^a	89.8 ± 5.65	66.3 ± 2.81
<i>Bambusae Folium</i> (죽엽) ^a	112.8 ± 1.07*	85.5 ± 5.98 [†]
<i>Cnidii Rhizoma</i> (천궁) ^a	102.0 ± 2.62	66.5 ± 5.00
<i>Biotae Orientalis Folium</i> (측백) ^a	102.0 ± 3.36	95.1 ± 7.89 [†]
<i>Biotae Orientalis Folium</i> (측백엽(초)) ^a	103.1 ± 5.49	93.8 ± 5.56 [†]
<i>Gardeniae Fructus</i> (치자(초)) ^a	109.0 ± 4.99	70.2 ± 3.38
<i>Cyperi Rhizoma</i> (향부자) ^a	104.3 ± 5.06	88.3 ± 2.50 [†]
<i>Nepetae Spica</i> (헝개) ^a	89.1 ± 1.33	78.5 ± 0.21
<i>Benincasae Semen</i> (동과자) ^a	105.2 ± 2.84	79.9 ± 10.67
<i>Santali alba Lignum</i> (백단향) ^a	126.5 ± 5.77*	103.1 ± 2.84 [†]
<i>Dioscoreae Rhizoma</i> (산약) ^a	103.1 ± 2.83	63.4 ± 3.37
<i>Dioscoreae Rhizoma</i> (산약(초)) ^a	103.6 ± 3.00	62.3 ± 1.05
<i>Mori Ramulus</i> (상지) ^a	113.4 ± 3.27*	121.6 ± 3.36 [†]
<i>Pini Ramulus</i> (송절) ^a	110.3 ± 5.82	104.5 ± 3.99 ^{†*}
<i>Rehmaniae Radix crudus</i> (지황) ^a	100.3 ± 10.10	68.1 ± 5.47
<i>Lycopi Herba</i> (택란) ^a	110.6 ± 3.71	78.4 ± 2.27
<i>Alismatis Rhizoma</i> (택사) ^a	111.9 ± 3.80*	78.1 ± 5.07
<i>Polygoni Avicularis Herba</i> (편축) ^a	93.9 ± 1.63	83.6 ± 5.55 [†]
<i>Vitidis Viniferae Caulis</i> (포도등) ^a	114.8 ± 5.00*	97.4 ± 5.12 [†]
<i>Cartami Semen</i> (홍화자) ^a	99.3 ± 4.70	73.4 ± 3.71
<i>Glycine Semen nigra</i> (흑두) ^a	105.8 ± 2.69	93.0 ± 3.91 [†]
<i>Angelicae koreanae Radix</i> (강활) ^b	117.0 ± 6.22*	82.8 ± 4.28
<i>Selaginellae Herba</i> (권백) ^b	116.1 ± 4.77*	76.9 ± 7.50
<i>Araliae Cordatae Radix</i> (독활) ^b	106.9 ± 4.38	67.1 ± 6.86
<i>Paeoniae Radix alba</i> (백작약) ^b	113.7 ± 3.42*	63.2 ± 3.98
<i>Atractylodis Rhizoma alba</i> (백출) ^b	116.4 ± 3.32*	65.3 ± 5.28
<i>Paeoniae Radix rubra</i> (적작약) ^b	123.8 ± 3.39*	68.4 ± 2.90
<i>Melonis Calyx</i> (과채) ^b	116.5 ± 3.65*	65.5 ± 8.26
<i>Cirsii Radix</i> (대계근) ^b	115.7 ± 3.80*	60.2 ± 10.79
<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i> (백하수오) ^b	106.4 ± 5.41	67.9 ± 3.47
<i>Rubi Fructus</i> (복분자) ^b	113.4 ± 1.60*	57.2 ± 6.34
<i>Polygonati Officinalis Rhizoma</i> (옥죽) ^b	105.6 ± 4.43	69.5 ± 4.46

Materials	Cell viability (%)	
	without LPS	with LPS
<i>Lonicerae Folium</i> (인동) ^b	102.6 ± 3.70	61.7 ± 4.55
<i>Zingiberis Rhizoma</i> (건강) ^b	79.5 ± 4.98*	44.4 ± 4.52
<i>Angelicae tenuissimae Radix</i> (고본) ^b	112.8 ± 3.94*	58.8 ± 7.04
<i>Fagopyri Semen</i> (교맥) ^b	99.0 ± 1.51	57.4 ± 7.48
<i>Cnidii Rhizoma</i> (천궁) ^b	114.5 ± 2.24*	84.2 ± 9.25
<i>Aconiti Jaluensis Tuber</i> (초오) ^b	118.3 ± 1.69*	90.0 ± 10.28 [†]
<i>Vitidis Viniferae Radix</i> (포도근) ^b	113.2 ± 3.00*	84.9 ± 4.06
<i>Zizyphi Fructus</i> (대추) ^b	111.3 ± 4.57*	91.8 ± 6.79 [†]
<i>Akebiae Caulis</i> (목통) ^b	102.8 ± 7.33	81.7 ± 11.77
<i>Perillae Folium</i> (소엽) ^b	118.5 ± 2.41*	86.5 ± 8.69
<i>Pini Pollen</i> (송화분) ^b	116.3 ± 3.52*	89.6 ± 9.67 [†]
<i>Massa Medicata Fermentata</i> (신곡) ^b	110.5 ± 4.17*	62.8 ± 8.01
<i>Astragali Radix</i> (황기) ^b	119.6 ± 1.15*	65.5 ± 3.09
<i>Siegesbeckiae Herba</i> (희첩) ^b	114.1 ± 6.57*	69.2 ± 4.55

^a Ethanol extracts, ^bDistilled water extracts

Each value represents mean ± SD.

Values are significantly different by one-way ANOVA test ($p < 0.05$, * vs VC without LPS, [†] vs VC with LPS).

Table 4. Effect of Korean Herb Medicines on NO and Cytokines Production in RAW264.7 Macrophage Stimulated by LPS

Materials	NO (μM)	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Control	1.54 ± 0.43	23.68 ± 1.18	17.59 ± 5.76	14.73 ± 1.76
VC with LPS	30.67 ± 0.72*	58.08 ± 3.05*	746.06 ± 102.4*	320.60 ± 14.62*
<i>Selaginellae Herba</i> (권백) ^a	31.09 ± 0.84	40.50 ± 0.23 [†]	578.13 ± 3.70 [†]	257.71 ± 15.50 [†]
<i>Perillae Folium</i> (소엽) ^a	29.08 ± 0.87	35.35 ± 5.18 [†]	436.70 ± 9.46 [†]	295.71 ± 10.67
<i>Pruni Humilidis Semen</i> (옥리인) ^a	29.80 ± 0.83	43.68 ± 1.64 [†]	776.38 ± 14.97	315.93 ± 13.92
<i>Arisaematis Rhizoma</i> (남성) ^a	29.68 ± 0.95	43.98 ± 1.02 [†]	542.10 ± 15.44 [†]	285.27 ± 4.16
<i>Massa Medicata Fermentata</i> (신곡) ^a	30.52 ± 0.42	43.53 ± 6.52 [†]	534.79 ± 55.97 [†]	288.38 ± 4.34
<i>Peucedani Radix</i> (전호) ^a	30.04 ± 0.41	91.56 ± 4.10 [†]	840.35 ± 26.92 [†]	676.60 ± 13.33 [†]
<i>Bambusae Folium</i> (죽엽) ^a	18.77 ± 0.62 [†]	39.52 ± 6.56 [†]	444.00 ± 16.48 [†]	286.16 ± 10.63
<i>Cnidii Rhizoma</i> (천궁) ^a	23.49 ± 1.28 [†]	43.08 ± 8.53 [†]	486.54 ± 7.27 [†]	269.71 ± 11.95 [†]
<i>Biotae Orientalis Folium</i> (측백) ^a	16.46 ± 0.54 [†]	40.42 ± 5.55 [†]	484.32 ± 14.73 [†]	276.16 ± 7.37 [†]
<i>Biotae Orientalis Folium</i> (측백엽(초)) ^a	11.27 ± 1.55 [†]	42.17 ± 5.42 [†]	470.98 ± 21.72 [†]	245.71 ± 13.10 [†]
<i>Gardeniae Fructus</i> (치자(초)) ^a	24.96 ± 1.13 [†]	45.35 ± 5.15 [†]	686.06 ± 9.31	296.16 ± 6.68
<i>Cyperi Rhizoma</i> (향부자) ^a	19.38 ± 1.04 [†]	40.05 ± 3.28 [†]	441.46 ± 7.27 [†]	267.49 ± 13.00 [†]
<i>Nepetae Spica</i> (헝개) ^a	19.50 ± 1.89 [†]	36.56 ± 3.49 [†]	500.98 ± 6.14 [†]	279.71 ± 10.10 [†]
<i>Benincasae Semen</i> (동과자) ^a	24.03 ± 0.28 [†]	38.45 ± 1.86 [†]	494.79 ± 16.63 [†]	279.27 ± 13.13 [†]
<i>Santali alba Lignum</i> (백단향) ^a	15.92 ± 0.51 [†]	31.86 ± 2.76 [†]	535.59 ± 20.48 [†]	285.71 ± 12.95
<i>Dioscoreae Rhizoma</i> (산약) ^a	25.89 ± 1.40 [†]	34.97 ± 2.18 [†]	600.67 ± 17.62 [†]	281.27 ± 10.58 [†]
<i>Dioscoreae Rhizoma</i> (산약(초)) ^a	25.41 ± 1.24 [†]	37.24 ± 1.07 [†]	552.25 ± 14.58 [†]	282.16 ± 9.05 [†]

Materials	NO (μ M)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
<i>Mori Ramulus</i> (상지) ^a	16.07 \pm 0.63 [†]	28.30 \pm 1.48 [†]	431.78 \pm 15.77 [†]	217.49 \pm 6.68 [†]
<i>Pini Ramulus</i> (송절) ^a	13.67 \pm 0.84 [†]	24.74 \pm 1.51 [†]	509.87 \pm 14.71 [†]	193.93 \pm 9.82 [†]
<i>Rehmaniae Radix crudus</i> (지황) ^a	30.76 \pm 0.94	44.74 \pm 1.02 [†]	645.27 \pm 21.74 [†]	257.27 \pm 16.34 [†]
<i>Lycopi Herba</i> (택란) ^a	23.52 \pm 0.55 [†]	49.21 \pm 3.87	626.86 \pm 20.91 [†]	258.16 \pm 7.81 [†]
<i>Alismatis Rhizoma</i> (택사) ^a	23.55 \pm 0.48 [†]	36.56 \pm 2.86 [†]	540.19 \pm 22.24 [†]	251.93 \pm 7.06 [†]
<i>Polygoni Avicularis Herba</i> (편축) ^a	24.33 \pm 0.60 [†]	52.39 \pm 3.03	695.59 \pm 7.53	319.49 \pm 11.10
<i>Vitidis Viniferae Caulis</i> (포도등) ^a	24.75 \pm 0.72 [†]	45.50 \pm 2.17	619.71 \pm 12.07 [†]	301.04 \pm 11.65
<i>Cartami Semen</i> (홍화자) ^a	23.91 \pm 0.55 [†]	41.33 \pm 1.39	604.48 \pm 25.56 [†]	291.93 \pm 15.93
<i>Glycine Semen nigra</i> (흑두) ^a	19.86 \pm 0.54 [†]	44.52 \pm 2.06	462.57 \pm 9.29 [†]	284.82 \pm 12.33
<i>Angelicae koreanae Radix</i> (강활) ^b	20.16 \pm 0.81 [†]	55.95 \pm 9.84	766.38 \pm 68.44	294.60 \pm 16.71
<i>Selaginellae Herba</i> (권백) ^b	21.60 \pm 0.44 [†]	52.39 \pm 1.93	732.73 \pm 39.98	300.16 \pm 11.74
<i>Araliae Cordatae Radix</i> (독활) ^b	30.64 \pm 0.79	57.62 \pm 7.66	872.41 \pm 33.70	359.71 \pm 19.28
<i>Paeoniae Radix alba</i> (백작약) ^b	28.47 \pm 0.77	54.14 \pm 2.62	703.37 \pm 38.49	286.16 \pm 14.55
<i>Attractylodis Rhizoma alba</i> (백출) ^b	24.33 \pm 1.32 [†]	60.50 \pm 2.27	726.70 \pm 30.27	307.27 \pm 15.38
<i>Paeoniae Radix rubra</i> (적작약) ^b	35.05 \pm 1.38	61.03 \pm 1.77	620.83 \pm 104.08	314.82 \pm 3.79
<i>Melonis Calyx</i> (과체) ^b	32.14 \pm 1.05	56.11 \pm 3.61	833.05 \pm 62.52	306.60 \pm 10.73
<i>Cirsii Radix</i> (대계근) ^b	31.54 \pm 1.43	52.47 \pm 3.10	867.97 \pm 51.50	363.71 \pm 43.59
<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i> (백하수오) ^b	33.94 \pm 0.87	51.71 \pm 3.61	920.98 \pm 39.61 [†]	344.60 \pm 29.01
<i>Rubi Fructus</i> (복분자) ^b	29.59 \pm 0.63	46.33 \pm 1.71	971.14 \pm 19.40 [†]	459.71 \pm 17.11 [†]
<i>Polygonati Officinalis Rhizoma</i> (옥죽) ^b	30.52 \pm 0.95	46.18 \pm 1.59 [†]	812.89 \pm 33.75	292.38 \pm 9.10
<i>Lonicerae Folium</i> (인동) ^b	30.16 \pm 0.69	50.95 \pm 1.27	825.90 \pm 2.97	296.38 \pm 12.76
<i>Zingiberis Rhizoma</i> (건강) ^b	31.24 \pm 1.66	55.73 \pm 4.11	855.43 \pm 73.44	355.04 \pm 7.37
<i>Angelicae tenuissimae Radix</i> (고본) ^b	30.58 \pm 0.50	53.98 \pm 1.25	759.24 \pm 19.22	275.49 \pm 9.62
<i>Fagopyri Semen</i> (교맥) ^b	32.74 \pm 1.09	60.80 \pm 0.80	952.41 \pm 63.85 [†]	397.49 \pm 24.74 [†]
<i>Cnidii Rhizoma</i> (천궁) ^b	30.64 \pm 0.14	52.02 \pm 4.07	801.94 \pm 8.20	318.16 \pm 4.68
<i>Aconiti Jaluensis Tuber</i> (초오) ^b	30.94 \pm 1.13	45.73 \pm 2.24 [†]	833.21 \pm 12.42	329.27 \pm 15.53
<i>Vitidis Viniferae Radix</i> (포도근) ^b	30.70 \pm 0.72	50.80 \pm 4.02	953.05 \pm 13.05 [†]	361.71 \pm 16.99
<i>Zizyphi Fructus</i> (대추) ^b	29.59 \pm 0.32	44.97 \pm 2.63 [†]	820.98 \pm 2.35	310.60 \pm 30.09
<i>Akebiae Caulis</i> (목통) ^b	29.32 \pm 0.77	45.12 \pm 4.22 [†]	814.63 \pm 16.58	295.49 \pm 20.66
<i>Perillae Folium</i> (소엽) ^b	29.08 \pm 0.91	58.76 \pm 1.07	865.90 \pm 39.39	365.93 \pm 34.59
<i>Pini Pollen</i> (송화분) ^b	30.22 \pm 1.25	55.88 \pm 3.48	824.16 \pm 33.18	318.16 \pm 23.71
<i>Massa Medicata Fermentata</i> (신곡) ^b	32.71 \pm 0.76	59.29 \pm 1.64	743.05 \pm 66.52	334.60 \pm 5.03
<i>Astragali Radix</i> (황기) ^b	32.29 \pm 0.48	53.15 \pm 1.71	755.27 \pm 25.62	306.16 \pm 9.34
<i>Siegesbeckiae Herba</i> (희침) ^b	28.26 \pm 5.80	58.23 \pm 1.78	778.29 \pm 10.79	325.04 \pm 10.03

^a Ethanol extracts, ^b Distilled water extracts

Each value represents mean \pm SD.

Values are significantly different by one-way ANOVA test ($p < 0.05$, * vs Control, [†] vs VC with LPS).

Table 5. Results of human skin primary irritation test of Korean herb medicines

(n = 33)

Materials	No. of responder	Score
Squalane (NC)	0	0.0
<i>Biotae Orientalis Folium</i> (측백)	0	0.0
<i>Biotae Orientalis Folium</i> (측백엽(초))	0	0.0
<i>Cyperi Rhizoma</i> (향부자)	0	0.0
<i>Nepetae Spica</i> (형개)	0	0.0
<i>Benincasae Semen</i> (동과자)	0	0.0
<i>Dioscoreae Rhizoma</i> (산약)	1	0.4
<i>Dioscoreae Rhizoma</i> (산약(초))	0	0.0
<i>Mori Ramulus</i> (상지)	0	0.0
<i>Pini Ramulus</i> (송절)	0	0.0
<i>Alismatis Rhizoma</i> (택사)	0	0.0

NC: negative control

나타났지만, 이는 전체 피험자의 3% 이하로 피부에 대해 저자극 물질로 판단하였다.

4. 고 찰

자극성 접촉피부염은 직접적인 자극에 의한 피부의 선천적 면역 반응의 결과이다. 자극원에 접촉된 피부는 외적인 손상이 유발되기 전 가장 먼저 IL-1 β 와 같은 염증 유발 인자의 분비가 관찰된다. 이를 시작으로 혈관이 확장되고 피부의 표피나 진피로 림프구, 대식세포와 같은 면역세포들의 침투가 일어나고, 그 결과 자극 부위에 국소적인 통증과 수포 형성, 홍반, 경화, 부종 등과 같은 표피의 손상이 나타난다. 또한, 자극의 강도는 자극원이 피부의 각질층을 투과하는 정도와 살아있는 세포에 대한 세포 독성 정도에 따라 결정된다. 따라서, 본 시험에서는 국산 약용식물 51종을 대상으로 대식세포에서 세포에 대한 독성과 염증 유발 인자에 대한 억제 효과를 측정하여 항염증 효과를 스크리닝하고 항염증 효과가 나타난 10종에 대해 인체 첩포시험을 통해 피부 자극 정도를 검증하였다.

결과적으로, 측백, 측백엽(초), 향부자, 형개, 동과자, 산약, 산약(초), 상지, 송절, 택사의 에탄올 추출물은 RAW264.7 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 세포 독성과 염증 매개 물질인 NO, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 억제하는 것으로 나타나 효과적인 항염증 활

성을 보여주었고 인체 피부에서 자극도 일으키지 않는 것을 확인 하였다.

측백나무(*Biotae Orientalis*)는 중국 북부 지방이 원산지로서, 한국, 일본, 인도 등 다른 아시아 지역에서도 자생하고 있으며[24], 측백의 항염증 활성은 이미 많은 연구에서 보고되고 있고[25-28] Kim 등의 연구에 따르면 측백의 양모효과는 이러한 항염증 활성에 기인한 것이라 추측하고 있다[29]. 또한, 그 잎이나 열매를 포함한 측백의 추출물은 항균, 항산화 활성에 대해서도 다양하게 보고되고 있다[30-32]. 향부자(*Cyperi Rhizoma*)는 강변이나 해변 모래사장에서 서식하는 식물로 그 뿌리는 한방에서는 통경, 진통제로서 사용되어 왔다[24]. 본 연구의 결과와 유사하게 Lee 등의 연구에서도 열수추출된 향부자는 대식세포에서 세포 생존율을 증가시키고 LPS에 의해 증가된 NO 생성량을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다[33]. 이는 향부자의 알코올 추출물에 대한 본 연구의 결과와 유사하게 나타났다. 한편, 최근에는 3-morpholino-sydnonimine에 의해 자극된 신경세포에서 향부자 추출물이 NO의 생성을 감소시켜 신경세포의 손상을 억제한다는 연구도 보고되었다[34].

형개(*Nepetae Spica*)는 한방에서 전초를 말려 감기의 발한, 해열 목적이나 볶아서 지혈을 목적으로 사용되어 왔으나[24] 형개의 약리 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다. 동과자(*Benincasae Semen*)는 동과의

씨로 한방에서 소염, 배농 등의 목적으로 사용되었고 차로도 음용되고 있다[24]. 여러 연구에서 거담, 항산화, 항암 효과 등이 보고 되었으나[35-37], 항염증 활성은 거의 보고된 바가 거의 없다. 산약(*Dioscoreae Rhizoma*)은 일반적으로 마라고 불리는 덩굴식물로 뿌리를 식용하고 한방에서는 기력을 증진시켜 주는 자양강장제로 활용되어 왔다[24]. 때문에 산약의 항산화, 항노화 활성은 다양한 세포에서 보고되고 있다[38-40]. 또한, 증류수 추출물과 발효 추출물은 대식세포에서 세포독성 없이 LPS에 의해 증가된 NO 생성량과 염증 관련 cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 생성을 농도 의존적으로 감소시켜 본 연구와 유사한 결과가 보고되기도 하였다[41-43]. 송절(*Pini Ramulus*)은 소나무 줄기의 마디로 한방에서는 풍증이나 근육과 골격의 병을 치료하는 약재로 사용되었고[24], Choi 등의 연구에 의하면 송절의 메탄올 추출물에서 강력한 항산화 작용이 보고되었다[44]. 또한, 대식세포에서 세포독성 없이 LPS에 의해 증가된 NO 생성량과 염증 관련 cytokine (IL-1 β , IL-6)의 생성을 효과적으로 감소시키는 등 본 연구와 유사한 결과가 보고되기도 하였다[45]. 상지(*Mori Ramulus*)는 뽕나무의 어린 가지를 말린 것으로 다양한 약리 작용이 보고되고 있다. 그중에서도 미백 활성이 보고되어 미백 화장품의 소재로 활용되고 있으나[46] 항염증 활성에 대해서는 보고된 바가 거의 없다. 택사(*Alismatis Rhizoma*)는 습지에서 자라는 식물로 그 뿌리는 한방에서 이뇨제나 부종, 습증 등에 약효가 있다고 알려져 있다[24]. 특히, 여러 연구를 통해 항산화, 항균, 항당뇨 활성 등 많은 약리 효과가 보고되었으나[47-49] 항염증 활성에 대해서는 알려진 바가 없다.

그 밖에도 권백(*Selaginellae Herba*)[50], 치자(초) (*Gardeniae Fructus*)[51], 지황(*Rehmaniae Radix crudus*)[52], 홍화자(*Cartami Semen*)[53], 독활(*Araliae Cordatae Radix*)[54,55], 적작약(*Paeoniae Radix rubra*)[56], 복분자(*Rubi Fructus*)[57], 건강(*Zingiberis Rhizoma*)[58], 고본(*Angelicae tenuissimae Radix*)[59], 천궁(*Cnidii Rhizoma*)[60], 황기(*Astragali Radix*)[61]는 이전의 다른 연구에서 항염증 효과가 보고된 바 있고, 그중 권백, 치자(초), 지황, 홍화자, 복분자는 본 연구에서도 NO 혹은 일부 염증 관련 cytokine에 대해 억제 효과를 보이기도 하였다.

결론적으로 본 연구를 통해 항염증 활성이 확인된 10종의 국산 생약 추출물은 인체 피부에 대해 피부 자극을 유발하지 않아 피부에 안전한 화장품 소재임이 입증되었고, 향후 이러한 항염증 활성을 활용하여 피부 장벽이 손상된 시험 모델을 이용하여 피부 장벽에 대한 효과를 검증할 예정이다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 A103017).

Reference

1. A. C. de Groot, Labelling cosmetics with their ingredients, *BMJ (Clinical research ed.)*, **300**(6740), 1636 (1990).
2. A. C. de Groot, E. G. Beverdam, C. T. Ayong, P. J. Coenraads, and J. P. Nater, The role of contact allergy in the spectrum of adverse effects caused by cosmetics and toiletries, *Contact dermatitis*, **19**(3), 195 (1988).
3. E. Gendler, Adverse reactions to cosmetics, *Cutis*, **39**(6), 525 (1987).
4. S. Wahie, J. J. Lloyd, and P. M. Farr, Sunscreen ingredients and labelling: a survey of products available in the UK, *Clinical and experimental dermatology*, **32**(4), 359 (2007).
5. E. G. Lee, B. M. Mickle-Kawar, and R. M. Gallucci, IL-6 deficiency exacerbates skin inflammation in a murine model of irritant dermatitis, *Journal of immunotoxicology*, **10**(2), 192 (2013).
6. M. Kamsteeg, P. A. Jansen, I. M. van Vlijmen-Willems, P. E. van Erp, D. Rodijk-Olthuis, P. G. van der Valk, T. Feuth, P. L. Zeeuwen, and J. Schalkwijk, Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis, *The British journal of dermatology*, **162**(3), 568 (2010).
7. J. Seneschal, E. Kubica, L. Boursault, J. Stokkermans, C. Labreze, B. Milpied, K. Ezzedine,

- and A. Taieb, Exogenous inflammatory acne due to combined application of cosmetic and facial rubbing, *Dermatology*, **224**(3), 221 (2012).
8. G. Wolf, Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization, *Histology and histopathology*, **12**(1), 251 (1997).
 9. I. Stewart, P. J. Schluter, and G. R. Shaw, Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review, *Environmental health : a global access science source*, **57** (2006).
 10. K. Aono, K. Isobe, K. Kiuchi, Z. H. Fan, M. Ito, A. Takeuchi, M. Miyachi, I. Nakashima, and Y. Nimura, *In vitro* and *in vivo* expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: involvement of other cytokines, *Journal of cellular biochemistry*, **65**(3), 349 (1997).
 11. J. C. Park, The integrated dictionary of herb medicine, oriental medicine and functional food, ed. J. C. Park, Purunhangbok, Seoul (2011).
 12. Y. M. Park, S. J. Kim, K. H. Jo, E. J. Yang, and S. T. Jung, Anticariogenic and Antioxidant Activities from Medicinal Herbs, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **35**(3), 10 (2006).
 13. S. E. Lee, N. S. Seong, J. K. Bang, C. G. Park, J. S. Sung, and J. Song, Antioxidative Activities of Korean Medicinal Plants, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **11**(2), 8 (2003).
 14. S. Y. Park and J. W. Kim, Screening and Isolation of the Antitumor Agents from Medicinal Plants (I), *Korean Journal of Pharmacognosy*, **23**(4), 4 (1992).
 15. G. Y. Kim, K. W. Nam, S. J. Jang, J. E. Kim, J. S. Iim, B. S. Ahn, D. S. Kwun, H. W. Jung, and K. O. Cho, Antibacterial Activities of Medicinal Herbs on Salmonella and E. Coli, *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*, **22**(3), 5 (2008).
 16. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, **65**(1-2), 55 (1983).
 17. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, *JAMA : the journal of the American Medical Association*, (2013).
 18. Korea Food & Drug Administration, Clinical test and *in vitro* test guideline for cosmetics (2011).
 19. P. J. Frosch and A. M. Kligman, The soap chamber test, A new method for assessing the irritancy of soaps, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1**(1), 35 (1979).
 20. L. J. Loretz and J. E. Bailey, CTFA Safety Evaluation Guidelines, The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, (2007).
 21. Y. Yamamoto, P. He, T. Klein, and H. Friedman, Endotoxin induced cytotoxicity of macrophages is due to apoptosis caused by nitric oxide production, *Journal of Endotoxin Research*, **1**(3), 181 (1994).
 22. J. L. Adams and C. J. Czuprynski, Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF- α , IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7, *Microbial pathogenesis*, **16**(6), 401 (1994).
 23. M. Iwamoto, M. Kurachi, T. Nakashima, D. Kim, K. Yamaguchi, T. Oda, Y. Iwamoto, and T. Muramatsu, Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264. 7 cells, *FEBS letters*, **579**(20), 4423 (2005).
 24. D. K. Ahn, Illustrated guide to Korean medical herbs, Kyohaksa, Seoul (2003).
 25. J. Y. Kim, H. J. Kim, S. M. Kim, K. R. Park, H. J. Jang, E. H. Lee, S. H. Jung, and K. S. Ahn, Methylene chloride fraction of the leaves of *Thuja orientalis* inhibits *in vitro* inflammatory biomarkers by blocking NF-kappaB and p38 MAPK signaling and protects mice from lethal endotoxemia, *Journal of ethnopharmacology*, **133**(2), 687 (2011).
 26. H. W. Jung, S. Y. Kang, K. H. Park, T. W. Oh, J. K. Jung, S. H. Kim, D. J. Choi, and Y. K. Park, Effect of the semen extract of *Thuja orientalis* on inflammatory responses in transient focal cerebral ischemia rat model and LPS-stimulated BV-2 microglia, *The American journal of Chinese medicine*, **41**(1), 99 (2013).

27. T. H. Kim, H. Li, Q. Wu, H. J. Lee, and J. H. Ryu, A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from Thuja orientalis, *Journal of ethnopharmacology*, **146**(3), 760 (2013).
28. Y. J. Lee, S. M. Hwang, J. J. Yoon, S. M. Lee, E. H. Kyung, J. S. Kim, D. G. Kang, and H. S. Lee, Inhibitory effect of Thuja orientalis on TNF-alpha-induced vascular inflammation, *Phytother Res.*, **24**(10), 1489 (2010).
29. Y. J. Kim, H. C. Chung, H. T. Chun, K. Y. Choi, Y. G. Yun, and S. I. Jang, Hair Growth Promoting Effect of Thuja orientalis Ethanol Extracts on Hair Loss-induced DBA1J Mice, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **18**(5), 5 (2004).
30. H. Y. Ahn, S. J. Heo, M. J. Kang, J. H. Lee, J. Y. Cha, and Y. S. Cho, Antioxidative Activity and Chemical Characteristics of Leaf and Fruit Extracts from Thuja orientalis, *Journal of Life Science*, **21**(5), 7 (2011).
31. D. S. Park and J. S. Lee, Cytotoxicity against Human Normal Epithelial Cell (Beas-2B) and Antioxidant Activity of Leaves Extracts of Thuja orientalis L., *J. Kor. Soc. Cosm.*, **16**(3), 5 (2010).
32. T. H. Youm and H. B. Lim, Antimicrobial Activities of Organic Extracts from Fruit of Thuja orientalis L., *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **18**(5), 315 (2010).
33. Y. S. Lee, O. K. Han, S. W. Shin, J. H. Park, and Y. K. Kwon, Effects of Water-Extracted Cyperus Rotundus on the Nitric Oxide Production and Cytokine gene Expression, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **17**(3), 6 (2003).
34. K. Hemanth Kumar, A. Tamatam, A. Pal, and F. Khanum, Neuroprotective effects of Cyperus rotundus on SIN-1 induced nitric oxide generation and protein nitration: ameliorative effect against apoptosis mediated neuronal cell damage, *Neurotoxicology*, **34**, 150 (2013).
35. S. Kim, H. Song, K. Park, and M. Shin, Studies on the Expectorant Activities of Water Extract of Semen Benincasae and its Fractions in the Rat Trachea, *The Korea Journal of Herbology*, **17**(1), 12 (2003).
36. H. R. Choi, K. H. Lee, and C. H. Kim, Radiosensitizing and Antitumor Effect of the Seed of Benincasae hispida, *Korean journal of food science and technology*, **35**(3), 4 (2003).
37. M. Bimakr, R. A. Rahman, F. S. Taip, N. M. Adzahan, M. Z. Sarker, and A. Ganjloo, Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (Benincasa hispida) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition, *Molecules*, **17**(10), 11748 (2012).
38. G. Y. Choi and B. W. Kim, Experimental Study on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Dioscoreae Rhizoma, *Korean J. Orient. Int. Med.*, **31**(2), 8 (2010).
39. Y. J. Jun, M. Y. Son, M. J. Khil, J. S. Sung, J. C. Jeong, and D. I. Kim, Cell differentiation and Anti-oxydative effect of Dioscoreae Rhizoma on HeLa Cell, *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology*, **20**(2), 5 (2007).
40. J. Y. Nam, J. J. Roh, J. H. Seung, M. Y. Son, M. J. Khil, J. S. Sung, and D. I. Kim, Non-toxic and Anti-oxydative effect of Dioscoreae Rhizoma on PC12 Cell, *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology*, **19**(4), 16 (2006).
41. S. Kim, S. Shin, B. Hyun, H. Kong, S. Han, A. Lee, S. Lee, and K. Kim, Immunomodulatory Effects of Dioscoreae Rhizome Against Inflammation through Suppressed Production of Cytokines Via Inhibition of the NF-kappaB Pathway, *Immune Netw.*, **12**(5), 181 (2012).
42. S. W. Shin, Y. S. Lee, J. H. Park, T. K. Kwon, S. I. Suh, and Y. K. Kwon, Comparison of Immunomodulatory Effects of Water-extracted Ginseng Radix, Pilose Asia-bell, Astragali Radix, Atractylodes Rhizoma alba and Dioscoreae Rhizoma, *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*, **18**(4), 7 (2004).
43. S. W. Lim, S. H. Lee, J. M. Hur, Y. M. Lee, and D. K. Kim, The Inhibitory Effect of Fermented

- Dioscoreae batatas Extract on Lipopolysaccharide-induced Macrophage Activation, *Yakhak Hoeji*, **55**(5), 7 (2011).
44. J. H. Choi, H. S. Kim, M. J. Jung, and J. S. Choi, (+)-Catechin, an Antioxidant Principle from the Leaves of *Pinus densiflora* that Acts on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical, *Natural Product Sciences*, **7**(1), 4 (2001).
 45. K. P. Lee and J. Y. Moon, *Pinus densiflora* Gnarl Extract for Pharmacopuncture Inhibits Inflammatory Responses through Heme Oxygenase-1 Induction in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages, *Korean Journal of Acupuncture*, **29**(1), 10 (2012).
 46. K. T. Lee, K. S. Lee, J. H. Jeong, B. K. Jo, M. Y. Heo, and H. P. Kim, Inhibitory effects of *Ramulus mori* extracts on melanogenesis, *Journal of cosmetic science*, **54**(2), 133 (2003).
 47. K. I. Seo, Y. S. Cho, J. R. Park, S. T. Yee, and C. K. Park, Antimicrobial and Antioxidative Effects of *Alismatis Rhizoma* Extract, *Journal of Life Science*, **10**(5), 5 (2000).
 48. J. W. Nam, S. H. Rhee, M. S. Kang, Y. K. Choi, C. Y. Jun, C. H. Park, and D. W. Kim, Effects of Different Lengths of Treatment with *Rhizoma Alismatis* on Diabetic Mellitus of Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rats, *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine*, **27**(4), 7 (2006).
 49. C. A. Toh, Antimicrobial and Antifungal Studies on *Alismae Rhizoma*, *Korean Journal of Pharmacognosy*, **27**(4), 5 (1996).
 50. B. T. Ahn, S. A. Shin, J. G. Kim, and W. H. Park, Inhibitory Effect of Amentoflavone of *Selaginella Tamariscina* on MMP-9 Expression through NF- κ B and AP-1 in Macrophage Raw 264.7 cells, *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*, **21**(1), 7 (2007).
 51. D. H. Shon, D. W. Choi, and M. H. Kim, Improvement of Anti-Inflammation Activity of *Gardeniae fructus* Extract by the Treatment of β -Glucosidase, *Korean journal of food science and technology*, **44**(3), 6 (2012).
 52. B. S. Chae and T. Y. Shin, Effect of Fresh *Rehmanniae Radix* Methanol Extracts on the Production of Cytokines, *Journal of the Pharmaceutical Society of Korea*, **50**(3), 7 (2006).
 53. D. H. Kim, E. Y. Hwang, and J. H. Son, Anti-Inflammatory Activity of *Carthamus tinctorius* Seed Extracts in Raw 264.7 cell, *Journal of Life Science*, **23**(1), 8 (2013).
 54. C. H. Kang, J. R. Koo, and J. S. So, Inhibitory Effects of *Aralia cordata* Thunb Extracts on Nitric Oxide Synthesis in RAW 264.7 Macrophage Cells, *Korean journal of food science and technology*, **44**(5), 7 (2012).
 55. T. D. Kim, J. Y. Lee, B. J. Cho, T. W. Park, and C. J. Kim, The analgesic and anti-inflammatory effects of 7-oxosandaracopimaric acid isolated from the roots of *Aralia cordata*, *Archives of pharmacal research*, **33**(4), 509 (2010).
 56. S. Y. Han and E. Yy. Lee, Effect of *Paeoniae Radix Rubra* Extract on the Production of NO and Prostaglandin E₂ in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages, *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*, **28**(1), 8 (2011).
 57. S. Y. Choi, K. C. Lee, Y. J. Jeoung, and B. O. Lim, *In vitro* Anti-inflammatory Activity of *Rubus coreanus* Miq. on Nitric Oxide, Interferon- γ , Cyclooxygenase-2, and Tumor Necrosis Factor- α Production in the Macrophage like Cell Line RAW 264.7 Activated by Lipopolysaccharide, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **15**(5), 5 (2007).
 58. H. W. Jung, C. H. Yoon, K. M. Park, H. S. Han, and Y. K. Park, Hexane fraction of *Zingiberis Rhizoma Crudus* extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF- κ B pathway, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **47**(6), 1190 (2009).
 59. S. Y. Lee, H. J. Park, D. S. Cha, T. Y. Shin, H. J.

- Na, W. S. Moon, Y. G. Kang, and H. Jeon, Antioxidant and Anti-inflammatory Effect of *Angelica Tenuissima* in IFN- γ /LPS-stimulated Peritoneal Macrophage, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **22**(6), 8 (2008).
60. S. W. Choi, E. O. Kim, H.-H. Leem, and J.-K. Kim, Anti-Inflammatory Effects of Volatile Flavor Extracts from *Cnidium officinale* and *Angelica giga*, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(8), 9 (2012).
61. M. Ryu, E. H. Kim, M. Chun, S. Kang, B. Shim, Y. B. Yu, G. Jeong, and J. S. Lee, Astragali Radix elicits anti-inflammation via activation of MKP-1, concomitant with attenuation of p38 and Erk, *Journal of ethnopharmacology*, **115**(2), 184 (2008).