

식물세포배양기술을 이용한 약용식물 개똥쑥 세포주 유도 및 세포주 추출물의 wound healing effect

오승택¹, 정해수¹, 조문진¹, 송미영¹, 모상현^{*}, 서효현¹
¹(주)바이오에프디엔씨 안티에이징연구소

Effect of *Artemisia annua* Linne callus induced by plant cell culture technology on wound healing

Seung Taek Oh¹, Hae Soo Jung¹, Moon Jin Cho¹, Mi Young Song¹,
Sang Hyun Moh^{*}, Hyo Hyun Seo¹

¹Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd.

요약 현재 많은 나라들은 자생식물을 활용한 산업소재를 개발하는 데 지대한 관심을 가지고 있다. 특히 화장품 산업은 친환경, 자연친화적인 소재를 찾는 데 집중하고 있는 추세이다. 우수한 생리활성 물질을 포함한 식물을 식물세포배양기술을 이용하여 대량으로 배양하고 그 함유물을 고농도로 얻음으로 효과적인 소재로 개발하려고 노력하고 있다. 이에 본 연구는 항암, 항균, 항산화, 항염 등의 효능이 입증되어 세계적으로 주목받고 있는 개똥쑥을 선택하여 식물세포배양기술을 이용해 유도한 캘러스의 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 약 6개월 동안 식물세포배양기술로 개똥쑥 캘러스를 유도하였고, 유도된 캘러스를 얻어 열수 및 에탄올 추출하여 약 2개월간 다양한 효능을 시험하였다. HPLC 분석을 통하여 열수 및 에탄올 추출물의 유효성분에 차이를 보임을 확인하였다. 또한 효능평가에서도 차이를 보였다. 개똥쑥 캘러스 에탄올 추출물을 처리하였을 경우 항염관련 단백질인 COX-2의 발현을 50% 이상 감소시키고 wound healing assay를 통해 상처 치유능이 70%정도 증가함을 확인하였다. 이를 통해 개똥쑥 캘러스 추출물이 자연친화적, 친환경적인 소재로써 항염 및 상처치료 관련 제품에 기여할 것으로 예상된다.

Abstract Currently, many countries have an interest in developing cosmetics materials using native plants. In this aspect, there is increasing need to develop cosmetics materials using native plants in our county. In the present study, calluses were induced from *Artemisia annua* Linne, which was highlighted because of its useful effects, such as anti-cancer, anti-fungal and anti-inflammation. Water and ethanol extractions were performed from the calluses of *Artemisia annua* Linne. After the mass production of *Artemisia annua* Linne's calluses, water and ethanol extraction was performed to examine its functional roles in healing wounds and inflammation. The differences in the effective elements were observed in the ethanol extract. The callus showed anti-inflammation activity through the suppression of the inflammation-related gene, COX-2, and ethanol extracts showed their ability to heal wounds. Overall, these results suggest that the extract of *Artemisia annua* Linne's calluses is a natural and environment-friendly material, and can be used as medical supplies associated with anti-inflammation and healing wounds.

Key Words : *Artemisia annua* Linne, Anti-inflammation, Plant cell culture technology, Wound healing

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 '나고야의정서 대응 창의 연구개발을 위한 인력양성 사업'의 지원을 받아 수행하였습니다.(NIBR No. 2013-02-071, 국문 과제명: 희귀 초본/목본류 식물의 조직배양을 통한 대량생산시스템 구축 및 화장품 소재사업화)

*Corresponding Author : Sang Hyun Moh(BIO-FD&C Co.,Ltd.)

Tel: +82-10-8921-0435 email: shmoh@biofdnc.com

Received April 28, 2014 Revised (1st June 16, 2014, 2nd July 3, 2014, 3rd July 15, 2014) Accepted September 11, 2014

1. 서론

국내화장품시장은 원료의 80% 이상을 수입에 의존하고 있어 화장품 시장이 성장 할수록 화장품 원료 수입액이 동시에 증가하는 무역수지불균형의 구조적인 문제점을 안고 있다. 따라서 국내 화장품 산업의 경쟁력 강화를 위해서는 화장품에 사용되는 원료의 국산화가 필수적이다. 전 세계적으로 화장품 산업이 성장세에 있으므로 화장품에 널리 사용될 수 있는 글로벌 신소재가 개발된다면 수출을 통해 큰 부가가치를 창출 할 수 있으며 이러한 신소재를 개발하기 위해서는 집중적인 R&D 투자가 필요한 실정이다. 항노화 원료의 대부분은 화장품 제형 내에서의 불안정성과 생체 이용률의 한계 때문에 그 사용이 제한되는 경우가 많다. 의약품과 달리 기능성 측면 외에도 감성적인 측면이 큰 비중을 차지하기 때문에 여러 종류의 계면활성제, 이온성 고분자, 오일, 왁스, 향 등이 함유되는 경우가 많으며 따라서 항노화 원료는 화장품의 감성적 특성을 유지하면서도 원하는 목적을 달성해야 하므로 경우에 따라서는 의약품 소재보다 훨씬 고도의 기술이 요구 된다. 항노화 시장은 아시아와 중남미에 국한되어있는 미백 시장과는 달리 전 세계적으로 필요로 하고 있는 시장으로 글로벌 소재로 개발하기에 아주 적합하다. 또한 앞에 언급되어 있듯이 소비자들의 인식과 고령화 사회 진입으로 항노화 소재 시장은 더 커질 것으로 예상되고 있다. 피부 프로테오믹스 기법을 이용한 연구를 통하여 새로운 피부노화 관련 단백질의 탐색, 동정 및 그 기능 연구가 필요하며, 세포기작을 조절함으로써 저용량으로도 효과적인 노화방지 작용을 나타내는 동시에 부작용 없이 사용할 수 있는 신소재가 필요하기에 여러 항노화 메카니즘 탐색을 통한 항노화 소재 개발이 요구 된다. 국내외적으로 친환경 바이오산업의 하나로써 기능성화장품 개발을 위한 환경 친화적인 천연소재의 발굴 및 개발이 새로운 분야로 대두되고 있고, 특히 국내의 경우 친환경 바이오 소재 개발이 국가적 전략사업의 하나로 특화되어 있다. 특히, 생명공학 기술을 이용한 배양기법 정립 및 친환경 추출법을 이용한 항노화 화장품 신소재를 개발하는 것은 세계적으로 뒤쳐진 소재산업 분야에 세계 경쟁력에서 우위를 점할 수 있다.

우리나라는 지리적으로 열대지방과 한대지방이 만나는 교차점에 위치하고 있으며 서식하는 식물들도 매우 다양하고 특이한 성질을 가지고 있다. 특히 수많은 종류

의 야생식물 자원을 약제로 사용해 온 경험과 한방 임상 시험 데이터가 충분히 확보되어있는 만큼, 이를 생명공학기술과 접목시킬 경우 뛰어난 기능성 물질을 개발해 낼 가능성이 높으며, 세계시장에서 이를 통해 막대한 경제적 가치를 획득할 수 있다. 이를 위해 약용식물에 포함되어 있는 유용물질을 생산하고자 자생 혹은 재배식물로부터 추출, 이용하여 왔으나, 생산비의 증가, 환경 적응성의 부족 등으로 인하여 인공재배가 어렵거나 자원이 한정되어 있는 고부가성 식물의 경우에는 조직배양 기술을 이용하여 기내 대량생산하는 방법을 이용하려고 노력하고 있다. 식물조직배양기술을 이용할 경우 재배할 토지가 필요 없으며, 고농도의 순수한 물질을 얻을 수가 있으며 농약과 같은 유해물질을 처리하지 않는 무공해성 물질을 생산할 수 있는 장점이 있다. 따라서 최근의 생물공학적 방법은 자연 조건에서 재배된 식물체보다 기내 배양한 기관으로부터 더 활성이 높은 유용물질을 생산하는데 초점이 맞추어 지고 있으며, 산업화가 이루어지고 있다. 식물조직배양은 식물의 세포 및 기관을 연중 균일하게 대량생산하는 가장 보편적인 방법으로, 식물체로부터 기관, 조직 및 세포를 적절 분리하여 기내에서 영양분이 함유되어 있는 배지를 이용해 무균 배양함으로써 캘러스(Callus)를 단세포의 집단을 유기하거나 완전한 기능을 가진 식물체로 재생시키는 기술을 말한다. 캘러스는 정상적인 기관형성이나 조직분화를 일으키는 능력을 잃은 무정형의 조직 또는 세포덩어리로서, 계대배양을 통해 지속적으로 만들어 낼 수 있다는 특징을 가진다. 이러한 캘러스 배양을 이용한다면 우수한 생리활성 효능을 지닌 화장품 원료를 개발할 수 있다. 현재 화장품 분야에 있어서 ‘식물줄기세포’라 불리는 식물의 캘러스 소재가 2009년도 이후 최근의 식물줄기세포 화장품이라는 새로운 트렌드를 형성하고 있지만, 다양한 식물줄기세포 소재가 개발되지 못한 상황이다. 따라서 다양한 효능의 요구를 충족할 수 있는 식물 캘러스 소재를 개발하고 공급할 필요성이 대두되었다[1,2].

개똥쑥(*Artemisia annua Linne*)은 쌍떡잎 식물로 초롱꽃목 국화과 쑥속에 속하며 씨앗으로 번식하는 한해살이 풀이다. 높이는 1m 내외이며, 본초강목 등의 한방에 따르면 경열과 부스럼을 치료하며 독충 또는 뱀에 물린 상처와 신경계 질환에 효능이 있다고 알려져 있다. 개똥쑥에는 암세포만 선택적으로 죽인다는 아르테미신이라는 물질이 함유되어 있어 탁월한 항암효능을 가지며, 말

라리아나 이질, 결핵 등을 치료하는데 효과 있다고 알려져 있다[3,4]. 또한 항균, 백혈병, 항염[5,6], 항산화[7-10]에도 효과가 입증되어 국내뿐만 아니라 세계적으로 주목 받고 있다. 보고에 의하면 개똥쭉은 항산화력이 가장 높은 약용식물 중의 하나로서 개똥쭉의 높은 항산화 활성은 함유된 페놀 화합물에 의한 것으로서, 줄기보다 잎이 강한 항산화 활성을 가진다[11-15]. 개똥쭉 추출물은 유방암 세포, 자궁경부 상피암 세포, 위암세포의 증식을 억제시켰으며, NO 발생 억제 효과를 통한 항염 효과를 가지고 있다[3].

이에 본 연구는 우수한 항암, 항산화 효능을 가진다고 알려진 개똥쭉을 이용하여 화장품 소재로 개발하기 위해 켈러스를 유도하고 대량생산하여 얻은 개똥쭉 켈러스를 열수 및 에탄올 추출하여 다양한 효능을 평가하고 이를 이용한 화장품 소재로서의 가능성을 연구하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 켈러스 유도 및 최적화 배지조성

켈러스 유도하고자 하는 개똥쭉의 종자에 표면 살균을 위해 70% 에탄올에 30초간 침지, 0.3% 차아염소산나트륨(Sodium hypochlorite)에 10 - 15 분 진탕하여 살균 후 멸균수로 세척하였다. 무균상태의 종자를 기본 MS배지(1 L당 MS 4.4 g, MES 0.5 g, sucrose 30 g)에서 10 일 동안 키워 발아를 유도하였다. 발아배지에서 10 일정도 후 발아하면, 적당히 자란 자엽을 잘라서 생물생장호르몬이 포함된 배지에 치상하여 켈러스를 유도하였다. 최적의 배지조성에서 배양하기 위해 각기 다른 plant growth regulator가 함유된 MS배지(1 L당 2,4-D 1.5 mg, NAA 0.1 mg, kinetin 0.25 mg, IAA 0.1 mg), SH배지(1 L당 2,4-D 0.5 mg, CPA 2 mg, kinetin 0.1 mg), I0.5/Z0.2 배지(1 L당 IAA 0.5 mg, zeatin 0.2 mg)에서 각각 치상한 후, 24±1℃의 배양실에서 4 주에서 10 주간 배양하였다. 유도된 켈러스는 4 주 간격으로 계대 배양하여 증식되었다.

2.2 켈러스 추출 방법

켈러스 배양물을 수확하여 충분히 수분을 제거한 후 60℃로 2일 동안 건조기에서 건조하였다. 건조된 켈러스 배양물 분말 100 g을 용기에 담고, 10 L의 정제수와 10

L의 70% 에탄올에 각각 넣은 후 121℃에서 1 시간동안 추출하였다. 추출 후, mesh로 여과하여 고형분을 제거하고, 여과하여 나온 켈러스 배양 열수, 에탄올추출물을 각 동결건조하여 5 mg/ml의 농도로 정제수에 녹여 실험에 사용하였다.

2.3 켈러스 배양 추출물의 HPLC 분석

식물조직배양기법을 통해 얻어진 켈러스 추출물의 신규물질 분석을 위해 HPLC를 사용하였다.

Waters 1525 μ Binary HPLC pump, Waters 996 photodiode array detector를 사용하였고 분리정제에 위해 Gemini 5 μ C18 110 A(5 μ m, 4.6 \times 250 nm, Phenomenex) column을 사용하였다. 분석을 위한 용매는 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 포함한 water(용매 A)와 acetonitrile(용매B)를 사용하였고 1 ml/min의 유속으로 270 nm 파장에서 분석하였다.

2.4 세포 배양

인간 각질형성 세포주(HaCaT, keratinocyte), 인간 섬유아세포(CCD986sk, fibroblast)를 DMEM, 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic(GIBCO)의 배지에서 dish에서 37℃, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

2.5 Cell viability 측정 시험

HaCaT cell을 24 well plate에 1×10^5 개의 세포를 분주하여 배양하였다. 24 시간 후 FBS를 포함하지 않는 배지로 교체하고 24 시간동안 starvation하고, 시료를 농도별로 처리하였다. 그 후 24 시간 동안 배양하고 배지를 제거한 뒤 5 mg/ml MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl Tetrazolium Bromide, Sigma) 시약을 각 40 μ l씩 처리 후 4 시간 동안 추가 배양하였다. 4 시간 뒤 배지를 제거하고, dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 1 ml씩 넣고 10 분간 흔들여 준 다음 200 μ l씩 96 well에 취하여 Spectrophotometer(Thermo)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[16,17].

Cell viability (%)

= (시험군의 흡광도 / 대조군의 흡광도) \times 100(%)

2.6 항염 관련 단백질 Cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현 비교

HaCaT를 24 well plate에 2×10^5 cells/well로 분주한 후 24 시간 배양하고, UVB 조사(50 mJ/cm^2) 후 시험물질을 농도별로 처리하였다. 양성대조군으로 $5 \mu\text{M}$ hydrocortisone을 처리하였다. 물질처리 후 4 시간동안 추가배양 후 cell lysis buffer (0.1% SDS, 1% NP40, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris-Cl(pH 7.5) and protease inhibitors)를 이용해 단백질을 추출하고 BCA assay로 단백질을 정량하였다 [18,19].

2.7 Western blotting

상기의 정량한 단백질 일정량을 SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동으로 분리하고, Nitrocellulose (NC) membrane으로 분리된 protein을 transfer 시켰다. 이 membrane을 blocking solution (5% skim milk in TBST(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20))에 담가 30 분이상 blocking 시키고 primary antibody (COX-2, Abcam) solution에 담가 4°C에서 overnight으로 반응시켰다. 그 후에 TBST로 10분간 3번 washing하고 Primary antibody conjugated secondary antibody를 2 시간동안 반응시키고 ECL solution kit (Amersham)으로 발색하여 분석하였다[20].

2.8 Procollagen synthesis assay

Procollagen synthesis 분석은 Procollagen Type I C-Peptide EIA kit (Takara)를 사용하여 측정하였다. CCD986sk cell을 48well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 후 24 시간동안 배양하고, 시험물질을 처리하였다. 물질처리 48 시간 후 얻은 배지를 Procollagen Type I C-Peptide EIA kit의 매뉴얼에 따라 진행하여 분석하였다[21,22].

2.9 Wound healing assay

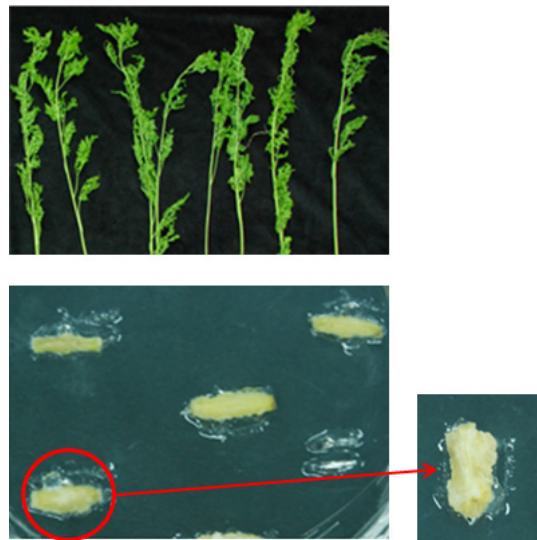
HaCaT cell을 12 well plate에 2×10^5 cells/well 분주한 후 24 시간 배양하고, FBS를 포함하지 않는 배지로 교체한 후 각 well에 200 μ l tip으로 스크래치를 내고 시험물질을 처리하였다. 물질처리 후 18 - 20 시간동안 추가배양 후 배지를 제거하고 fixing solution(4% paraformaldehyde)으로 넣고 15 분간 상온에서 incubation하고 PBS로 3번 washing하여 fixing한 후 wound healing이 된 정도를 현미경으로 사진을 찍어

Image J 프로그램을 이용하여 계산하였다[23-25].

3. 결과 및 고찰

3.1 캘러스 유도 및 최적의 배지조성

개똥쑥 종자를 배양하여 얻은 개똥쑥 성체를 잘라 캘러스를 유도하였다. 캘러스 유도 조건을 확립하고자 다양한 배지 조성을 사용하였다. 그 결과 MS배지(1 L 당 30 g sucrose, plant growth regulator 2,4-D 1.5 mg, NAA 0.1 mg, kinetin 0.25 mg, IAA 0.1 mg, pH 5.8)에서 캘러스가 유도 되었다. Fig. 1은 유도된 개똥쑥 캘러스를 보여준다. 이렇게 유도된 개똥쑥 캘러스를 동일한 조성의 액상배지 15 L에서 대량배양하며 4 주간 유지 및 증식시켜 대량생산하여 실험에 사용하였다.

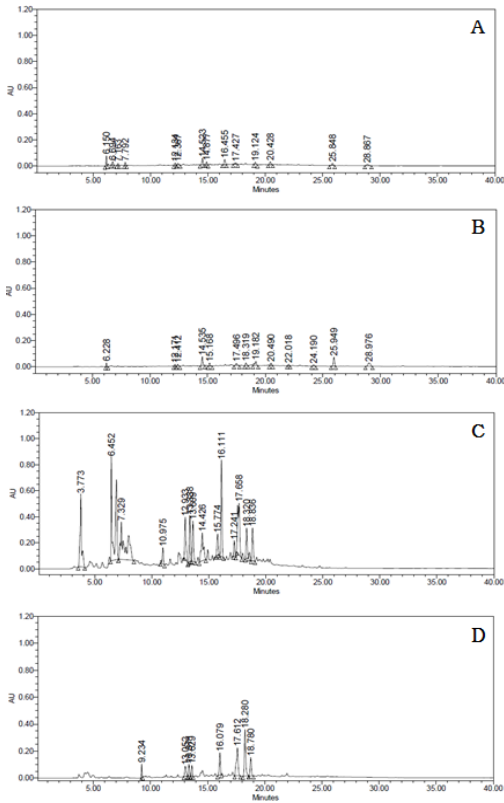


[Fig. 1] Callus induction of *Artemisia annua* Linne.

3.2 캘러스 추출물의 HPLC 분석

대량배양을 통해 얻은 개똥쑥 캘러스를 배지를 분리해 60°C에서 2일간 건조시켜 이후 실험에 시료로 사용하였다. 건조된 캘러스 파우더 100 g을 열탕증류기에서 정제수 10 L와 70% 에탄올 10 L에 각각 넣어 24시간동안 100°C에서 추출하였다. 추출 후, mesh로 여과하여 고형분을 제거하고, 여과하여 나온 개똥쑥 캘러스 배양 열수, 에탄올추출물을 각 동결건조하여 정제수에 녹여 사용하였다. 이렇게 얻은 추출물을 HPLC를 이용하여 유효성분

을 분석하였다. 개똥쑥 켈러스 추출물을 성체 추출물과 비교하였을 때 유효성분으로 보이지는 피크가 늘어남을 확인하였고 그 중에서도 열수추출물에서 더 많은 피크를 관찰 하였다. 이를 통해 성체에서보다 성체에서 유도된 켈러스에서 더 많은 유효성분이 있음을 확인하였다. 켈러스 추출물에 함유된 유효성분이 다양한 효능을 가지는지 확인하기 위해 열수, 에탄올 추출물을 이용해 효능평가를 진행하였다.

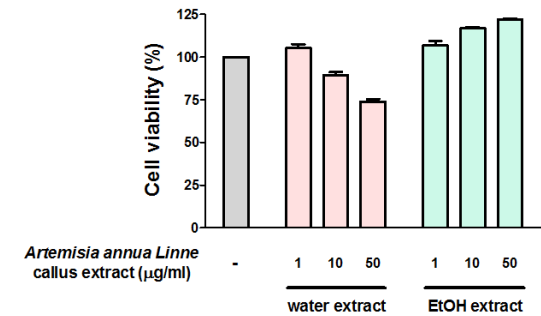


[Fig. 2] HPLC chromatogram of *Artemisia annua Linne* extracts. A : *Artemisia annua Linne* adult plant water extract, B : *Artemisia annua Linne* adult plant ethanol extract, C : *Artemisia annua Linne* callus water extract, D : *Artemisia annua Linne* callus ethanol extract

3.3 개똥쑥 켈러스 추출물의 cell viability 측정

개똥쑥 켈러스 추출물을 세포에 처리하여 세포의 성장 및 증식, 혹은 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 시험하였다. 개똥쑥 켈러스 열수, 에탄올추출물을 각각 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 세포에 처리하여 cell viability를 시험하였다. 그 결과 열수추

출물을 처리한 실험군에서 처리 농도가 증가할수록 세포 독성을 보이며 cell viability가 감소하는 양상을 보였다. 반면에 에탄올추출물을 처리한 실험군은 처리 농도가 증가할수록 오히려 cell viability가 증가함을 확인하였다. 이는 앞선 유효성분을 분석한 결과와 상반된 결과이다. HPLC 분석결과에 따르면 열수 추출물의 유효성분이 에탄올 추출물에 비해 상대적으로 더 많았지만 이러한 다량의 유효성분이 오히려 세포내에서 독성을 내는 것처럼 보였다. 이러한 결과는 유효한 성분뿐 아니라 유해한 성분도 함께 다량으로 보유하고 있기에 cell viability 측정 시 세포 독성을 보였다고 판단된다.

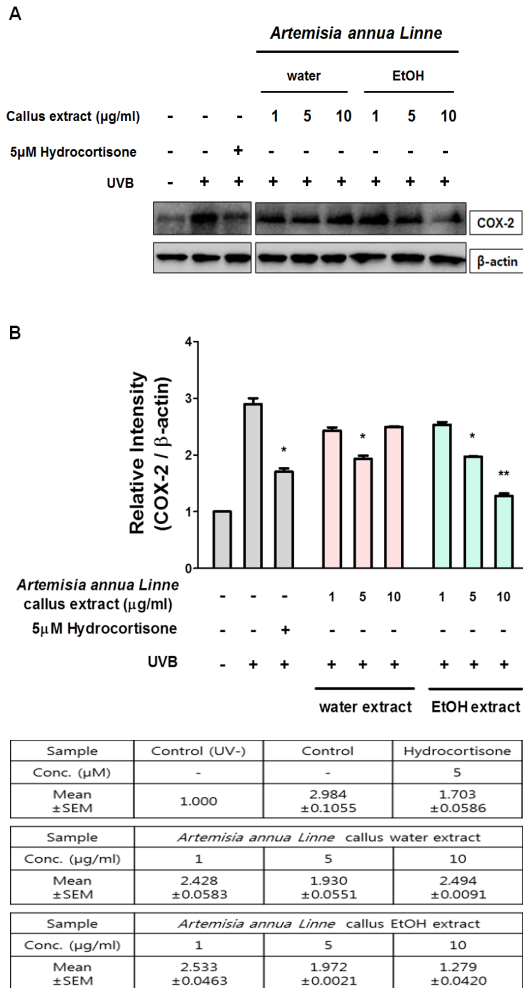


[Fig. 3] Cell viability effect of *Artemisia annua Linne* callus extracts.

3.4 COX-2 활성저해를 통한 항염 효과

HaCaT에 UV 조사를 통해 염증과 관련된 단백질인 COX-2를 유도하고 켈러스 추출물을 처리하여 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. COX-2는 외부 자극에 의해 유도되는 단백질로 염증반응과 관계가 있다. 양성대조군인 hydrocortisone을 처리하였을 때 UV조사에 의해 유도된 COX-2의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 개똥쑥 켈러스 추출물을 처리하여 COX-2 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 에탄올추출물의 농도가 증가할수록 COX-2의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 실험군은 UV를 조사하지 않은 대조군만큼 COX-2의 발현이 감소하였다. 반면에 열수추출물을 처리하였을 때는 COX-2 발현에 변화가 없었다. 이를 통해 열수와 에탄올 추출시 추출되는 유효성분에 차이가 있으며 상대적으로 적은 유효성분을 가지지만 직접적인 효능을 나타내는 유효성분은 에탄올 추출물이 더 많이 함유하고 있음을 알 수 있다. 또한 Kang GJ et al.(2012)에서 개똥쑥 추출물을 처리하여 HaCaT 각질형

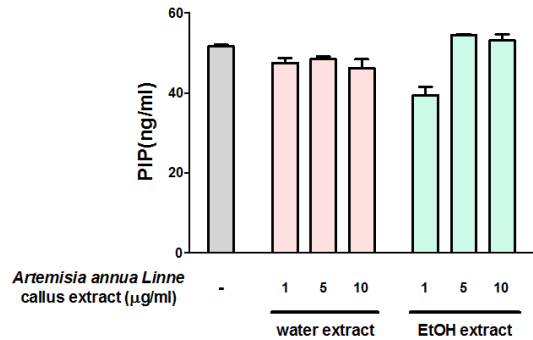
성세포에서 신호 인자(STAT1, NF- κ B와 p38) 억제를 통해 인터페론- γ 와 TNF- α 가 유발하는 macrophage-derived chemokine 발현을 억제하여 항염 효능이 있음을 밝혀졌다. 동일한 실험은 아니지만 본 실험에 사용된 식물조직배양을 통해서 얻어진 켈러스에서도 염증관련 단백질인 COX-2의 발현 억제를 통해 항염 효능을 확인할 수 있었다.



[Fig. 4] Anti-inflammation effect of *Artemisia annua Linne* callus extracts. A. Western blot result showing the effects of *Artemisia annua Linne* callus extracts, B. quantification of the bands. Results are expressed as the mean \pm s.e.m. of three independent experiments, * p <0.05, ** p <0.005 versus UVB-stimulated group.

3.5 Collagen 합성 촉진능 시험을 통한 주름 개선 효과

시료의 세포내 collagen의 생성 증가 정도를 PIP EIA kit를 사용하여 측정하였다[20,21]. 개똥썩 켈러스 추출물의 세포내 collagen 합성에 미치는 영향을 확인하고자 세포 밖으로 분비되는 PIP의 양을 측정하였다. 그 결과 열수 추출물은 대조군과 비슷한 수치를 보였다. 반면에 에탄올 추출물을 처리한 실험군에서는 1 μ g/ml 농도로 처리하였을 때 PIP의 양이 감소하다가 처리 농도가 증가하면 대조군과 비슷한 수준으로 PIP가 생성됨을 확인하였다. 열수, 에탄올 추출물 모두 PIP 생성을 촉진하는데 큰 영향을 주지 않음을 확인하였다. 이를 통해 개똥썩 켈러스 추출물은 collagen 합성과 관련된 주름개선에 효능이 없음을 알 수 있다.



Sample	Control	Artemisia annua Linne callus water extract			Artemisia annua Linne callus EtOH extract		
Conc. (μ g/ml)	-	1	5	10	1	5	10
Mean \pm SEM	51.59 \pm 0.4940	47.49 \pm 1.306	48.46 \pm 0.6877	46.21 \pm 2.198	39.42 \pm 2.072	54.53 \pm 0.2239	53.12 \pm 1.559

[Fig. 5] Anti-winkle of *Artemisia annua Linne* callus extracts.

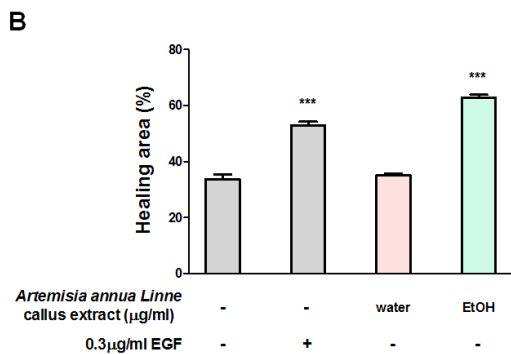
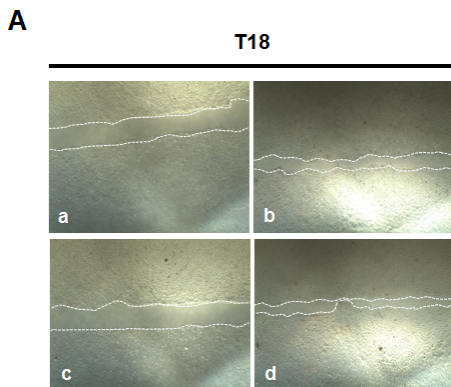
3.6 개똥썩 켈러스 추출물의 상처치료 효과

Wound healing assay를 이용하여 개똥썩 켈러스 추출물이 세포의 migration을 촉진하는지의 유무를 관찰하여 상처치료 효과를 평가하고자 하였다. HaCaT cell을 배양한 plate에 스크래치를 낸 후 켈러스 추출물을 처리하고 18 시간동안 배양하여 wound healing area를 계산하였다. Cell viability가 최소 70%정도인 농도 내에서 가장 높은 농도를 정해 처리하였다. 열수추출물은 50 μ g/ml, 에탄올추출물은 100 μ g/ml을 처리하여 시험하였다. 그 결과 개똥썩 에탄올추출물을 처리한 실험군에서 대조군에 비해 약 30% 정도 healing area가 증가 하였다. 이는 양성대조군인 EGF를 처리하였을 때 보다 약 10%

정도 더 증가하였다. 이를 통해 EGF보다 개똥쑥 켈러스 에탄올 추출물이 세포의 migration을 촉진하여 healing area를 증가시키는데 더 효과적임을 확인하였다. 반면에 상대적으로 적은 양을 처리한 열수추출물은 대조군과 거의 차이를 보이지 않았다. 이전에 개똥쑥 관련 효능 중 상처 치유와 관련된 보고는 없었다. 하지만 본 연구를 통해 에탄올 추출을 통해 얻어진 추출물이 항염 뿐 아니라 세포의 migration을 촉진하여 상처치료에도 효능을 가짐을 알 수 있다.

4. 결론

개똥쑥 켈러스를 각각 열수, 에탄올 추출하여 얻은 추출물을 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 세포에 처리하여 항염 및 항주름 등 다양한 효능을 평가하였다. 그 결과 개똥쑥 켈러스 에탄올추출물을 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 UV를 조사하지 않은 대조군만큼 COX-2의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 wound healing assay를 통해 상처 치유능 평가는 한 결과 개똥쑥 에탄올추출물에서 대조군에 비해 약 30%정도 healing area가 증가하는 것을 관찰하였다. 이러한 효능평가 결과를 통해 개똥쑥 켈러스 에탄올추출물이 열수추출물에 비해 더 유효한 성분을 가지고 있음을 예상할 수 있고 기존에 널리 알려진 항염 효능과 더불어 상처 치유능을 가짐을 확인하였다. 이를 통해 개똥쑥 켈러스 추출물은 자연친화적이고 친환경적인 소재로 개발함으로 다양한 항염 및 상처 치료 관련 제품 보급에 기여할 것으로 예상된다.



[Fig. 6] Wound healing effect of *Artemisia annua Linne* callus extracts. A. Wound healing cell images ; a. control, b. 0.3 $\mu\text{g/ml}$ EGF, c. *Artemisia annua Linne* callus water extract, d. *Artemisia annua Linne* callus ethanol extract) B. Wound healing area(%) of *Artemisia annua Linne* callus extract. Results are expressed as the mean \pm s.e.m. of three independent experiments, *** p <0.0001 versus control group.

References

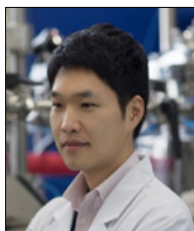
- [1] Kang, B. H. "Native plants and useful plants", *Korean J. Seed Sci.* 28, 12-16, 2008.
- [2] Hong Yunho, "Food physiological active substance science", *Chonnam National University Press.* 13-72, 2009
- [3] Choi EJ, Kim GH, "Antioxidant and anticancer activity of *Artemisia princeps* var. *orientalis* extract in HepG2 and Hep3B hepatocellular carcinoma cells", *Chin J Cancer Res.* 25, 536-243, 2013.
- [4] Kim JH, Jung SH, Yang YI, Ahn JH, Cho JG, Lee KT, Baek NI, Choi JH, "Artemisia leaf extract induces apoptosis in human endometriotic cells through regulation of the p38 and NF κ B pathways", *J Ethnopharmacol.* 145, 767-775, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.003>
- [5] Chang SH, Jung EJ, Park YH, Lim DG, Ko NY, Choi WS, Her E, Kim SH, Choi KD, Bae JH, Kim SH, Kang CD, Han DJ, Kim SC, "Anti-inflammatory effects of *Artemisia princeps* in antigen-stimulated T cells and regulatory T cells", *J Pharm Pharmacol.* 61, 1043-1050, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1211/jpp.61.08.0008>
- [6] Kang GJ, Kang NJ, Han SC, Koo DH, Kim YS, Lee JH, Kim SC, Park DH, Lee JS, Kang HK, Yoo ES, "HaCaT 각질형성세포에서 개똥쑥(*Artemisia annua* L) 유래 성분인 Artemisinic acid의 Macrophage-derived Chemokine 억제

- 효과”, *Korean J Pharm* 43, 217-223, 2012.
- [7] Kiharu I, Miho I, Toshimi H. “Major antioxidative substances in leaves of Atsumi-kabu”, *Agric Biol Chem* 54, 1053-1055, 1990.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/abb1961.54.1053>
- [8] Hayashi, T., Hayakawa, Y., Hayashi, T., Sasaki, H., Sakuragawa, N., “Sulfated polysaccharide from the leaves of *Artemisia princeps* activates heparin cofactor II independently of the Lys 173 and Arg 189 residues of heparin cofactor II”, *Thromb. Res.* 87, 105-112, 1997.
- [9] Kim, N.M., Kim, J., Chung, H.Y., Choi, J.S. “Isolation of luteolin 7-O-rutinoside and esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts of *Artemisia montana*”, *Arch Pharm Res.* 23, 237-239, 2000.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02976451>
- [10] Toda, S., Shirataki, Y. “Inhibitory effects of isoflavones in roots of the *Astragalus membranaceus* Bunge (*astragali radix*) on lipid peroxidation by reactive oxygen species”, *Phytother. Res.* 12, 59-61, 1998.
DOI : [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(19980201\)12:1%3C59::AID-PTR182%3E3.0.CO;2-R](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(19980201)12:1%3C59::AID-PTR182%3E3.0.CO;2-R)
- [11] K. E. Hwang, H. W. Kim, Y. S. Choi, S. Y. Lee, E. J. Yeo, Y. K. Ham, S. M. Choi, M. A. Lee, C. J. Kim, “Evaluation of the antioxidant effect of ganghwayakssuk (*Artemisia princeps* Pamp.) extract alone and in combination with ascorbic acid in raw chicken patties”, *Poultry Science*, 92, 3244-3250, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03274>
- [12] Ryu SY, Kim JO, Choi SU. “Cytotoxic components of *Artemisia princeps*”, *Planta Med* 63, 384-385, 1997.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957714>
- [13] Sarath VJ, So CS, Won YD, “*Artemisia princeps* var *orientalis* induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells”, *Anticancer Res.* 27, 3891-3898, 2007.
- [14] Bora KS, Sharma A. “Evaluation of antioxidant and freeradical scavenging potential of *Artemisia absinthium*”, *Pharm Biol.* 49, 1216-1223, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2011.578142>
- [15] Kim KS, Lee S, Lee YS, “Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*”, *J Ethnopharmacol.* 85, 69-72, 2003.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00338-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00338-0)
- [16] Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J, “Cell sensitivity assays: the MTT assay”, *Methods Mol Biol.* 731, 237-245, 2011.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- [17] Fotakis G, Timbrell JA, “In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride”, *Toxicol Lett.* 160, 171-177, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- [18] E. M. Middleton, A. H. Teramura, “The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage”, *Plant Physiol.* 103, 741-752, 1993.
- [19] Saveria Pastore, Daniela Lulli, Alla I. Potapovich, Paolo Fidanza, Vladimir A. Kostyuk, Elena Dellambra, Chiara De Luca, Riccardo Maurelli, Liudmila G. Korkina, “Differential modulation of stress-inflammation responses by plant polyphenols in cultured normal human keratinocytes and immortalized HaCaT cells”, *J Dermatological Science*, 63, 104-114, 2011.
- [20] Potapovich AI, Lulli D, Fidanza P, Kostyuk VA, De Luca C, Pastore S, Korkina LG, “Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFκB and AhR and EGFR-ERK pathway”, *Toxicol Appl Pharmacol.* 255, 138-149, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.06.007>
- [21] Atsushi Masamune, Shin Hamada, Kazuhiro Kikuta, Tetsuya Takikawa, Shin Miura, Eriko Nakano, Tooru Shimosegawa, “The angiotensin II type I receptor blocker olmesartan inhibits the growth of pancreatic cancer by targeting stellate cell activities in mice”, *Journal of Gastroenterology.* 48, 602-609, 2013.
- [22] Cho S, Kim HH, Lee MJ, Lee S, Park CS, Nam SJ, Han JJ, Kim JW, Chung JH, “Phosphatidylserine prevents UV-induced decrease of type I procollagen and increase of MMP-1 in dermal fibroblasts and human skin in vivo”, *J Lipid Res.* 49, 1235-1245, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M700581-JLR200>
- [23] Justin C Yarrow, Zachary E Perlman, Nicholas J Westwood, Timothy J Mitchison, “A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods”, *BMC Biotechnology.* 4, 21, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-4-21>
- [24] Coomber BL, Gotlieb AI, “In vitro endothelial wound repair, interaction of cell migration and proliferation”, *Arteriosclerosis.* 10, 215-222, 1990.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.10.2.215>
- [25] Lampugnani MG, “Cell migration into a wounded area in vitro”, *Methods Mol Biol.* 96, 177-182, 1999.
- [26] Kaji T, Kaga K, Miezi N, Hayashi T, Ejiri N, Sakuragawa N, “Possible mechanism of the stimulatory effect of *Artemisia* leaf extract on the proliferation of cultured endothelial cells: involvement of basic fibroblast growth

factor", *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 38, 2494-2497, 1990.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.38.538>

오 승 택(Seungtaek OH)

[정회원]



- 2011년 2월 : 성균관대학교 유전공학 전공 (이학학사)
- 2013년 2월 : 성균관대학교 일반대학원 의학 전공 (이학석사)
- 2013년 9월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>
생명과학, 유전공학

정 해 수(Haesoo Jung)

[정회원]



- 2012년 2월 : 청운대학교 화장품화학 전공 (이학학사)
- 2011년 8월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>
화장품 과학

조 문 진(Moonjin Cho)

[정회원]

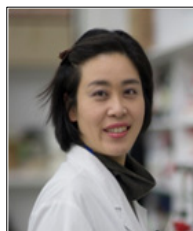


- 2007년 8월 : 수원대학교 화학전공 (이학학사)
- 2009년 11월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>
화학

서 효 현(Hyo Hyun Seo)

[정회원]



- 1999년 12월 ~ 2007년 3월 : (주)금호석유화학 금호생명환경과학연구소 선임 연구원
- 2004년 8월 : 광주과학기술원 생명과학과 (이학석사)
- 2007년 6월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>
생명과학

모 상 현(Sang Hyun Moh)

[정회원]



- 2003년 8월 : 광주과학기술원 생명과학과 (이학석사)
- 2013년 2월 : 성균관대학교 나노과학기술협동학부 (이학박사)
- 2005년 11월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 대표이사

<관심분야>
생명과학, 나노과학

송 미 영(Miyoung Song)

[정회원]



- 2008년 2월 : 건국대학교 화학전공 (이학학사)
- 2012년 8월 : 건국대학교 일반대학원 의생명과학전공 (이학석사)
- 2013년 9월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 근무

<관심분야>
생명과학, 화학