

팔물탕의 항산화 효과와 자외선으로 유도된 각질형성세포 손상에 대한 보호효과

김태연¹⁾ · 박종필^{2)*}

¹⁾ 세명대학교 한의과대학 예방의학교실, ²⁾ 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

Antioxidant and Protective Effects of *Palmul-tang* on Ultraviolet B (UVB)-induced Damage in Human Keratinocytes

Tae-Yeon Kim¹⁾ & Jong-Phil Bak^{2)*}

¹⁾ Dept. of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Semyung University

²⁾ Clinical Trial Center for Bio-Industry, Semyung University

Abstract

Objective : In this paper, we investigated the anti-oxidative capacities and protective effects of water extract of *palmul-tang*(PMT) against Ultraviolet B(UVB)-induced oxidative damage in human keratinocytes(HaCaT).

Method : To evaluate the anti-oxidative activities of PMT, we measured scavenging activities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion, lipid peroxidation and reducing power of PMT. To give an oxidative stress to HaCaT cells, UVB was irradiated with 40 mJ/cm² to HaCaT cells. To detect the protective effects of PMT against UVB, we measured cell viability, apoptotic bodies and reactive oxygen species(ROS) generation.

Results : PMT showed the anti-oxidative activities by scavenging DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion, lipid peroxidation, Also PMT showed high reducing values. The UVB-induced oxidative conditions led to the cell apoptosis. However, treatment with PMT reduced oxidative stress conditions, including inhibition of cell apoptosis and expression of ROS.

Conclusion : PMT had anti-oxidative activities and exhibited protective effects against UVB on HaCaT cells. PMT would be useful for the development of cosmetics treating UVB-induced skin aging.

Key words : *Palmul-tang*(PMT), Ultraviolet B(UVB), Human keratinocytes(HaCaT), Anti-oxidative activity, Apoptosis, Reactive oxygen species(ROS)

• 접수 : 2015년 10월 6일 • 수정접수 : 2015년 11월 6일 • 채택 : 2015년 11월 9일

*교신저자 : 박종필, 충북 제천시 세명로 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

전화 : 043-653-6409, 팩스 : 043-653-6302, 전자우편 : jpbak77@gmail.com

I. 서론

건강하고 행복한 삶을 추구하는 현대인들에게 개인의 건강과 외적인 아름다움이 드러나는 피부는 노화를 방지하기 위한 중요한 부분으로 많은 관심을 받고 있다¹⁾. 피부노화는 크게 내적노화와 외적노화로 구분되는데, 자외선, 바람, 열, 담배 등 외적 요인에 의한 외적노화는 생리적 노화인 내적노화를 촉진하거나 첨가적 역할을 할 뿐만 아니라 그 자체로도 피부노화를 유발한다²⁾.

자외선은 피부의 외적노화를 초래하는 가장 중요한 요인이다. 피부가 자외선에 노출되면 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되는데³⁾, 활성산소종의 범주에는 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$)과 히드록실 라디칼(hydroxyl radical, $\cdot OH$)과 같은 산소중심의 라디칼 뿐만 아니라 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 싱글렛 옥시젠(siglet oxygen, 1O_2)과 같은 몇 종류의 비라디칼, 그 외에 활성산소종과 생체성분과의 반응으로 유래된 과산화 라디칼(peroxyl radical, $ROO\cdot$), 알콕실 라디칼(alkoxyl radical, $RO\cdot$), 히드로 과산화물(hydro peroxide, $ROOH$) 및 내피세포 유래 완화인자로 알려진 산화질소(nitric oxide, NO) 등이 포함되어 있다⁴⁻⁶⁾. 이들은 피부의 효소적 그리고 비효소적 항산화 방어를 위태롭게 하여 산화적 스트레스를 초래하므로 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히아루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, 지질과산화(lipid peroxidation), 단백질 산화, DNA 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상 및 세포사멸을 야기시킨다⁷⁻⁹⁾. 따라서 자외선을 비롯한 외부 스트레스로부터 피부 세포를 보호하고 노화를 예방하기 위해서는 활성산소로 인한 산화적 스트레스를 억제하고 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어체계 강화가 중요하다¹⁰⁾.

최근 피부노화와 관련하여 특히 자외선 조사 후 생체 내 활성산소의 증가 및 내인성 항산화효소 및 항산화제들의 감소에 대한 연구가 보고되고 있으며¹¹⁻¹²⁾, 또한 한방에 대한 관심이 높아지면서 천연물이나 한방제제로부터 인체에 무해하면서도 보다 강력한 항산화력을 가진 물질을 탐색하기 위한 노력 및 추출성분 중 생리활성이 뛰어난 성분들을 이용하여 기능성 제제로 활용하는 방안도 활발히 연구되고 있는 실정이다^{9,13)}.

팔물탕(*palmul-tang*, PMT)은 補氣의 기본 처방인

사군자탕과 血虛에 사용하는 사물탕이 합쳐진 처방으로 虛勞와 氣血이 모두 虛한 것을 치료하는 처방이다⁴⁾. 사군자탕은 활성산소 과잉 생성에 의한 노화과정에서 세포손상과 지질과산화를 억제하는 효과가 있다고 알려져 있으며¹⁵⁾ 사물탕 또한 항산화능¹⁶⁾, 항염증¹⁷⁾, 세포손상보호¹⁸⁾ 등의 효과가 있음이 보고되어 있다. 그러나 팔물탕에 대한 연구는 주로 면역강화에 대한 내용이 대부분이고 그 외 세포사멸, 생식능력, 뇌혈류 역학, 대사기질 및 호르몬에 대한 연구가 이루어져 있으나¹⁹⁾ 자외선으로 유발된 피부노화와 관련된 항산화 연구는 미흡한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 피부노화를 개선하기 위한 한방 천연 소재 발굴을 목표로 한방처방인 팔물탕의 항산화능력과 각질형성세포에서 자외선으로 유도되는 세포사멸에 대한 억제능력을 확인하는 실험을 진행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 팔물탕(*Palmul-tang*, PMT)에 사용된 약재는 새롬제약(한국, 안성)에서 구입하였으며 세명대학교 부속한방병원에서 조제하였다(Table 1). 팔물탕 80 g을 증류수로 씻은 뒤 1 L의 증류수를 넣고 전기약탕기(대웅바이오가전, 한국)로 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출된 용액은 원심분리하여 상층액을 취한 뒤 감압회전농축기(BUCHI, Switzerland)로 200 ml가 되도록 감압 농축하고 $-80^{\circ}C$ 에서 동결시켰다. 이를 다시 동결건조기(일산바이오베이스, 한국)를 이용하여 7일간 동결건조 시킨 후 14.8 g의 분말을 얻었다. 팔물탕의 수득율은 18.5%로 $-20^{\circ}C$ 에 보관하였다가 실험 직전 생리식염수나 배지에 희석하여 0.2 μm 실린지필터(Millipore, Ireland)로 여과 후 실험에 사용하였다.

2) 시약

Methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), DMSO는 Bio Basic(Canada)으로부터, Hoechst 33342와 2',7'-dichlorodihydrofluo-

<Table 1> Prescription of Palmul-tang²⁰⁾

Herb Name	Latin Name	Weight(g)
人蔘	Ginseng Radix Alba	10
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	10
白茯苓	Poria Sclerotium	10
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	10
熟地黄	Rehmanniae Radix Preparata	10
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	10
當歸	Angelicae Gigantis Radix	10
川芎	Cnidii Rhizoma	10
Tatal		80

rescein diacetate(DCFH-DA)는 Thermo Fisher Scientific Inc.(USA)로부터, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), iron(II) sulfate heptahydrate, hydrogen peroxide, 2-deoxy-D-ribose, thiobarbituric acid(TBA), trichloroacetic acid(TCA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), peroxidase, potassium ferricyanide, linolenic acid 및 기타 시약은 Sigma Chemical Co.(USA)로부터 구입하였다.

3) 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 HaCaT 세포주는 Cell Line Service (Germany)에서 분양 받았으며, 세포주를 배양하기 위하여 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fetal Bovine Serum(FBS), Penicillin/Streptomycin, Trypsin-EDTA 그리고 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS)는 Life Technologies(USA)로부터 구입하였다. HaCaT 세포주를 배양하기 위하여 10% FBS와 100 unit/ml Penicillin/Streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 동결된 HaCaT 세포주를 DMEM 배지를 이용하여 빠르게 해동시키고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 여분의 동결 보존액을 제거 하였다. 세포주에 10 ml의 DMEM 배지를 첨가하여 100 mm culture dish에 접종하고 37℃, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 배양하였다. 배지는 주 3회 교체하였으며 culture dish 바닥면적의 70% 이상 자랐을 때 계대배양하였다. 계대배양 시 세포를 분리하기 위하여 0.25% trypsin-EDTA를 사용하였다.

2. 방법

1) 팔물탕의 항산화 능력 측정 실험

(1) DPPH 라디칼 분석법

Brand-Williams 등의 실험방법²¹⁾을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼에 대한 팔물탕의 소거능력을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 팔물탕 열수추출물 500 µl를 1.5 ml tube 에 넣고 0.3 mM DPPH 용액을 500 µl 가하여 10초 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 함량은 [(흡광도_{시료무첨가} - 흡광도_{시료}) / 흡광도_{시료무첨가}] × 100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 1 µg/ml vitamin C를 사용하였다.

(2) 히드록실 라디칼(hydroxyl radical, ·OH) 분석법

Chung 등의 실험방법²²⁾을 변형하여 히드록실 라디칼에 대한 팔물탕의 소거능력을 측정하였다. 50 µl의 10 mM FeSO₄와 50 µl의 10 mM H₂O₂를 이용한 Fenton 반응으로 히드록실 라디칼을 발생시켰다. 발생된 라디칼을 25 µl의 10 mM EDTA, 25 µl의 10 mM 2-deoxyribose, 150 µl의 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)의 존재 하에서 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 팔물탕 열수추출물과 반응시킨 다음 37℃에서 4 시간 동안 반응시켰다. 여기에 250 µl의 2.8% TCA 용액 및 250 µl의 1% TBA 용액을 첨가한 후에 100℃로 가열하였다. 그 후 상온에서 식힌 다음 1000×g에서 5분 동안 원심분리 하였다. 회수한 상등액은 micro-

plate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정 하였으며 항산화 활성은 [(흡광도_{시료무첨가} - 흡광도_{시료}) / 흡광도_{시료무첨가}]×100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 µg/ml vitamin E를 사용하였다.

(3) 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂) 분석법

Choi 등의 실험방법²³⁾을 변형하여 과산화수소에 대한 팔물당의 소거활성을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 팔물탕 열수추출물 각 80 µl를 20 µl의 10 mM 과산화수소 및 100 µl의 0.01 M 인산완충용액(pH 5.0)과 37°C에서 5분 동안 반응시켰다. 그 후, 15 µl의 1.25 mM ABTS 및 30 µl의 peroxidase를 37°C에서 10분 동안 반응시켜 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 항산화 활성은 [(흡광도_{시료무첨가} - 흡광도_{시료}) / 흡광도_{시료무첨가}]×100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 200 µg/ml vitamin C를 사용하였다.

(4) 수퍼옥사이드 음이온(superoxide radical, O₂⁻) 분석법

Liu 등의 실험방법²⁴⁾에 따라 수퍼옥사이드 음이온에 대한 팔물당의 소거활성을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 시료 각 20 µl에 62 µM nitro blue tetrazolium(NBT)와 98 µM β-nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)를 함유한 20 mM Tris 용액(pH 8.0) 800 µl를 혼합한 다음, 20 mM Tris 용액 80 µl와 33 µM phenazine methosulfate(PMS) 100 µl를 각각 첨가하였다. 비효소적 PMS / NADH로 유발된 수퍼옥사이드 음이온에 의해 자주색의 formazan으로 환원된 NBT를 측정하기 위해 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 560 nm에서 10분 동안 반응물의 흡광도를 측정하였다. 시료의 수퍼옥사이드 음이온 소거능은 [(흡광도_{시료무첨가} - 흡광도_{시료}) / 흡광도_{시료무첨가}]×100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 mU superoxide dismutase(SOD)를 사용하였다.

(5) 지질과산화(lipid peroxidation) 분석법

Shlafer 등의 실험방법²⁵⁾을 변형하여 지질과산화에 대한 팔물당의 항산화 효과를 측정하였다. 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 팔물탕 열수추출물 2 µl를 linolenic

acid emulsion 98 µl와 혼합한 후에 0.8 mM H₂O₂ 50 µl와 0.8 mM FeSO₄ 50 µl를 혼합하여 히드록실 라디칼을 발생시킨 용액과 5시간 동안 반응 후 0.4% 2-thiobarbituric acid(TBA)를 200 µl 첨가하고 95°C에서 2시간 반응시킨 다음 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 다음 15 : 1 비율의 n-butanol : pyridine 용액을 500 µl 첨가하고 1000×g에서 10분 동안 원심 분리한 후 상등액을 취하여 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화 정도는 [(흡광도_{시료무첨가} - 흡광도_{시료}) / 흡광도_{시료무첨가}]×100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 10 µg/ml vitamin E를 사용하였다.

(6) 환원력 분석법

Oyaizu의 방법²⁶⁾에 따라 팔물당의 환원력을 측정하였다. 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도의 팔물탕 열수추출물 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액을 1 ml 가하여 13500×g에서 15분 동안 원심분리하고 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml를 혼합한 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력은 [(흡광도_{시료무첨가} - 흡광도_{시료}) / 흡광도_{시료무첨가}]×100의 공식으로 계산하였다. 양성 대조군으로는 5 µg/ml vitamin C를 사용하였다.

2) 팔물당의 세포독성 실험

팔물탕 열수추출물이 HaCaT 세포주의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 96 well plate에 2 X 10⁴ cell/well이 되도록 세포주를 분주하고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 여기에 팔물탕 열수추출물을 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리하고 24시간 동안 추가 배양 후 MTT 수용액을 최종농도 1 mg/ml가 되도록 배지에 넣고 1시간 30분 동안 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 DMSO 용액을 각 well 당 200 µl 넣은 뒤 30분 정도 웨이커에 올려놓아 석출되게 한 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를

이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다. 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

3) UVB로 유도된 활성산소종(ROS) 억제 실험

HaCaT 세포주를 6 well plate에 2×10^5 cell/well 이 되도록 접종하고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/cm² 세기로 UVB를 조사하였다. 이후 0 µg/ml, 200 µg/ml 농도의 팔물탕 열수추출물이 포함된 DMEM 배지를 각각 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 10 µM DCFH-DA가 첨가된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 30분간 배양한 후 PBS로 3회 세척 후 형광현미경(EVOS fl, AMG, USA)을 이용하여 관찰하였다.

4) UVB로 유도된 세포사멸 억제 실험

(1) MTT 분석법

6 well plate에 1×10^5 cell/well이 되도록 세포주를 분주하고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/cm² 세기로 UVB를 조사하여 세포사멸을 유도하였다. 이후 FBS가 포함된 DMEM에 팔물탕 열수추출물을 25, 50, 100, 200 µg/ml 농도로 처리하고 48시간 동안 추가 배양 후 MTT 수용액을 최종농도 1 mg/ml가 되도록 배지에 넣고 1시간 30분 동안 암소에서 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 DMSO 용액을 각 well 당 1 ml씩 넣은 뒤 30분 정도 쉐이커에 올려놓아 석출되게 한 후 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다.

(2) Hoechst 33342 염색법

HaCaT 세포주를 6 well plate에 2×10^5 cell/well 이 되도록 접종하고 37°C, 5% CO₂가 공급되는 조건에서

16시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. PBS로 3회 세척 후 5개의 UVB 램프(G8T5E, Sankyo Denki, Japan)를 이용하여 40 mJ/cm² 세기로 UVB를 조사하였다. 이후 0 µg/ml, 200 µg/ml 농도의 팔물탕 열수추출물이 포함된 DMEM 배지를 각각 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 세포의 핵을 염색하기 위하여 배지의 상층액을 제거한 후 차가운 DPBS로 3회 세척하고 4% paraformaldehyde로 상온에서 30분간 처리하여 세포를 고정하였다. 다시 DPBS로 3회 세척 후 Hoechst 33342를 DPBS에 녹인 1 µg/ml 수용액으로 15분간 염색하고 형광현미경(EVOS fl, AMG, USA)을 이용하여 apoptotic body를 관찰하였다.

5) 자료분석

실험결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며 통계적 유의성은 t 검증(paired t test)을 시행하여 평가하였다. 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 실시하였다.

III. 결 과

1. 팔물탕의 항산화 능력

1) DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼에 대한 팔물탕의 항산화 효과를 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 처리한 결과, DPPH 라디칼 소거능은 12.55%, 21.69%, 41.15%, 71.28%로 농도 의존적으로 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A).

2) 히드록실 라디칼 소거능

Fenton 반응으로 발생된 히드록실 라디칼에 팔물탕을 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 처리한 결과, 히드록실 라디칼 소거능은 각각 9.17%, 10.02%, 12.88%, 15.79%로 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

3) 과산화수소 소거능

과산화수소에 대한 팔물탕의 항산화 효과를 확인하

기 위하여 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 2.35%, 6.54%, 14.41%의 소거능을 나타내었으며 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 17.06%의 소거능을 보여준 vitamin C와 유사한 항산화 능력을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

4) 수퍼옥사이드 음이온 소거능

수퍼옥사이드 음이온에 대한 팔물탕의 항산화 효과를 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로

처리한 결과, 8.19%, 12.83%, 24.04%, 46.69%의 유의성 있는 수퍼옥사이드 음이온 소거능을 확인할 수 있었다(Fig. 1D).

5) 지질과산화 억제능

지질과산화에 대한 팔물탕의 항산화 효과를 조사하기 위하여 linolenic acid를 Fenton반응으로 발생시킨 히드록실 라디칼에 노출시키고 팔물탕을 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과, 5.83%, 27.30%,

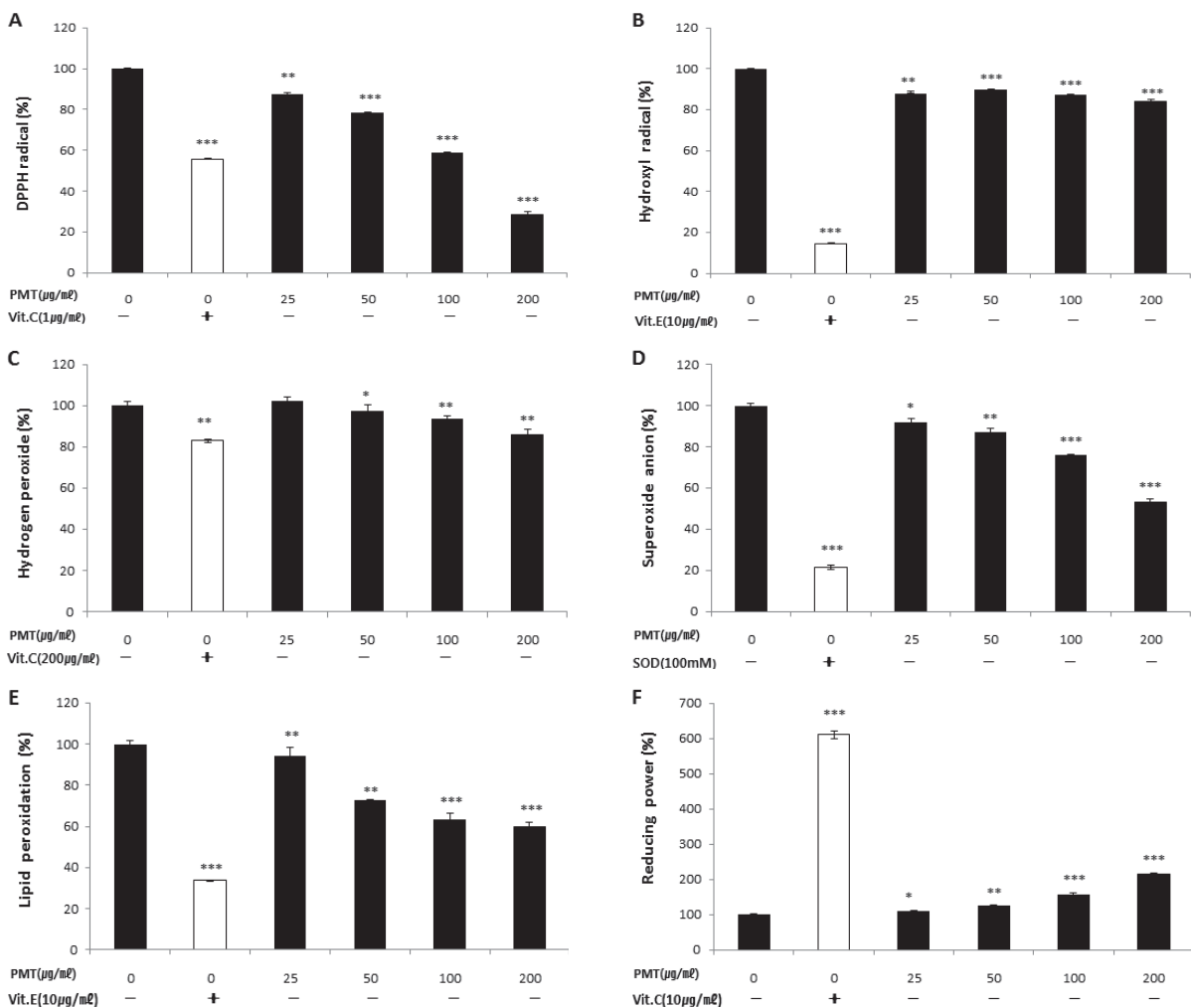


Fig. 1. Scavenging activities of Palmul-tang(PMT) on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, superoxide anion, lipid peroxidation and reducing power of PMT. DPPH radical(A), hydroxyl radical by Fenton reaction(B), hydrogen peroxide(C), superoxide anion(D), lipid peroxidation(E) and reducing power(F) was evaluated in the presence of PMT. After PMT at the indicated concentrations was reacted with each radical, the optical density of each reaction mixture was measured at a specific wavelength with spectrophotometer. Data are given as means of values \pm S.D. from three independent experiments(n=3). Level of significance was identified statistically (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) using paired t test compared with control group.

36.40%, 40.07%로 전 농도에서 유의성 있는 지질과산화 억제효과가 관찰되었다(Fig. 1E).

6) 환원력 증가 효과

팔물탕의 환원력을 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 결과, 11.57%, 26.03%, 58.62%, 116.24%의 환원력을 관찰할 수 있었다(Fig. 1F).

2. 팔물탕의 세포독성 실험

팔물탕이 HaCaT 세포주의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT 분석법을 실시하였다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군의 흡광도 평균을 100으로 정하고 각 흡광도 값을 환산하여 계산한 결과, 팔물탕은

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군과의 유의한 차이가 관찰되었다. 따라서 팔물탕은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 세포 생존율과 증식을 저해하지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

3. 팔물탕의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제효과

UVB 조사가 ROS 생성을 유도하는지를 확인하고, UVB가 조사된 세포 내에서 ROS 생성에 미치는 팔물탕의 영향을 관찰하고자 DCFH-DA assay를 시행한 결과, UVB의 자극은 세포 내 ROS의 생성을 현저히 증가시켰으며, 이러한 ROS의 생성은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 팔물탕 열수추출물 처리에 의하여 억제됨을 확인할 수 있었다.

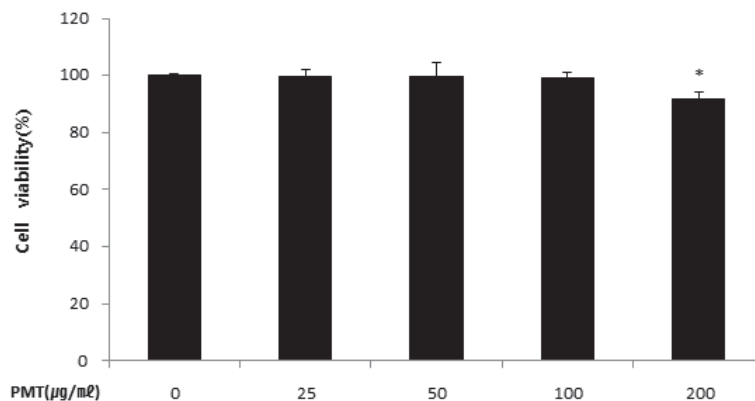


Fig. 2. Effects of Palmul-tang(PMT) on the cell viability of HaCaT cells. Data are given as means of values \pm S.D. from three independent experiments(n=3). Level of significance was identified statistically using paired t test compared with control group.

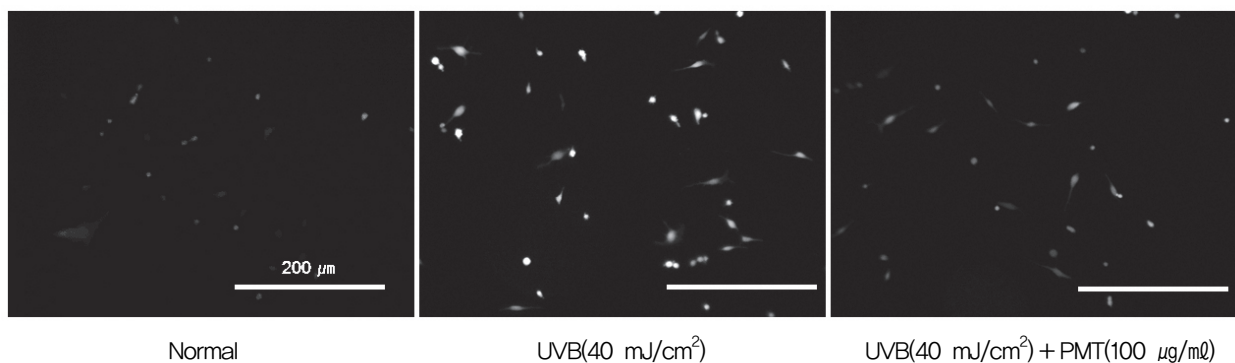


Fig. 3. Ultraviolet B(UVB) induced intracellular oxidant generation in HaCaT cells. The cells treated only UVB(40 mJ/cm^2) or with Palmul-tang(PMT, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were stained with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA).

4. UVB로 유도된 세포사멸에 대한 팔물탕의 손상 회복 효과

UVB로 유도되는 세포사멸에 대한 팔물탕의 회복력을 확인하기 위하여 세포에 UVB를 40 mJ/cm²로 조사한 후 팔물탕을 0, 25, 50, 100 µg/ml로 처리한 결과, 50, 100 µg/ml에서 손상 회복에 의한 생존율이 증가하였다(Fig. 4). UVB로 유도된 세포사멸에서 나타나는 apoptotic body를 Hoechst 33342로 염색하여 형광 현미경에서 관찰한 결과, UVB 조사 후 팔물탕 100 µg/ml를 처리한 군은 UVB 단독 조사군과 비교하여 apoptotic body를 형성한 세포(화살표)가 현저히 감소하였음을 확인하였다(Fig. 5). 따라서 팔물탕은 UVB로 유도된 세포손상에 대하여 회복 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

IV. 고찰

한의학적 관점에서 노화는 氣血의 盛衰와 매우 관련이 깊다. 《諸病源候論》에서는 “人稟陰陽而生, 含血氣而長”라 하여 사람이 氣血의 작용으로 자란다고 하였으며²⁷⁾, 《靈樞·營衛生會篇》에서는 “老者之氣血衰, 其肌肉枯, 氣道澀, 五臟之氣相搏, 其營氣衰少”라 하여 노화는 氣血의 쇠약으로 발생한다고 하였다. 《靈樞·天年》에서는 “人生十歲, 五藏始定, 血氣已通 … 二十歲, 血氣始盛, 肌肉方長 … 三十歲, 五藏大定, 肌肉堅固, 血氣盛滿 … 四十歲, 五藏六府十二經脈, 皆大盛以平定, 腠理始疏, 榮華頹落, 髮頗斑白, 平盛不搖 … 六十歲 … 血氣懈惰 … 七十歲 … 皮膚枯 … 九十歲 … 四藏經脈空虛, 百歲, 五藏皆虛, 神氣皆去, 形骸獨居而終矣.”라 하여 청

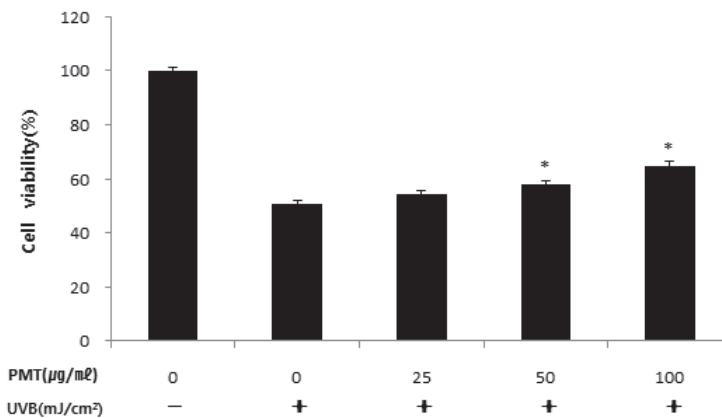


Fig. 4. Effect of Palmul-tang(PMT) under Ultraviolet B(UVB) irradiation on cell viability. Cells were radiated with 40 mJ/cm² of UVB and then incubated with different doses of PMT for 48 h. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments(n=3). Level of significance was identified statistically (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001) using paired t test compared with control group.

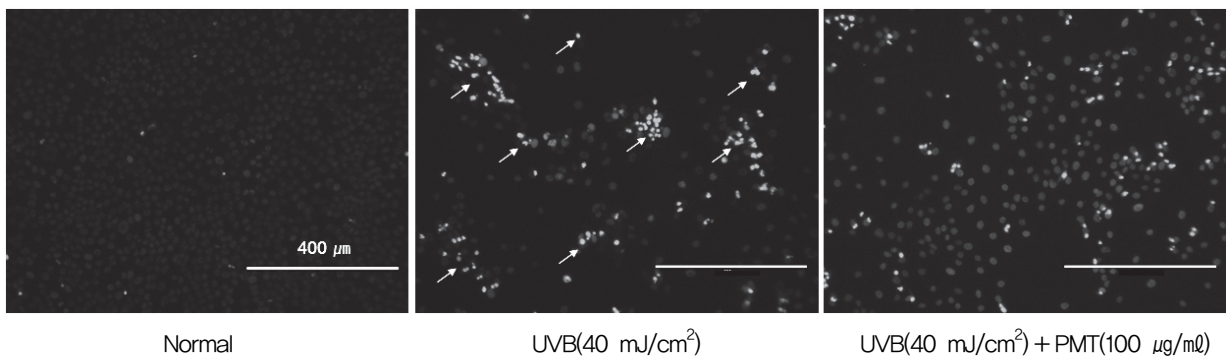


Fig. 5. Ultraviolet B(UVB) induced apoptotic body in HaCaT cells. The cells treated only UVB(40 mJ/cm²) or with Palmul-tang(PMT, 100 µg/ml) were stained with Hoechst 33342.

년기(20~30세)에는 氣血이 왕성하고 肌肉이 충실해지다가 40세에 이르면 腠理가 성글어지고 머리카락의 색이 빠지는 등의 노화가 시작되며, 이후 형체는 더 이상 氣血의 작용을 받지 못해 초취해진다고 하였다²⁸⁾. 《素問·陰陽應象大論》에 의하면 “年四十, 而陰氣自半也, 起居衰矣. 年五十, 體重, 耳目不聰明矣. 年六十, 陰痿, 氣大衰, 九竅不利.”이라 하여 40세 때부터 陰氣가 감소하기 시작하면서 노화의 증상이 나타나는 것으로 서술하였으며²⁹⁾. 《東醫寶鑑》에서는 “老因血衰”라 하여 노화의 원인을 血不足으로 여겼고²⁰⁾ 《醫學入門》에서도 “老人無非血液衰”라 하여 노화의 원인을 같은 관점에서 보았다³⁰⁾. 또한 《黃帝內經》에서는 노화가 陰精의 소모와 함께 진행하며, 이를 따라 血氣의 운행에 이상이 생겨 신체의 氣가 下虛上實한 상태로 변천해가는 것이라고 하였다³¹⁾. 따라서 노화의 각종 변화의 근원이 氣血에 있고 연령에 따라 氣血이 부단히 衰耗되는 것을 알 수 있다.

팔물탕(*palmul-tang*, PMT)은 元代 沙圖穆蘇가 지은 《瑞竹堂經驗方》에 최초로 기록되어 있는 처방으로³²⁾, 補氣의 기본방인 사군자탕과 血虛에 사용하는 사물탕이 합쳐진 처방으로 虛勞와 氣血이 모두 虛한 것을 치료하는 처방이다³³⁾. 사군자탕의 구성약물인 인삼은 微溫微甘微苦하여 培元氣 固脫生津하고, 백출은 溫苦甘하여 補裨益氣 清熱解毒 調和諸藥한다. 백복령은 平甘淡하여 利水滲濕하고, 감초는 補脾益氣 清熱解毒 調和諸藥한다. 사물탕의 구성약물인 당귀는 溫甘辛하여 補血和血 潤腸滑腸 溫中止痛하고, 숙지황은 微溫甘하여 滋陰補血 益精填髓하며, 백작약은 微寒苦酸하여 養血柔肝 緩中止痛 斂陰收汗하고, 천궁은 溫無毒하고 辛하여 活血行氣 祛風止痛한다³⁴⁾. 팔물탕에 대한 연구를 살펴보면 항암 및 면역기능과 관련된 연구³⁵⁻⁴⁰⁾가 가장 많았으며, 그 외 항피로⁴¹⁻⁴³⁾, 뇌혈류에 미치는 영향 및 기전^{44,45)}, 심근 세포고사에 미치는 효과⁴⁶⁾, 신경교세포 사멸에 대한 보호효과⁴⁷⁾, 유즙분비 촉진⁴⁸⁾ 등이 규명되어 있다.

피부의 노화는 다양한 신체 노화 현상 중 외견상 가장 두드러지는 까닭에 한의학에서도 노화의 정도를 구분하는 기준으로 언급되어 왔으며 피부노화의 원인도 결국 노화의 원인과 다르지 않다⁴⁹⁾. 이에 저자는 補氣 補血하여 인체의 眞氣를 보양하면 피부의 노화 또한 개선될 것으로 사료되어 氣血虛를 치료하는 대표적 처방인 팔물탕을 사용하여 본 연구를 진행하였다.

모든 인간이 겪게 되는 노화의 원인에 대해서는 지금까지 많은 가설들이 제기되어 왔다. 이중 90% 이상의 보편적인 지지를 받고 있는 가설은 활성산소에 의해 DNA, 단백질, 지방이 손상된다는 덴햄 하먼(Denham Harman) 박사의 활성산소론(free radical theory)이다⁵⁰⁾. 인체가 섭취한 산소의 약 95% 이상은 세포의 대사과정에서 생성되는 전자와 결합하여 물로 환원되지만 2~3%의 일부 산소는 불완전 환원으로 전자를 흡수하려는 과정을 통해 세포의 파괴 작용을 초래하는데 이러한 산물들을 활성산소라고 한다⁵¹⁾. 또한 활성산소는 흡연, 스트레스, 과도한 운동, 피부병, 바이러스 감염 및 자외선 등 우리의 건강을 위협하는 여러 인자들에 의해서도 발생하므로 인간은 지속적으로 활성산소의 위협에 노출되어 있다. 인체에는 세포를 보호하는 다양한 항산화 방어기전이 갖추어져 있으나⁵²⁾, 과도한 활성산소는 이러한 방어체계를 파괴하여 생체노화 및 피부노화를 촉진시키므로 노화에 있어서 활성산소에 대한 연구가 주목을 받고 있다⁵³⁾.

피부는 개개인의 생체적 노화 정도를 판단할 수 있는 가장 큰 지표가 된다. 피부는 외부환경에 항상 노출되어 있으므로 노화에 따른 피부변화는 많은 부분이 외부인자들의 영향에 의한 것이라고 할 수 있는데 특히 자외선을 통해 생성되는 활성산소가 피부노화의 가장 중요한 원인으로 간주되고 있다⁵⁰⁾. 따라서 본 연구에서는 팔물탕의 항산화능력을 확인하고, 사람각질형성세포에서 팔물탕이 자외선으로 유도된 세포사멸을 억제하는지 여부 및 사람각질형성세포에서 자외선 조사로 활성화되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성에 미치는 영향을 규명함으로써 자외선으로 유도된 피부노화에 대한 팔물탕의 보호효과 및 그 기전을 확인하고자 하였다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 안정한 유리기로 cysteine, glutathion과 같은 황 함유 아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine(*p*-phenylenediamine, *p*-aminophenol) 등에 의해 환원되어 자색이 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다²¹⁾. 팔물탕은 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서부터 농도 의존적으로 대조군과 비교하여 유의성 있는 DPPH 라디칼 소거능을 보였다.

히드록실 라디칼은 구리, 철 이온과 같은 금속이온과 반응하여 독성이 강한 자유라디칼을 생성하므로 DNA에 손상을 주거나 돌연변이를 유발시킨다⁵¹⁾. 25, 50,

100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 팔물탕을 처리한 후 히드록실 라디칼 소거능을 측정한 결과, 전 농도에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 소거능이 관찰되었다.

과산화수소는 자유라디칼은 아니지만 활성산소를 쉽게 생성하기 때문에 ROS의 범주에 포함되는 것으로 그 자체의 독성은 낮지만 세포막을 통과할 수 있고 Fe^{2+} 등과 같은 금속이온과 반응하여 독성이 강한 히드록실 라디칼을 생성하기 때문에 생체나 식품에서 문제 시 되고 있다⁵²⁻⁵⁴. 팔물탕은 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 대조군과 비교하여 유의성 있는 소거능을 나타내었으며 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 vitamin C(17.06%)와 유사한 소거능(14.41%)을 확인할 수 있었다.

수퍼옥사이드 음이온은 ROS에서 유래된 가장 대표적인 산소라디칼로 dismutation 반응 후 과산화수소에 의해 물질의 산화 및 발암 과정과 밀접한 관계를 갖고 있는 반응성이 더 큰 히드록실 라디칼로 전환되므로 생체 거대분자를 손상시키고 단백질 구조를 변형시켜 효소의 불활성이 유도되는 과정에 관여한다⁵⁵⁻⁵⁷. 본 실험에서 xanthine과 xanthine oxidase에 의해 생성되는 수퍼옥사이드 음이온에 대한 팔물탕의 소거능을 평가한 결과, 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 농도 의존적으로 소거능이 증가함을 확인할 수 있었다.

활성산소에 의해 생성된 과산화지질(Lipid peroxide, LPO)은 불포화지방산이 산화되어 생성된 유해한 반응산물로, 이것이 증가하면 피부섬유가 취약해져 주름살, 색소침착 등의 피부노화가 발생하며 뇌조직에 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다⁵⁸. 본 연구에서는 지질과산화에 대한 팔물탕의 항산화 효과를 조사하기 위하여 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 팔물탕을 처리한 결과, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서부터 대조군과 비교하여 유의성 있는 지질과산화 억제효과를 나타내었다.

항산화 능력은 항산화제에서 제공되는 수소원자가 자유라디칼과 반응하는 능력인 환원력에 의하여 좌우되므로²⁶ 팔물탕의 환원력을 확인하기 위하여 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과, 농도 의존적으로 환원력이 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2F).

상기 결과를 통하여 팔물탕이 여러 종류의 활성산소종을 억제하는 항산화능력을 지니고 있음을 확인할 수 있었으며, 이러한 효과는 팔물탕의 지표 성분인 진세노사이드 Rg1(ginsenoside Rg1), 진세노사이드 Rb1(ginsenoside Rb1), 5-히드록시메틸-2-푸르알데히드(5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, 5-HMF),

Z-리구스틸라이드(z-ligustilide), 알비플로린(albiflorin), 패오니플로린(paeoniflorin), 리퀴리틴(liquiritin) 등이⁵⁹ 지닌 항산화 효능⁶⁰⁻⁶⁴으로 인한 결과일 것으로 사료된다.

서양의학적 관점에서 피부노화는 내인성 요인과 외인성 요인으로 그 원인을 나눌 수 있다⁶⁵. 피부노화의 내인성 요인은 주로 유전적인 요인을 의미하며 피부 세포와 조직의 구조 및 변화를 결정하는데, 확정되어 있으며 조작불가능하다는 특징이 있다⁶⁶. 외인성 요인은 외부에서 유래된 것으로서 얼마든지 예방 가능하고 피할 수 있는 요인이다. 흡연, 과도한 음주 섭취, 영양부족, 만성적인 태양광선 노출 등이 피부노화를 촉진시키는 외인성 요인에 속하며 이중 태양광선이 안면부 피부노화에 미치는 비중은 80% 이상 되는 것으로 보고 있다⁶⁷.

태양광선을 파장에 따라 분류하면 자외선(ultraviolet rays, UV), 적외선(infrared rays, IR), 가시광선(visible rays)으로 나뉜다. 이중 200~400 nm 파장의 자외선은 인간의 피부에 광생물학적 반응을 유발하여 광노화를 초래하는 중요한 광선이다. 자외선을 다시 세분하면 오존층에 의해 제거되는 제일 짧은 파장의 자외선C(200~290 nm), 유리창에 의해 제거되는 중간 파장의 자외선B(290~320 nm)와 파장이 가장 긴 자외선인 자외선A(320~400 nm)로 나뉘는데 자외선B는 대체로 표피에서 흡수되므로 각질세포에 영향을 미치며, 자외선A는 보다 심층부까지 침투하므로 표피의 각질세포와 진피의 섬유아세포에 영향을 미친다⁶⁸. 본 실험에서는 자외선B를 조사하여 사람각질형성세포인 HaCaT 세포에 미치는 영향을 확인하였다.

자외선에 의한 피부의 손상은 자외선에 의해서 생겨나는 과도한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 때문에 일어나는 것으로 세포 내 단백질, 지질 등을 산화시켜서 정상적인 생리 활성을 저해하고 세포 사멸에 이르게 하는 것으로 알려져 있다⁶⁹. 자외선은 두 가지 기전을 통하여 피부에 수퍼옥사이드 음이온, 과산화수소 및 히드록실 라디칼⁷⁰과 같은 ROS를 발생시킨다. 첫째, 자외선 조사는 염증성 매개체(mediator)를 방출시켜 백혈구를 활성화시키는데 이러한 백혈구는 NADPH 산화산소계에 개입하여 활성산소를 생성한다. 둘째, 자외선은 지질, 특히 불포화지방산에서 전자를 빼앗아 지질 라디칼을 형성하는데 이것은 산소 분자와 묶여 과산화지질이 된다⁷¹. 이렇게 형성된 ROS는

피부의 항산화 방어 시스템을 파괴시켜 DNA, RNA, 효소 및 세포막에 손상을 일으켜 세포사멸을 초래하거나 유전자 발현양식 변화에 의한 광독성, 광노화 및 피부암을 유발시킨다⁷²⁾.

사람각질형성세포인 HaCaT 세포주에서 자외선B로 유발되는 ROS에 대한 팔물탕의 효과를 확인하고자, ROS가 존재하는 환경에서 고휘광의 2',7'-dichloro-fluorescein(DCF)로 빠르게 산화되는 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)⁷³⁾를 이용한 염색법을 시행한 결과, 자외선 조사 후 100 µg/ml의 팔물탕을 처리한 군은 자외선 단독 조사군과 비교하여 ROS 생성이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 세포내 ROS 생성 억제 효과를 바탕으로 팔물탕이 자외선B로 유도된 세포사멸에 미치는 영향을 확인하고자 MTT assay를 시행한 결과, 팔물탕의 농도 의존적 세포사멸 억제 효과를 확인할 수 있었으며, Hoechst 33342 염색상에서도 팔물탕 처리군은 자외선 단독 조사군과 비교하여 세포사멸에서 초래되는 핵 응축 현상인 apoptotic body가 감소되어 팔물탕의 세포사멸 억제능력을 재차 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 팔물탕의 항산화능력과 자외선B로 유도되는 ROS 및 세포사멸 억제능을 확인함으로써 팔물탕이 자외선으로 인한 피부손상을 보호하는 효능을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 추후 주름생성과 색소침착 등의 기전에 대한 항노화 연구가 함께 진행된다면 한방처방의 활용 범위가 안전하면서도 효과적인 화장품 소재 개발 분야로까지 확대될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결론

본 연구에서는 팔물탕의 항산화 효과 및 자외선으로 유도된 각질형성세포 손상에 대한 보호 효과를 확인하고자 생체 내 산화적 스트레스와 관련되어 있는 DPPH 라디칼, 히드록실 라디칼, 과산화수소, 수퍼옥사이드 음이온, 지질과산화에 대한 팔물탕 열수추출물의 소거 효과 및 환원력 평가와 사람 각질형성세포주인 HaCaT cell에서 자외선B로 유도된 활성산소종 및 세포사멸에 대한 팔물탕의 작용을 평가하는 실험을 진행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 팔물탕은 DPPH 라디칼, 히드록실 라디칼, 과산화

수소, 수퍼옥사이드 음이온에 대하여 농도 의존적 소거능력을 보였다.

2. 팔물탕은 지질과산화 억제능 및 환원력을 나타냈다.
3. 팔물탕은 HaCaT cell에서 자외선조사로 유발되는 활성산소종에 대하여 억제효과를 보였다.
4. 팔물탕은 HaCaT cell에서 자외선 조사로 유도된 세포사멸에 대하여 억제효과를 보였다.

참고문헌

1. 정문신. 중년여성의 안면피부노화에 대한 인식과 개선욕구에 관한 연구. 서경대학교 석사학위논문. 2014.
2. Choi YB, Kim ST. Photomedicine:Korean Dermatological Association. Textbook of Dermatology. 6th ed. Seoul:medbook, 2014:157-162.
3. Gilchrest, B.A. Skin aging and photoaging. Dermatol Nurs 1990;2(2):79-82.
4. Pierre JL. Chemistry of dioxygen and its activated species:Mechanisms of oxidative stress:Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL. Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Berlin:Birk-Muser. 1995:1-10.
5. Garrel C, Fontecave M. Nitric oxide:Chemistry and biology:Mechanisms of oxidative stress:Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL. Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Berlin:BirkMuser. 1995: 21-36.
6. Hogg N. Pro-oxidant and antioxidant effects of nitric oxide:Mechanisms of oxidative stress:Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL. Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Berlin:BirkMuser. 1995: 37-50.
7. Sies H. Biochemistry of Oxidative Stress. Angewandte Chem. 1986;25(12):1058-1071.
8. Sies H. Oxidative stress:oxidants and anti-oxidants. Experimental Physiology. 1997;82(2):

- 291-295.
9. Witt EH, Motchnik P, Packer L. Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin. : Fuchs J, Packer L Eds. Oxidative stress in dermatology. New York:Marcel Dekker. 1993: 29-47.
 10. Lim SW, Ryoo HC, Lee SH. Understanding of skin aging and its prevention and care. JSBR. 2002;4(1):71.
 11. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. Ann N Y Acad Sci. 2002; 973:31-43.
 12. Yaar M, Gilchrest BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. Br. J. Dermatol. 2007;157(5):874-887.
 13. 이진태, 정수현, 조우아, 강보연, 최은영, 정연숙, 손애량. 한방소재의 생리활성기능 검증과 화장품 신소재 탐색. 한약응용학회지. 2005;5(1):33-41.
 14. 윤용갑. 신동의방제 2223 도해임상활용 下. 서울: 정담. 2006:2263.
 15. 이용태, 조수인, 김영균. 사군자탕의 항산화 효과. 대한예방의학회지. 2000;4(2):170-192.
 16. Choi MA, Kim ML, Park CS. The Antibacterial and Antioxidative Activities of Samultang Ingredient Extracts. Korean Journal of Food & Cookery Science. 2008;24:52-58.
 17. 김은경, 김은영, 이현삼, 정혁상, 박성규, 손영주, 손낙원. 사물탕이 알려지 염증반응에 미치는 영향. 대한동의생리병리학회지. 2007;21(3):617-625.
 18. 조권일, 정승원, 장재호, 이대용, 박세욱, 이인, 신선호, 문병순. 培養心筋細胞의 酸化的 損傷에 대한 四物湯의 防禦效果. 대한한의학회지. 2005;26(1): 174-186.
 19. 마충제, 이남현, 마진열, 하혜경, 유영법, 신현규. EBM 기반 구축을 위한 팔물탕 문헌 연구 분석. 대한한의학방제학회지. 2007;15(2):35-45.
 20. 허 준. 대역동의보감. 서울:동의보감 출판사, 2005: 40, 55-57, 128, 258.
 21. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci. Technol-Leb. 1995;28(1):25-30.
 22. Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl Radical-scavenging Effects of Spices and Scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). Biosci. Biotech. Biochem. 1997;61(1): 118-123.
 23. Choi GP, Dhung BH, Lee DI, Lee HY, Lee JH, Kim JD. Screening of inhibitory activities on angiotensin converting enzyme from medicinal plants. Korean J Medicinal Crop Sci. 2002;10:399-402.
 24. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extract. Life Sci. 1997;60:763-771.
 25. Shlafer M, Shepard BM. A method to reduce interference by sucrose in the detection of thiobarbituric acid-reactive substances. Analytical biochemistry. 1984;137(2):269-276.
 26. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn. J. Nutr. 1986;44:307-315.
 27. So WB. Jebyeongwonhuron. Beijing:Inmin-wisaengchulpansa, 2006:266.
 28. 人民衛生出版社[編]. 靈樞經. 北京:人民衛生. 1997: 71, 102-103.
 29. 권건혁 편집. 편집황제내경. 서울:도서출판 반룡. 2005:3, 4, 15.
 30. 李梴. 編註醫學入門, 서울:대성문화사, 1989:542.
 31. 백상룡. 노화에 대한 연구(황제내경을 중심으로). 경희한의대 논문집. 1999:22(1):107-118.
 32. 마충제, 이남현, 마진열, 하혜경, 유영법, 신현규. EBM 기반 구축을 위한 팔물탕 문헌 연구 분석. 대한 한의학방제학회지. 2007;15(2):35-45.
 33. 汪昂. 醫方集解. 서울:대성문화사. 1984:262.
 34. 한의과대학방제학교수 공저. 방제학. 서울:영림사. 2014:345, 447, 573, 579, 584, 630, 633, 635.
 35. 허만규, 홍현우, 감철우, 박동일. 八物湯이 알레르기반응에 미치는 효과. 동의병리생리학회지. 2003; 17(4):1075-1081.
 36. 손재혁, 정진홍, 유동열, 유동렬. 八物湯이 생쥐

- 妊娠 末期에 免疫細胞의 cytokines 生成에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2000;13(1):342-376.
37. 김성훈 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 Prednisolone으로 誘發된 생쥐의 免疫反應低下에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1987;2(1):42-59.
38. 하지용, 남우열. 八物湯이 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 1995;10:295-315.
39. 박혜준, 고우신. 八物湯이 抗癌 및 免疫機能에 미치는 實驗的 效果. 대한한학회지. 1998;19(1):327-338.
40. 은재순, 전훈, 김대근. 八物湯이 복강 마크로파지의 탐식능에 미치는 영향. 생약학회지. 1999;30(4):363-367.
41. 권오봉, 임형호. 八物湯 및 加味八物湯이 白鼠의 항피로에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2002;12(1):89-100.
42. 박상현, 김진성, 류봉하, 박동원, 류기원 八物湯이 생체의 젖산내성 및 회복률에 미치는 영향. 대한한방성인병학회지. 2000;6(1):184-196.
43. 윤진환. 팔물탕 급성투여가 점증적부하 운동후 혈중젖산 및 혈액가스 변화에 미치는 영향. 한국사회체육학회지. 2001;15:635-647.
44. 박철훈, 배인태, 정현우. 八物湯이 腦血流力學변화에 미치는 효과. 동의생리병리학회지. 2004;8(4):1014-1020.
45. 박철훈, 김계엽, 정현우. 八物湯이 腦血流力學변화에 미치는 작용기전. 동의생리병리학회지. 2004;18(6):1714-1722.
46. 임은경, 신선호. 八物湯이 저산소증에 의한 배양심근세포고사에 미치는 영향. 대한한학회지. 2004;25(2):67-76.
47. 신용진, 신선호. Glutamate 로 유도된 C6 glial 세포의 독성에 대한 八物湯의 보호 효과. 동의생리병리학회지. 2012;26(4):475-482.
48. 송윤희, 김태희. 八物湯복용이 산후 유즙분비 관련 인자에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2010;23(1):12-29.
49. 한정민, 고우신, 윤화정. 노화와 피부노화에 대한 동서의학적 고찰. 한방안이비인후피부과학회지. 2014;27(1):45-57.
50. 홍재기. 활성산소에 의한 피부노화와 항산화비타민의 효능에 대한 이론적 고찰. 대한피부미용학회지. 2009;7(2):51-62.
51. Bu HJ, Lee HJ, Yoo ES, Jung DS, Riu KZ, and Lee S. Antioxdnat effects and inhibitory effect on NO synthesis by extracts of *Cansvalia lineate*. Kor J Phar. 20043;5:338-345.
52. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. London: Clarendon Press, 1989:1-85.
53. 박수남. 피부노화와 항산화제. 대한화장품학회지. 1997;23(1):75-132
54. Cho TY. Free radical scavenging activity of tryptophan metabolites. M.S. Thesis. Yonsei University. 1999.
55. Lee KM. Protective effect of *Ganoderma lucidum* and *Panax ginseng*, C.A. Meyer on oxidative damage. M.S. Thesis. Seoul National University. 1997.
56. Namiki MO. Antioxidant/antimutagens in food. Critical Review in Food Science and Nutrition, 1990;29:273-300.
57. Kang KH. Antioxidant and pro-oxidant activity of plant extracts. M.S. Thesis. Seoul National University. 1998.
58. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. Fase. J. 1987;1:258-364.
59. 한국한의학연구원. 표준한약처방 의약품정보 2013. pp. 370-374.
60. Wang XY, Wang YG, Wang YF. Ginsenoside Rb1, Rg1 and three extracts of traditional Chinese medicine attenuate ultraviolet B-induced G1 growth arrest in HaCaT cells and dermal fibroblasts involve down-regulating the expression of p16, p21 and p53. Photo-dermatol Photoimmunol Photomed. 2011;27(4):203-212.
61. Li Y, Li Y, Qian ZJ, Kim MM, Kim SK. In Vitro Antioxidant Activity of 5-HMF Isolated from Marine Red Alga *Laurencia undulata* in Free Radical Mediated Oxidative Systems. J. Microbiol. Biotechnol. 2009;19(11):1319-1327.
62. Yu Y, Du JR, Wang CY, Qian ZM. Protection

- against hydrogen peroxide-induced injury by z-ligustilide in PC12 cells. *Exp Brain Res.* 2008;184:307-312.
63. Okubo T, Nagai F, Seto T, Satoh K, Ushiyama K, Kano I. The inhibition of phenylhydroquinone-induced oxidative DNA cleavage by constituents of Moutan Cortex and Paeoniae Radix. *Biol Pharm Bull.* 2000;23:199-203.
64. Ha JH. Protective Effect and Mechanism of Liquiritin and Liquiritigenin, Components of Glycyrrhiza uralensis Fisher against UV radiation in HaCaT cell. M.S. Thesis, Seoul National University of Science and Technology. 2015.
65. Baumann L. Skin ageing and its treatment. *Journal of Pathology* 2007;211:241-251.
66. Nakamura K, Izumiyama-Shimomura N, Sawabe M, Arai T, Aoyagi Y, Fujiwara M, Tsuchiya E, Kobayashi Y, Kato M, Oshimura M, Sasajima K, Nakachi K, Takubo K. Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium, *J invest Dermatol.* 2002; 119(5):1014-1019.
67. Uitto J. Understanding premature skin aging. *N. Engl. J. Med.* 1997;337(20):1463-1465.
68. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000;16:239-244.
69. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324:1-18.
70. Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem.* 1997;174:305-319.
71. Akira Kawada. Photoaging clinic. Seoul:Shinheung Medscience. 2006:19-28.
72. Shindo Y, Witt E, Packer L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol.* 1993;100(3):260-265.
73. 전혜숙, 이창현, 안홍석. UVB 조사에 의한 육미지황탕의 광노화 피부 억제에 관한 실험적 연구. *동의생리병리학회지.* 2014;28(5):520-529.