

조합 추출물이 HaCaT cells의 항염증과 SEB-1 cells의 피지분비 억제에 미치는 영향

구은진 · 한재경 · 김윤희

대전대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

The Effects on Anti-inflammatory Action in HaCaT Cells and Inhibiting Sebum Secretion in SEB-1 Cells by *Gleditsiae Fructus* Extract

Koo Eun Jin · Han Jae Kyung · Kim Yun Hee

Department of Pediatrics, College of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives

The purpose of this study is to investigate the effects of *Gleditsiae Fructus* 70% EtOH extract (JS_E) on anti-inflammatory action in HaCaT cells (A spontaneously immortalized human keratinocyte cell line) and inhibiting triglyceride genesis in SEB-1 cells (Immortalized human sebocyte).

Methods

The anti-inflammatory effect of JS_E was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) which measured levels of IP-10, RANTES and MDC in HaCaT cells. Also the effect on secretion of sebum of JS_E was analyzed by TG-S kit which measured the quantity of triglyceride in SEB-1 cells.

Results

JS_E inhibited IP-10, RANTES and MDC expression in a dose dependent manner. IP-10 expression was inhibited significantly in comparison to TNF- α and IFN- γ recombination (TI) control group at concentration of JS_E 200 μ g/ml and RANTES and MDC expressions were inhibited significantly at concentration of JS_E 100, 200 μ g/ml. JS_E also inhibited triglyceride secretion of SEB-1 cells significantly in comparison to the control group in a dose dependent manner.

Conclusions

This study shows that JS_E has the effects of anti-inflammatory action and inhibiting sebum secretion. According to these results, JS_E can be used for treating skin diseases such as acne and dermatitis caused by inflammation and excessive secretion of sebum by controlling the activity of the HaCaT and SEB-1 cells.

Key words : *Gleditsiae fructus*, Acne, Inflammation, Sebum, HaCaT cells, SEB-1 cells, IP-10, RANTES, MDC, Triglyceride

I. Introduction

여드름은 사춘기에 호발하는 모피지선 단위 (pilosebaceous unit)의 자기국한성 만성 염증성 질환으로 우리나라의 약 80~95%의 성인이 과거에 여드름을 경험했거나 현재 앓고 있다¹⁾. 여드름은 모낭 각질형성 세포의 과증식, 피지의 과다 분비, propionibacterium acne (P. acne) 균의 증식, 피지선 주위의 염증이 주 발생 원인이 되며 이러한 여러 인자의 상호 작용과 함께 모낭 내 물질이 진피로 유출되어 발생한다^{2,3)}. 양방에서는 여드름 치료에 국소 도포제 및 경구 약물로 benzoyl peroxide, retinoid, azelaic acid, tetracycline, erythromycin, isotretinoin 등을 이용하고 있지만 이들 약물은 자극성 피부염, 색소 침착, 홍반, 항생제 내성 등의 부작용을 가져올 수 있고 일부는 12세 이하의 소아에 안전성이 확립되어 있지 않다²⁾.

한의학에서는 여드름이 粉刺, 面皰, 面瘡, 肺風粉刺, 粉花瘡 등⁴⁾에 해당한다. 발생 원인으로는 風, 濕, 熱의 外因과 脾胃濕熱, 肺熱, 血熱, 痰飲, 陰虛, 衝任不調 등의 內因이 있으며 병리학적으로는 脾氣不建, 運化失調하여 水濕이 內停하고 이것이 오래되어 成痰, 化熱하여 피부에 凝聚되면 낭종, 결절을 형성하게 되는데, 치료는 환자의 개인별, 체질별 증상에 맞추어 清泄肺胃, 涼血清肺, 活血散結, 健脾化痰, 利濕清熱, 疏肝解鬱 등의 처방에 따라 체침, 안면침, 미세다룬침 등의 침치료와 탕약치료 및 散劑, 膏劑, 汁 등을 이용한 洗滌, 塗敷, 濕敷 등의 외치법이 이용되고 있다^{4,6)}. 더불어 여드름 치료에 활용할 수 있는 한약재의 효능을 밝히기 위한 다양한 약리학적 연구⁷⁻¹¹⁾들이 진행되고 있으며 그 외 국내 여드름 치료 약물 연구에는 涼膈散火湯¹²⁾, 顛倒散¹³⁾, 清上防風湯加味¹⁴⁾, 玉容散¹⁵⁾, 加減枇杷清肺飲¹⁶⁾, 連翹敗毒散加味方¹⁷⁾, 如意金黃散¹⁸⁾ 등의 처방을 이용한 실험적 연구와 이 등¹⁹⁾의 六味地黃湯加味方 복용 및 면포 압출 치료, 김 등²⁰⁾의 清上防風湯 복용에 관한 임상 연구가 있었고 외용제 연구로는 김 등²¹⁾의 국내 여드름 외용약 치료에 대한 고찰 연구, 홍²²⁾의 顛倒散을 이용한 임상 연구가 있었다.

조협 (*Gleditsiae Fructus*)은 콩과 (Leguminosae)에 속한 낙엽교목인 조각자나무 (*Gleditsia sinensis* Lam.)의 과실 혹은 성숙하지 않은 과실을 건조한 것으로 氣味는 辛鹹, 性은 溫하며 有小毒하고 肺, 大腸에 歸經하고²³⁾, 破堅積, 散結消腫, 清風去痒, 除毒消癰, 數腫消毒의

효능을 가지며²⁴⁾ 태운 연기로 薰蒸하거나 熬膏로 만들어 瘡腫未潰한 환부에 塗敷하여 勞瘵, 腫毒, 風癬, 疥癩²⁵⁾ 및 소아의 頭瘡, 惡瘡 치료²⁶⁾에 이용되었다. 《東醫寶鑑》²⁷⁾에서는 면부 질환 처방인 玉容散, 紅玉散, 玉容西施散의 君藥으로서 안면의 기미, 작은 부스럼, 종기, 땀띠와 여드름을 치료하며 피부 소양감을 완화시키고 피지 분비를 억제하는 외용제로 쓰였다. 현재 까지 조협에 관한 국내 연구로는 조협의 saponin 성분 분리 동정 연구²⁸⁾ 및 독성에 관한 실험 연구²⁹⁾와, 조협의 효능 연구로서 자외선 차단 효과와 피부 미백 기능³⁰⁾, 항산화 활성³¹⁾ 등을 밝힌 연구들이 있었으나 조협의 항염증 및 피지분비억제 효능을 밝힌 연구는 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 TNF- α 와 IFN- γ recombinant로 염증반응이 유도된 인간각질형성세포 (HaCaT cells)에 조협 추출물을 처리하여 ELISA를 통해 IP-10, RANTES, MDC 단백질 생성량을 측정하고, 조협 추출물을 처리한 인간피지선세포 (SEB-1 cells)에서 생성되는 triglyceride의 양을 측정한 결과 조협의 항염증 및 피지 분비 억제 효과를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and methods

1. 재료

1) 시약 및 기기

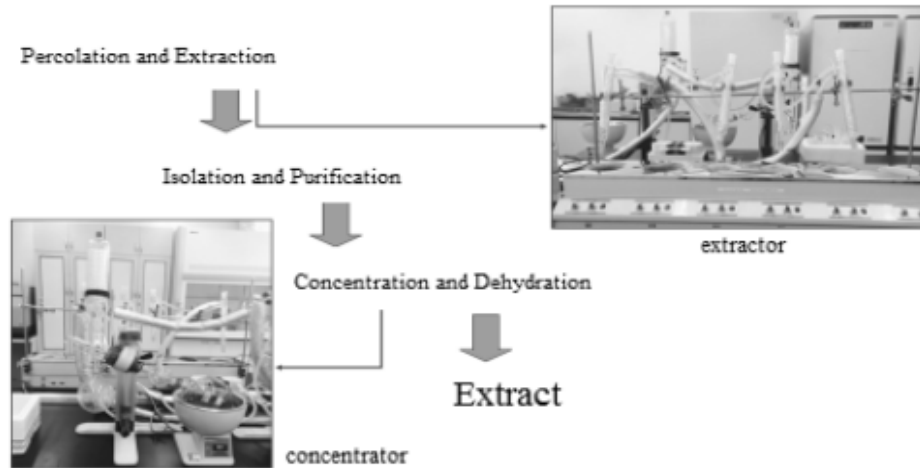
(1) 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-kiphenyl-tetrazilium bromide (MTT), Tris-HCl, KCl, MgCl₂, Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배양액, dimethyl sulfoxide (DMSO), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), Streptomycin는 sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. TNF- α 와 IFN- γ recombinant는 R&D system 사 (Minneapolis, MN, USA) 제품을, trypsin-EDTA와 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Invitrogen Gibco™ (Carsbad, CA, USA) 제품을, triglyceride량 측정은 아산 제약사 TG-S kit (AM157, Korea)를 사용하였고, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 실험에서는 한일분쇄기 (FM-700SS, Yeongdeungpo,

Scheme. 1. Extraction Process of Gleditsiae Fructus



Korea), 환류추출기 (Heating Mantle, MS-DM 609/20 L, PK Lab, Korea), 열탕추출기 (DWT-1800T, 대웅, Kangnam, Korea), 감압증류기 (N-1200A, EYELA. CO. LTD, Japan), 동결건조기 (PF-10/ALPHA 1-2LD, Germany), CO₂ 배양기 (Forma scientific Co., USA), 원심분리기 (한일과학, Yeongdeungpo, Korea), plate shaker (Lab-Line, TRIPUNITHURA, USA), Spectrophotometer (Shimazu, Kyoto, Japan), Bio-freezer (Sanyo, MORIGUCHI, Japan), ELISA microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA) 등을 사용하였다.

2) 세포 배양 및 추출물 분리

(1) HaCaT cells 배양

인간각질형성세포주 (A spontaneously immortalized human keratinocyte cell line, HaCaT cells)는 한국 세포주은행 (Seoul National University, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며 10% FBS와 1% 항생제가 첨가된 DMEM 배지에서 37 °C의 온도와 5% CO₂ 조건이 유지되는 CO₂ 배양기를 통해 배양하였다.

(2) SEB-1 cells 배양

인간피지선세포주 (Immortalized human sebocyte, SEB-1 cells)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구매하여 사용하였으며 FBS 2.5%, adenosine 1.8×10^4 M, hydrocortisone 0.4 µg/ml, insulin 10 ng/ml, epidermal growth factor 3 ng/ml, cholera toxin 1.2×10^{10} M을 포함하는 standard medium인 DMEM (5.5 mM glucose) : F-12 배양액을 3 : 1 비율로

섞은 배지에서 37 °C의 온도와 5% CO₂ 조건이 유지되는 CO₂ 배양기를 통해 배양하였다.

(3) 조협 추출물 분리

본 실험에 사용한 조협 (Gleditsiae Fructus)은 국내 한약공급업체인 옴니허브 (www.omniherb.com, Korea)에서 구입, 정선하여 사용하였다. 조협 (20 g)을 분쇄기로 두 쪽으로 분쇄하여 환류추출기에 넣고 45 °C에서 70% 에탄올 1 l를 넣고 60 분 추출한 후 다시 70% 에탄올 1 l를 넣고 같은 조건으로 60 분 동안 재당하였다. 그 후 감압증류기를 이용하여 유기용매를 제거하는 농축과정을 거치고, 동결건조기를 통하여 건조된 조협 70% EtOH 추출물 3.4 g (이하 JS_E)을 얻었다 (수득율 17%) (Scheme. 1).

2. 방법

1) HaCaT cells를 이용한 조협 추출물의 항염증 효과

(1) MTT 분석

JS_E가 HaCaT cells에 세포독성을 나타내는지 확인하고자 MTT 분석을 시행하였다. MTT 분석은 세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 formazan 측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법³²⁾으로 실험내용은 다음과 같다. 각각 HaCaT cells를 96-well plates에 1×10^6 cells/ml 농도로 100 µl씩 분주한 뒤 24 시간 동안 배양한 후 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 JS_E를 각 농도별 (12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml)로 제조한 후 세포에 처리하여 24 시간 동안 배

양하였다. 24 시간 후 DMEM의 10분의 1에 해당하는 MTT 용액 0.5 mg/ml을 가하고 4 시간 더 배양하여 MTT를 환원시킨 후 상층액을 제거하였다. 그런 다음 암 조건에서 30 분간 건조한 후 DMSO 100 μ l를 분주하여 1 시간 동안 혼합한 후 ELISA microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존률은 시료 무첨가구의 흡광도 대비 시료첨가구의 흡광도의 백분율에 의해 산출하였다.

$$\text{세포생존률} = \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{시료무첨가구의 흡광도}} \times 100$$

(2) ELISA 분석

HaCaT cells에 TNF- α 와 IFN- γ recombinant (이하 TNF- α + IFN- γ)를 10 ng/ml 처리하여 inducible protein 10 (IP-10), regulated on activation (RANTES), macrophage-derived chemokine (MDC) 단백질 생성을 유도한 후 JS_E가 이들 유전자 발현에 영향을 미치는지 확인하고자 각각의 단백질 양을 측정하기 위해 ELISA를 시행하였다. HaCaT cells 배양은 24-well culture plate에 넣고 standard incubator conditions (37 $^{\circ}$ C, humidified, 5% CO $_2$, 95% air environment)에서 24 시간 배양한 다음, 상층액을 제거했고, 여기에 10 μ g/ml의 농도로 TNF- α + IFN- γ 를 처리한 JS_E (100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml)를 1 ml씩 넣고, 다시 24 시간 배양한 후 상층액을 분리하여 냉동실에 보관하여 사용하였다. 이후 ELISA kit를 사용하여 사람 IP-10, RANTES 그리고 MDC를 microwell에 100 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 16 시간 두었으며 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μ l씩 넣어서 1 시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품은 희석하고, 각각의 배양 상층액은 20 배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 배양 상층액을 100 μ l씩 넣었으며 2 시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1 시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 30 분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450 nm로 항염증 효과를 측정하였다.

2) SEB-1 cells를 이용한 조합 추출물의 피지 분비 억제 효과

(1) MTT 분석

JS_E에 의한 SEB-1 cells의 증식에 대한 효과를 알아보기 위해 MTT 분석을 시행하였다. 먼저, SEB-1 cells를 24 well plate에 5×10^4 cells/ml의 농도로 seeding하여 60~70% 세포배양용기에 채워질 때까지 48시간 동안 배양하였다. 그 다음, 성장배지를 제거하고 FBS를 포함하지 않은 유지 배지에 희석한 JS_E를 6.25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 농도로 가하여 1, 3, 5 일간 동시 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 1 mg/ml 농도의 MTT 용액을 넣어 4 시간 동안 반응시킨 후에, 생성된 formazan 양을 ELISA를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 판정하였다.

(2) TG-S kit 분석

JS_E가 SEB-1 cells의 lipid pattern에 미치는 영향을 분석하기 위하여 TG-S kit를 이용하여 triglyceride의 변화를 조사하였다. 먼저, SEB-1 cells를 6 well plate에 1×10^6 개를 분주하고 JS_E를 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml의 농도로 처리하여 5 일 동안 배양한 후 triglyceride를 정량하였다. triglyceride는 Lipoprotein lipase (LPL)의 작용에 의해 가수분해되어 Glycerol이 형성되며 Glycerol은 Glycerol kinase와 보조소 ATP의 작용에 의해 L-a-glycerophosphoric acid로 변환한다. L-a-glycerophosphoric acid는 L-a-Glycerol phosphate oxydase에 의해 산화되어 과산화수소를 발생시키며, 생성된 과산화수소는 Peroxidase에 의해 N-Ethyl-N-sulfopropyl-Toluidine과 4-Aminoantipyrine을 산화 縮合해 적색 색소를 생성한다. 이 색소를 550 nm에서 比色하여 triglyceride를 측정하는데, 효소시약과 효소시약 용해액의 혼합액을 효소용액으로 하여 검체 (혈청 0.02 ml)와 혼합 후 37 $^{\circ}$ C에서 10 분 간 방치한 뒤 triglyceride의 양을 측정하고 사전에 설정된 농도 또는 활성치 환산기능에 의해 검체의 triglyceride 농도를 구했다.

$$\text{triglyceride의 양(mg/dl)} = (\text{검체의 흡광도/표준의 흡광도}) \times 300$$

$$(\text{표준액 triglyceride의 양} = 300 \text{ mg/dl})$$

3. 통계 분석

각 실험군 결과 값은 SPSS 통계프로그램을 사용하여 통계처리 하였으며, independent T-test로 p<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다. (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001)

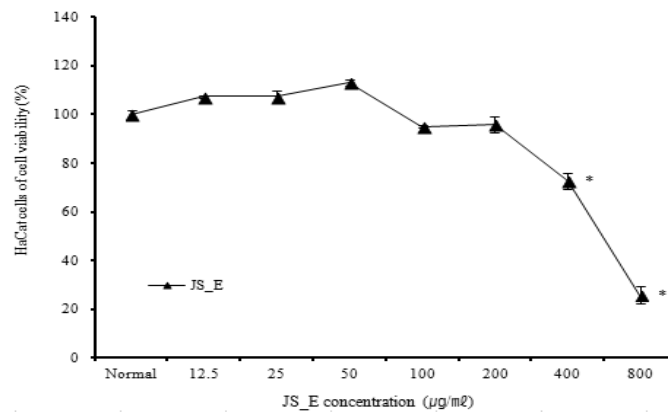


Fig. 1. Effect of JS_E on cell viability in HaCaT cells

HaCaT cells were pre-treated with JS_E (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml) or none (normal) for 24h. MTT assay was carried out to check the cytotoxic effect of HaCaT cells. Each bar graph represents mean ± (SE) of at least 4 independent experiments.

* Significantly different from normal group (*: P<0.05, **: P<0.01) / JS_E: *Gleditsiae Fructus* 70% EtOH extract

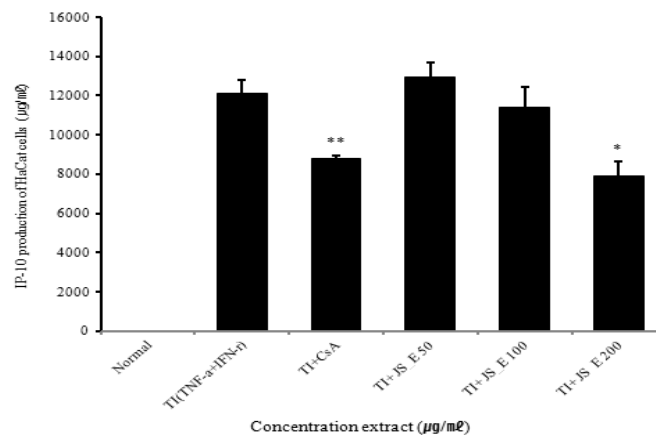


Fig. 2. Effect of JS_E on TNF-α + IFN-γ induced IP-10 protein expressions in HaCaT cells

HaCaT cells were incubated with TNF-α + IFN-γ (10 ng/ml) in JS_E. To investigate effect of JS_E, cells were stimulated with TNF-α + IFN-γ (10 ng/ml) and the indicated concentrations of JS_E for 24 hrs. Level of IP-10 in culture media was measured using a commercially available ELISA kit as described in Methods.

* Significantly different from control group (TI) (*: P<0.05, **: P<0.01) / JS_E: *Gleditsiae Fructus* 70% EtOH extract

III. Results

1. HaCaT cells에 대한 조합 추출물의 항염증 효과

1) 세포생존률

JS_E에 대한 피부 항염 효과 측정을 위해 HaCaT cells의 세포독성을 확인한 결과, JS_E 400 µg/ml의 농도에서 HaCaT cells의 생존률은 72.68%, 800 µg/ml은 25.87%로 400, 800 µg/ml에서 세포독성을 보였다 (p<0.05, p<0.01) (Fig. 1).

2) 조합 추출물의 항염증 효과

(1) IP-10 단백질 발현

대식세포염증성 단백질인 IP-10 생산량은 정상군 (normal)에 비하여 TNF-α + IFN-γ (TI)를 처리한 대조군 (TI)에서 12129.10 pg/ml로 증가되었으며, CsA (cyclosporin A)를 처리하고 TI로 자극한 양성 대조군은 8791.56 pg/ml으로 감소하였다. JS_E를 처리한 후 TI로 자극한 실험군에서 JS_E 50 µg/ml는 12978.18 pg/ml, 100 µg/ml는 11375.64 pg/ml, 200 µg/ml는 7905.90 pg/ml로 측정되어 JS_E의 농도가 증가함에 따라 IP-10 생산량이 감소하는 경향을 보였으나, 통계학적 유의성은 JS_E 200 µg/ml (p<0.05)에서만 관찰되었다 (Fig. 2).

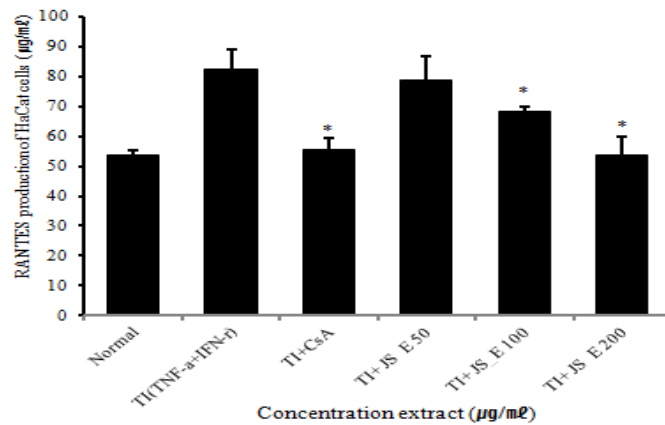


Fig. 3. Effect of JS_E on TNF-α + IFN-γ induced RANTES protein expressions in HaCaT cells

HaCaT cells were incubated with TNF-α + IFN-γ (10 ng/ml) in JS_E. To investigate effect of JS_E extracts, cells were stimulated with TNF-α + IFN-γ (10 g/ml) and the indicated concentrations of JS_E for 24hrs. Level of RANTES in culture media was measured using a commercially available ELISA kit as described in Methods.

* Significantly different from control group (TI) (*: P<0.05) / JS_E: *Gleditsiae Fructus* 70% EtOH extract

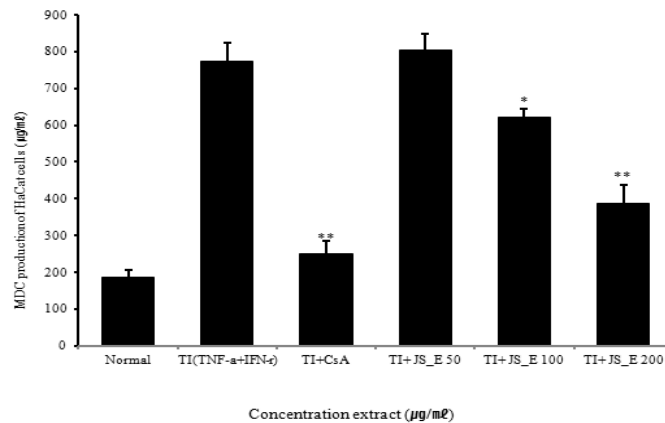


Fig. 4. Effect of JS_E on TNF-α + IFN-γ induced MDC protein expressions in HaCaT cells

HaCaT cells were incubated with TNF-α + IFN-γ (10 ng/ml) in JS_E. To investigate effect of JS_E, cells were stimulated with TNF-α + IFN-γ (10 ng/ml) and the indicated concentrations of JS_E for 24 hrs. Level of MDC in culture media was measured using a commercially available ELISA kit as described in Methods.

* Significantly different from control group (TI) (*: P<0.05, **: P<0.01) / JS_E: *Gleditsiae Fructus* 70% EtOH extract

(2) RANTES 단백질 발현

대식세포염증성 단백질인 RANTES 생산량은 정상군 (normal)에서 53.46 pg/ml이었으며 TNF-α + IFN-γ (TI) 를 처리한 대조군 (TI)은 82.30 pg/ml, CsA (cyclosporin A)를 처리하고 TI로 자극한 양성 대조군은 55.39 pg/ml 였다. JS_E를 처리한 후 TI로 자극한 실험군에서 JS_E 50 µg/ml는 78.68 pg/ml, 100 µg/ml는 68.31 pg/ml, 200 µg/ml는 53.44 pg/ml로 측정되어 JS_E 농도가 증가함에 따라 RANTES의 생산량이 감소하는 경향을 보였으며, 통계학적 유의성은 JS_E 100, 200 µg/ml (p<0.05)에서 만 관찰되었다 (Fig. 3).

(3) MDC 단백질 발현

대식세포염증성 단백질인 MDC 생산량은 정상군 (normal)에서 185.44 pg/ml이었으며 TNF-α + IFN-γ (TI) 를 처리한 대조군 (TI)은 774.65 pg/ml, CsA (cyclosporin A)를 처리하고 TI로 자극한 양성 대조군은 250.59 pg/ml 였다. JS_E를 처리한 후 TI로 자극한 실험군에서 JS_E 50 µg/ml는 805.09 pg/ml, 100 µg/ml는 620.81 pg/ml, 200 µg/ml는 388.26 pg/ml로 측정되었고 JS_E 농도 가 증가함에 따라 MDC의 생산량이 감소하는 경향을 보였으며 통계학적 유의성은 JS_E 100, 200 µg/ml (p<0.05, p<0.01)에서만 관찰되었다 (Fig. 4).

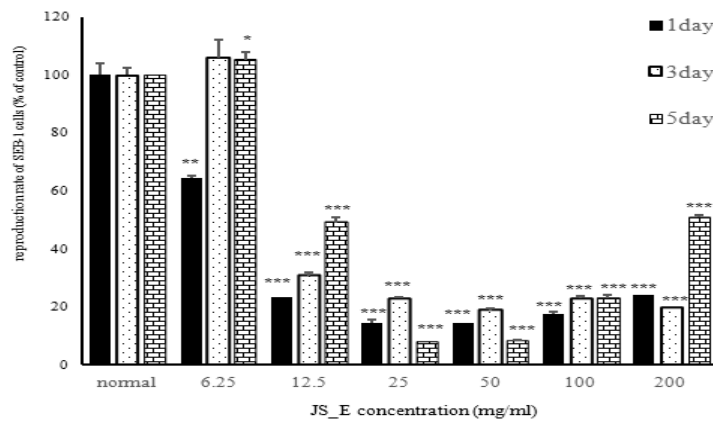


Fig. 5. Effect of JS_E on the reproduction rate of SEB-1 cells

Cells were plated at 5×10^4 cells/well and incubated in media containing 6.25 $\mu\text{g/ml}$ to 200 $\mu\text{g/ml}$ of JS_E for 1, 3, 5 days. The reproduction rate of cells was measured by MTT assay as described in Materials and methods. Data are mean \pm SD of three experiments performed in triplicate. * Significantly different from normal control group (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$) / JS_E: *Gleditsiae Fructus* 70% EtOH extract

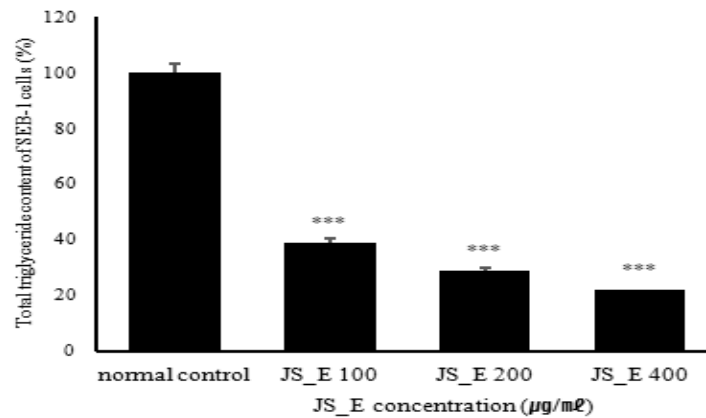


Fig. 6. Effects of JS_E on triglycerides content of SEB-1 cells

SEB-1 cells were plated at 1×10^6 cells/well and incubated in media containing 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ of JS_E for 5 days. Triglycerides were measured by triglycerides kit respectively as described in Materials and methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. Normal control group: Non treated group

* Significantly different from normal control group (***: $P < 0.001$) / JS_E: *Gleditsiae Fructus* 70% EtOH extract

2. SEB-1 cells에 대한 조합 추출물의 피지 분비 억제 효과

1) 세포증식률

SEB-1 cells의 세포증식률은 정상군 (normal)을 100%로 기준하였을 때, JS_E를 처리한 실험군에서 JS_E 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 는 날짜별로 1, 3, 5 일 각각 64.28%, 105.98%, 105.30%였으며, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 는 23.14%, 30.60%, 59.03%, 25 $\mu\text{g/ml}$ 는 14.37%, 22.76%, 7.85%, 50 $\mu\text{g/ml}$ 는 14.19%, 18.56%, 8.11%, 100 $\mu\text{g/ml}$ 는 17.56%, 22.74%, 22.9%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 는 23.95%, 19.62%, 50.80%로 JS_E의 농도가 증가함에 따라 감소하고 처리한 시간에 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. JS_E 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 를 1 일 간 처리한 경우 대조군에 비해 세포증식이 통계적으로

유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제되었으나 3, 5 일간 처리한 경우 대조군에 비해 세포증식률이 증가되었다. 나머지 군에서는 모두 통계적으로 유의성 있는 ($p < 0.001$) 세포증식률의 감소가 관찰되었다 (Fig. 5).

2) triglyceride 생성량

triglyceride의 생성량은 정상 대조군의 triglyceride를 100%로 기준할 때, JS_E를 처리한 실험군에서 JS_E 100 $\mu\text{g/ml}$ 는 39.98%, 200 $\mu\text{g/ml}$ 는 28.96%, 400 $\mu\text{g/ml}$ 는 21.86%로 측정되어 JS_E의 농도가 증가함에 따라 정상 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 ($p < 0.001$) 감소하였다 (Fig. 6).

IV. Discussion

조협 (*Gleditsiae Fructus*)은 조각자 나무 (*Gleditsia sinensis* Lam.)의 말린 열매로서 조각자 나무의 과실은 조협, 가시는 조각자 (刺)라 하며 모두 약용한다²³⁾. 조협에는 triterpenoid계 saponin이 10% 가량 함유되어 있으며²³⁻⁴⁾ saponin은 식물계에 널리 분포하는 배당체의 한 종류로 강력한 항염 작용과 항산화, 과산화수소 소거 효능이 있으며 각질형성세포 등의 세포 재생을 촉진시킨다³³⁻⁴⁾.

조협에 관한 국내 연구들을 살펴보면 이 등²⁸⁾은 조협의 sapogenin 성분을 동정하여 oleanolic acid, echinocystic acid로 분류하였고, 김 등³⁰⁾은 조협의 T tyrosinase 활성 저해, UV 흡수능, 활성 산소종 형성 억제 효과를 실험하여 자외선 차단효과와 피부 미백 기능을 증명하였으며 박³¹⁾은 조협 추출물의 ethyl acetate 분획과 butanol 분획에서 우수한 항산화 활성을 확인하여 기능성 화장품으로서의 소재 가치를 언급하였다. 반면 서²⁹⁾는 조협의 saponin 성분의 독성에 관한 실험을 통해 소화기계통, 혈액계통, 중추신경계통 등에 일으킬 수 있는 손상 가능성을 보고하였다. 이처럼 조협의 성분과 효능에 대한 여러 연구가 이루어졌지만 조협의 항염증 및 피지 분비 억제 작용을 밝힌 연구는 미미하였다. 한편, 조각자 나무의 과실은 조협이지만 그 가시는 조각자 (刺)라 하여 조협과 유사한 消腫托毒排膿, 祛風殺蟲의 효능으로 癰疽腫毒, 癩瘋, 疥癬 치료에 활용되어왔는데²³⁾, 조각자의 항염증 효과에 관한 연구들이 몇몇 발표되었으나³⁵⁻⁹⁾ 인간의 피부세포를 대상으로 한 실험은 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 TNF- α 와 IFN- γ recombinant로 염증반응이 유도된 HaCaT cells와 SEB-1 cells를 이용한 실험을 통해 조협 추출물의 항염증 및 피지 분비 억제 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

모든 실험에 앞서 MTT 분석을 통해 세포의 생존률 및 증식능을 측정하였으며 조협 추출물 (JS_E)을 처리한 HaCaT cells는 400 μ g/ml 이상에서 80% 미만으로 감소하여 세포독성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 1). 세포독성 실험은 각 well에 세포를 90% 이상 배양하여 추출물을 처리한 지 24 시간 경과 후, 대조군을 100%로 기준하였을 때 시료의 상대 정량 수치를 비교한 것이다. 반면 SEB-1 cells의 MTT 분석은 세포의 증식능을 측정하기 위한 것으로 세포를 세포배양용기에 60~

70% 가량 채운 후 1, 3, 5 일간 배양하여 세포증식이 얼마나 일어났는지 대조군과 상대 비교하는 실험이다. SEB-1 cells에 JS_E를 6.25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml의 농도로 처리한 후 1, 3, 5일 동안 동시 배양한 결과, JS_E의 농도가 증가함에 따라 SEB-1 cells의 증식률이 점차 감소하는 경향을 보이며 12.5 μ g/ml 이상에서 정상 대조군의 60% 이하로 세포 증식이 억제되었다 (Fig. 5).

표피의 가장 바깥층인 각질층은 표피세포의 80%를 차지하며 외부 유해 물질의 침입을 막는 장벽으로서 중요한 기능을 한다. 그러나 다양한 외부 유해물질이나 물리적 자극에 의해 각질층이 손상되거나, 자외선 등에 의해 피부 자극을 받게 되면, 각질형성세포 내에서 염증 반응을 유도하는 사이토카인을 발현하여 분비하게 되는데, 반응 초기에 분비되는 대표적인 염증 유발 사이토카인으로 IFN- γ 와 TNF- α 가 있다⁴⁰⁻¹⁾. IFN- γ 와 TNF- α 는 세포성 면역 반응에 관여하는 Th1 세포에서 분비되는 사이토카인 (Th1 cytokine; proinflammatory cytokine)으로, 혈관내피세포에 새로운 표면 부착인자의 발현을 유도하여 호중구, 단핵구, 림프구를 축적시켜 각질형성세포의 구조적인 변화, 주변 조직의 손상과 함께 초기 염증 반응을 매개한다. 또한 케모카인 (chemokine)의 분비를 촉진하며 알레르기 반응을 일으키는 Th2 세포를 억제하는 역할을 한다⁴²⁻³⁾. TNF- α 와 IFN- γ 를 처리한 HaCaT cells에서 발현되는 RANTES, IP-10, MDC 등의 케모카인은 Th 1,2 사이토카인에 의해 유발되어 수지상세포와 림프구 등 초기 면역반응 세포의 감염 부위로의 이동 및 활성화에 중요한 역할을 하며 염증세포의 조직 침윤을 유도하고 선천면역과 함께 획득면역 발달에 관여하는 단백질이다⁴³⁾. 본 실험에서는 염증이 유발된 HaCaT cells에서 IP-10, RANTES, MDC 단백질을 증가시킨 후 JS_E가 이들 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 ELISA를 시행하였다. 그 결과 JS_E는 대조군에 비해 200 μ g/ml의 농도에서 IP-10의 발현을 유의성 있게 ($p < 0.05$) 감소시켰고 (Fig. 2), 100, 200 μ g/ml에서 RANTES의 발현을 유의성 있게 ($p < 0.05$) 억제시켰으며 (Fig. 3), 100, 200 μ g/ml에서 MDC의 발현에 유의성 있는 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 감소를 보였다 (Fig. 4). 이를 통해 JS_E가 IP-10, RANTES, MDC의 생성을 저해함으로써 염증 반응을 억제하는 효능이 있음을 확인할 수 있었다.

피지를 생성하는 피지선 (sebaceous gland)은 각 모낭의 부속물로 손바닥과 발바닥을 제외한 전신에 분포하

는데, 피지는 피부의 심한 건조를 막고, 외부 유해물질의 경피 흡수를 차단하며, 여러 가지 미생물들의 성장을 억제하고 자외선을 차단하는 등 피부 보호에 중요한 역할을 한다^{40,44}. 인간의 피지는 triglyceride, wax esters, squalene, cholesterol esters, cholesterol, 그리고 free fatty acids로 구성되어 있으며, 이 중 triglyceride와 fatty acids의 화합물이 57.5%로 가장 많이 차지하고 wax esters (26%), squalene (12%)이 그 뒤를 잇는다⁴⁵. 이와 관련하여 한약재의 피지 분비 억제 효능에 관한 국내 실험연구로는 피지세포에서의 squalene의 합성 억제능 관찰⁴⁶, triglycerides 생성량 측정⁴⁷, 5 α -reductase의 활성 저해⁴⁸에 관한 연구가 있었다. 여드름은 *P. acnes*의 증식, 피지의 과다 생성 그리고 모공의 과각질화의 상호작용에 의해 유발되는데, *P. acnes* lipase에 의해 피지의 중성지방이 가수분해 되면서 형성되는 유리 지방산의 양이 여드름 발생에 큰 영향을 미친다. 유리 지방산은 모공의 상피세포가 손상되면서 그 작용을 더욱 활성화시키고 피부 염증을 야기하며, 유리 지방산의 감소는 *P. acnes* 증식을 억제하는 결과를 가져온다⁴⁹. 이에 본 연구에서는 피지의 가장 많은 구성 성분으로서 *P. acnes* 과 모공 각질세포의 손상에 의한 염증 유발에 직접적인 영향을 미치는 trygliceride의 생성량을 지표로 조합 추출물이 SEB-1 cells의 lipid pattern에 미치는 영향을 조사하였다. TG-S 키트를 이용해 SEB-1 cells의 triglyceride의 양을 분석한 결과, 정상 대조군에 비해 JS_E를 처리한 군에서는 SEB-1의 증식이 억제되는 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 모두 triglyceride이 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.001$) (Fig. 6). 이는 JS_E가 SEB-1의 지질 합성을 억제함으로써 피지 분비 억제 효능을 가진다는 것을 의미한다.

이상의 결과를 통해 JS_E가 항염증 및 피지 분비 억제 효능을 가짐을 확인하였으며 이를 바탕으로 향후 여드름을 포함한 피부 각질 세포의 손상 및 염증, 피지의 과잉 분비로 야기되는 다양한 피부 질환에 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 추후 본 연구에서 다루지 못한 조합 추출물의 유효, 지표 성분 관련 연구와 함께 치료 제제 개발, 안전성 관련 연구 및 임상 연구가 추가적으로 이루어지길 기대하는 바이다.

V. Conclusion

조합 추출물이 HaCaT cells에서 IP-10, RANTES, MDC 발현에 미치는 효과와 SEB-1 cells에서 triglyceride 생성에 미치는 영향을 입증하고자 실험을 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 조합 추출물은 HaCaT cells에서 TNF- α 와 IFN- γ 에 의해 유도되는 IP-10, RANTES, MDC 발현을 억제하였다.
2. 조합 추출물은 SEB-1 cells에서 triglyceride의 생성을 억제하였다.

이상에서 조합 추출물이 항염증 및 피지 분비 억제 효능을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

References

1. Jung JY. ACNE. Seoul: MDworld Co. 2007:15-35.
2. Hwang KY. ABC of dermatology. Seoul: Medbook Co. 2001:91-9.
3. Yu M. Review of the kind, pathogenesis, treatment and management of acne. Grad School Konkuk Univ. 2003.
4. Kim KB, Kim DG, Kim YH, Kim JH, Min SY, Park EJ, Baek JH, Sung HK, Yu SA, Lee SY, Lee JY, Chang GT, Jung MJ, Chai JW, Chun JH, Han YJ, Han JK. *Pediatr Korean Medicine*. Seoul: EuiSeongDang Publishing Co. 2015:398-401.
5. Roh SS. *Wonsaek Dermatology*. Seoul: Ibicykihuik Co. 2006:737-41.
6. The society of Korean medicine obstetrics and gynecology. *Hanbangeosunguihak*. Seoul: EuiSeongDang Publishing Co. 2012:866-75.
7. Kim KL. Antimicrobial activity and acne improvement effect of ethanol extract from *Caesalpinia Sappan*. Grad School Wonkwang Univ. 2009.
8. Lee SY. The effects of Sulfur extract on anti-inflammation and anti-propionibacterium acne. Grad School Sangji Univ. 2007.
9. Yoon JY. Effects of Epigallocatechin-3-gallate on *P. acnes* and sebocytes. Grad School Konkuk Univ. 2011.

10. Jeon OD. The effects of Houத்துyniae herba extract on anti-inflammation and anti-propionibacterium acnes. Grad School Sangji Univ. 2007.
11. Kim NK, Kim MH, Yoon CS, Choi SW. Studies on the anti-inflammatory activity of Paulownia Coreana Uyeki leaf extract. J Soc Cosmet Sci Korea. 2006;32(4):241-7.
12. Tak MJ. The inhibitory effects of Yang Geouk San Hwa Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells. Grad School Dongeui Univ. 2010.
13. Choi KH. The effects of Jeondo-San on anti-inflammation and anti-propionibacterium acnes. Grad School Sangji Univ. 2007.
14. Hong SH, Roh SS. The study on the effect of Chungsang BangpungTang and Lonicerae flos, Coicis semen (CBTLC) on acnes. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2002;15(1):315-35.
15. Hyung YK. The study on the effect of Okyongsan in acnes. Grad School Woosuk Univ. 1998.
16. Yim HS. The experimental study of Gagambipachungpeum on acne. Grad School Kyunghee Univ. 2000.
17. Kim SB. Effect of the addition temperament drugs of Yeongyopaedock-san on acne in the state of inflammation. Grad School Gachon Univ. 2002.
18. Yoo JG. The effects of Yeouigeumhwang-san on anti-inflammation and anti-propionibacterium acnes. Grad School Sangji Univ. 2007.
19. Lee YS, Yoon JY, Han JK, Kim YH. A case study about the effect of Yukmijihwangtang Gamibang and comedon extraction on male acne. Collection of dissertations. Research Institute of Korean Med, Daejeon Univ. 2011;20(1):119-25.
20. Kim JH, Yoo DY. A case report of acne vulgaris patient treated with Cheongsangbangpung-tang. Collection of dissertations, Research Institute of Korean Med, Daejeon Univ. 2013;22(1):185-91.
21. Kim MA, Kim MB, Shin SH, Byun SM, Ko WS, Lee HS, Park SK, Yoon HJ. The study on external treatment of oriental medical care on acne. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2008;21(2):102-11.
22. Hong SH. The clinical study on the effect of Jeondo-san (Diandao-san) on acnes. J Korean Med. 2005;26(3):74-9.
23. Hantuigwadaehak Bonchohak Pyeonchanwiwonhoe. Bonchohak. Seoul: Yeonggrimsa Publishing Co. 2008:490-1.
24. Shin KG. Shincibonchohak. Seoul: Sumunsa Publishing Co. 1973:404-7.
25. Jang KA. Hankulkyoungakjeonsu (2). Seoul: Hanmiuihak Publishing Co. 2011:58.
26. Lee SJ. Bonchogangmok. Seoul: Komunsa Publishing Co. 1993:1153-7.
27. Heo J. Shindaeyukdonguibokam. Seoul: Bubinmunhwasa Publishing Co. 2009:597-9.
28. Lee EO, Yu CS. Prosapogenin in pods of Gleditsia officinalis. J Korean Pharmacog. 1978;9(2):93-7.
29. Seo BI. A philological study on poisoning of Gleditsiae fructus. J East West Med. 2008;33(1):15-28.
30. Kim YJ, Kim J, Park HJ, Lee CM. Inhibition effect of Gleditsia sinensis lam on T tyrosinase activity and reactive oxygen species related to Melanin biosynthes. J Korean Biotechnol Bioengineering. 2005;15:541-3.
31. Park DY. Antioxidant activities of extracts from Gleditsiae fructus. Grad School Chungang Univ. 2012.
32. Berridge MV, Tan AS. Characterisation of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Archives Biochem Biophys. 1993;303:474-82.
33. Park HJ, Kim MM, Lee DH. Effect of saponin with antioxidant activity on matrix Metalloproteinase in human dermal fibroblasts. Kor J Life Sci. 2011;21(9):1266-73.
34. Joh EH. Anti-inflammatory effects of saponins derived from natural products. Grad School KyungHee Univ. 2015.
35. Geum JH. Compounds from the spina of Gleditsia japonica and their anti-inflammatory. Grad School Catholic Univ of Daegu. 2015.
36. Seo CS, Lim HS, Ha H, Jin SE, Shin HK. Quantitative analysis and anti-inflammatory effects of Gleditsia sinensis thorns in RAW 264.7 macrophages and HaCaT keratinocytes. Mol Med Rep. 2015;12(3):4773-81.
37. Park EH, Shin MJ. Anti-inflammator activity of aqueous extrat from Gleditsiae spina. J Korean Pharm Soci. 1993;37(2):124-8
38. You JY. The anti-inflammatory activity of ethanol extracts of Gleditsia japonica Miquel var. Koraiensis Nakai in

- raw 264.7 cells. Grad school Chung-ang Univ. 2009.
39. Park NH. Anti-inflammatory effects of GST extract fermented by lactic acid bacteria on mouse macrophage cells and the CIA mouse model. Grad School Korea Univ. 2015.
40. Han YS, Choi TB, Lee YH, Kim CJ, Kim JY, Jang MH. Dermatology (3rd edition). Seoul: Jungdammedia. 2011:18-22, 75-80.
41. Lee KE, Nam JJ, Kim SM, Kim HK, Moon SJ, Youm JK. Anti-inflammatory effects of the mixture of Sorbus commixta, Urtica dioica, Phyllostachys nigra, and Rhus semialata Gall extracts on LPS-induced inflammation in HaCaT cells. J Soc Cosmet Sci Korea. 2014;40(1):45-54
42. Kim HJ, Kim WS, Park HJ, Moon G, Kim DW, Won JH, Kim YK. Inhibitory effect of Jaeumganghwa-tang on allergic inflammatory reaction. Korean J Orient Int Med. 2004;25(2):174-82.
43. Andrew D Luster. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol. 2002;14(1):129-35.
44. Park SJ, Kim YM, Lim KS, Woo WH, Mun YJ. Inhibitory effect of extract of Ficus folium on the Sebum synthesis in human sebocyte cell line (SZ95). J Korean Orient Physiol Pathol. 2006;20(4):919-23.
45. Monica O, Emanuela C, Mauro P. Lipid mediators in Acne. J Mediat Inflamm. 2010:Article ID 858176.
46. Park SM. Studies on the effects of sucrose disinate isolated from Raphanus sativus for the production of sebum in sebocytes. Grad School Hanbat Univ. 2014.
47. Yoon JY. Effects of Epigallocatechin-3-gallate on P.acnes and sebocytes. Grad School Konkuk Univ. 2011.
48. Park JS. Evaluation of the sebosuppressive activity of topical Glycyrrhizinitic acid. Grad School Korea Univ. 2004.
49. Higaki. Lipase inhibitors for the treatment of acne. J Mol Catal B Enzym. 2003;22(5/6):377-84.