

LPS로 유도한 Raw 264.7 세포에서 A.C.C. 추출물의 항염증 효과

류진협¹, 안주희¹, 우용규¹, 조현정^{2*}
¹(주)네이처포, ²건양대학교 임상병리학과

The anti-inflammation effects of A.C.C. extracts on the LPS-induced Raw 264.7 cell

Jin-Hyeob Ryu¹, Ju-Hee An¹, Yong-Kyu Woo¹, Hyun-Jeong Cho^{2*}

¹Nature4 Co. Ltd,

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Science, Konyang University

요약 본 연구의 목적은 황백을 포함한 총 14가지의 한약재를 증류 추출하여 얻은 시료(A.C.C. 추출물)의 항염증 활성을 확인하고 임상적인 효과를 평가하는 것이다. 이를 위해, Lipopolysaccharide(LPS)로 자극한 RAW 264.7세포에서 세포가 방출하는 nitric oxide(NO) 생성량과 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1 β 및 IL-6 생성량의 변화를 확인하였다. 그 결과, A.C.C. 추출물은 세포 독성없이 LPS가 증가시킨 NO와 염증성 사이토카인들의 생성을 강력하게 억제하였다. 또한, A.C.C. 추출물은 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, MRSA(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* 등의 세균들에서 99.9%의 강력한 세균 감소율을 보여 주었다. 이는 A.C.C. 추출물이 항염증 효과와 함께 강력한 항균 효과를 가진 유효한 성분인 것을 의미한다. 또한, 기저귀 발진, 가려움증, 땀띠 증상을 겪고 있는 영·유아에게 A.C.C. 추출물을 도포하였을 때, 발진, 아토피, 짓무름, 가려움증, 땀띠 등의 증상 개선 효과를 나타내었으며, 영·유아 피부의 땀띠가 2주일 경과 후 상당히 완화된 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 이는 A.C.C. 추출물이 임상적으로도 항염증 및 항균작용을 통하여 기저귀 발진 및 땀띠 등의 증상을 완화 시키는 물질임을 확실히 한 것이다. 그러므로, A.C.C. 추출물이 염증성 질환에 대한 효과적인 대안이 될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract This study was conducted to evaluate the anti-inflammatory activity and clinical efficacy of a sample (A.C.C. extracts) obtained by distillation extraction of 14 herbal medicines including *Phellodendron bark*. To confirm this, the amount of nitric oxide (NO) produced by the cells in RAW 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and the changes in the production of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-6 were determined. The results showed that A.C.C. extracts strongly inhibited the production of NO and inflammatory cytokines increased by LPS without cytotoxicity. In addition, A.C.C. extracts showed strong bacterial reduction rates of 99.9% in *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. These findings indicate that A.C.C. extracts are effective ingredients with a strong antimicrobial effect together with an anti-inflammatory effect. In addition, when A.C.C. extracts were applied to infants and toddlers who were suffering from diaper rash, itching, and perspiration symptoms, symptoms of rash, atopy, rash, itching, and heat rash were improved. After the lapse of time, it was visually confirmed that it was considerably relaxed. These findings confirm that A.C.C. extracts comprise a clinically effective anti-inflammatory and anti-bacterial agent that alleviates symptoms such as diaper rash and fever and may therefore be an effective alternative to inflammatory diseases.

Keywords : A.C.C. extracts, Anti-bacterial, Anti-inflammation, Cytokine, Lipopolysaccharide-induced Raw 264.7 cell, Nitric oxide

본 연구는 중소기업청 창업성장기술개발사업 “창조경제혁신센터 연계과제” (No. S2424308)로 지원받아 연구되었다.

*Corresponding Author : Hyun-Jeong Cho (Konyang Univ.)

Tel:+82-42-600-6376 email: hjcho@konyang.ac.kr

Received November 1, 2017

Revised(1st November 20, 2017, 2nd November 29, 2017)

Accepted December 8, 2017

Published December 31, 2017

1. 서론

체내에서 일어나는 염증 반응은 상처나 세균 감염과 같은 물리적, 화학적 자극이 있을 때 손상 부위를 회복시키는 중요한 신체의 방어 기전 가운데 하나이며, 자극이 가해질 때 국소적으로 혈관 활성 물질들이 유리됨으로써 혈관 투과성이 증대되어 염증이 유발된다[1]. 이는 생체에서 일어나는 방어 기전이지만, 지속적으로 염증반응이 일어날 때 점막 손상을 촉진하여 결과적으로 부종, 통증, 발적, 발열 등을 유발하며, 심혈관 질환, 류마티스 관절염, 기관지염 및 암과 같은 만성적인 염증과 연관된 질병을 야기할 수 있다[2]. 대식세포(machrophage)는 염증 반응을 일으키는 주요 세포로 알려져 있으며, 이들은 자극이 있을 경우나 면역세포들에서 분비되는 cytokine에 의해 활성화되어 nitric oxide(NO)와 cytokine을 생성하여 생체방어에 중요한 역할을 담당한다[3].

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 있는 내독소로 잘 알려져 있는데, 이는 대식세포 또는 단핵구를 자극함으로써 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 IL-6등의 염증매개성 cytokine들의 분비를 자극하여 염증 반응을 촉매한다[4-7]. TNF- α 는 체내에서 대식세포, 림프구 및 백혈구 등에서 생성되는 cytokine으로 정상상태에서는 생성되지 않다가 대식세포가 자극을 받게 되면 합성되어 분비된다. IL-6는 대표적인 pro-inflammatory cytokine의 한 종류이며, 단핵구를 포함한 여러 종류의 세포에서 분비되어 초기 면역 반응에서 중요한 역할을 한다[8]. IL-1 β 는 IL-6 및 TNF- α 와 함께 대표적인 염증성 cytokine의 하나로 NO를 생성하게 하는 매개물질로서, 국소염증을 일으키고 T 세포 활성화와 B 세포의 성숙 및 NK cell을 활성화시키는 cytokine으로 알려져 있다[9]. 이러한 염증 매개성 물질들의 합성은 cyclooxygenase(COX)에 의해 arachidonic acid가 leukotriene, prostaglandin, thromboxane 등으로 전환되는 과정 및 nitric oxide (NO)이 생성되는데 관여하며, 결과적으로 숙주에 치명적 결과를 초래한다고 보고되어 있다[10,11]. 특히, NO는 반응성이 높은 물질로서 박테리아, 바이러스, 균, 및 기생충과 같은 병원균에 대하여 선천 면역 반응에 필수적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는 물질로서[12], NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 만들어지며, NOS는 constitutive NOS(cNOS)와 inducible NOS(iNOS)로 나뉜다. 이 중

iNOS는 외부자극 또는 pro-inflammatory cytokine 등의 자극이 있을 경우, 다량의 NO를 생산하여 혈관 투과성 및 부종 등을 일으켜 염증반응을 유발시키고[13], 과도한 경우 류마티스 관절염 및 자가 면역 장애와 같은 면역성 질환까지도 이어진다고 알려져 있다[14].

본 연구에서는 주요 성분으로서 황백을 포함한 총 14가지의 한약재를 증류 추출하여 얻은 시료(A.C.C. 추출물)를 이용하였다. 황백은 황백 나무의 껍질을 말린 것으로, 혈당저하, 폐렴쌍구균, 인형결핵균, 포도상구균 등에 대하여 발육 저하 작용을 함과 동시에 종양 세포의 번식을 감소시키며, 살균작용을 한다고 보고된 바가 있고, 항염증에 관련된 효과가 알려져 있으나 그 기전이나 임상적인 의의에 대한 연구는 미흡한 실정이다[15].

따라서, 본 연구는 대식세포인 Raw 264.7 세포가 LPS에 의해 염증반응이 유도되었을 때, A.C.C. 추출물이 NO 생성 및 pro-inflammatory cytokine(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) 합성에 있어서 어떤 영향을 미치는 확인함으로써 A.C.C 추출물의 항염증 효과를 알아보고자 하였다. 또한, *seudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Candida albicans* 및 *Streptococcus mutans* 균주를 이용하여 항균 활성을 보고자 하였으며, 이를 임상적으로 적용하여 기저귀 발진, 가려움증, 땀띠 증상을 겪고 있는 영·유아에게 A.C.C. 도포하였을 때 증상이 개선되는 효과가 나타나는지 보고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험재료

본초학을 바탕으로 문헌 조사를 진행하여 총 14가지의 한약재를 선별하였다. 한약재의 구입은 서울 약령시에 씨케이(주)에서 생약제제로 포장되어 판매하는 제품을 사용하였다. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone(Logan, UT, USA)에서 구입 하였다. Penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 ug/ml)은 Gibco(Life technology Inc., Gaithersburg, MD, USA)에서 구입 하였다. LPS, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), Sodium Nitrite, Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)

에서 구입하였다. Nitrite oxide(NO) detection kit은 iNtron에서 구입하여 이용하였으며, ELISA assay kit은 Thermo Fisher Scientific에서 구입하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 A.C.C. 추출물의 준비

황백 외 13가지 한약재를 각각의 비율에 따라 배합하여 3차 증류수 40L를 용매로 하여 80℃에서 11시간을 증류추출 하였다(Fig. 1, Table 1).

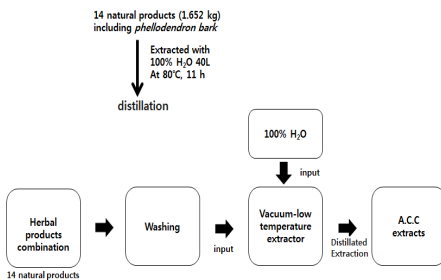


Fig. 1. Distilled extraction of 14 natural products including *phellodendron bark* (A.C.C extracts).

Table 1. The materials and proportion of in A.C.C. extracts

Materials	Proportion (%)
<i>Phellodendron bark</i>	24
<i>Scutellaria baicalensis</i>	5
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	12
<i>Dictamnus dasycarpus</i> Turcz.	12
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	6
Alumen	12
<i>Dryobalanops aromatica</i> Gaertner	2
<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i>	4
<i>Inula helenium</i>	3
<i>Syringa velutina</i> var. <i>kamibayashii</i>	1
<i>Corydalis incisa</i>	6
<i>Eclipta prostrata</i>	6
<i>Lonicera japonica</i>	1
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	6

2.2.2 Raw 264.7 세포의 배양

Raw 264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. Penicillin/streptomycin 100 unit/ml과 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양 하였다.

2.2.3 MTT assay에 의한 세포 독성 측정

Raw 264.7 세포 생존율 측정은 96 well plate에 2×10⁴cells/well의 농도가 되도록 조절한 후 24시간 동안 배양하여 안정화를 시행하였다. 24시간 후 well에 배지를 모두 제거 하였다. A.C.C. 추출물의 최종 농도로 1, 5, 10 µg/ml이 되도록 배양액에 희석하여 세포주에 처리한 후 3시간 동안 배양하였다. 3시간 후 대조군을 제외한 well에 LPS 1 µg/ml을 처리하였다. 24시간 후 배지를 모두 제거한 후, 각 well에 MTT용액(0.2 µg/ml in phenol red free DMEM) 100 µl씩 첨가하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 2시간 동안 반응하여 MTT가 환원되도록 하였다. 그 후, 각 well에 DMSO 용액을 첨가하여 생성된 formazan을 용해시켰다. Microplate reader를 이용하여 545 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.4 Nitric Oxide 생성량 측정

Raw 264.7 세포를 6 well plate에 1×10⁵ cells/well의 농도로 세포를 첨가 하였다. 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에 보관 한 후, Raw 264.7 세포에 1, 5, 10 µg/ml A.C.C. 추출물을 처리 하고 3시간 후 LPS 1 µg/ml를 처리하여 24시간 배양하였다. nitric oxide을 Griess reaction에 기초한 nitrite oxide(NO) detection kit (iNtron)로 분석하였다. 세포 배양 상등액에 Griess Reagent를 넣고 혼합하여 10분 간 상온에서 반응시킨 후, microplate reader로 520 nm 흡광도에서 측정하였다. Sodium nitrite의 농도별 표준곡선을 바탕으로 하여 식에 적용 시켜 배양액 내의 NO 농도를 결정하였다.

2.2.5 염증 관련 cytokines 분비량 측정

염증 유발 사이토카인인 TNF-α, IL-6 및 IL-1β 생성량을 측정하기 위하여 6 well plate에 Raw 264.7 세포를 1×10⁵cells/well의 농도로 첨가 하였다. 24시간 후 1, 5, 10 µg/ml A. C. C. 추출물을 처리 하고 3시간 후 1 µg/ml의 LPS를 대조군을 제외한 모든 well에 처리 하였다. 24시간 동안 배양 후 배지에 분비된 TNF-α, IL-6 및 IL-1β 를 ELISA kit(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 분석을 하였다. Microplate reader로 450 nm에서 측정하였다.

2.2.6 항균 활성

A.C.C. 추출물의 항균활성을 보기 위하여 항균력 측

정은 paper disc 방법을 사용하였다. 시험 전 배양한 시험 균주를 각 배지에 맞게 1.0×10^4 이상 접종 하였다. 멸균된 paper disc에 A.C.C. 100 μ l 로딩 후 30분 동안 말려서 준비하였다. 시험균주가 접종된 배지 위에 A.C.C. 가 로딩된 paper disc를 간격에 맞추어 올린 후 24-48 시간 incubator에 배양 하였다. Paper disc 주변의 억제대를 측정하여 결과 판정 및 분석하였다.

2.2.7 임상 연구 절차

공고를 통하여 모집된 피험자는 대상자의 특성에 따라 대리인(보호자)이 “사전 설문지” 작성을 실시한다. 사전 설문조사를 통하여 증상, 피부 상태 등을 파악한 뒤 조성물을 제공하고 연구원은 피험자에게 14일 동안 매일 같은 시간에 하루 1cc 양으로 5-10회를 도포할 수 있도록 교육 하였다. 또한 객관적인 연구 결과를 위하여 환부를 사진 촬영하여 도포 전과 후를 비교 분석 하며, 이때 사진은 얼굴과 같이 개인을 식별할 수 있는 부위는 제외 하였다. 도포 14일 종료 후 대리인은 “시험 설문지”를 작성 하였다. 자료의 보관 기간은 생명윤리법에 따라 연구가 종료된 시점으로부터 3년 동안 보관하며, 정보 보호 기간 이후 개인정보 및 사진은 복원이 불가능한 방법으로 영구 삭제 할 것이다.

2.2.8 통계분석

모든 측정값은 평균 \pm 표준편차값으로 표시하였고, 통계적 분석은 적절하게 양측 독립표본 t-test 또는 ANOVA test를 통하여 수행 하였다. 이 분석이 각 집단간의 그룹 평균값이 상당한 차이를 나타내는 경우, 각 집단을 사후 검정 방법인 Scheffe's 방법을 통하여 적용하였다.

3. 결과

3.1 A.C.C. 추출물이 Raw 264.7 세포에 미치는 세포독성

A.C.C. 추출물이 Raw 264.7 세포에 미치는 영향을 확인하기 위하여 A.C.C. 추출물을 농도별(1, 5, 10 μ g/ml)로 전처리한 후 1 μ g/ml의 LPS를 처리하였다. 24 시간 동안 배양한 후, MTT assay 방법을 이용하여 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 세포 생존율이 각각 98.47, 90.91, 93.23%로 세포 생존에 있어서 유의적인 의미를 보이지 않는 높은 생존율이 확인되었다(Fig. 2).

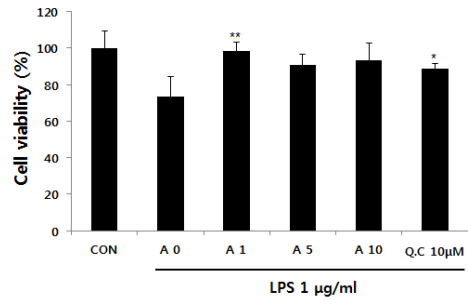


Fig. 2. Effects of A.C.C extracts on cell viability in Raw 264.7 cells treated with LPS. Cell viability was measured by MTT assay. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared to control. Con; control, LPS 1 μ g/ml ; 1 μ g/ml lipopolysaccharide, A0; LPS 1 μ g/ml, A1; A.C.C. 1 μ g/ml, A5; A.C.C. 5 μ g/ml, A10; A.C.C. 10 μ g/ml, Q.C 10 μ M; quercetin 10 μ M.

3.2 A.C.C. 추출물이 Raw 264.7 세포의 NO 생성억제에 미치는 효과

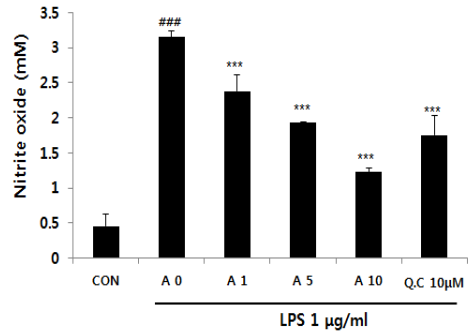


Fig. 3. Effects of A.C.C extracts on nitric oxide production in Raw 264.7 cells treated with LPS. NO concentration was determined by Griess reaction. ###, $p < 0.001$ compared to control, and ***, $p < 0.001$ compared to 1 μ g/ml LPS. Con; control, LPS 1 μ g/ml ; 1 μ g/ml lipopolysaccharide, A0; LPS 1 μ g/ml, A1; A.C.C. 1 μ g/ml, A5; A.C.C. 5 μ g/ml, A10; A.C.C. 10 μ g/ml, Q.C 10 μ M; quercetin 10 μ M.

대식세포를 LPS로 자극하였을 때, inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 발현되어 과량의 NO를 생성한다. 생성된 NO는 염증반응을 촉진하여 조직 손상을 유발한다고 알려져 있다[16]. 따라서 A.C.C. 추출물이 NO와 같은 염증성매개물질을 억제하는지 보고자 하였다.

그 결과, Raw 264.7 세포에 LPS 처리하였을 때, 대조군에 비하여 NO 생성이 0.45에서 3.15로 7배로 증가되는 것을 확인하였다. A.C.C. 추출물을 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 NO의 생성억제 효과를 측정하였을 때, 그 결과 Raw 264.7세포에서 LPS 유도로 증가된 NO생성이 A.C.C. 추출물로 인해 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

3.3 A.C.C. 추출물이 Raw 264.7 세포의 cytokine 생성억제에 미치는 효과

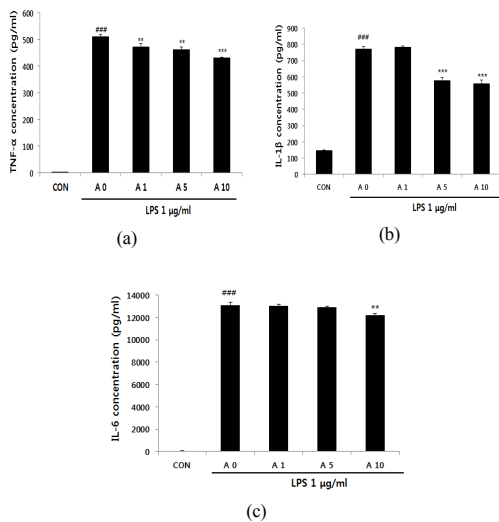


Fig. 4. Inhibitory effects on cytokine production of A.C.C. extracts in Raw264.7 cells with LPS. (a) Effects of A.C.C. extracts on TNF- α in dose-dependent manner. (b) Effects of A.C.C. extracts on IL-1 β in dose-dependent manner. (c) Effects of A.C.C. extracts on IL-6 in dose-dependent manner. Pro-inflammatory cytokines was measured in the media with Raw264.7 cells that were stimulated with LPS. ###, $p < 0.001$ compared to control, and **, $p < 0.01$, and ***, $p < 0.001$ compared to 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Con; control, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide, A0; LPS 1 $\mu\text{g/ml}$, A1; A.C.C. 1 $\mu\text{g/ml}$, A5; A.C.C. 5 $\mu\text{g/ml}$, A10; A.C.C. 10 $\mu\text{g/ml}$.

염증반응이 유도되는 과정에서 NO 및 PGE2와 같은 염증 매개물의 생성과 면역반응을 통한 염증성 cytokine의 생성이 동반되어 일어난다. 대표적인 cytokine으로 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6가 있다[17]. A.C.C. 추출물이 염증 매개성 cytokine 생성에 어떤 영향을 미치는지 보기

위하여 ELISA assay 방법으로 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 변화량을 측정하였다. Raw 264.7 세포에 A.C.C. 추출물을 농도별로 처리 후 LPS 처리를 하였다. 그 결과, Raw 264.7 세포에 LPS 처리시 대조군과 비교하였을 때, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6는 상당히 증가 하였다(Fig. 4). 하지만 A.C.C. 추출물 처리에 의하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6는 감소하였다. 특히, A.C.C. 추출물을 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리 하였을 때, 상당히 감소하였다. 이러한 결과를 통하여 A.C.C. 추출물이 Raw 264.7 세포에서 염증을 유도하는 cytokine을 억제함으로써 항염증 효과가 있다는 것을 확인 하였다.

3.4 A.C.C. 추출물의 항균 활성 효과

가려움증, 소아발진을 유발하는 주요 원인균으로 A군 사슬알균(*Streptococcus pyogenes*) 및 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)이 알려져 있다. 또한, 여성 질염(Vaginal Candidiasis), 발진, 소양감의 주요 원인 진균으로 *Candida albicans*이 있으며, 이로 인해 남성의 경우 사타구니 등 피부가 접히고 습기가 잘 차는 부위에 곰팡이가 감염되는 경우 살색선 또는 칸디다성 간찰진과 같은 피부 감염증이 발생할 수 있다 [18]. 본 실험에서는, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, MRSA(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Candida albicans* 및 *Streptococcus mutans* 균들에 대하여 아래의 표와 같은 방법으로 실험을 진행하였으며, A.C.C. 추출물이 총 5가지 균주에서 99.9%라는 강력한 세균 감소율(%)을 보여 주었다(Table 2). 따라서 A.C.C. 추출물은 위 5가지 균에 대하여 강력한 항균 효과를 가진 유효한 성분인 것을 알 수 있다.

Table 2. Anti-bacterial activities of A.C.C. extracts.

Contents	Results			Condition
	Initial conc. (CFU/ml)	Con. after 24 h (CFU/ml)	Inhibition rate(%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	control	1.2×10^4	2.3×10^5	-
	A.C.C.	1.2×10^4	< 10	99.9
<i>Staphylococcus aureus</i>	control	3.6×10^4	7.5×10^5	-
	A.C.C.	3.6×10^4	<10	99.9
MRSA (Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)	control	1.0×10^4	2.4×10^4	-
	A.C.C.	1.0×10^4	<10	99.9
<i>Candida albicans</i>	control	3.8×10^4	1.7×10^5	-
	A.C.C.	3.8×10^4	<10	99.9
<i>Streptococcus mutans</i>	control	2.2×10^4	3.9×10^5	-
	A.C.C.	2.2×10^4	<10	99.9

3.5 A.C.C. 추출물이 영·유아의 기저귀 발진, 땀띠에 미치는 영향

기저귀 발진, 가려움증, 땀띠 증상을 겪고 있는 영·유아를 대상으로 하여 A.C.C. 추출물을 도포하였을 때, 발진, 아토피, 짓무름, 가려움증, 땀띠 등의 증상이 개선 되는지 임상적으로 확인하고자 하였다. 임상 시험 전 발진, 아토피, 짓무름, 가려움증 및 땀띠의 총 5가지 항목으로 사전 설문지를 진행 하였다. 총 4점 만점으로 진행 하였으며, 발진 항목이 2.61 ± 1.1 점으로 가장 높았으며, 다음으로는 땀띠 항목이 2.41 ± 1.1 점으로 높았다. 사전 설문지 작성 후, 14일 동안 매일 같은 시간에 1cc 양을 하루에 5~10회 도포하도록 하고 14일 후에 시험 설문지 작성을 진행하였다. 그 결과, 사용 후 점수는 모두 1.5 점 이하로 전반적으로 개선된 양상을 보였다. 사용 전 가장 높았던 발진과 땀띠 모두 각각 1.39 ± 0.70 , 1.35 ± 0.70 점으로 상당히 감소된 결과를 확인하였다 (Fig. 5, Table 3). 또한, 영·유아의 임상 시험 전과 A.C.C. 추출물을 1주일간 도포 후, 그리고 A.C.C. 추출물을 2주일간 도포 후의 경과를 비교하여 관찰하였다. 그 결과, 피부의 땀띠가 2주일 경과 되었을 때 상당히 사라진 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 A.C.C. 추출물이 기저귀 발진 및 땀띠 등의 증상에 효과가 있는 것으로 보여진다(Fig. 6).

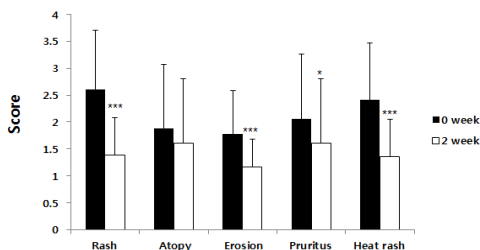


Fig. 5. Change of symptoms after using A.C.C. extracts (n=18). *, $p < 0.05$, and ***, $p < 0.001$ compared to 0 week.

Table 3. Change of rash, atopy, erosion, pruritus, heat rash symptoms according to the using A.C.C. extracts

	0 week (average ± SD)	2 week (average ± SD)
Rash	2.611 ± 1.092	1.388 ± 0.697
Atopy	1.888 ± 1.182	1.611 ± 1.195
Erosion	1.777 ± 0.808	1.167 ± 0.514
Pruritus	2.055 ± 1.211	1.611 ± 1.195
Heat rash	2.411 ± 1.064	1.352 ± 0.702

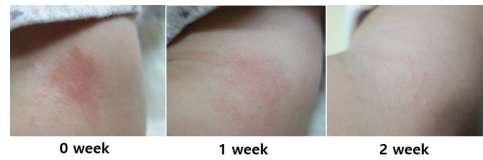


Fig. 6. Change of heat rash symptoms before and after using A.C.C. extracts.

4. 고찰 및 결론

염증반응은 외부자극에 의해 생체 내에서 일어나는 복구체계로서 임상적으로 발적, 발열, 종창, 동통 등을 동반하여 나타난다. 염증반응에 관여하는 세포로는 대식세포, 단구, 림프구, 비만세포, 섬유아세포, 혈소관 등이 있으며, 염증 반응시 히스타민, 세로토닌, arachidonic acid 대사체, 활성 산소, 사이토카인 등과 같은 염증매개 인자가 생성 및 방출된다[19]. 반복적인 염증반응은 염증세포에서 활성산소종과 활성질소종의 과다 생성을 유발함으로써 영구적인 유전자의 변형을 일으켜 비가역적인 병변을 초래하기도 한다[20]. 대체로 nitric oxide synthase (NOS) 중의 iNOS가 염증반응에 관여한다고 알려져 있으며, interferon- γ , 염증성 사이토카인 및 LPS의 자극으로 인해 발현된다. 체내에서의 NO는 항균과 종양제거에 있어서 중요한 기능을 담당하지만[21], iNOS에 의해 만들어진 NO는 혈관투과성 증가, 부종 등의 반응을 유발하고 염증매개물질의 합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[22,23].

본 연구의 결과를 볼 때, A.C.C. 추출물은 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 세포독성을 가지지 않는 것을 확인할 수 있는데(Fig. 2), 이는 A.C.C. 추출물이 세포에서 나타내는 효과들이 세포의 생존율의 변화와는 무관한 고유의 효과라는 것을 의미한다. A.C.C. 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 A.C.C. 추출물을 여러농도로 3시간 동안 전처리하고, 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS를 24시간 동안 처리한 후, 세포에서 염증성 인자인 NO의 생성변화를 측정하였다. 그 결과 LPS에 의해 증가한 NO 생성량이 A.C.C. 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 A.C.C. 추출물이 LPS에 의해 진행되는 염증과정에서 중요한 매개체인 NO의 형성을 저해하는 것으로 항염증 작용을 가진다는 것을 말해준다. 또한, 염증반응이 시작될 때 염

증반응의 전사인자로 알려진 NF- κ B가 활성화됨으로 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 중요한 염증촉진 단백질의 유전자 발현을 조절하는데, 이들이 iNOS의 활성화를 조절하여 염증반응에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[24-26]. 따라서, 염증의 중요한 지표로서 염증 매개성 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6)에 미치는 A.C.C. 추출물의 효과를 확인하고자 하였다. RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발하고, 이 때 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성량을 A.C.C. 추출물이 어떻게 변화시키는지 확인한 결과, A.C.C. 추출물이 LPS에 의하여 유도된 염증인자들을 농도 의존적으로 강력하게 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 이 결과들로 통해 A.C.C. 추출물이 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성을 감소시킴으로써 iNOS의 발현을 조절하여 NO 생성을 억제하는 항염증 효과를 나타낸다는 것을 분명히 하였다.

또한, A.C.C. 추출물은 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Candida albicans* 및 *Streptococcus murans* 균들에 대하여 99.9 %라는 강력한 세균 감소율(%)을 나타내었다(Table 1). 이는 A.C.C. 추출물이 항염증 효과와 항균 작용의 시너지를 나타내는 효과적인 염증 치료제로서 이용 가능성이 있음을 보여준 것이다. 이를 확실하게 확인하기 위하여 기저귀 발진, 가려움증, 땀띠 증상을 겪고 있는 영·유아를 대상으로 하여 A.C.C. 도포시 발진, 아토피, 짓무름, 가려움증, 땀띠 등의 증상 개선 효과가 있는지 평가해 보았다. 사전 설문지를 평가한 결과 4점 만점에서 발진 항목이 2.61 ± 1.1 점으로 가장 높았으며, 14일 사용 후 1.39 ± 0.70 점으로 사용 전에 비하여 상당히 감소되었다(Fig. 5). 또한, 영·유아의 임상 시험 전, 후의 경과를 관찰한 결과, A.C.C. 추출물을 2주일 동안 사용하였을 때 피부의 땀띠가 상당히 완화된 것을 확인 할 수 있었다. 이는 A.C.C. 추출물이 임상적으로도 항염증 및 항균작용을 통하여 기저귀 발진 및 땀띠 등의 증상을 완화시키는 물질이라는 것을 확실하게 한 것이다(Fig. 6). 그러므로, 항염증 및 항균효과를 가지는 A.C.C. 추출물 및 이를 주원료로 한 제품이 염증성 질환에 대한 효과적인 대안이 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- [1] S. T. Lee, Y. R. Jeong, M. H. Ha, S. H. Kim, M. W. Byun, S. K. Jo, "Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage", J. Korean Soc. Food Sci. Nutr, vol. 29, pp. 342-348, 2000.
- [2] T. Ljung, S. Lundberg, M. Varsanyi, C. Ohansson, P. T. Schmidt, M. Herulf, "Rectal nitric oxide as biomarker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus non-responders", World Gastroenterol, vol. 12, no. 21, pp. 3386-3392, June, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i21.3386>
- [3] J. B. Jeong, S. C. Hong, H. J. Jeong, J. S. Koo, "Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells", Korean Journal of Plant Resources, vol. 25, no. 3, pp. 299-307, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.7732/kjpr.2012.25.3.299>
- [4] J. Frostegård, A. K. Ulfgrén, P. Nyberg, U. Hedin, J. Swedenborg, U. Andersson, G. K. Hansson, "Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines", Atherosclerosis, vol. 145, no. 1, pp. 33-43, July, 1999.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00011-8)
- [5] J. Shi, S. Shan, H. Li, G. Song, Z. Li, "Anti-inflammatory effects of millet bran derived-bound polyphenols in LPS-induced HT-29 cell via ROS/miR-149/Akt/NF- κ B signaling pathway", Oncotarget, vol. 8, no. 43, pp. 74582-74594, September, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20216>
- [6] H. Zhang, B. Zhang, X. Zhang, X. Wang, K. Wu, Q. Guan, "Effects of cathelicidin-derived peptide from reptiles on lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation in weaned piglets", Vet Immunol Immunopathol, vol. 192, pp. 41-53, October, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.09.005>
- [7] J. W. Lee, H. W. Ryu, S. Y. Park, H. A. Park, O. K. Kwon, H. J. Yuk, K. K. Shrestha, M. Park, J. H. Kim, S. Lee, S. R. Oh, K. S. Ahn, "Protective effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) leaf extract against cigarette smoke- and lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation", Int J Mol Med, vol. 40, no. 6, pp. 1932-1940, December, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3178>
- [8] J. H. Moon, H. Go, S. M. Shin, K. T. Kim, "Anti-inflammatory effect of extracts from *Ligustrum obtusifolium* S. fruits in RAW 264.7 macrophages", J. Soc. Korean Med. Diagn, vol. 17, pp. 263-273, 2013.
- [9] S. L. Masters, A. Simon, I. Aksentijevich, D. L. Kastner, "Horror Auto inflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease", Annual Review of Immunology, vol. 27, no. 1, pp. 621-668, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141627>
- [10] D. H. Kim, S. J. Park, J. Y. Jung, S. C. Kim, S. H. Byun, "Anti-inflammatory Effects of the Aqueous Extract of Hwangnyeonhaedok-tang in LPS-activated Macrophage Cells", Korean J. Herbol, vol. 24, no. 4, pp. 39-47, 2009.
- [11] M. L. McDaniel, G. Kwon, J. R. Hill, C. A. Marshall,

- J. A. Corbett, "Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 211, no. 1, pp. 24-32, January, 1996.
DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-211-43950D>
- [12] K. Min-Ji, B. Nan-Yong, K. Koth-Bong-Woo-Ri, P. Ji-Hye, P. Sun-Hee, J. Mi-Ran, A. Dong-Hyun, "Anti-Inflammatory Effect of Chondrus nipponicus Yendo Ethanol Extract on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, vol. 45, no. 2, pp. 194-201, February, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.2.194>
- [13] T. H. Lee, H. B. Kwak, H. H. Kim, Z. H. Lee, D. K. Chung, N. I. Baek, J. Kim, "Methanol Extracts of *Stewartia koreana* Inhibit Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Gene Expression by Blocking NF- κ B Transactivation in LPS-activated RAW 264.7 Cells", *Mol. Cells*, vol. 23, no. 3, pp. 398-404, 2007.
- [14] J. MacMicking, A. Qiaowen Xie, C. Nathan, "NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION", *Annual Review of Immunology*, vol. 15, no. 1, pp. 323-350, 1997.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
- [15] B. B. Lee, Y. B. Chae, Y. K. Kwon, C. H. Yang, M. R. Kim, K. J. Kim, D. H. Hahm, H. J. Lee, "Inhibitory Action of Cortex *Phellodendris* on Nicotine-induced Behavioral Sensitization", *Korean J. Physiology & Pathology*, vol. 18, no. 3, pp. 767-773, 2004
- [16] Y. Y. Lim, H. M. Kim, W. S. Park, J. H. Kim, H. J. Shin, M. N. Kim, B. J. Kim, "Anti-inflammatory and Anti-pruritic Effects of *Portulaca oleracea* L. Extract Using In Vitro and In Vivo Inflammation Model: LPS-treated Raw264.7 Cells, Keratinocytes, NC/Nga Mice and Hairless SKH-1 Mice", *The Korean Asthma and Allergy*, vol. 31, no. 3, pp. 199-206, 2011.
- [17] S. G. Park, K. H. Jegal, J. Y. Jung, Y. D. Back, S. H. Byun, Y. W. Kim, "Leonuri Fructus Ameliorates Acute Inflammation via the Inhibition of NF- κ B-mediated Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokine Production", *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, vol. 28, no. 2, pp. 178-185, March, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.15188/kjopp.2014.04.28.2.178>
- [18] S. Singh, A. Kumar, A. Agrawal, R. Singh, "Study of Dermatophytes and incidence of different clinical types of Tinea in skin OPD", *Eastern Journal of Medical Sciences*, vol. 1, no. 1, pp. 24-30, 2016.
- [19] J. McCord, K. Wong, S. Stokes, W. Petrone, D. English, "Superoxide and inflammation: a mechanism for the anti-inflammatory activity of superoxide dismutase", *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, vol. 492, pp. 25-30, January, 1980.
- [20] N. Azad, Y. Rojanasakul, V. Vallyathan, "Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species", *J. Toxicol. Environ. Health B*, vol. 11, no. 1, pp. 1-15, January, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10937400701436460>
- [21] S.-G. Lee, M.-M. Kim, "Anti-inflammatory effect of scopoletin in RAW264.7 macrophages", *Journal of Life Science*, vol. 25, no. 12, pp. 1377-1383, October, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.5352/JLS.2015.25.12.1377>
- [22] M. M. Mu, D. Chakravorty, T. Sugiyama, N. Koide, K. Takahashi, I. Mori, T. Yoshida, T. Yokochi, "The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells", *J Endotoxin Res*, vol. 7, no. 6, pp. 431-438, December, 2001.
DOI: <https://doi.org/10.1179/096805101101533034>
- [23] J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, Y. K. Kim, "Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages", *Phytother Res*, vol. 17, no. 5, pp. 485-489, May, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.1180>
- [24] B. Halliwell, J. Gutteridge, "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease", *Biochemical Journal*, vol. 219, no. 1, pp. 1-14, April, 1984.
DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2190001>
- [25] E. Hyun, H. Lee, W. Yoon, S. Park, H. Kang, S. Kim, E. Yoo, "Inhibitory effect of *Salvia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in murine macrophage RAW264.7", *Yakhak Hoeji*, vol. 48, pp. 159-164, 2004.
- [26] J. Y. Kim, K. S. Jung, H. G. Jeong, "Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase 2 expression in macrophages", *FEBS letters*, vol. 569, no. 1-3, pp. 321-326, June, 2004.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.05.070>

류 진 협(Jin-Hyeob Ryu)

[정회원]



- 2010년 2월 : 인제대학교 임상병리학과
- 2013년 3월 : 츠쿠바대학교 석사
- 2017년 3월 : 동경대학교 의과대학, 면역병리미생물학 박사
- 2017년 4월 ~ 현재 : 네이처포, 최고기술책임자

<관심분야>

병리학, 면역학, 미생물학, 분자유전생물학

안 주 희(Ju-Hee An)

[정회원]



- 2012년 2월 : 대구한의대학교 한방생약자원학과 학사
- 2016년 7월 : 경북대학교 약학과 석사
- 2017년 1월 ~ 현재 : 네이처포 R&D팀, 연구원

<관심분야>

천연물의약품, 약학

우 용 규(Yong-Kyu Woo)

[정회원]



- 1998년 7월 : 경북대학교 전자공학 학사
- 2003년 2월 : 서울대학교 의용생체공학 석사수료
- 2014년 7월 ~ 현재 : 네이처포, 개발/경영, 대표이사

<관심분야>
의용공학

조 현 정(Hyun-Jeong Cho)

[정회원]



- 2002년 2월 : 인제대학교 임상병리학과 석사
- 2005년 2월 : 인제대학교 임상병리학과 박사
- 2005년 3월 ~ 2006년 2월 : 일본 (주)파마푸드 박사후연수
- 2008년 2월 ~ 현재 : 건양대학교 의과학대학 임상병리학과 부교수

<관심분야>
혈액학, 뇌과학