

가지-청열소독음(淸熱消毒飲)의 항산화 및 항염 효능에 관한 연구

윤종문[†] · 김동인 · 이지혜 · 한소정 · 김하은 · 김현정* · 남규우** · 박지연** · 지경엽 · 안봉진

대구한의대학교 화장품약리학과, *주식회사 허브누리, **주식회사 땡큐파머
(2017년 4월 19일 접수, 2017년 6월 27일 수정, 2017년 6월 27일 채택)

Study on Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activity of Eggplant-cheongyeolsodokum

Jong-Moon Yoon[†], Dong-In Kim, Ji-Hae Lee, So-Jung Han, Ha-Eun Kim, Hyeon-Jeong Kim*,
Kyu-Woo Nam**, Ji-Yeon Park**, Gyeong-Yup Chi, and Bong-Jeun An

Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Eobongji-gil, Gyeongsan-si, Gyeongbuk-do 38578, Korea

*Institute of Technology, Herbnouri Co., Ltd., 17, Chilsungnam-ro 30 Beon-gil, Buk-gu, Daegu 41597, Korea

**THANK YOU FARMER Co., Ltd., 1-1017, Lotte IT Castle, 98, Gasan digital 2-ro, Geumcheon-gu, Seoul 08506, Korea

(Received April 19, 2017; Revised June 27, 2017; Accepted June 27, 2017)

요약: 본 연구의 목적은 8가지 한약재(가지, 금은화, 감초, 천궁, 당귀, 황련, 치자, 연교)로 구성된 가지청열소독음의 항산화 효과와 항염증 효과를 검증하여 효과적인 화장품소재로서의 가능성을 확인하는 것이다. 한약재의 구성과 비율은 동의보감에 수록된 청열소독음(淸熱蘇毒飲) 처방을 변형시켜 사용하였고 추출은 열수와 70% 에탄올로 하여 동결건조 분말화하였다. 항산화 효능을 확인하기 위해 라디칼 소거능력(DPPH, ABTS⁺, super-oxide), superoxide dismutase (SOD) 유사활성능력, 총 폴리페놀 화합물 함량을 조사하였고 항염증 효능을 확인하기 위해 LPS (lipopolysaccharide)로 염증반응을 유도시킨 RAW264.7 대식세포에서의 nitric oxide (NO) 생성 저해력과 western blot 분석을 통한 염증 관련 단백질 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase (COX-2)의 발현 저해를 확인하였다. 그 결과, 가지청열소독음은 뛰어난 항산화 효과와 항염증 효과를 나타내었고 화장품을 위한 효과적인 성분으로 사용 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: The purpose of this study is verification of the anti-oxidant effect and anti-inflammatory effect of Eggplant-cheongyeolsodokum composed of 8 herbs (*Solanum melongena* L., *Lonicera japonica* Thunb., *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Ligusticum chuanxiong* Hort., *Angelica gigas* Nakai., *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao., *Gardenia jasminoides* J. Ellis., *Forsythia suspensa* Vahl) to confirm the possibilities as useful cosmetic material. We used the modified prescription of 'cheongyeolsodokum' contained in Korean traditional medical book 'Donguibogam' as composition of Eggplant-cheongyeolsodokum and their proportions. Eggplant-cheongyeolsodokum were extracted with hot water, 70% ethanol and then powdered. To confirm anti-oxidant effect, we investigated radical scavenging ability (DPPH, ABTS⁺, superoxide), superoxide dismutase (SOD)-like activity, total polyphenolic contents. Also to confirm anti-inflammatory effect, we investigated inhibition effect of nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophages, and Inhibition effect of the expression of inflammatory-related proteins (iNOS, COX-2) by western blot analysis. As a result, Eggplant-cheongyeolsodokum showed good anti-oxidant and anti-inflammation effects, we suggest that it can be used as an active ingredient for cosmetics.

Keywords: anti-oxidant, anti-inflammatory, RAW264.7 cell, polyphenol, cosmetics

† 주 저자 (e-mail: yjm2777@naver.com)
call: 010)7247-1508

1. 서 론

현대의 사람들은 사회의 급격한 경제성장에 따라 삶의 질이 향상되어 아름다움과 건강에 대한 관심이 늘고 있다. 특히 육체적·정신적 조화를 추구하여 아름답고 행복한 삶을 추구하는 웰빙(well-being) 문화가 확산되고 있으며, 사람들의 요구에 부합하는 천연 식물자원을 이용한 항산화, 노화방지에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 추세이다. 노화는 선천적인 유전자 이상에 의해 진행되기도 하지만 생물의 퇴행성 변화를 고려하면 개체의 행동 양상에 따른 후천적 원인이 더욱 중요하게 작용하며 그 주요 원인으로 free radical에 의한 세포의 산화적 스트레스(oxidative stress)가 많이 연구되어져 이해되고 있다[1]. 이에 따르면 세포에서 이용된 산소의 2% 정도는 부분적으로 환원되며 활성 산소로 변화하며[2], 그로 인한 산화 스트레스는 세포의 노화를 유발하는 것으로 알려져 있다[3]. Nitric oxide (NO)는 고 반응성의 생체 생성 radical의 일종으로 neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS) 세 가지 형태로 구성된 NOS (nitric oxide synthase)에 의해 L-arginine과 O₂로부터 생성되는데 [4-6] 정상 생리 상태에서는 신경신호 전달 및 박테리아의 사멸을 통한 면역작용 등의 생리적으로 중요한 역할을 하지만[7], 과도하게 작용하면 생체 내 염증을 유발시키고 유전자의 변이, 조직과 신경의 손상 등을 일으키며 인체에 해로운 작용을 하게 된다[8-13]. 또한 NO는 직·간접적으로 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 활성을 조절하는데 직접적으로는 superoxide anions radical과 반응하여 peroxynitrite anions (ONOO⁻)을 생성하여 COX-2의 촉매적 활성을 증가시키며, 간접적으로는 signaling cascade를 촉발하여 전사단계에서 COX-2의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[14]. COX-2는 염증반응을 조절하는 중요인자 중 하나인 COX의 inducible isoform으로서 다양한 난치성 질환에 관여하며 병리학적 염증반응에서 급성적으로 발현되는 것으로 알려져 있다[15-18]. Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포벽을 구성하는 성분으로 대식세포의 toll-like receptor (TLR)에 결합하여 염증 매개반응을 유발하는 유력한 인자로 알려져 있으며 다양한 염증 연구에 활용되고 있다[19-23]. 통상 LPS로 자극을 받은 대식세포에서 염증 반응이 일어날 때에는 iNOS에 의

해 NO가 다량 생성되며 COX-2의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있기 때문에[24-25] iNOS와 COX-2의 생성을 억제하는 물질은 염증반응의 조절제로서의 가능성이 높다. 청열소독음은 한국 전통의학서인 동의보감 [26]에 수록되어져 있는 처방이며 청열해독(淸熱解毒)하여 열을 내리고 독을 없애는 효능을 가진 연교, 금은화, 황련, 치자, 자음청열(滋陰淸熱)하여 음기(陰氣)를 길러 성질을 차거나 서늘하게 시키는 지황, 보혈화혈(補血和血)하여 피가 부족하거나 물린 것을 치료하는 당귀, 활혈행기(活血行氣)하여 혈액 순환과 기(氣)의 운행이 원활하게 돕는 천궁, 산어지통(散瘀止痛)하여 어혈(瘀血)을 제거하고 통증을 멈추는 작약, 협화제약(協和諸藥)하여 모든 약재의 약효를 조화롭게 하여 상호 협조시켜 주는 감초로 구성되어져 있으며 주로 갈증과 발열 등의 증상에 오래도록 사용되어져 왔다. 하지만 이는 경구적 내복약으로서의 효능이며 피부에 영향을 줄 수 있는 효능에 관해서는 각종 피부상재균에 대한 항균 효과, 항산화 효과, 피부흑색종의 원인이 되는 멜라노마세포 G361와 B16F10을 포함한 각종 암세포에 대한 항암 효과 등이 일부 연구되어져 있으나[27] 세포수준의 항염증 효과, 미백 효과 등 그 밖의 연구는 현재까지 미비한 실정이다. 이에 본 연구팀은 청열소독음의 피부 외용으로서의 사용을 도모하고 피부약리학적 효과를 상승시키기 위한 방법을 모색하여 피부보호 효과를 나타내는 가지를[28,29] 주성분으로 첨가하는 등 처방을 일부 변경함으로써 가지청열소독음을 제조하였고 그 효과를 검증하여 화장품 소재로서의 가능성을 알아보려고 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 한약재는 인터넷쇼핑몰 한약재시장(www.hanyakjae.net)에서 구입하여 사용하였으며 구성과 학명은 다음과 같다(Table 1).

항산화능 측정 실험에 사용된 시약은 다음과 같다. 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid) diammonium salt, potassium peroxodisulfate, butylated hydroxy anisole, L-ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, tannic acid, pyrogallol, 2,6-dihydroxypurine, nitro blue tetrazolium, xanthine oxidase 등은 Sigma (USA)에

Table 1. The Component of Eggplant-cheongyeolsodokum

韓藥名	Scientific name	Weight (g)
茄子	<i>Solanum melongena</i> L.	30.0
金銀花	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	12.0
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	8.0
川芎	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort	10.0
當歸	<i>Angelica gigas</i> Nakai	10.0
黃連	<i>Coptis deltoidea</i> C. Y. Cheng et Hsiao	10.0
梔子	<i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis	10.0
連翹	<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	10.0
Total		100.0

서 구입하여 사용하였다. Folin-ciocalteu phenol reagent는 Junsei Chemical (Japan)에서 구입하여 사용하였다. Ethanol, sodium carbonate, hydrogen chloride, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic 등은 Duksan pure chemicals (Korea)에서 구입하여 사용하였다.

세포실험에 사용된 세포주 및 시약은 다음과 같다. 세포주 murine macrophage cell (RAW264.7)은 American type culture collection (USA)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)은 Lonza (Switzerland)에서 구입하여 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Griess reagent (modified), RIPA buffer, phosphatase inhibitor cocktail 3, protease inhibitor cocktail for use with mammalian cell and tissue extract, aluminum chloride, 1.0 M solution in nitrobenzene, ammonium persulfate 등은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. iNOS, COX-2, β -actin, anti-mouse, anti-rabbit은 Santa Cruz (USA)에서 구입하여 사용하였다. Tris-base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol), 20x PBS buffer, SDS (sodium dodecyl sulfate), glycine, TEMED는 Biosesang에서 구입하여 사용하였다. Protein assay dye reagent concentrate는 Bio-Rad (USA)에서 구입하여 사용하였다. pH 7 albumin-bovine은 USB (USA)에서 구입하여 사용하였다. PageRuler™ prestained protein ladder, western blot stripping buffer는 Thermo (Lithuania)에서 구입하여 사용하였다. Tween 20은 Daejung chemicals & metals (Korea)에서 구입하여 사용하였다. Acryl-bisacrylamide (29 : 1) 30% stock solution은 Mbiotech (Korea)에

서 구입하여 사용하였다. Transfer membrane은 Millipore (USA)에서 구입하여 사용하였다. 3 mm CHR은 GE healthcare life sciences (China)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 다음과 같다. Microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA), freeze drier (Ilsin bio base, Korea), microscope (Olympus, Japan), CO₂ incubator, BOD incubator, autoclave (Hanbaek Scientific, Korea), biohazard safety cabinet (JSresearch, Korea), rotary vacuum evaporator (Rikakikai, Japan), digital reciprocating shaker (Daihan Scientific, Korea), centrifuge (VS-15000CFNII, Visionsci, Korea), power supply electrophoresis (Powerpac™ HC, Bio-rad, USA), western imaging system (CAS-400SM, Davinch-K, Korea).

2.2. 추출물의 제조

가지청열소독음의 추출 과정은 Figure 1과 같다. 열수 추출물은 건조된 시료 중량의 20배의 초순수를 용매로 하여 85 °C에서 4 h 동안 추출하는 과정을 3회 반복한 후 추출액을 여과지로 여과, 감압 농축, 동결건조하여 분말화 하였다. 70% 에탄올 추출물은 건조된 시료 중량의 20배의 70% 에탄올을 용매로 하여 상온에서 24 h 침지시켜 추출하는 과정을 3회 반복하여 추출액을 얻은 후 열수 추출물과 동일한 방법으로 분말화 하였다. 열수 추출물의 수율은 36.51%, 70% 에탄올 추출물의 수율은 28.59%이었다. 각 추출물은 4 °C 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

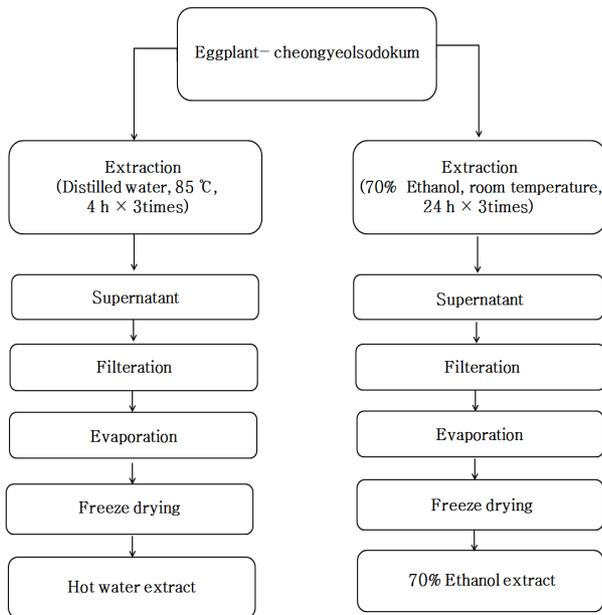


Figure 1. The procedure for extraction from Eggplant-cheongyeolsodokum.

2.3. DPPH Radical 소거능 측정

DPPH radical scavenging을 이용한 항산화 효과의 측정은 Blois의 방법[30]에 따라 측정하였다. 각 시료용액 120 μL 에 0.45 mM의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 60 μL 를 넣고 15 min 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 계산하였다.

DPPH radical 소거능(%)

$$= (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.4. ABTS⁺ Radical 소거능 측정

ABTS⁺ radical scavenging을 이용한 항산화 효과의 측정은 Van den Berg의 방법[31]에 따라 측정하였다. 7 mM 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 와 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24 h 동안 방치하여 ABTS⁺ radical을 형성시킨 후 99% ethanol로 희석하여 사용하였다. 각 시료용액 100 μL 에 희석한 ABTS⁺용액 100 μL 넣고 암실에서 7 min 동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 계산하였다.

ABTS⁺ radical 소거능(%)

$$= (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.5. Superoxide Anion Radical 소거능 측정

Superoxide anion radical scavenging을 이용한 항산화 효과의 측정은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법 [32]에 의해 측정하였다. 각 시료용액 10 μL 에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 40 μL 와 1.2 mM xanthine과 0.72 mM NBT를 1 : 1 비율로 섞어서 만든 기질 용액 100 μL 와 0.15 unit/mL xanthine oxidase 100 μL 를 넣고 37 °C에서 12 min 동안 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 계산하였다.

Superoxide anion radical 소거능(%)

$$= (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.6. 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀의 정량은 Folin-danis법[33]에 의해 측정하였다. Folin-Ciocalteu phenol reagent 50 μL 에 농도별로 희석한 시료용액 50 μL 를 넣고 실온에서 3 min 동안 반응시키고 난 후 0.7 M Na₂CO₃ 용액 50 μL 를 넣은 뒤 암실에서 1 h 동안 반응시키고 730 nm에서 흡광도를 측정 후, 미리 작성한 표준물질 tannic acid의 흡광도 그래프와 대비하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

2.7. Superoxide Dismutase (SOD) 유사활성능 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법[34]에 따라 측정하였다. 각 시료용액 20 μL 에 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6) 130 μL 와 7.2 mM pyrogallol 20 μL 를 넣은 뒤 20 min 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 계산하였다.

SOD 유사활성능(%)

$$= (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.8. 세포 배양

본 실험에 이용한 RAW264.7 murine macrophage cell의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 unit/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며 37 °C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

2.9. 세포 생존률 측정

세포 생존률 측정은 Carmichael의 방법[35]에 따라 측정하였다. 세포주 RAW264.7을 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well이 되도록 seeding 하고 37 °C, 5% CO₂

incubator에서 24 h 동안 배양시킨다. 이후 혈청제거 배지로 교환하고 각 시료용액을 농도별로 처리한 뒤 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양시킨다. 대조군은 시료와 동량의 DMEM 배지를 첨가하여 같은 조건으로 배양하였다. 이후 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL 첨가하여 4 h 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.1 mL를 넣어 실온에서 10 min 동안 반응시킨 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 계산하였다.

세포 생존률(%)

$$= (\text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.10. Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

Nitric oxide (NO) 생성량은 세포배양액에 존재하는 NO를 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다 [36]. 세포주 RAW264.7을 96-well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 seeding 하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양시킨다. 이후 혈청제거 배지로 교환하고 세포의 염증 반응을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS)를 1 ppm/well이 되도록 처리하고 각 시료용액을 농도별로 처리한 뒤 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양시킨다. 대조군은 시료와 동량의 DMEM 배지를 첨가하여 같은 조건으로 배양하였다. 이후 새로운 96-well plate에 세포 배양액을 100 μL 옮기고 Griess reagent를 100 μL 첨가하여 상온에서 5 min 동안 반응시킨 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 계산하였다.

NO 생성량(%)

$$= (\text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.11. Western Blot 분석을 통한 단백질 발현 측정

세포주 RAW264.7을 6-well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 seeding 하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양시킨다. 이후 혈청제거 배지로 교환한 후 세포의 염증 반응을 유도하기 위하여 lipopolysaccharide (LPS)를 1 ppm/well이 되도록 처리하고 각 시료용액을 농도별로 처리한 뒤 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양시킨다. 대조군은 시료와 동량의 DMEM 배

지를 첨가하여 같은 조건으로 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척 후 protease inhibitor를 0.1% 함유시킨 RIPA buffer를 60 μL/well로 처리하여 세포를 용해시키고 centrifuge를 이용하여 4 °C 15,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액을 Bradford assay로 정량하여 얻은 단백질 20 μL를 10% SDS-PAGE 하여 분리시키고 power supply electrophoresis를 이용하여 PVDF membrane에 옮겨 digital reciprocating shaker를 이용하여 5% skin milk, 1차 항체, 세척, 2차 항체, 세척 순서의 blocking 과정을 거친 다음 HRP substrate 시약으로 2 min 동안 반응시킨 후 western imaging system 기기를 이용하여 밴드를 확인하고 결과를 산출하였다.

2.12. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고 결과는 평균 값 ± 표준편차로 나타냈다. 통계분석은 SPSS 10.0 프로그램을 사용하였다. 처리구간 간의 유의성 검증을 위해 분산분석(analysis of variance, ANOVA)하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 검정을 실시하였다.

3. 실험 결과

3.1. DPPH Radical 소거능

DPPH radical은 보라빛을 띠는 비교적 안정한 라디칼로서 항산화 물질과 반응하면 proton-radical scavenger에 의하여 노란빛으로 탈색되는 특징이 있으며 [37] 색변화에 의한 흡광도의 차이는 517 nm 부근에서 최대가 된다. 비교적 간단한 방법을 사용하므로 항산화 활성을 측정하는데 많이 이용되고 있다. 가지청열소독음의 열수와 70% 에탄올 추출물의 항산화 효능을 측정하기 위한 방법으로 DPPH radical 소거능을 측정하였으며 결과는 Figure 2에 나타내었다. 가지청열소독음은 열수와 70% 에탄올 추출물 모두에서 농도 의존적인 항산화 효과가 나타났다. 1,000 μg/mL 농도에서 열수 추출물의 효과가(62.43%) 에탄올 추출물(55.78%)보다 더 높게 나타났지만 농도가 낮을수록 각 시료의 차이는 줄어드는 경향을 보였다. 대조군인 butylated hydroxy anisole (BHA)보다는 낮은 효과가 나타났다.

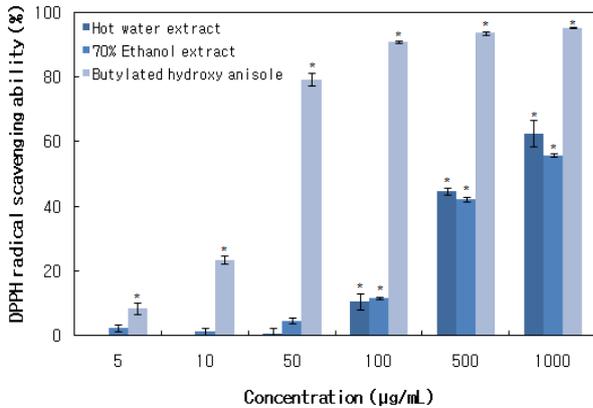


Figure 2. The DPPH radical scavenging ability of Eggplant-cheongyeolsodokum extracts. Each value presents the mean ± standard deviation (S.D.) of triplicate determinations. **p* < 0.05 indicate a significant difference from sample not treated control.

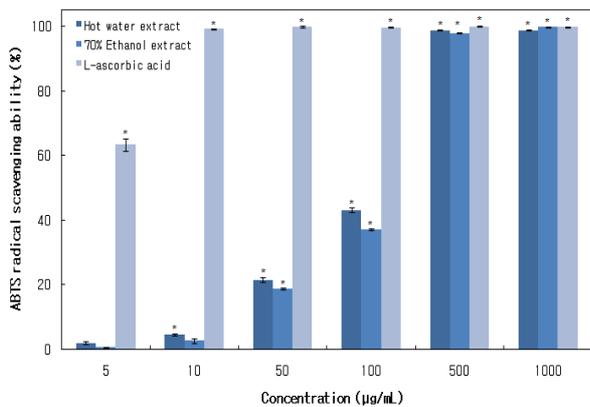


Figure 3. The ABTS radical scavenging ability of Eggplant-cheongyeolsodokum extracts. Each value presents the mean ± S.D. of triplicate determinations. **p* < 0.05 indicate a significant difference from sample not treated control.

3.2. ABTS⁺ Radical 소거능

ABTS cation radical은 짙은 청록색을 띠는 라디칼로 항산화 물질과 반응함에 따라 연한 녹색으로 탈색되는 특징이 있다. hydrogen-donating antioxidant와 chain-breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있는 방법으로 알려져 있으며[38] DPPH 실험법과 마찬가지로 비교적 손쉬운 실험방법으로 인해 일반적으로 많이 사용하고 있는 항산화능 측정 방법 중 하나이다. 가지청열소독음의 ABTS cation radical 소거능을 측정한 결과는 Figure 3에 나타내었다. 가지청열소독음은 열수와 70% 에탄올 추출물 모두에서 농도의존적인 항산화 효과가

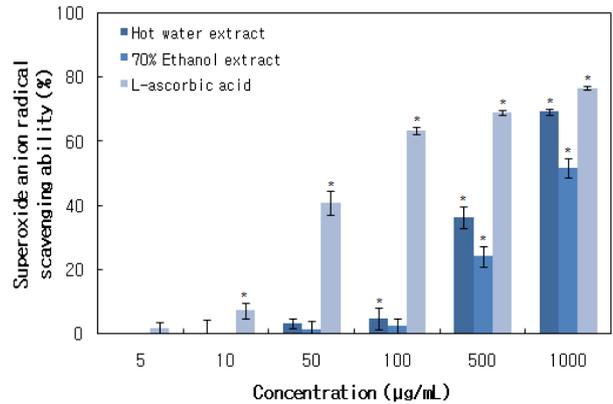


Figure 4. The superoxide anion radical scavenging ability of Eggplant-cheongyeolsodokum extracts. Each value presents the mean ± S.D. of triplicate determinations. **p* < 0.05 indicate a significant difference from sample not treated control.

나타났다. 100 µg/mL 농도에서는 열수 추출물의 효과가(43.18%) 70% 에탄올 추출물의 효과(37.07%)보다 더 높게 나타났지만 농도가 낮을수록 각 시료의 차이는 줄어드는 경향을 보였다. 500 µg/mL 이상의 농도에서는 두 추출물 모두 99% 내외의 효과를 나타내었으며 대조군인 L-ascorbic acid와 비슷한 항산화 효과가 확인되었다.

3.3. Superoxide Anion Radical 소거능

Superoxide anion radical 소거능 측정 실험은 물질의 항산화 효과 측정에 이용되는 한 방법으로 xanthine과 xanthineoxidase의 반응 과정에서 생성되는 superoxide anion radical과 nitro blue tetrazolium이 반응하여 보라빛으로 발색되는 현상을 이용하는 방법이다. 가지청열소독음의 superoxide anion radical 소거능을 측정한 결과는 Figure 4에 나타내었다. 가지청열소독음은 열수와 70% 에탄올 추출물 모두에서 농도의존적인 항산화 효과가 나타났다. 열수 추출물이 70% 에탄올 추출물보다 효과가 뛰어난 경향을 보였으며 1,000 µg/mL 농도에서의 효과는 열수 추출물이 69.24%, 70% 에탄올 추출물이 51.56%로 대조군인 L-ascorbic acid의 효과(76.75%)보다는 낮게 나타났다.

3.4. 총 폴리페놀 함량

가지청열소독음 추출물의 폴리페놀 화합물의 함량은 Table 2에 나타내었다. 열수 추출물(22.39 ± 0.95)에

Table 2. Total Polyphenol Contents of Eggplant-cheongyeolsodokum Extracts

Type of solvent extract	Polyphenol contents (mg TAE/g) ¹⁾
Hot water extract	22.39 ± 0.95
70% Ethanol extract	20.44 ± 0.47

Each value presents the mean ± standard deviation (S.D.) of triplicate determinations. ¹⁾ TAE standards for tannic acid equivalent.

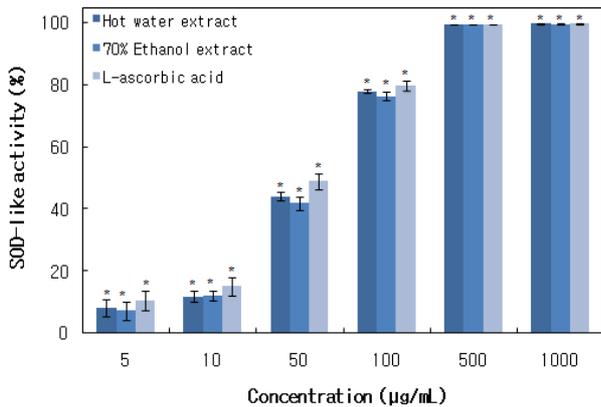


Figure 5. The Superoxide dismutase (SOD)-like activity of Eggplant-cheongyeolsodokum extracts. Each value presents the mean ± S.D. of triplicate determinations. **p* < 0.05 indicate a significant difference from sample not treated control.

서 70% 에탄올 추출물(20.44 ± 0.47) 보다 많은 폴리페놀 화합물이 포함되어 있는 것으로 확인되었다. Radical 소거능 측정 실험에서 열수 추출물의 항산화 효과가 70% 에탄올 추출물보다 다소 높게 나왔던 결과의 이유는 항산화 작용을 하는 폴리페놀 화합물의 양과 관련이 있을 것으로 사료된다.

3.5. Superoxide Dismutase (SOD) 유사활성 효과

SOD 유사활성 측정 실험은 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용하는 항산화능 측정 방법이다. Pyrogallol은 알칼리 수용액에서 자동산화가 빠르게 일어나는 물질로 superoxide가 반응에 관여한다고 알려져 있다. 실험에 사용하는 시료에 superoxide를 저해시키는 물질인 SOD 혹은 SOD 유사활성 물질이 존재하는 경우 산화에 의한 발색을 억제할 수 있으며, 발색이 억제되는 정도를 비교하여 시료의 항산화 효과를 측정할 수 있다. 가지청열소독음의 SOD 유사활성 능력을 측정한 결과는 Figure 5에 나타내었다. 가지청열소독음은 열수와 70% 에탄올 추출물 모두에서 농도의존적인 항

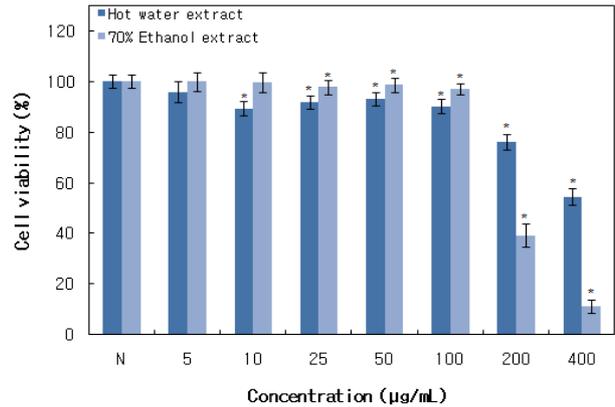


Figure 6. Cell viability of RAW264.7 macrophage cell on each concentration of Eggplant-cheongyeolsodokum extracts. N: normal, sample not treated group. Each value presents the mean ± S.D. of triplicate determinations. Values are relative to the normal. **p* < 0.05 indicate a significant difference from the normal.

산화 효과가 나타났다. 500 µg/mL 이상의 농도에서 두 추출물은 99% 이상의 효과를 나타내었으며 모든 농도에서 대조군인 L-ascorbic acid와 같은 수준의 항산화 효과를 보여 효과적인 항산화 기능성 첨가 물질로서 가능성을 확인하였다.

3.6. 세포 생존률 측정

가지청열소독음 추출물의 농도별 처리에 따른 RAW264.7 murine macrophage cell의 생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 진행하였다(Figure 6). 열수와 70% 에탄올 추출물을 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL 농도로 24 h 동안 처리한 결과 두 추출물 모두 200 µg/mL 이상의 농도에서는 세포 생존율이 급격하게 줄어드는 반면 100 µg/mL 이하의 농도에서는 90% 이상의 세포 생존율이 확인되었다. 따라서 100 µg/mL 농도를 이후의 항염증 관련 세포 실험의 최고 농도로 설정하였다.

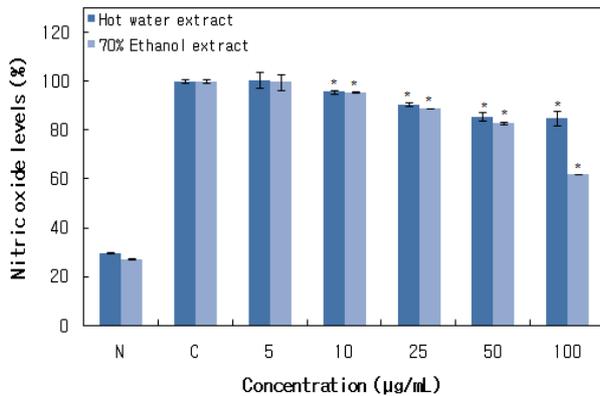


Figure 7. Nitric oxide levels of LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cell on each concentration of Eggplant-cheongyeolsodokum extracts. N: normal, LPS not treated group, C: control, LPS treated group. Each value presents the mean \pm S.D. of triplicate determinations. Values are relative to the control. * $p < 0.05$ indicate a significant difference from the LPS-treated control.

3.7. Nitric Oxide (NO) 생성량

인체에서의 염증반응은 생체 방어를 위한 필수적인 반응이다. NO는 외부 자극으로 인해 대식세포가 생성하는 염증 매개물질로 알려져 있으며 면역활동과 조직 재생을 돕는 역할을 하지만 과하게 분비되면 염증을 유발, 혈관 확장시키며 만성염증, 자가 면역질환으로 진행 가능성이 있어 인체에 해로운 작용을 하기도 한다고 알려져 있다[39]. 따라서 염증 반응의 적절한 조절은 생명현상 유지를 위해 중요하다. 이에 가지청열소독음 추출물이 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 세포의 NO생성에 미치는 영향을 알아보았으며 결과는 Figure 7에 나타내었다. LPS로 자극을 준 RAW264.7 세포는 정상적인 세포에 비해 NO를 3배 이상 생성하였다. 가지청열소독음의 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물을 처리한 구간에서는 모두 LPS에 의해 증가한 NO의 생성량을 농도의존적으로 감소시키는 것으로 나타났으며 100 µg/mL 농도로 처리한 구간에서의 NO 생성량은 70% 에탄올 추출물(61.91%)이 열수 추출물(84.84%)보다 낮게 나타났다. 가지청열소독음은 LPS로 자극시킨 RAW264.7 세포에서 염증물질 NO의 생성을 유의성 있게 저해 시켰다는 것을 확인하였다.

3.8. Western Blot을 통한 통한 단백질 발현

iNOS는 LPS로 자극을 받은 대식세포에서 염증 반응이 일어날 때 NO를 다량 생성시키며 과잉의 NO는 염증 반응과 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[40]. COX-2는 염증반응에서 나타나는 중요인자 중 하나로서 통증, 발열, 면역반응 등에 반응하는 물질을 생성하는 등[41] 다양한 질환에 관여하며 병리학적 염증반응에서 급성적으로 발현되는 것으로 알려져 있다. 이에 가지청열소독음 추출물이 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 세포에서 염증관련 단백질 iNOS와 COX-2의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot 분석을 시행하였다 (Figure 8). 그 결과 가지청열소독음은 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 유의성 있게 감소시켰다는 것을 확인하였다.

4. 고찰 및 결론

본 연구에서는 아름다움과 건강에 대한 관심이 늘고 있는 현대 사회의 니즈에 부합하는 새로운 천연물 화장품 소재를 개발하기 위해 가지청열소독음을 제조하였고 그 효과를 검증하여 화장품 소재로서의 가능성을 알아보려고 하였다. 그 결과 가지청열소독음 추출물은 각종 radical (DPPH, ABTS, superoxide) 소거 효과가 뛰어나며 특히 superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정실험에서는 기존의 항산화제로 널리 사용되어지고 있는 L-ascorbic acid와 동등한 항산화 효과를 나타내었고 이는 700 µg/mL 농도에서 약 10%의 효과를 나타낸 An 등[27]의 청열소독음 추출물의 SOD 유사활성 측정결과와 비교해 보았을 때 가지청열소독음의 효과가 월등하게 뛰어난 것을 알 수 있었다. 또한 RAW264.7 murine macrophage cell을 이용한 항염증 효과 측정실험에서는 nitric oxide를 비롯한 염증 매개물질 iNOS와 COX-2의 발현을 적절하게 억제시키는 효과를 검증하였다. 따라서 가지청열소독음 추출물은 피부약리학적으로 기존의 청열소독음보다 뛰어난 항산화 효과를 가지며 항염증 효과 또한 뛰어나 각종 기능성 소재로서 사용 가능할 것으로 보이며 이를 응용한 효과적인 화장품소재로서의 적용 가능성 또한 높다고 사료된다.

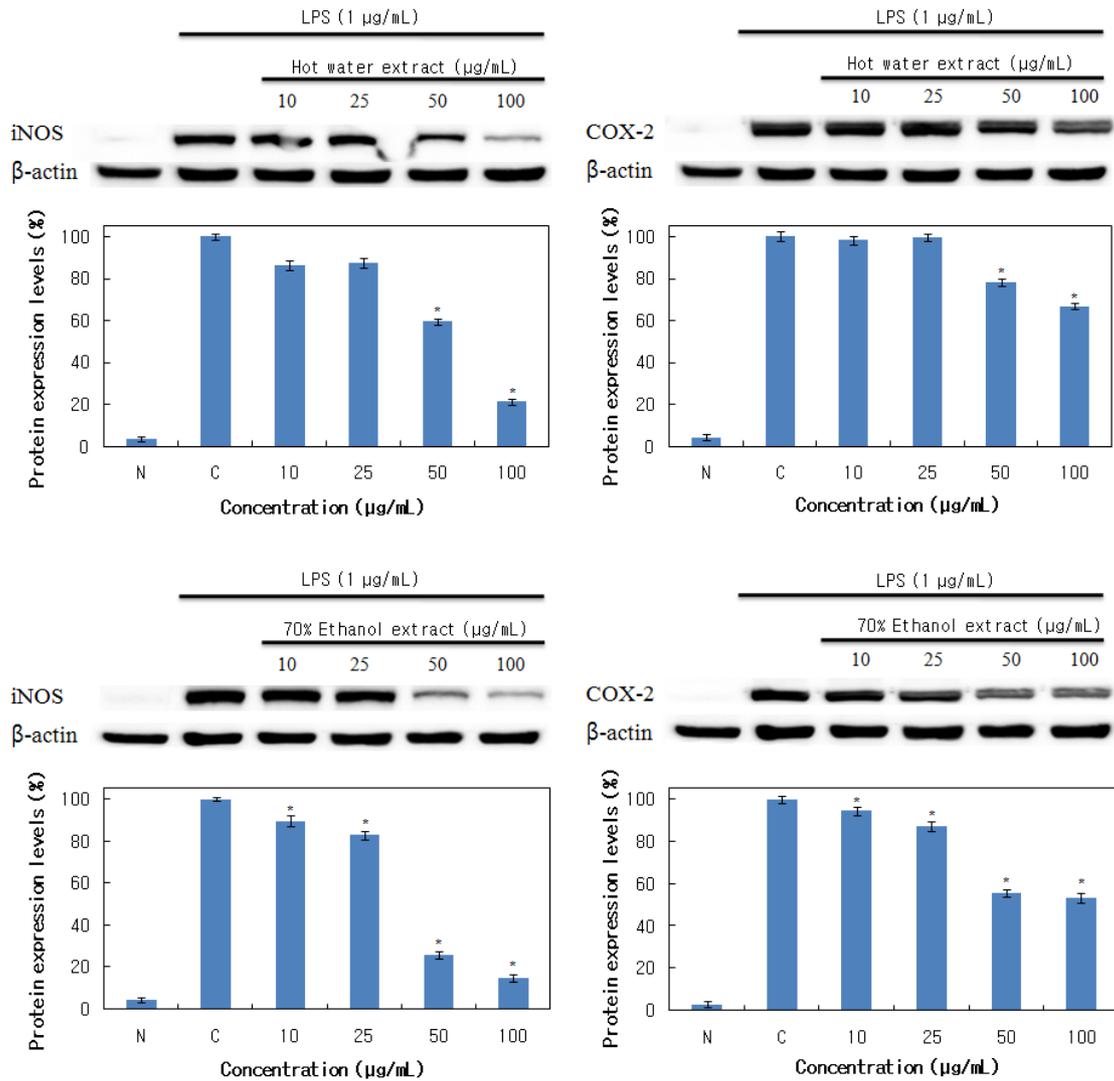


Figure 8. Expression levels of iNOS, COX-2 protein in LPS-stimulated RAW264.7 cells on each concentration of Eggplant-cheongyeolsodokum extracts. N: normal, LPS not treated group, C: control, LPS treated group. Each value presents the mean ± S.D. of triplicate determinations. Values are relative to the control. * $p < 0.05$ indicate a significant difference from the LPS-treated control.

Reference

1. R. Pamplona, M. Portero-Otin, J. Requena, R. Gredilla, and G. Barja, Oxidative, glycoxidative and lipoxidative damage to rat heart mitochondrial proteins is lower after 4 months of caloric restriction than in age-matched controls, *Mech. Ageing Dev.*, **123**(11), 1437 (2002).
2. B. Chance, H. Sies, and A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiological reviews*, **59**(3), 527 (1979).
3. T. von Zglinicki, Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **908**(1), 99 (2000).
4. N. McCartney-Francis, J. B. Allen, D. E. Mizel, J. E. Albina, Q. W. Xie, C. F. Nathan, and S. M. Wahl, Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, **178**(2), 749 (1993).

5. W. G. Seo, H. O. Pae, G. S. Oh, K. Y. Chai, Y. G. Yun, T. O. Kwon, and H. T. Chung, Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages stimulated with interferon- γ and lipopolysaccharide, *Gen. Pharmacol-Vasc. S.*, **35**(1), 21 (2000).
6. A. Weisz, L. Cicatiello, and H. Esumi, Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine, *Biochemical Journal*, **316**(1), 209 (1996).
7. I. Posadas, M. C. Terencio, I. Guillén, M. L. Ferrándiz, J. Coloma, M. Pay, and M. J. Alcaraz, Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **361**(1), 98 (2000).
8. B. Chance, H. Sies, and A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, **59**(3), 527 (1979).
9. W. F. Chiou, C. J. Chou, and C. F. Chen, Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW264.7 macrophages, *Life sci.*, **69**(6), 625 (2001).
10. M. Guha and N. Mackman, LPS induction of gene expression in human monocytes, *Cell. Signal.*, **13**(2), 85 (2001).
11. H. Kawamata, H. Ochiai, N. Mantani, and K. Terasawa, Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line, *Am. J. Chin. Med.*, **28**(02), 217 (2000).
12. B. G. Lee, S. H. Kim, O. P. Zee, K. R. Lee, H. Y. Lee, J. W. Han, and H. W. Lee, Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 macrophages by two β -carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*, *Eur. J. Pharmacol.*, **406**(3), 301 (2000).
13. M. L. McDaniel, G. Kwon, J. R. Hill, C. A. Marshall, and J. A. Corbett, Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes, *Exp. Biol. Med.*, **211**(1), 24 (1996).
14. J. S. Kang, M. H. Kim, Y. I. Lee, B. S. Lee, and B. S. Kim, The effects of exercise on inflammatory response according to stress, *The Korean Journal of Sports Science*, **17**(4), 1131 (2008).
15. H. J. Cho, J. H. Shim, H. S. So, and J. H. YoonPark, Mechanism underlying the anti-inflammatory action of piceatannol induced by lipopolysaccharide, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, **41**(9), 1226 (2012).
16. H. H. Leem, E. O. Kim, M. J. Seo, and S. W. Choi, Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.), *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, **40**(10), 1361 (2011).
17. H. Matsuda, T. Kageura, T. Morikawa, I. Toguchida, S. Harima, and M. Yoshikawa, Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**(4), 323 (2000).
18. M. S. Sung, Y. H. Kim, Y. M. Choi, H. M. Ham, H. S. Jeong, and J. S. Lee, Anti-inflammatory effect of *Erigeron annuus* L. flower extract through heme oxygenase-1 induction in RAW264.7 macrophages, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, **40**(11), 1507 (2011).
19. E. J. Han, Cytotoxicity of *Daucus carota* L. on various cancer cells, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.*, (2000).
20. E. J. Jeon, J. S. Kim, Y. K. Park, T. S. Kim, and M. H. Kang, Protective effect of yellow-green vegetable juices on DNA damage in Chinese hamster lung cell using Comet assay. *Korean Journal of Nutrition*, **36**(1), 24 (2003).
21. C. M. Kim, M. G. Shin, D. G. Ahn, G. S. Lee, B. S. Kang, and S. S. Kang, The chinese herbal Dictionary, 2770, Jeongdam, Seoul (1997).
22. T. J. Kim, Wild flowers and resources plants in Korea, 3, 451, Seoul National University (2008).
23. N. R. Rho, and D. H. Kim, Anti-tumor effect of carrot extracts in the human lung cancer cell line NCI-H1299, 12, 289, *J. East Asian Soc. Diet. Life*

- (2002).
24. C. Hoffmann, COX-2 in brain and spinal cord-implications for therapeutic use, *Curr. Med. Chem.*, **7**(11), 1113 (2000).
 25. H. Y. Yun, V. L. Dawson, and T. M. Dawson, Neurobiology of nitric oxide. *Critical Reviews™ in Neurobiology*, **10**(3), 291 (1996).
 26. J. Hur, Donguibogam, Namsandang, Seoul (2007).
 27. B. J. An, J. T. Lee, C. E. Lee, J. H. Son, J. Y. Lee, T. S. Park, I. C. Lee, M. A. Song, S. J. Cheon, and S. Y. Jee, Cytotoxicity, antibacterial and antioxidant activities of the prescription cheongyeolsodokum and its constituent herbs, *Korea J. Herbol.*, **20**(4), 41 (2005).
 28. Y. N. Jo, H. R. Jeong, J. H. Jeong, and H. J. Heo, The skin protecting effects of ethanolic extracts of eggplant peels, *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **44**(1), 94 (2012).
 29. H. Y. Kim, Y. J. Cho, N. Yamabe, and E. J. Cho, Free radical scavenging activity and protective effect from cellular oxidative stress of active compound from eggplant (*Solanum melongena* L.), *Korean J. Agri. Sci.*, **38**(4), 625 (2011).
 30. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**(4617), 1199 (1958).
 31. R. van den Berg, G. R. Haenen, H. van den Berg, and A. A. L. T. Bast, Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures, *Food Chem.*, **66**(4), 511 (1999).
 32. I. Fridovich, Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **245**(16), 4053 (1970).
 33. O. Folin and W. Denis, On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *J. Biol. Chem.*, **12**(2), 239 (1912).
 34. S. Marklund and G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, **47**(3), 469 (1974).
 35. J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer research*, **47**(4), 936 (1987).
 36. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, **126**(1), 131 (1982).
 37. C. I. Park and G. H. Park, Antioxidant and anti-wrinkling effects of extracts from *Nelumbo nucifera* leaves, *Korea J. Herbol.*, **31**(4), 53 (2016).
 38. F. Natella, M. Maldini, G. Leoni, and C. Scaccini, Glucosinolates redox activities: can they act as antioxidants?, *Food Chem.*, **149**, 226 (2014).
 39. H. Vlassara, Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1043**(1), 452 (2005).
 40. M. F. Shih, Y. D. Cheng, C. R. Shen, and J. Y. Cherng, A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW264.7 cells through selective iNOS protein inhibition, *J. Nat. Med.*, **64**(3), 330 (2010).
 41. J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M. Leahy, W. G. Smith, and K. Seibert, Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**(8), 3228 (1994).