

## 적작약 꽃 추출물의 활성산소 억제와 항염증 및 MMP-1 발현 억제능 효과에 관한 연구

이재남<sup>a</sup> · 김영삼<sup>b†</sup>

건국대학교 산업대학원 향장학과, 건국대학교 산업대학원 이미지산업학과  
(2018년 8월 15일 접수: 2018년 9월 13일 수정: 2018년 9월 17일 채택)

### The Effects of *Paeonia Lactiflora Pallas* on Inhibition of Oxygen Free Radical, Anti-inflammation and MMP-1 Inhibitory Activity

Jae-Nam Lee<sup>a</sup> · Young-Sam Kim<sup>b†</sup>

<sup>a</sup>Department of Cosmetology, Graduate School of Engineering, Konkuk University,  
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

<sup>b†</sup>Department of Image Industry, Graduate School of Engineering, Konkuk University,  
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

(Received August 15, 2018; Revised September 13, 2018; Accepted September 17, 2018)

**요약** : 본 연구는 적작약 꽃 추출물의 활성산소 억제와 항염증 및 MMP-1 발현 억제능 효과에 관해 알아보고 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 본 실험 방법으로는 세포 내 ROS 측정을 통한 활성산소 억제효과와 세포 독성 평가 및 항염증 측정, HDF 세포에서의 MMP-1의 발현 억제능 효과를 측정하고자 하였다. 실험 결과, RAW 264.7 세포와 HDF 세포 내에서 ROS로 억제효과를 확인하였고, 세포 독성평가는 적작약 꽃 추출물 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리 농도에서 90% 이상의 세포 생존율, 그 외 처리 농도에서는 80% 이상의 세포 생존율을 확인하였다. 또한 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제와 HDF 세포에서 MMP-1의 발현 억제능이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하면, 적작약 꽃 추출물의 세포 내 ROS 생성억제와 NO 생성 억제로 항산화와 항염증 효과, 피부세포에 대한 낮은 독성, MMP-1의 발현 억제를 통한 노화 효과가 확인됨에 따라 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

**주제어** : 항염증, 적작약 꽃, 항노화, 세포독성, 활성산소

**Abstract** : This study attempted to investigate the effects of *Paeonia Lactiflora Pallas* (*P. lactiflora*) on the inhibition of oxygen free radical, anti-inflammation and MMP-1 inhibitory activity and examine its possibility as a functional cosmetic material. For test methods, the inhibition of oxygen

---

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: gracehelen@konkuk.ac.kr)

free radical after measuring reactive oxygen species (ROS) in the cell, cytotoxicity assessment and anti-inflammation were measured, and MMP-1 inhibitory effects in the HDF cell were measured. According to the test, the inhibition of ROS was confirmed in RAW 264.7 and HDF cells. In terms of cytotoxicity assessment, 90% or higher cell viability was detected at 5/10  $\mu\text{g/mL}$  *Paeonia Lactiflora Pallas* extract while it was 80% or higher at other concentration levels in both RAW 264.7 and HDF cells. In addition, NO production was inhibited in the RAW 264.7 cell while MMP-1 was significantly inhibited in the HDF cell. The above results reveal a possibility of *Paeonia Lactiflora Pallas* extract as a functional cosmetic material after confirming the inhibition of ROS synthesis in the cell, antioxidant and anti-inflammatory effects by inhibiting NO synthesis, low toxicity on skin cells and anti-aging effect through MMP-1 inhibition.

*Keywords* : Anti-inflammatory, *Paeonia Lactiflora pallas* (*P. lactiflora*), Anti-oxidant, Reactive Oxygen Species(ROS), cytotoxicity

## 1. 서론

적작약은 모간과(미나리아재비과, Ranunculaceae)에 속하는[1] 뿌리가 붉은 빛이 도는 품종으로 학명은 *Paeonia lactiflora palls*이다. 보통 높이 50~80 cm 정도로 자라고, 꽃은 5월~6월에 피며 꽃 색깔에 따라 백작약, 적작약으로 나누기도 한다. 꽃은 원줄기 끝과 가지 끝에 5~10 cm 정도의 크고 탐스러운 적색 꽃이 한 송이씩 화사하게 달리고, 꽃잎은 8~11장이 붙어 있으며, 꽃 가운데 많은 황색의 수술을 가지고 있다. 적작약 꽃은 건조하여 차로 마시면 약간 시고 쓴 맛이 나며 보혈보신 기능이 있어 진통, 해열, 조혈작용이 있다. 또한 적작약 뿌리는 열과 어혈 등에 특히 효험이 있어 한방에서는 발열, 오한, 두통, 요통, 관절염, 피부염, 비출혈 등에 효과를 보여 오래 전부터 한약재로 이용되고 있다[2]. 적작약의 주요 성분은 paeoniflorin, paeonin, paeonol, 정유 및 tannin 등으로 항염증에 유의하게 작용한다고 보고되고 있으며[3-7], 특히 꽃잎에는 항염증 작용을 하는 methyl gallate, 주요 플라보노이드로 항산화 작용이 있는 astragalinal 성분 함유되어 있다[8, 9].

염증은 다양한 유형의 감염이나 대사 물질에 의한 자극에 의해 생성되는 생체조직 방어 반응의 하나로서 대부분의 질환이 이에 속하며, 질환은 주로 염증반응에 관여하는 세포인 macrophage나 monocyte등이 Reactive Oxygen Species (ROS) 활성산소종과 Reactive Nitrogen Species(활성질소종) 및 Nitric Oxide (NO)나 Prostaglandin E2

(PGE2), 염증성 cytokine 등의 염증 매개물질들을 분비하여 발생한다[10-13]. 때문에 NO의 생성이나 PGE2, Reactive Oxygen Species, 염증성 사이토카인 등의 발현억제는 염증성 질환을 치료하거나[14] 노화 예방에 있어서 중요한 목표가 된다.

이에 따라 최근에는 독성이 적은 천연물로부터 염증 매개물질 조절에 의한 항염증 물질 및 항노화 물질 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 천연물 소재에서 추출한 생리활성물질들은 항염증뿐만 아니라[15, 16] 항산화작용과 미백작용[17], 피부자극 완화효과가 우수하여 그 효능에 대한 연구가 계속해서 진행되고 있다.

현재까지 적작약의 효능에 대한 국내 연구 동향으로는 赤芍藥이 강제수영부하시험에서 CRF, c-Fos와 TH에 미치는 영향에서 항우울증 효과[18], 지실과 적작약 추출물의 항균효과에 관한 연구[19], 赤芍藥추출물이 大食細胞에서 NO 및 PGE2 생성에 미치는 영향[20] 등에 관한 연구가 보고되고 있다. 하지만 현재까지 기능성 화장품 소재로써 적작약 꽃에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 적작약 꽃 추출물의 화장품 소재로써의 가능성을 알아보고자 하였다. 먼저 세포실험을 시행하여 대식 세포인 RAW 264.7 세포와 HDF 세포내 Reactive oxygen species (ROS) 측정을 통한 활성산소 억제효과와 세포 독성 평가 및 항염증 측정, HDF 세포에서의 MMP-1의 발현 억제능 효과 측정을 하였으며, 이 자료를 기반으로 적작약 꽃 추출물의 활성산

소 억제효과와 항염증효과 및 항노화 효과를 가진 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료

#### 2.1.1. 재료 및 추출

본 연구에 사용된 적작약 꽃은 전라도 함양에서 채취하여 건조시킨 것을 실험재료로 구입하였다. 시료의 추출은 적작약 꽃 100 g에 70 % ethanol 용액에 중량의 10배의 양을 가한 후 실온에서 72 h 방치하였다. 이후 추출물의 상층액을 정제한 후, 추출액만 분리하기 위하여 원심분리(FinePCR, Korea)를 시행 한 후 여과지(whatman No.2)를 이용하여 상층액을 여과하였고, Rotary evaporator(EYELA, Japan)를 사용하여 추출 용매인 에탄올을 제거하였다. 감압 농축 후 동결건조(FDU-8606, Operaon Gimpo, Korea)를 실시하여 분말형태의 적작약 꽃 추출물을 얻었으며 본 실험의 시료로 사용하였다.

#### 2.1.2. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 Dichlorofluorescein diacetate, griess reagent, lipopolysaccharide, neutral red solution, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), L-tyrosine, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, formaldehyde, phosphate buffered saline solution (PBS), primary antibody(anti-MMP-1 mouse antibody), secondary antibody(alkaline phosphatase conjugated antibody-IgG antibody), p-nitrophenyl phosphate Sigma Chemical Co. (USA)로부터 구입하여 사용하였고, 그 외의 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

#### 2.1.3. 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용한 HDF (Human Dermal Fibroblast), RAW 264.7 macrophage 세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 구입한 세포주들은 High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; HYCIONE, USA)배지에 사용하였으며, 이 배지에 10% fetal bovine serum

(FBS; Sima-Aldrich, USA)과 1% antibiotic-antimycotic (Sima-Aldrich, USA)을 통해 37°C의 온도에서 상대습도 100%, 5%의 CO<sub>2</sub> incubator 안에서 배양하였다.

### 2.2. 실험 방법

#### 2.2.1. RAW 264.7 세포, HDF 세포 내 ROS 측정

적작약 꽃 추출물의 세포내 활성산소 억제 효과를 측정하기 위하여 Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 방법을 이용하여 세포 내 ROS 농도 변화를 측정하였다. RAW 264.7 세포, HDF 세포를 이용하여  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주 한 후 24 h 배양하였다. 24 h 후 DCF-DA 10  $\mu$ M 첨가하여 30 min 동안 어두운 곳에서 배양한 후 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA)을 이용하여 485 nm excitation 530 nm emission wavelength에서 ROS의 변화량을 측정하였다.

#### 2.2.3. Neutral Red (NR) assay를 이용한 세포 독성 평가

적작약 꽃 추출물의 세포독성을 평가하기 위하여 Moon & you의 방법[21]에 따라 neutral red (NR) assay를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포, HDF 세포를 사용하여 96 well plate에 well 당  $3 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하고, 24 h 동안 배양기에서 부착시켰다. 세포 부착 확인 후, 적작약 꽃 추출물을 농도별로 무혈청 배지에 희석하여 처리한 후 37°C에서 CO<sub>2</sub> 배양기에서 48 h 동안 배양하였다. 배양한 세포는 배양액을 NR solution (Sigma-Aldrich, USA)이 1% 포함된 무혈청 배지로 교환하여 3 h 동안 배양한 다음 현미경하에서 NR의 결정화 유무를 확인하였다. 세포 고정액으로 10% formaldehyde 용액이 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100  $\mu$ L로 20 min 처리하여 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100  $\mu$ L로 분주하여 세포 내의 NR을 추출하고 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 동일한 조건으로 3회 반복 실험하여 평균값을 측정하였다. 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

세포 생존율(100%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

#### 2.2.4. Nitric oxide (NO) 생성 억제능 측정

적작약 꽃 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여 Nitric Oxide (NO) 생성 억제능을 측정하였다. 측정 방법은 세포 배양액내 NO양을 nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)와 nitrate(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 형태로 측정하는 Green의 방법[22]을 이용하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well당 5×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주하고, 24 h 동안 배양 후 배지를 제거한 다음 lipopolysaccharide (LPS) 1 μg/mL 농도로 처리된 배지에 적작약 꽃 추출물을 농도별로 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 새로운 96 well plate에 Griess reagent (Sigma-Aldrich, USA) 100 μL와 배양된 세포 배양 상층액 100 μL을 가하여 차광된 상태에서 10 min 반응시킨 후 microplate reader (Synergy HT; BioTek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성 억제능은 다음의 식에 따라 산출하였다.

NO 생성 저해능(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

#### 2.2.5. HDF cell에서의 MMP-1의 발현 억제능 측정

적작약 꽃 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF 세포를 96 well plate에 well당 3×10<sup>4</sup> 씩 부착시켜 배양하였다. 12 h 후 상층액을 버리고 DMEM에 녹인 추출물을 농도별로 처리한 후 UVB를 20 min 조사하고 24 h 배양하였다. 배양 상층액 100 μL를 96 well plate에 옮긴 후 coating buffer 100 μL를 첨가하여 고정시킨 후, 다시 배양 상층액을 제거한 다음 PBS-T (PBS, 0.05% Tween-20)로 washing을 하고 blocking buffer (PBS, 0.1% BSA) 처리 후 37°C에서 1 h 동안 방치시킨 후 PBS-T로 washing 하였다. blocking solution으로 1,000배 희석한 primary antibody (anti-MMP-1 mouse antibody)를 처리 후 37°C에서 1 h 동안

방치한 후 PBS-T로 washing 후 4,000배 희석한 secondary antibody (alkaline phosphate conjugated anti-mouse IgG antibody)를 각 well에 처리하여 37°C에서 1 h 방치시켰다. 마지막으로 PBS-T washing하고 1 mg/mL의 농도로 녹인 p-nitrophenyl phosphate (in 9.7% diethanolamine buffer, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.8)를 각 well에 처리 후 37°C 암실에서 1 h 동안 방치시켜 405 nm 흡광도를 측정한다.

#### 2.3. 통계

본 실험의 연구 결과는 평균±표준편차(mean±standard deviation, M±SD)로 표기하였으며, 통계 처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) window version 17.0(IBM, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 실시하였고, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. RAW 264.7 세포내 Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포내에 증가된 ROS는 DNA와 미토콘드리아의 손상, 세포 또는 조직의 손상과 염증, 노화와 관련한 변성, 종양 생성 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, ROS를 소거하는 방어기작으로 항산화 효소들이 존재하여 이들 사이의 항상성이 깨지게 되면 질병의 발생이 증가하게 된다 [23-25].

본 실험에서는 적작약 꽃 추출물의 RAW 264.7 세포 내 활성산소 억제에 미치는 효과를 확인하기 위하여 세포 대사 과정 중에서 발생하는 세포 내 ROS를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 실험 결과 적작약 꽃 추출물을 처리하였을 때 농도 의존적인 ROS 생성 억제 효과가 확인되었으며, 특히 10, 25, 50, 100 μg/mL 농도에서 유의하게 억제됨을 확인하였다. 이와 같은 결과는 적작약 꽃 추출물이 항산화 활성과 세포 내 ROS 활성 억제 효과로 인하여 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있을 것으로 사료되어 진다.

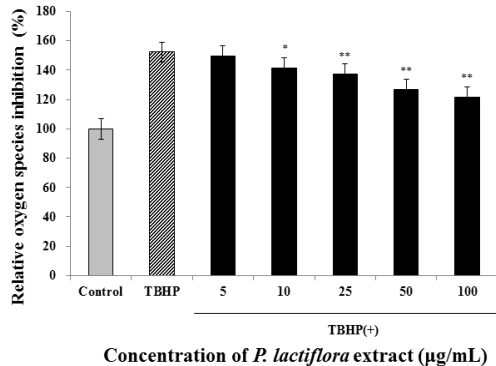


Fig. 1. Reactive oxygen species (ROS) inhibition of *Paeonia lactiflora* extract. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (\* $p$ <.05, \*\* $p$ <.01).

### 3.2. HDF 세포내 Reactive oxygen species (ROS) 측정

자외선과 미세먼지, 세균 등과 같은 외부환경에 의해 피부는 ROS와 NO의 연쇄 반응을 통해 노화가 촉진되고 염증질환 등이 발생된다[26, 27]. ROS를 소거하는 방어기작으로 항산화 효소들이 존재하여 이들 사이의 항상성이 깨지게 되면 질병의 발생이 증가하게 된다[23-25]. 본 실험에서는 적작약 꽃 추출물이 HDF 세포 내 활성산소 억제에 미치는 효과를 확인하기 위하여 세포 대사 과정 중에서 발생하는 세포 내 ROS를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 실험 결과, 적작약 꽃 추출물을 처리하였을 때 농도 의존적인 ROS 생성 억제 효과가 확인되었으며, 특히 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL 농도에서 유의하게 억제됨을 확인하였다. 이와 같은 결과는 적작약 꽃 추출물이 항산화활성과 세포 내 ROS 활성 억제 효과로 피부에서 항염증과 항산화제로서 작용할 수 있음을 의미하는 것으로 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있을 것으로 사료되어진다.

### 3.2. RAW 264.7 대식세포의 세포독성 측정 결과

RAW 264.7 대식세포는 마우스 유래 대식세포주이며, LPS (lipopoly saccharide)에 의해 염증반응이 활성화되어 염증성 사이토카인을 방출하는 것으로 알려져 있다[14]. 본 실험에서는 적작약 꽃 추출물의 RAW 264.7 대식세포에 대한 독성

평가하기 위하여 NR assay를 수행하여 Fig. 3에 나타내었다. 실험결과, 적작약 꽃 추출물 5, 10  $\mu$ g/mL 처리 농도까지 90% 이상의 세포 생존율이 나타났으며 25, 50, 100  $\mu$ g/mL 처리 농도에서 세포 생존율이 각각 13.3%, 17.3%, 19.6% 감소하였지만 세포 생존율에 크게 영향을 주지 않는다고 판단하였다. 따라서 본 연구의 적작약 꽃 추출물이 RAW 264.7 세포에 대한 유의한 독성이 나타나지 않은 것을 확인하였다. Kim *et al.*, (2016)의 연구에서는 마우스 대식세포 RAW 264.7 세포에 백작약 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 세포독성을 측정한 결과 세포 독성이 낮은 것으로 보고하여[28] 본 연구 결과와 유사하였다.

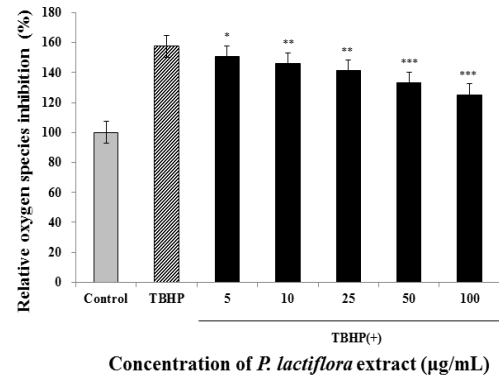


Fig. 2. Reactive oxygen species (ROS) inhibition of *Paeonia lactiflora* extract. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (\* $p$ <.05, \*\* $p$ <.01, \*\*\* $p$ <.001).

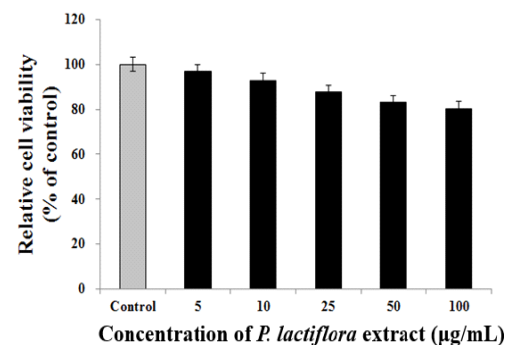


Fig. 3. Cytotoxicity in RAW 264.7 cells. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

### 3.3. HDF에 대한 세포독성 측정 결과

적작약 꽃 추출물의 HDF 세포에 대한 독성을 확인하기 위하여 NR assay를 수행하여 측정된 독성평가를 Fig. 4에 나타내었다. 실험 결과, 적작약 꽃 추출물의 5, 10  $\mu\text{g/mL}$  처리 농도까지 90% 이상의 세포 생존율이 나타났으며, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 세포 생존율이 각각 14.8%, 17.5%, 19.7% 감소하였지만 세포 생존율에 크게 영향을 주지 않는다고 판단하였다. 따라서 본 연구에서는 적작약 꽃 추출물이 HDF 세포에 대한 유의한 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다.

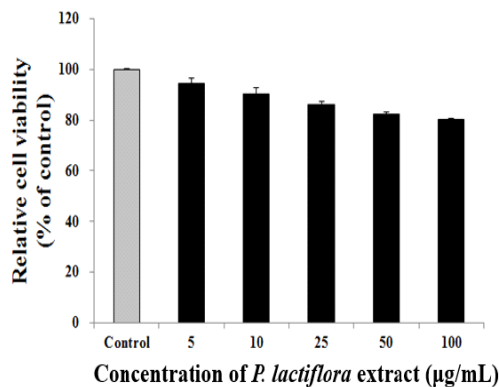


Fig. 4. Cytotoxicity in HDF cells. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

### 3.4. RAW 264.7 cell에서의 항염증 측정 결과

Macrophage가 분비하는 세포독성 물질로 알려진 NO (nitric oxide)는 과량 생성 시 조직과 신경 손상을 유발하고, 유전자 변이를 유도하거나, 부종을 유발하는 등 과도한 염증반응을 일으킨다 [29-31]. 그러나 NO는 체내에서 세균과 종양을 제거하고, 신경전달을 매개하거나 혈압을 조절하는 등 다양한 역할을 담당하는 중요한 인자로 알려져 있으며 [32], 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포는 LPS의 자극에 반응하여 매우 효과적으로 염증인자들이 생성되기 때문에 유용한 항염증 물질을 찾는 선별 시험에서 주로 사용하고 있다 [33, 34]. 본 실험에서는 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효과를 확인하고자 염증 매개물질인 LPS로 염증을 유도한 뒤 NO 생성억제 측정 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과, 적작약 추출물 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  처리 농도에서 82.90, 77.28, 69.78, 62.76, 57.61%의 NO 생성

이 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. Han(2011)의 연구에서 열수 추출한 赤芍藥의 농도가 25, 125  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 염증 유발물질인 NO 생성에 유의한 억제 효과가 있는 것으로 보고하였고 [20], Jo *et al.*, (2012)의 연구에서는 백작약 에탄올 추출물이 아토피 피부염을 유발시킨 마우스에 도포 시 염증성 사이토카인을 감소시키는 것으로 보고되었다 [35]. 이와 같은 결과는 본 연구 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제가 확인됨에 따라 항염증 효과가 있음을 의미하는 것으로 적작약 꽃 추출물은 염증을 완화시킬 수 있는 화장품 소재로서의 활용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

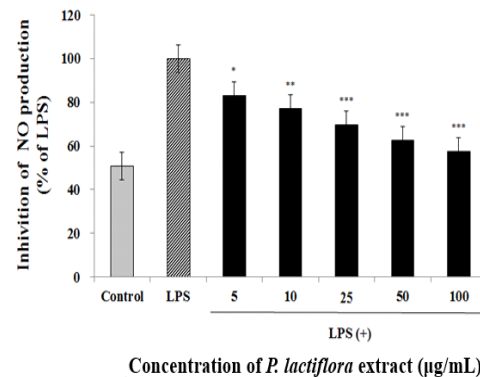


Fig. 5. Inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 cell treated with *Paconia lactiflora* extract. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ ).

### 3.5. HDF 세포에서 MMP-1의 발현 억제 측정 결과

matrix metallo proteinase (MMP)는 세포외기질을 분해시키는 중요한 효소 단백질로 교원섬유와 더불어 피부노화 지표로 사용되고 있다 [36]. 반복적인 자외선 노출은 ROS를 촉진하고, ROS에 의해 피부의 각질형성세포에서 분비되는 cytokine이 fibroblast을 자극해 MMP-1의 생성을 증가시키며, 콜라겐의 전구물질인 type-1 procollagen의 분해를 촉진시켜 굵고 거친 광노화 주름을 형성시킨다 [37, 38]. 본 실험에서는 적작약 꽃 추출물이 HDF 세포에서 MMP 발현 억제능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF 세포에 UVB

100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 를 조사하였다. 시료 무처리군은 Control로 설정하고 적작약 꽃 추출물을 농도별로 처리하여 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과, 적작약꽃 추출물의 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리 농도에서 79.38%, 72.34%, 66.225%, 53.45%, 42.42%의 MMP-1의 발현이 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 MMP-1 발현 억제 활성이 있는 것으로 평가할 수 있다. Ghersetich *et al.*, (1994)와 KiM(2018)에 의하면 항노화 물질은 collagen의 형성을 증가시키고 단백질가수분해 효소 MMP의 활성과 발현을 감소시킴으로써 피부의 주름과 노화를 완화시켜 준다고 보고하였다 [39, 40]. 이와 같은 본 연구결과 적작약 꽃 추출물의 사용은 효과적으로 MMP-1이 진피 내 과다하게 축적되는 것을 억제하고 콜라겐 분해를 감소시킴으로써 피부 탄력의 유지 및 주름 형성을 억제할 수 있을 것으로 사료되어 적작약 꽃 추출물이 항노화 화장품 소재로서 가능할 것으로 판단된다.

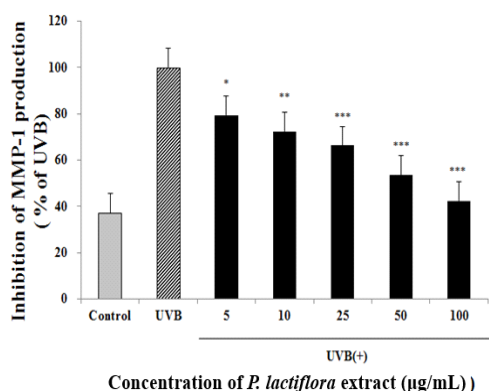


Fig. 6. Inhibitory effect of *Paeonia lactiflora* extract on UVB-induced secretion of MMP-1 by HDF cells. The results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments (\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ ).

#### 4. 결론

최근에는 천연 화장품 개발과 건강한 아름다움을 위해 화학적으로 합성된 물질보다 유효성, 안전성, 안정성이 높은 친환경적인 천연물 소재에서 추출한 생리활성 물질들에 대한 효능 연구가 증

가하고 있는 추세이다. 본 연구는 적작약 꽃 추출물의 활성산소 억제와 항염증 및 MMP-1 발현 억제능 효과에 관해 알아보고, 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인하고자 RAW 264.7 세포와 HDF 세포 내에서 ROS 측정을 통한 활성산소 억제효과와 세포 독성 평가 및 항염증 측정, HDF 세포에서의 MMP-1의 발현 억제능 효과를 측정하고자 하였다. 본 실험 결과 세포 독성평가에서 적작약 꽃 추출물 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리 농도에서 90% 이상의 세포 생존율, 그 외 처리 농도에서는 80% 이상의 세포 생존율을 나타내어 B16F10 melanoma 세포와 HDF 세포에 대해 세포 독성을 나타내지 않았다. ROS 생성 억제효과를 측정한 결과 RAW 264.7 세포와 HDF 세포 내에서 ROS 생성 억제효과를 확인하였고, LPS에 의해 유도된 NO 생성 억제 측정 결과 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제효과를 확인하였으며, 자외선 UVB에 의해 발현을 유도한 MMP-1의 발현 억제능 결과에서는 HDF 세포에서 MMP-1의 발현 억제능이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 통해 적작약 꽃 추출물의 세포내 ROS 생성 억제와 NO 생성 억제로 항산화 및 항염증 효과, 피부세포에 대한 낮은 독성, MMP-1의 발현 억제를 통해 항노화 효과가 확인됨에 따라 염증 및 주름개선을 위한 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인할 수 있었다.

#### References

- Gong P, Lu Z, Xing J, Wang N, Zhang Y. "Traditional chinese medicine xuebijing treatment is associated with decreased mortality risk of patients with moderate paraquat poisoning", *journal PLoS One*, Vol.10, No.4 pp. 1371-1370, (2015).
- S. G. Yun, "Study on antibacterial effect of the extracts From Poncirus trifoliata and Paeonia lactiflora", *Kangwon National University Doctoral Thesis*, pp. 1-29, (2015).
- Wang Q, Dai N, Han N, Ao W. "Two new compounds from Paeonia lactiflora", *Nat Prod Commun*, Vol.10, No.2 pp. 323-432, (2015).

4. Muñoz G, Campos F, Salgado D, Galdames R, Gilchrist L, Chahin G, Andrade O, "Molecular identification of Botrytis cinerea, Botrytis paeoniae and Botrytis pseudocinerea associated with gray mould 32 disease in peonies (*Paeonia lactiflora* Pall.) in Southern Chile", *Rev Iberoam Micol.*, Vol.33, No.1 pp. 43-47, (2016).
5. Chen P, Zhou X, Zhang L, Shan M, Bao B, Cao Y, Kang A, Ding A. "Anti-inflammatory effects of Huangqin tang extract in mice on ulcerative colitis", *J Ethnopharmacol.*, Vol.13, No.162 pp. 207-214, (2015).
6. Wang Q, Liang Z, Peng Y, Hou JL, Wei SL, Zhao ZZ, Wang WQ, "Whole transverse section and specific-tissue analysis of secondary metabolites in seven different grades of root of *Paeonia lactiflora* using laser microdissection and liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry", *J. Pharm Biomed Anal.* Vol.103, pp. 7-16, (2015).
7. Zhang J, Li H, Huo R, Zhai T, Li H, Sun Y, Shen B, Li N. "Paeoniflorin selectively inhibits LPS-provoked B-cell function". *J. Pharmacol Sci.*, Vol.128, No.1 pp. 8-16, (2015).
8. S. J. Kim, J. H. Park, G. W. Kim "Change of Medicinal Components by Different Species, Plant Parts and Growth Stage of *Paeonia* spp", *Kor. Journal of Crop Science.*, Vol.51, No.3 pp. 215-219, (2006).
9. W. J. Choung, S. H. Hwang, D. S.Ko, S. B. Kim, S. H. Kim, S. H. J, H. D. Choi, S. S. Lim, J. H. Shim, "Enzymatic Synthesis of a Novel Kaempferol-3-O- $\beta$ -d-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -d-glucopyranoside Using Cyclodextrin Glucanotransferase and Its Inhibitory Effects on Aldose Reductase, Inflammation, and Oxidative Stress", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.65, No.13 pp. 2760-2767, (2017).
10. Bogdan, C. "Nitric oxide and the immune response", *Nat. Immunol.*, Vol.2, No.10 pp. 907-916, (2001).
11. Y. H. Chang, S. T. Lee, W. W. Lin, "Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids", *J. Cell Biochem.*, Vol.81, No.4 pp. 715-723, (2001).
12. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E, "Nitric oxide production and signaling in inflammation", *Curr Drug Targets Inflamm. Allergy*, Vol.4, No.4 pp. 471-479, (2005).
13. Raison CL, Capuron L, Miller AH. "Cytokines and the blues: inflammation and the pathogenesis of depression", *pubmed Trends Immunol.*, Vol.27, No.1 pp.24-31, (2006).
14. J. H. Shim. "Anti-inflammatory Effect of Galium aparine Extract in RAW264.7 Cells", *Asian J Beauty Cosmetol.* Vol.16, No.2 pp. 223-242, (2018).
15. M. Y. Kim. "The Hair Protection Effects of Microcapsule Treatment of Moutan Cortex Radicis at the time of Hair Permanent Wave Treatment", *Wonkwang University Doctoral Thesis*, pp. 1-125, (2014).
16. M. O. Jeon, J. S. Moon, "Study on Applicability of *Pinus koraiensis* Siebold et Zucc Leaf Extract as a Cosmetic Ingredient", *Journal of Oil & Applied Sciencety*, Vol.34, No.3 pp. 602-612, (2017).
17. S. h. You, "Antioxidant Activity and Whitening activity of *Psidium guajava* leaf extract", *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, Vol.34, No.2 pp. 296-304, (2017).
18. M. K. Min, "Effects of *Paeoniae Radix Rubra* on CRF, c-Fos and TH in FTS", *Kyungwon University Doctoral Thesis*, (2009).
19. S. G. Yun, "Study on antibacterial effect of the extracts From *Poncirus trifoliata* and *Paeonia lactiflora*", *Kangwon*



- National University Doctoral Thesis*, (2015)
20. S. Y. Han, "Effect of Paeoniae Radix Rubr aextract on the production of NO and Prostaglandin E<sub>2</sub> in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages", *Korean Medicine major Semyung University Master Thesis*, (2011).
  21. J. S. Moon, S. H. You, "A Study on Anti-oxidative, Anti-inflammatory, and Melanin Inhibitory Effects of Chrysanthemum Sibiricum Extract", *Journal of the Korean oil chemists' society*, Vol.33, No.4 pp. 762-770, (2016).
  22. Green stork CL. "Radiation and aging free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention". *J. Med. Hypotheses*, Vol.41, pp. 473-482, (1993).
  23. B. R. Yoon, B. J. Cho, H. K. Lee, D. J. Kim, S. K. Rhee, H. D. Hong, K. T. Kim, C.W. Cho, H. S. Choi, B. Y. Lee, O. H. Lee, "Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from Tartary and Common buckwheats", *Korean J Food Preserv.*, Vol.19, No.1 pp. 123-130, (2012).
  24. S. S. Kim, S. M. Son, "Oxidative stress and cell dysfunction in diabetes: Role of ROS produced by mitochondria and NAD(P)H Oxidase", *Korean J Diabetes.*, Vol.32, No.5 pp. 1976-9180, (2008).
  25. Y. A. Kim, S. H. You, "Antioxidant Activity and Anti-inflammatory effects of Sicyos angulatus L. extract", *Journal of Oil & Applied Science.*, Vol.4, No.3 pp. 536-544, (2017).
  26. J. Kim, C. W Lee, E. K. Kim, S. J. Lee, N. H. Park, H. S. Kim, H. K. Kim, K. Char, Y. P. Jang, J. W. Kim, "Inhibition effect of Gynura procumbens extract on UV-B-induced matrix metallo proteinase expression in human dermal fibroblasts". *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.137, pp. 427-433, (2011).
  27. H. S. Talwar, C. E. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton, J. J. Voorhees, "Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.105, pp. 285-290, (1995).
  28. M. Y. Kim, B. Y. Yoon, K. S. Ko, "Study on Cosmeceutical Activities of Paeonia japonica Ethanol Extracts", *Journal of The Korean Society of cosmetology*, Vol.22, No.4 pp. 818-823, (2016)
  29. Gabay C. "Interleukin-6 and chronic inflammation", *Arthritis Research & Therapy*, Vol.8, No.2 pp. 1917-1924, (2006)
  30. D. Y. Im, "Volatile compounds analysis of the extract from dried bark of Prunus sargentii and physiological activity of the main compound, benzaldehyde". *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, Vol.12, pp. 155-162, (2014).
  31. Van Triel JJ, Arts JH, Muijser H, Kuper CF. "Allergic inflammation in the upper respiratory tract of the rat upon repeated inhalation exposure to the contact allergen-dinitrochlorobenzene (DNCB)". *Toxicol. Lett.*, Vol.269, No.1 pp. 73-80, (2010).
  32. H. J. Lee, B. Y. Sim, J. W. Bak, D. H. Kim, "Effect of Gami-sopungsan on inflammation and DNCB-induced dermatitis in NC/Nga in mice", *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine.*, Vol.28, pp. 146-153. (2014).
  33. K. A. Kim, H. S. Yi, H. J. Yun, S. D. Park, "Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Fractionated Extracts of Cynomorium Songaricum", *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.*, Vol.23, No.6 pp. 1320-1331, (2009).
  34. M. J. Kim, J. N. Lee. "A Study on Peucedanum Japonicum Thunberg Extract on Anti-oxidation and Cell Activities as Cosmetic Additive", *Journal of The Korean Society of cosmetology.*, Vol.22, No.6 pp. 1135-1143, (2016).
  35. G. H. Jo, "Effect of Paeoniae radix alba or Dictamini radices cortex application on atopic dermatitis like immune alterations

- in mice”, *Catholic University of Daegu Doctoral Thesis*, pp. 93-94, (2012).
36. Homebeck W, “Downregulation of tissue inhibitor of matrix metallo protease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival”, *Pathologie Biologie*, Vol.51, pp. 569-573, (2003).
37. Scharffetter-Kochanek K., Wlaschek M., Briviba K., Sies H. “Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts”. *FEBS Lett.*, pp. 304-306, (1993).
38. J. N. Lee, “Effect of Oral Curcumin Administration and Full Body Massage on the Improvement of Obesity and Skin Conditions in Female College Students”, *Konkuk University Doctoral Thesis*, p. 17, (2011).
39. Ghersctich I, Lotti T, Campanile G, Grapponc, Dini G, “Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging”, *int J Dermatol.*, Vol.33, No.2 pp. 119-122, (1994).
40. Y. A. Kim, S. H. You, “Antioxidant Activity and Anti-inflammatory effects of *Sicyos angulatus* L. extract”, *Journal of Oil & Applied Science.*, Vol.34, No.3 pp. 536-544, (2017).