

택란 추출물 및 분획물의 항산화, 항균 및 세포 보호 효과

이진경[#] · 박영민[#] · 이상래 · 송바름 · 이윤주 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소, 코스메틱 용·복합산업 지원센터
(2018년 12월 10일 접수, 2018년 12월 19일 심사, 2018년 12월 26일 채택)

Antioxidant, Antimicrobial and Cellular Protective Effects of *Lycopus lucidus* Extract and Fraction

Jin Kyoung Lee[#], Young Min Park[#], Sang Lae Lee, Ba Reum Song, Yun Ju Lee, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center, Seoul National University
of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
(Received December 10, 2018; Revised December 19, 2018; Accepted December 26, 2018)

초 록

본 연구에서는 택란(*Lycopus lucidus*)의 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물에 대하여 항산화, 항균 및 세포 보호 효과를 비교 분석하였다. 택란 추출물 및 분획물의 자유 라디칼 소거 활성을 측정된 결과(FSC₅₀), 추출물은 65.1 µg/mL, 분획물은 64.9 µg/mL로 나타났다. Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 활성산소 소거 활성(OSC₅₀) 각각, 6.6, 6.3 µg/mL로 모두 총 항산화능이 뛰어났다. 항균 활성에서, 추출물은 *S. aureus*에서, 분획물은 *A. niger*를 제외한 모든 균에서 활성을 나타냈다. 택란 추출물 및 분획물의 세포 보호 효과 비교 결과, ¹O₂로 유도된 적혈구 세포손상에 대한 보호 효과(τ₅₀)는 50 µg/mL에서 각각 51.3, 73.7 min로 나타났다. 과산화수소와 UVB로 손상된 각질형성세포에 대한 세포 보호 효과에서 추출물은 각각 효능을 나타내지 않고, 1-2 µg/mL에서 효능을 나타냈다. 분획물은 각각 세포 생존율을 최대 85.8, 81.9%까지 증가시켰다. 세포 내 ROS 소거 활성 결과, 분획물 1-2 µg/mL에서 소거 활성을 나타내었다. 종합적으로 택란 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 생리활성을 비교한 결과, 택란 에틸아세테이트 분획물은 추출물과 비슷한 항산화 효능을 가지며, 항균 및 세포 보호 효과에서 추출물보다 뛰어난 효과를 나타냄으로써 외부 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는 화장품 소재로 응용가능성이 있음을 시사한다.

Abstract

In this study, antioxidative, antibacterial and cytoprotective effects of the ethanol extract and ethylacetate fraction of *Lycopus lucidus* (*L. lucidus*) were compared and analyzed. Free radical scavenging activities (FSC₅₀) of the *L. lucidus* extract and fraction were found to be 65.1 and 64.9 µg/mL respectively. In the Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system, the reactive oxygen species (ROS) scavenging activities (OSC₅₀) for the extract and fraction were 6.6 and 6.3 µg/mL, respectively which showed excellent total antioxidant abilities. The extract showed antibacterial activity against *S. aureus*, while the fraction showed in all the bacteria except for *A. niger*. The cytoprotective effect of *L. lucidus* extract was compared to that of the fraction and the effect against ¹O₂-induced cellular damage of human erythrocytes (τ₅₀) was 51.3 and 73.7 min at 50 µg/mL, respectively. For the cytoprotective effect of keratinocytes damaged by H₂O₂ and UVB, the extracts did not show any efficacy but showed efficacy at 1-2 µg/mL, respectively. The fraction increased the cell viability up to 85.8 and 81.9%, respectively. As a result of intracellular ROS scavenging activity, the scavenging activity was observed at 1-2 µg/mL of the fraction. From the results comparing the physiological activities of *L. lucidus* extract and the fraction, the ethylacetate fraction of *L. lucidus* has antioxidative effect similar to that of the extract whereas superior antimicrobial and cytoprotective effects than that of the extract. Overall, the ethylacetate fraction of *L. lucidus* protects cells from an external stress which can be used as a potential cosmetic material.

Keywords: *L. lucidus*, ROS, Antimicrobial, Antioxidative, Cytoprotective effect

1. 서 론

피부는 우리 몸의 최외각 방어망으로 자외선, 항원, 미생물 등의 외부 자극으로부터 신체를 보호하는 역할을 한다[1]. 피부는 피부 상재균에 따라 심각한 염증, 피부 질환이 유발할 수 있으므로 미생물에 대한 관리가 필요하다. 피부 상재균 외에도 화장품을 변질시키는 세균

[†] Corresponding Author: Seoul National University of Science and Technology, Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr

[#] These authors contributed equally to this work.

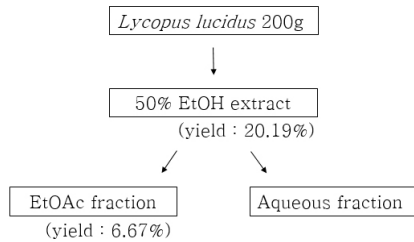


Figure 1. Manufacturing process of 50% ethanol extract and ethyl acetate fraction from *L. lucidus* and their yield.

이 피부에 영향을 미치기 때문에, 이러한 균을 사멸시키기 위해 다양한 방부제나 항균제가 사용된다[2]. 화장품에 사용되는 방부제의 종류는 매우 다양하나 일반적으로 파라벤류, 페녹시에탄올 등을 많이 사용한다. 그러나 이러한 화학 방부제들이 오히려 피부 알러지를 일으킬 수 있음이 밝혀지면서 이를 대신할 수 있는 천연방부제에 대한 관심이 높아지고 있다[3-5].

또한 피부는 다양한 환경적 요인에 의해 직접적으로 노출되어 피부 노화가 가속화된다. 피부 노화는 피부 세포 및 조직에서 나타나는 복합적인 생물화학적 현상으로 가장 중요한 요인은 자외선에 의한 광노화이다[6]. 자외선은 UVA, UVB, UVC로 크게 구분되며, 그중 UVB는 피부 표피까지 침투하며, 에너지가 크기 때문에 피부노화에 큰 영향을 미친다[7]. 자외선에 노출된 피부에서는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 따라서 ROS는 피부의 산화적 손상을 실질적으로 증가하고 있다. ROS의 종류에는 singlet oxygen (1O_2), superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 그리고 hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 포함된다. 이들은 광증감 반응 및 여러 효소 반응을 포함하는 과정들을 거쳐 피부 세포 및 조직 중에 생성된다[8]. 이러한 ROS는 피부에서 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 분자들의 산화적 손상을 초래한다. 또한 산화적 스트레스를 지속적으로 받게 되면 세포 손상 뿐만 아니라 피부 노화가 촉진되어 암과 같은 질병 발생 등 심각한 문제가 야기될 수 있다[9,10]. 따라서 피부에서 과잉의 활성산소가 생성되는 것을 억제하거나 미생물로부터 피부를 보호하고 피부 노화를 방지하기 위한 항산화, 항균 효과를 가진 생약 소재 개발 연구가 다양하게 이루어지고 있다.

택란(*Lycopodium lucidus*)은 썩싸리라고도 불리며 꿀풀과에 속한 여러해살이풀이다. 시베리아 동부에서 한국, 일본 등 아시아 온대에 분포한다. 택란은 항염, 항알러지 효과, 항암 효과가 있는 것으로 보고되어 있다[11-14]. 특히 택란(*L. lucidus*)의 에센셜 오일은 간암과 유방암에 대해 강력한 항암 효과를 나타내며 항산화 및 항균작용이 있는 것으로 보고되고 있다[15]. 하지만 추출물이나 특정 분획물을 항산화 소재로 화장품에서 응용한 연구는 아직도 미흡한 실정으로 특히 택란 추출물 및 분획물을 이용한 총 항산화능 연구나 세포 손상에 대한 보호 효과, 항균 활성 효과에 관한 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 택란 50% 에탄올 추출물과 분획물을 이용하여 항균, 항산화 효능 및 세포보호 효과 확인하여 화장품에서 새로운 소재로서의 가능성을 평가하였다.

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

본 연구에서 UV-visible spectrophotometer는 Cary 50 (Varian, Australia)을 사용하였으며, 화학 발광기는 6-channel LB9505 LT

(Berthold, Germany)를 사용하였다. 적혈구 광용혈 실험에 Milton Roy (USA), pH 미터로 Mettler-Toledo (Switzerland)을 사용하였다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, luminol, heparin, rose-bengal, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), H_2O_2 , (+)- α -tocopherol 및 L-ascorbic acid은 Sigma (USA) 제품을 사용하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei (Japan) 제품을 사용하였으며, 세포배양에서 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S) 및 trypsin 등을 Capricorn Scientific (Germany)에서 구매하였다. 완충 용액 제조에 사용된 H_2SO_4 , $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, NaCl, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 그리고 에탄올 (EtOH), 에틸아세테이트(EtOAc), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 택란은 2018년 4월경 경동시장에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2.2. 택란의 추출/발효 및 수율

택란 200 g을 50% 에탄올 2 L에 침적시키고 24 h 동안 교반하여 추출하였다. 50% 에탄올 추출물 1 L를 40 °C에서 감압 증류하여 추출물 파우더(수율 20.19%)를 얻었다. 남은 50% 에탄올 추출물은 감압 증류하여 수증만 남긴 후, 이를 에틸아세테이트와 1 : 1 비율로 3번 추출하였다. 망초산(Na_2SO_4)을 이용하여 물을 제거하고 감압 증류하여 에틸아세테이트 분획 파우더(수율 6.67%)를 얻었다(Figure 1).

2.3. 택란 추출물 및 분획물의 항산화 활성

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 피부 노화의 원인으로 간주되고 있다. 본 연구에서는 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자 주개 능력을 통하여 택란 추출물 및 분획물의 환원력을 측정하였다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가한 후 농도별로 택란 추출물 및 분획물을 각각 1 mL씩 첨가하여 25 °C에서 10 min 동안 방치하였다. UV/Vis spectrophotometer로 517 nm에서 용액의 흡광도를 측정하였다[16]. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소하는 데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC₅₀, $\mu g/mL$)로 표기하였다.

2.3.2. 루미놀 화학발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

철이나 구리 같은 전이 금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical ($\cdot OH$)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 본 실험에서 사용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 각종 ROS ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, 그리고 H_2O_2)를 생성시킨다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS 사이의 반응을 통한 화학 발광을 측정함으로써 알 수 있다. 실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 여러 농도의 택란 추출물 및 분획물과 2.5 mM EDTA 40 μL , 5 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 μL , 35 mM luminol 80 μL 를 첨가하여 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고, 5 min 동안 37 °C에서 항온시켰다. 그 후 150 mM H_2O_2 40 μL 를 넣고 25 min 동안 화학 발광을 측정하였다[17]. 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기(counts per minute, cpm)가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀, $\mu g/mL$)로 표기하였다.

Table 1. List of Strains and Cultivation Condition Used for Antimicrobial Experiment

	Strains	Media	Temperature (°C)	Time (h)
Gram (+) bacteria	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	37	24
Gram (-) bacteria	<i>E. coli</i> ATCC 23736	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	37	24
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 29336	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	37	48
Yeast	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	30	48
Mold	<i>A. niger</i> ATCC 16404	PDA ³⁾ , PDB ⁴⁾	30	72

¹⁾TSA: Tryptic soy agar (Difco, USA), ²⁾TSB: Tryptic soy broth (Difco, USA), ³⁾PDA: Potato dextrose agar (Difco, USA), ⁴⁾PDB: Potato dextrose broth (Difco, USA).

2.4. 택란 추출물 및 분획물의 항균 활성 측정

2.4.1. 사용균주, 배지 및 배양 조건

본 실험에 사용된 균주는 CTFA challenge test에서 사용되는 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (황색포도상구균), 호기성 그람 음성 균주인 *Escherichia coli* ATCC 23736 (대장균), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29336 (녹농균), 효모균인 *Candida albicans* ATCC 10231, 곰팡이균인 *Aspergillus niger* ATCC 16404 총 5가지 균주를 한국 미생물 보존센터에서 분양받아 사용하였다. 해당 균주를 배양하는 데 필요한 배지 및 배양 조건은 Table 1로 나타났다.

2.4.2. 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

각 추출물의 정확한 최소저해농도를 조사하기 위하여 broth-dilution method를 사용하였다. 음성 대조군으로는 50% DMSO를, 양성 대조군으로는 화장품에 방부제로 널리 사용되는 methyl paraben을 사용하였다. 각 실험군을 96-well plate에 20 µL 주입한 후 50% DMSO를 사용하여 2배 희석법을 이용하여 농도를 희석하였다. 각각의 균주는 1×10^6 - 1×10^7 CFU/mL로 농도를 맞추어 본 실험에 사용하였다. 균주를 함유한 배지 180 µL를 실험군이 주입된 각각의 well에 접종한 후 30-37 °C대의 배양기에서 배양 후, 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 최소저해농도로 결정하였다[18].

2.5. 택란 추출물 및 분획물의 Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

2.5.1. 적혈구 현탁액 제조

본 실험에서 사용된 적혈구는 건강한 성인으로부터 얻었다. 체혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 혈액을 넣고, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, 9.6 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1.6 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O)로 3회 세척하여 실험에 사용하였으며, 모든 실험은 체혈 후 24 h 이내에 실행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 광학 밀도(optical density, O.D.) 값이 0.6이 되도록 제조하였으며, 이때 적혈구 수는 약 1.5×10^7 cells로 계산된다.

2.5.2. 택란 추출물과 분획의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 택란 추출물과 분획물을 각각 50 µL씩 넣었다. 암소에서 30 min 동안 방치시킨 후, 광증감제인 rose bengal (13 µM) 0.5 mL를 가하고 파라 필름으로 입구를 감싼 후 15 min 동안 광조사 하였다. 광조사가 끝난 후 암반응시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 시간 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)를 통해 평가하였다[19]. 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈정도에 비례한다. 택란 추출물 및 분획물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된

그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간인 τ_{50} 을 구하여 비교하였다. 대조군은 τ_{50} 이 32.6 min으로 오차 범위 ± 0.5 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다.

2.6. 택란 추출물 및 분획물의 각질형성세포를 이용한 세포 보호 효과 측정

2.6.1. Cell Culture

각질 형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusenig (German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양받았으며, 10% FBS와 1% P/S를 함유한 DMEM배지를 이용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다.

2.6.2. 택란 추출물 및 분획물의 세포 독성 평가

HaCaT 세포에 대한 택란 추출물 및 분획물의 농도범위를 결정하기 위해 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-di-phenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay를 이용하여 세포 독성 평가를 확인하였다. HaCaT 세포는 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 접종하여 70-90% 까지 배양하였다. 무혈청 배지에 택란 추출물 및 분획물의 다양한 농도별로 희석하여 24 h 동안 처리하였다. 배지를 모두 제거하고 0.5 mg/mL MTT용액을 각 well에 첨가하고 1 h 동안 37 °C 세포 배양기에서 반응시켰다. 생성된 formazan은 DMSO로 녹여 ELISA reader (Tecan, Austria) 570 nm에서 흡광도를 측정하였다[20].

2.6.3. 과산화수소 및 UVB로 유도된 세포손상에 대한 보호효과 측정

HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well씩 접종하고 24 h 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 모두 제거하고 무혈청 배지에 시료를 농도별로 희석하여 24 h 배양하였다. 배지를 모두 걷어내고 PBS 100 µL로 1회 세척 후, 과산화수소 2 mM (in PBS)을 30 min 또는 PBS를 넣고 UVB 200 mJ/cm²를 처리하였다. PBS를 모두 제거 후, 새로운 PBS로 2회 세척하였다. 세척 후, 무혈청 배지로 바꿔 24 h 배양하였다. 배양 후, MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인하여 과산화수소 및 UVB로 손상된 세포에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다[21].

2.6.4. 세포 내 ROS 소거 활성

세포 내 ROS 소거 활성은 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA)를 이용하여 fluorescence를 측정하였다. HaCaT세포를 96-well blackplate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 70-80% 정도까지 배양하였다. 시료를 농도별로 처리한 후 세포 배양기에서 24 h 배양하였다. PBS를 이용하여 세포를 2회 세척 후, 20 µM H₂DCFH-DA로 30 min 동안 37 °C에서 처리하였다. CL-1000 ultraviolet crosslinker를 이용하여 PBS 상태에서 UVB 200 mJ/cm²를 조사하여 세포 내 ROS를 생성시켰다. Fluorescence ELISA reader (excitation 490 nm, emission

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, µg/mL) of *L. lucidus* 50% EtOH Extract/EtOAc Fraction Against Bacteria, Yeast and Mold

Strains	MIC (µg/mL)				
	Gram positive bacteria	Gram negative bacteria		Yeast	Mold
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Methyl paraben	2,500	2,500	1,250	625	625
EtOH extract	2,500	-	-	-	-
EtOAc fraction	78	1,250	2,500	2,500	-

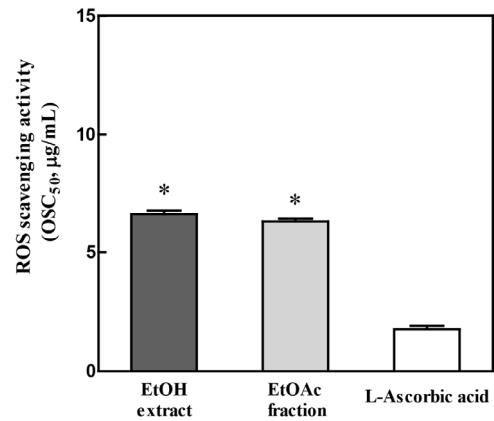
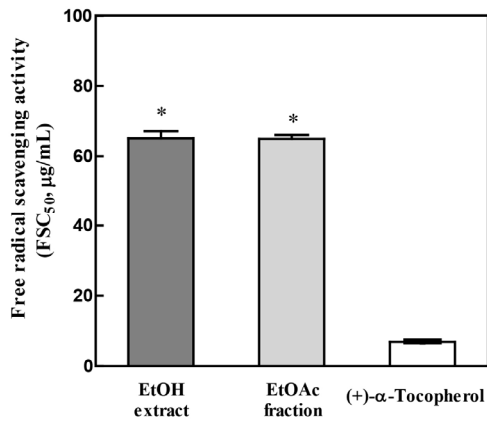


Figure 2. Free radical scavenging activities of *L. lucidus* 50% EtOH extract and EtOAc fraction. Data is indicated as the concentration required for 50% scavenging of free radical. Data are presented as mean ± S.D. (p* < 0.05 compared with (+)-α-tocopherol).**

Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activities of *L. lucidus* 50% EtOH extract and EtOAc fraction in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay. Data is indicated as the concentration required for 50% scavenging of free radical. Data are presented as mean ± S.D. (p* < 0.05 compared with L-ascorbic acid).**

530 nm) 기기를 통하여 형광의 세기를 측정하였다[22].

2.7. Statistical Analysis

본 연구에서 모든 실험은 3회 반복하였으며, 통계자료의 값은 mean ± SD로 나타냈다. 통계적 유의성 검증은 Graphpad Prism 7.0 (San Diego, CA)을 이용했으며, one-way ANOVA 및 Student's *t*-test 검정을 적용하여 *p* < 0.05 유의수준에서 유의성 검정을 실시했다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

자외선 노출과 같은 외부 스트레스에 의해 피부에서 생성되는 과잉의 ROS는 세포 및 조직에 손상을 주어 노화를 가속화시킨다. (+)-α-tocopherol과 같은 항산화제는 전자 공여능을 가진 것으로 지질라디칼에 전자를 제공하여 연쇄반응을 종결시키고 세포를 보호한다. DPPH 라디칼 소거 활성은 비교적 안정한 free radical인 DPPH와 시료의 반응을 통해 시료의 수소 공여 능력을 평가하는 방법이다. 이러한 항산화 효과를 평가하기 위해 시료를 처리하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 택란 추출물, 분획물 및 (+)-α-tocopherol의 자유 라디칼 소거 활성을 FSC₅₀으로 나타냈다. 택란 추출물의 FSC₅₀은 65.1 µg/mL, 택란 에틸아세테이트 분획물은 64.9 µg/mL로 나타났다(Figure 2). 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol (6.9 µg/mL)보다는 낮았지만 추출물과 분획물을 비교한 결과 유의적인 차이 없이 모두 높은 자유 라디칼 소거 활성을 나타냄을 확인하였다.

3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성 산소 소거 활성(총항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계는 철이 촉매로 작용하여 H₂O₂, O₂^{·-} 및 ·OH과 같은 다양한 ROS가 생성된다. 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS의 반응을 통한 발광을 측정함으로써 확인할 수 있다. Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 다시 바닥 상태로 떨어지며 발광(420-450 nm)하는 것으로 이를 통해 총 항산화능을 평가하였다. 본 실험에서는 택란 추출물, 분획물 및 대조군으로 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid의 총 항산화능을 비교 평가하였으며 총 항산화능은 OSC₅₀으로 나타났다. 실험 결과 택란 추출물의 경우 6.6 µg/mL, 분획물의 경우 6.3 µg/mL로 나타났다(Figure 3). Positive control인 L-ascorbic acid (1.50 µg/mL)와 비교해 볼 때 차이를 나타냈지만 자유 라디칼 소거 활성과 마찬가지로 택란 추출물 및 분획물 모두 높은 항산화능을 나타냈다. 택란 추출물과 분획물을 비교해 본 결과, 유의적 차이 없이 유사한 활성산소 소거 활성을 나타냈다.

3.3. 택란 추출물 및 분획물의 항균 활성

택란 추출물 및 분획물을 이용하여 화장품 미생물 규제에 포함되는 5가지의 균주에 대한 항균 활성을 평가하였다. 항균 활성 평가는 MIC 평가법을 이용하여 진행하였으며 실험 결과는 Table 2에 나타내었다. 택란 추출물은 *S. aureus*에서만 항균 활성을 나타내었고, 이는 대조군인 methyl paraben과 비슷한 수준의 항균 활성을 나타내었다. 반면 에틸 아세테이트 분획은 *A. niger*를 제외하고 실험에 사용한 모든 균에서 항균 활성을 나타내었다. 특히 *S. aureus*와 *E. coli*에 대해서는 positive control보다 더 높은 항균 활성을 나타냄을 확인하였다. 이러한

Table 3. Relative Cellular Protective Effects of *L. lucidus* 50% EtOH extract, EtOAc fraction and (+)- α -Tocopherol on Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Erythrocytes

Relative cellular protective effect for erythrocyte (τ 50 min)			
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	12.5	25	50
EtOH extract	34.8 \pm 2.7	39.9 \pm 3.8	51.3 \pm 1.8
EtOAc fraction	44.8 \pm 3.2	61.6 \pm 1.3	73.7 \pm 0.5
(+)- α -Tocopherol	40.3 \pm 2.3	50.7 \pm 1.8	61.4 \pm 2.6

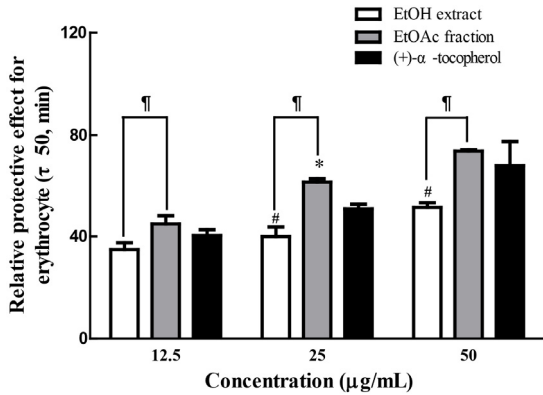


Figure 4. Cellular protective effect of 50% EtOH extract, EtOAc fraction of *L. lucidus*, and (+)- α -tocopherol at 12.5-50 $\mu\text{g/mL}$ on rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes. Data are presented as mean \pm SD. # p < 0.05 compared with (+)- α -tocopherol in EtOH extract group by one-way ANOVA, * p < 0.05 compared with (+)- α -tocopherol in EtOAc fraction groups by one-way ANOVA. ¶ p < 0.05 EtOH extract versus EtOAc fraction by Student's *t*-test.

결과들로 택란 추출물 보다 에틸아세테이트 분획물에서 더 뛰어난 항균 활성을 나타내었다. 따라서 택란 에틸아세테이트 분획은 화학적 방부제의 함량을 줄이거나 다른 천연물과의 시너지 방부 효과를 이용하여 화학적 방부제를 대체할 가능성이 있을 것으로 사료된다.

3.4. $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과

피부에 자외선이 조사되면 피부에 존재하는 광증감제(porphyrin 또는 riboflavin)에 의해 다양한 ROS가 생성된다. 그중 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)은 반응성이 매우 큰 활성산소종으로 피부 항산화 방어막을 붕괴시키고 세포막 구성 성분인 인지질을 산화시켜 지질 과산화 반응을 개시한다. 이러한 자동산화반응에 의해 세포막이 손상되고 세포는 파괴된다. 따라서 적혈구 세포를 이용한 광용혈 실험을 통해 활성산소에 의한 세포 손상을 방어하는 항산화제의 세포보호 효과를 측정할 수 있다. 본 실험에서는 rose bengal로 유도된 $^1\text{O}_2$ 에 의한 세포 손상에 대하여 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 항산화 능력을 평가하였다. 적혈구 파괴에 대한 세포 보호 효과를 추출물과 분획 농도별로 비교하여 그래프로 나타내었다(Table 3). 세포보호 효과는 적혈구가 50% 용혈되는 데 걸리는 시간인 τ_{50} 으로 나타내었다. 택란 추출물과 분획을 12.5, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 적혈구 광용혈 실험에 사용하였다. 그 결과 택란 50% 에탄올 추출물의 τ_{50} 은 각각 34.8, 39.9 및 51.3 min으로 농도 의존적으로 세포 보호 효과를 나타내었다. 반면, 에틸 아세테이트 분획물은 44.8, 61.6 및 73.7 min으로 농도 의존적으로 높은 세포 보호 효과를 나타내었다. 택란 추출물, 분획

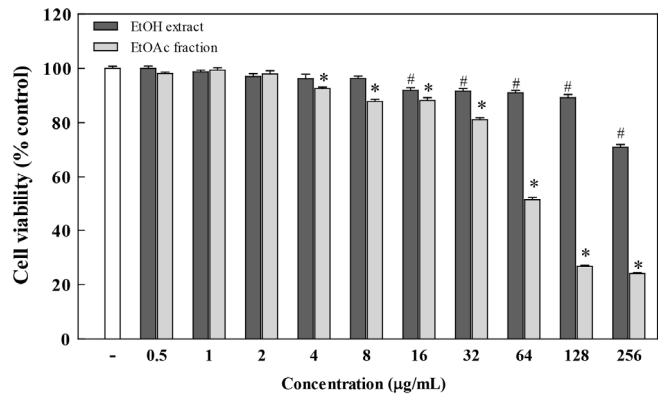


Figure 5. Effect of *L. lucidus* 50% EtOH extract and EtOAc fraction treatment on HaCaT cell viability. HaCaT cells were treated with various concentrations of samples for 24 h and cell viability was determined using the MTT assay. Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. # p < 0.05, * p < 0.05 compared with untreated control.

물 및 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol을 농도별로 비교하여 그래프로 나타내었다(Figure 4). 택란 추출물과 분획물의 효과를 비교한 결과 전 농도 유의적 차이를 나타냄으로써 분획물이 적혈구 세포 파괴에 대한 보호효과가 더욱 뛰어난 것으로 확인할 수 있었다. 분획물은 12.5, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 (+)- α -tocopherol과 비슷한 효능을 나타내었으며 특히 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 (+)- α -tocopherol과 유의적 차이가 있는 것으로 지용성 항산화제보다 뛰어난 세포 보호 효과를 확인하였다.

3.5. 각질 형성 세포 보호 효과

3.5.1. 세포 독성 평가

MTT assay를 통해 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 HaCaT 세포에 대한 독성 평가를 평가함으로써 앞으로의 세포 보호 효과 평가를 위한 샘플의 농도 범위를 결정하였다. 0.5-256 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 세포에 24 h 처리 후 세포 생존율을 확인하였다. 실험결과, 대조군에 (100%) 비해 택란 50% 에탄올 추출물은 16 $\mu\text{g/mL}$, 에틸아세테이트 분획물은 4 $\mu\text{g/mL}$ 부터 세포독성을 나타내었다(Figure 5). 따라서 본 실험에서는 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 같은 농도로 효능을 비교하기 위해 2 $\mu\text{g/mL}$ 를 최고 농도로 설정하였다.

3.5.2. 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과

활성산소인 과산화수소는 세포막을 통과하여 생체 내 미량으로 존재하는 금속 이온과 반응하여 다른 ROS를 생성시켜 세포 손상을 야기시킨다. 본 연구에서는 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 과산화수소로 손상된 HaCaT 세포에 대한 세포 보호 효과를

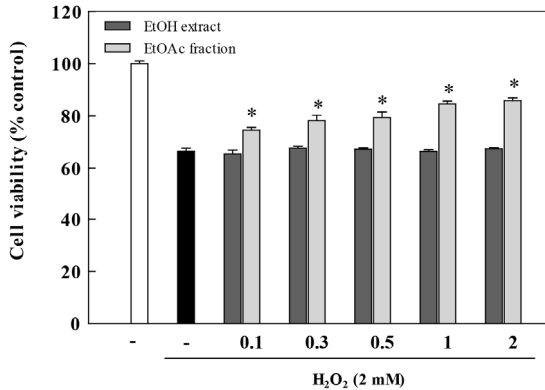


Figure 6. Cell protective effects of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from *L. lucidus* on H₂O₂-induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. Data are presented as the mean ± SD. **p* < 0.05 compared with H₂O₂ treated control in EtOAc fraction dose-treated groups by one-way ANOVA.

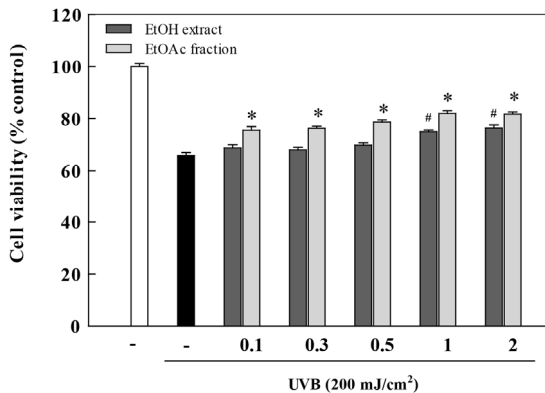


Figure 7. Cell protective effects of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from *L. lucidus* on UVB-induced HaCaT cell. HaCaT cells were treated with different concentration of sample for 24 h after being exposed to oxidative stress. Data are presented as the mean ± SD. #*p* < 0.05 compared with UVB treated control in 50% EtOH extract dose-treated groups by one-way ANOVA. **p* < 0.05 compared with UVB treated control in EtOAc fraction dose-treated groups by one-way ANOVA.

확인하였다. 실험 결과, 과산화수소를 처리한 실험군은 대조군에 비하여 약 66.4%의 세포 생존율을 나타냈다(Figure 6). 0.1-2 µg/mL 농도 범위에서 50% 에탄올 추출물을 처리한 군은 전 농도에서 과산화수소를 처리한 실험군에 비해 유의적 차이를 나타내지 못하였다(각각 65.3, 67.6, 67.2, 66.3, 67.4%). 반면, 에틸아세테이트 분획물 처리 시 모든 농도범위에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 유의적으로 증가했으며, 최대 85.8%까지 증가했다(각각 74.5, 78.1, 79.3, 84.5, 85.8%). 이러한 결과들로 택란 50% 에탄올 추출물은 과산화수소로 손상된 각질 형성 세포에 대한 보호 효과를 나타내지 못한 반면 에틸아세테이트 분획물은 추출물에 비해 더 뛰어난 세포 보호 효과를 나타내었다.

3.5.3. UVB로 유도된 세포 손상에 대한 보호

광노화의 주원인인 자외선 중 UVB는 UVA에 비해 에너지가 높고 표피를 통과하여 진피의 윗부분까지 침투할 수 있으며 이 과정 중에

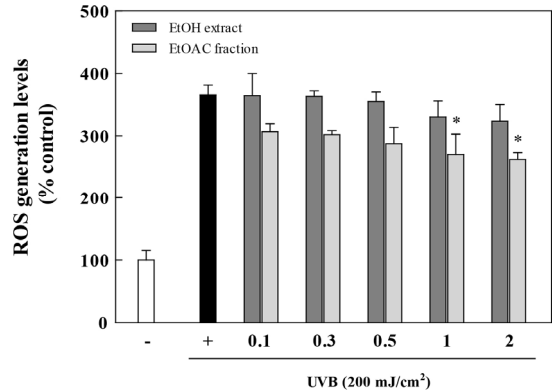


Figure 8. Effects of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from *L. lucidus* on UVB-induced oxidative stress in HaCaT. 50% EtOH extract and EtOAc fraction from *L. lucidus* scavenged UVB-induced upregulation of intracellular ROS production. The DCF-DA probe was used to investigate intracellular ROS levels. Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments (**p* < 0.05 compared with untreated control).

DNA 손상, 비정상적인 사이토카인 방출, 과잉의 활성산소가 발생하게 되므로 피부에 대하여 UVB는 자외선 중 가장 해로운 인자이다. 본 연구에서는 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 UVB로 손상된 HaCaT 세포에 대한 세포 보호 효과를 확인하였다. 실험 결과, UVB를 조사한 실험군은 대조군에 비해 약 65.8%의 세포 생존율을 나타냈다(Figure 7). 0.1-2 µg/mL 농도의 50% 에탄올 추출물을 처리 시 1 µg/mL 이상에서 유의적인 차이를 나타냈으며, 세포 생존율을 최대 76.3%까지 증가시켰다(각각 68.7, 67.9, 69.7, 76.9, 76.3%). 반면, 에틸아세테이트 분획물을 처리했을 경우, 모든 농도범위에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 현저히 증가했으며 최대 81.9%까지 증가했다(각각 75.5, 76.2, 78.7, 81.7, 81.9%). 이러한 결과들로 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물 모두 UVB로 손상된 HaCaT 세포에 대한 보호효과를 나타내었다. 특히 추출물과 분획물을 비교해 보았을 때, 고농도(1-2 µg/mL)에서 유의적인 보호효과를 나타낸 추출물에 비해 전 농도에서 보호효과를 나타낸 분획물이 세포 보호효과에 뛰어남을 확인하였다.

3.5.4. 세포 내 ROS 소거 활성

피부에 자외선 처리 시 세포 내 생성된 ROS는 세포의 구성 성분인 단백질, DNA, 피부막 및 지질 등을 손상시키고 피부 탄력에 영향을 주는 콜라겐, 엘라스틴을 분해시키는 MMPs 발현을 증가시켜 피부 노화를 촉진한다. 항산화제에 의해 세포 내 ROS 억제를 통해 피부 노화를 방지할 수 있다. 본 연구에서 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 세포 내 ROS 소거 활성은 각질형성세포인 HaCaT 세포, H₂DCF-DA를 통하여 측정하였다. UVB를 조사한 실험군은 대조군에(100%) 비하여 세포 내 ROS가 약 364.4%로 증가했다. 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 HaCaT 세포에 0.1-2 µg/mL를 24 h 처리 시, 추출물과 분획물 모두 감소하는 양상을 나타내었다. 택란 추출물과 분획물을 비교하였을 때, 추출물은 UVB군에 비해 전 농도 유의적 차이를 나타내지 않았다(각각 364.5, 363.3, 355.2, 330.4, 323.7%). 반면 분획물은 농도 의존적으로 ROS 생성을 현저히 감소시켰다(각각 306.7, 302.2, 287.4, 270.5, 262.6%). 특히, 분획물의 최저 농도인 0.1 µg/mL에서 추출물의 최고 농도인 2 µg/mL에

서 보다 더 높은 소거 활성을 나타냈으며, 1 µg/mL 이상에서 유의적 감소를 나타내었다(Figure 8). 이러한 결과들로 택란 에틸아세테이트 분획물은 추출물보다 각질 형성 세포 내 ROS 소거 활성에 더 뛰어난 세포 보호 효과를 나타내었다.

4. 결 론

이상의 결과들로부터 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에 대한 항산화, 항균 및 세포 보호 효과를 비교하였다.

항산화 활성은 DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성, 루미놀을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 활성산소 소거 활성을 통해 확인하였다. 택란 50% 에탄올 및 에틸아세테이트 분획물의 자유 라디칼 소거 활성은(FSC₅₀), 추출물(65.1 µg/mL), 분획물(64.9 µg/mL)이고, Fe³⁺-EDTA /H₂O₂계에서 활성산소 소거 활성은(OSC₅₀) 추출물(6.6 µg/mL), 분획물(6.3 µg/mL)로 유의적인 차이가 나타나지 않는 것으로 택란 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물 모두 항산화능이 뛰어나다.

항균 활성은 MIC 측정을 통해 확인하였다. MIC 측정 결과, *S. aureus*에 대한 항균 활성을 나타낸 택란 50% 에탄올 추출물에 비해 에틸아세테이트 분획물은 *A. niger*를 제외한 실험에 사용한 모든 균에서 항균 활성을 나타낸 것으로 택란 에틸아세테이트 분획물의 항균 활성이 택란 50% 에탄올 추출물보다 뛰어난 것을 나타냈다.

세포 보호 효과는 크게 적혈구 세포와 피부 각질 형성 세포를 이용하여 평가하였다. ¹O₂로 유도된 적혈구 세포손상에 대한 세포 보호 효과 측정 결과(τ₅₀), 최고농도에서(50 µg/mL) 택란 50% 에탄올 추출물 51.3 min, 에틸아세테이트 분획물 73.7 min로 추출물에 비해 분획물의 뛰어난 세포 보호 효과를 나타냈다. 과산화수소로 손상된 각질 형성 세포에 대한 세포 보호 효과 측정 결과, 택란 50% 에탄올 추출물은 유의적인 보호 효과를 나타내지 않은 반면, 에틸아세테이트 분획물은 과산화수소 처리군에(66.4%) 비해 세포 생존율 85.8%까지 증가시켜 추출물보다 뛰어난 보호 효과를 나타냈다. UVB로 손상된 각질 형성 세포에 대한 세포 보호 효과 측정 결과, 세포 생존율을 UVB 조사군에(65.8%) 비해 택란 50% 에탄올 추출물은 76.3%, 에틸아세테이트 분획물은 81.9%까지 증가시킨 것으로 추출물에 비해 분획물에서 더 높은 세포 보호 효과를 나타냈다. 마지막으로 UVB로 유도된 세포 내 ROS 소거 활성 결과, 택란 50% 에탄올 추출물은 유의적인 소거 활성을 나타내지 못한 반면 에틸아세테이트 분획물은 고농도(1-2 µg/mL)에서 유의적인 소거 활성을 나타냈다.

종합적으로 택란 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 생리활성을 비교한 결과, 택란 에틸아세테이트 분획물은 추출물과 비슷한 항산화 효능을 가지며, 항균 및 세포 보호 효과에서 추출물보다 뛰어난 효과를 나타냄으로써 외부 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는 화장품 소재로 응용가능성이 있음을 시사한다.

References

1. J. A. Park and M. O. Choi, Antimicrobial activity and anti-inflammation effect to the human skin pathogens by the *Rumex crispus* L. Root Extracts, *Korean J. Aesthet. Cosmetol.*, **9**(2), 1-8 (2011).
2. T. S. Park, J. Y. Lee, S. J. Hyun, G. H. Park, Y. J. Cho, S. G. Kim, and B. J. An, Antimicrobial effect of irradiated green tea

- polyphenol addition into cosmetic composition, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **50**(3), 210-216 (2007).
3. Y. H. Yeo and C. H. Park, Cosmetics preservation and moisturizing effect by methanol extracts of *Scutellaria baicalensis* George and *Liriope platyphylla*, *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **29**(5), 372-379 (2014).
4. C. N. Smith and B. R. Alexander, The relative cytotoxicity of personal care preservative systems in Balb/C 3T3 clone A31 embryonic mouse cells and the effect of selected preservative systems upon the toxicity of a standard rinse-off formulation, *Toxicol. In Vitro*, **19**, 963-969 (2005).
5. E. Y. Choi, Effect of phenoxyethanol and alkane diol mixture on the antimicrobial activity and antiseptic ability in cosmetics, *Korean J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**(2), 213-220 (2015).
6. D. S. Lee, M. S. Lim, S. S. Kwan, S. Y. Kim, and S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Chamaecyparis obtusa* leaf extract, *Appl. Chem. Eng.*, **23**(1), 93-99 (2012).
7. M. A. Zaid, F. Afaq, D. N. Syed, M. Dreher, and H. Mukhtar, Inhibition of UVB mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx, *Photochem. Photobiol.*, **83**, 882-888 (2007).
8. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 209-218 (1984).
9. S. H. Park, H. S. Shin, N. H. Lee, I. K. Hong, and S. N. Park, Cellular protective effects and mechanisms of kaempferol and nicotiflorin isolated from *Annona muricata* against ¹O₂-induced damage, *Appl. Chem. Eng.*, **29**(1), 49-55 (2017).
10. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, **160**, 1-40 (2006).
11. D. Y. Kim and S. H. Ghil, Effect of *Lycopus lucidus* Trucz on cell growth of human breast cancer cells, MCF-7, *J. Exp. Biomed. Sci.*, **15**, 147-152 (2009).
12. Y. J. Lee, D. G. Kang, J. S. Kim, and H. S. Lee, *Lycopus lucidus* inhibits high glucose-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells, *Vascul. Pharmacol.*, **48**, 38-46 (2008).
13. T. Y. Shin, S. H. Kim, K. H. Suk, J. H. Ha, I. K. Kim, M. G. Lee, C. D. Jun, S. Y. Kim, J. P. Lim, J. S. Eun, H. Y. Shin, and H. M. Kim, Anti-allergic effects of *Lycopus lucidus* on mast cell-mediated allergy model, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **209**, 255-262 (2005).
14. E. R. Woo and M. S. Piao, Antioxidative constituents from *Lycopus lucidus*, *Arch. Pharm. Res.*, **27**, 173-176 (2004).
15. J. Q. Yu, J. C. Lei, X. Q. Zhang, H. D. Yu, D. Z. Tian, Z. X. Liao, and G. L. Zou, Anticancer, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lycopus lucidus* Turcz. var. hirtus Regel, *Food Chem.*, **126**(4), 1593-1598 (2011).
16. J. H. Ha, Y. J. Jeong, J. S. Seong, K. M. Kim, A. Y. Kim, M. M. Fu, J. Y. Suh, N. H. Lee, J. Park, and S. N. Park, Antioxidant and antibacterial activities of *Glycyrrhiza uralensis* Fisher (Jecheon, Korea) extracts obtained by various extract conditions, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(4), 361-373 (2015).
17. S. N. Park, D. H. Won, J. P. Hwang, and S. B. Han, Cellular protective effects of dehydroeffusol isolated from *Juncus effusus* L. and the mechanisms underlying these effects, *J. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 3046-3052 (2014).

18. J. L. Rodriguez-Tudela, F. Barchiesi, J. Bille, E. Chryssanthou, M. Cuenca-Estrella, D. Denning, J. P. Donnelly, B. Dupont, W. Fegeler, C. Moore, M. Richardson, and P. E. Verweij, Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts, *Clin. Microbiol. Infect.*, **9**(8), 1-8 (2003).
19. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **23**, 75-132 (1997).
20. S. H. Xuan, Y. M. Park, J. H. Ha, Y. J. Jeong, and S. N. Park, The effect of dehydroglyasperin C on UVB-mediated MMPs expression in human HaCaT cells, *Pharmacol. Rep.*, **69**(6), 1224-1231 (2017).
21. K. M. Kim, A. R. Kim, A. Y. Kim, J. H. Ha, S. H. Xuan, Y. J. Jeong, Y. M. Park, H. J. Jeong, I. G. Hong, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of dolwoe (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) extracts against oxidative stress, *Korean J. Pharmacogn.*, **48**(2), 1-9 (2017).
22. Y. Yoshihisa, M. U. Rehman, and T. Shimizu, Astaxanthin a xanthophyll carotenoid, inhibits ultraviolet-induced apoptosis in keratinocytes, *Exp. Dermatol.*, **23**(3), 178-183 (2014).