Journal of Convergence for Information Technology
Vol. 9. No. 6, pp. 218-226, 2019
e-ISSN 2586-4440
DOI : https://doi.org/10.22156/CS4SMB.2019.9.6.218

삼내자 열수추출물의 항산화 및 항염 효과

진정원비너스[1], 이지안[2*]
[1]서경대학교 일반대학원 미용예술학과 학생, [2]서경대학교 일반대학원 미용예술학과 교수

Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Hot Water Extracts from *Kaempferia Galanga* L

Ching Yuen Venus Chan[1], Ji-An Lee[2*]
[1]Student, Department of Beauty Art, Graduate School of Seokyeong University
[2]Professor, Department of Beauty Art, Graduate School of Seokyeong University

요 약 본 연구의 목적은 삼내자(*Kaempferia Galanga*) 열수추출물의 항산화, 세포독성, 항염 효능을 조사하여 화장품 성분으로서 활용 가능성을 알아보고자 하였다. 항산화 활성 평가를 위해 DPPH, ABTS 라디컬 소거능 활성, FRAP 환원력, 총폴리페놀 함량을 측정하였다. 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 대상으로 MTT assay를 수행하여 세포독성을 확인하였다. 항염 효능을 알아보기 위해 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 nitric oxide(NO), TNF-α 분비 및 iNOS, TNF-α mRNA 발현 수준을 조사하였다. 그 결과 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 라디칼 소거 활성이 증가하였다. FRAP 값은 5 mg/mL에서 24.5 uM로 가장 높게 나타났으며, 총폴리페놀 함량은 1.28±0.064 mg GAE/g로 나타났다. KG 추출물 농도 0.625~2.5 mg/mL에서 세포독성은 보이지 않았다. 또한 RAW264.7 세포에서 LPS 유도에 의한 NO, TNF-α 분비 그리고 iNOS, TNF-α의 mRNA 발현이 KG 추출물에 의해 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 삼내자 열수추출물이 안전하고 효과적인 화장품 원료로서의 활용 가능성이 있음을 보여준다.

주제어 : 항산화, 항염, TNF-α, 삼내자, 화장품 원료

Abstract In this study, we investigated the possibility of *Kaempferia Galanga*(KG) hot water extract on the antioxidant, cytotoxic and anti-inflammatory efficacy as a cosmetic ingredient. Antioxidant effects were evaluated based on DPPH and ABTS radical scavenging activity, FRAP assay, and total polyphenol contents. The MTT assay was used to confirm the cell toxicity in mouse macrophage RAW264.7 cells. Anti-inflammatory effects were also investigated in LPS-induced RAW264.7 cells by measuring secretion of NO, TNF-α and iNOS, TNF-α mRNA expression level. As a result, DPPH and ABTS radical scavenging activities were increased in a concentration-dependent manner. The ferric reducing antioxidant power(FRAP) was the highest at 5 mg/mL as 24.5 uM. The measurements of total polyphenol content was 1.28±0.064 mg GAE/g. The cytotoxicity of the KG extract results showed no cytotoxicity at concentration of 0.625 to 2.5 mg/mL. In addition, the extract of KG significantly suppressed the LPS-induced nitrite, TNF-α secretion and the mRNA expression of iNOS, TNF-α in RAW264.7 cells. Taken together, these data suggest that the KG hot water extracts can be used as a safe and functional cosmetic raw material.

Key Words : Antioxidant, Anti-inflammatory, TNF-α, Kaempferia Galanga, Cosmetic Material

*Corresponding Author : Ji-An Lee(jessicajslee@naver.com)
Received May 7, 2019
Accepted June 20, 2019
Received May 30, 2019
Accepted June 28, 2019

1. 서론

현대의 화장품 산업은 세계적으로 IT, BT, NT 등 첨단 기술과의 기술융합 트랜드에 따른 과학과 뷰티를 융합한 뷰티과학분야로 성장하였다. 특히 고령화 시대에 따른 항노화 화장품 시장의 지속적인 확대가 예상된다. 동시에 고도의 산업화와 도시화에 따른 장시간의 실내거주 생활패턴, 심리적 스트레스, 미세먼지와 같은 환경오염 등에 의한 활성산소(Reactive oxygen species)와 염증의 유해성에 대한 관심이 집중되고 이를 해결하려는 연구가 진행되고 있다[1,2].

노화 특히, 피부의 노화과정은 크게 활성산소에 의한 내인성 요인과 자외선, 흡연, 미세먼지 등에 의한 외인성 요인으로 나뉜다. 그러나 최근에는 활성산소와 염증성 사이토카인이 내인성 노화뿐만 아니라 외인성 노화과정 모두에 주요 요인으로 작용한다고 알려져 있다[3,4].

활성산소를 억제시키는 항산화 물질 대부분은 합성 항산화제로 높은 독성과 부작용으로 인하여 친환경적 대체 원료 개발이 시급한 실정이다. 따라서 최근에는 안전성이 확보된 천연식물 소재에서 추출한 생리활성 물질들의 항균[5], 항산화[6] 및 항염증 효능뿐만 아니라 미백, 주름 등 피부의 기능성 효능에 대한 연구가 급증하고 있다[7-10].

삼내자 (*Kaempferia Galanga* L.)는 생강과(Plant Zingiberaceae)에 속하는 다년생 열대초본식물로 뿌리줄기인 근경(rhizome, 根莖)부위가 주로 열대아시아 요리에 첨가 되어 식용 또는 약용으로도 널리 사용되고 있다[11,12]. 삼내자는 헥산(Hexane), 에탄올 또는 메탄올 등의 다양한 추출법을 이용한 여러 가지 미생물에 대한 항균활성[13], 항암[14-16], 미백 효능[17-19]에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 삼내자 추출물의 항염 효과에 대한 연구는 carrageenan로 유도된 쥐의 부종 모델에서 항 알러지 및 항염증 효능[20,21], asetosal로 유도된 쥐의 위궤양 모델에서 항 위궤양성 대장염 완화 효과[22]등 질병관련 동물모델을 이용한 선행연구결과로서 피부 염증과 관련된 연구는 아직까지 보고된 바가 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 삼내자 열수추출물을 이용하여 항산화, 세포독성, 항염 효능을 조사하여 천연식물 원료의 화장품 소재로서의 활용가능성을 확인하고자 하였다.

2. 연구방법

2.1 실험 재료

2.1.1 삼내자 열수추출물의 제조

본 실험에 사용된 삼내자의 뿌리줄기는 중국 하남성에서 재배한 것으로 2018년 10월에 서울시 약령시장에서 건조된 삼내자를 구입하여 사용하였다. 열수추출은 건조 분쇄한 삼내자 300 g에 증류수 5 L를 첨가하여 80℃에서 24 시간 추출한 후, 여과(Whatman filter paper No.2)하였다. 여과액을 감압 농축(EYESA, N-1100 series, Tokyo, Japan)하고 72시간 동결건조(Labconco Co., Kansas city, MO, USA)시켜 분말로 만들어 사용하였다(수율 10.78%).

2.1.2 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용한 쥐의 대식세포(RAW264.7)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum과 1% Penicillin-Streptomycin을 넣은 DMEM 배양액을 이용하여 5% CO_2가 공급되는 배양기에서 37℃ 조건으로 배양하였다.

2.2 항산화 활성 측정

2.2.1 DPPH 라디컬 소거능

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디컬 소거능은 Blois 등의 실험 방법을 수정하여 수행하였다[23]. 농도별 삼내자 열수추출물과 0.2 mM DPPH(Sigma, St. Louis, MO, USA)용액을 30분간 반응시킨 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물질로는 1 mg/mL의 Vitamin C(A5960, Sigma, China)를 이용하였다.

2.2.2 ABTS 라디컬 소거능 측정

ABTS 라디컬 소거능은 Roberta 등의 실험 방법을 수정하여 수행하였다[24]. $ABTS^+$ 라디컬 생성은 7.4 mM ABTS(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 2.6 mM potassium persulfate를 첨가하여 암 조건하에서 12시간 이상 반응시킨 후 734 nm 파장에서 흡광도가 0.7 (± 0.02)이 되도록 메탄올로 희석하였다. 농도별 삼내자 열수추출물 20 μl에 희석시킨 $ABTS^+$ 라디컬 용액 180 μl을 첨가하고, 30분 반응시킨 뒤 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.3 FRAP에 의한 환원력 측정

FRAP에 의한 삼내자 열수추출물의 환원력 측정은 Benzie 등의 실험 방법을 수정하여 수행하였다[25]. 표준시약으로는 Ferrous sulfate를 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 nM의 농도로 만들어 사용하였다. FRAP 용액(300 mM acetate buffer pH3.6 40 mL + 10 mM TPTZ(40 mM HCl) 4

mL + 20 mM $FeCl_3$ 4 mL + 증류수 4.8 mL)을 만든 뒤 200 μl씩 분주하였다. 분주된 FRAP 용액에 농도별 삼내자 열수추출물 20 μl를 첨가한 후, 37℃에서 30분간 암 조건하에서 반응시킨 뒤 594 nm에서 흡광을 측정하였다.

2.2.4 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 함량은 AOAC[26]의 실험 방법을 수정하여 Folin-Denis법으로 수행하였다. 농도별 삼내자 열수추출물과 Folin-Denis reagent 를 동일한 양으로 섞어 실온에서 5분간 용해시킨 뒤 10% Na_2CO_3 를 첨가하여 암 조건하에서 반응시킨다. 1시간 후 상등액을 취하여 96well plate에 옮겨 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 gallic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 mg gallic acid equivalent(GAE)/g 로 나타내었다.

2.3 세포독성 실험

삼내자 열수추출물의 RAW264.7 세포에 대한 세포독성 여부를 조사하기 위하여 세포를 $3x10^4$ cells/well로 96 well culture plate에 넣고 16시간 배양하였다. 새로운 배지 100 μl로 교체한 뒤, LPS(200 ng/mL)와 농도별 삼내자 열수추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2, 5-diphenyltetrazolium bromide(1 mg/mL) 용액을 100 μl 씩 첨가하여 다시 4시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 100 μl의 DMSO를 첨가한 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4 항염 효과 측정

2.4.1 NO 생성 저해

삼내자 열수추출물의 RAW264.7세포에서 NO (nitric oxide)의 생성에 대한 영향을 조사하기 위하여 세포를 $1x10^5$ cells/well로 24 well culture plate에 넣고 16시간 배양하였다. 추출물 처리 전 새로운 배지로 교체한 뒤, LPS (200 ng/mL)와 농도별 삼내자 열수추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포 배지 내 분비된 NO 양은 Griess reagent 방법을 수정하여 측정하였다[27]. 세포 배양 상등액 100 μl와 Griess reagent(Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 μl를 혼합하여 암 조건하에서 10 분간 반응시킨 뒤 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4.2 iNOS 발현 억제

삼내자 추출물의 iNOS (Inducible nitric oxide synthase) 발현에 대한 영향을 조사하기 위해 western blot을 수행하였다. RAW264.7 세포를 1×10^6 cells/dish로 60 mm-dish에 넣고 16시간 배양하였다. 새로운 배지로 교체한 뒤, LPS(200 ng/mL)와 농도별 삼내자 열수추출물을 24시간 처리하였다. 차가운 PBS로 세포를 2회 세척하고, RIPA buffer(Thermo scientific, Rockford, IL, USA)를 첨가하여 얼음에서 30분간 세포를 용해시켰다. 13,000 rpm, 4℃ 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 대상으로 Bradford assay를 이용하여 단백질을 정량하였다. 각 well 당 50 μg의 whole lysates를 SDS-PAGE에 전기영동한 후, PVDF membrane으로 transfer하였다. 5% BSA 용액으로 blocking한 뒤, 1차 항체인 Rabbit 항-iNOS(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)와 Mouse 항-β-actin을 4℃에서 16시간 반응시켰다. 0.05% TBST로 15분간 3회 membrane을 씻은 후, 항-rabbit IgG, HRP-linked antibody(Cell Signaling Technology, MA, USA)과 항-mouse IgG, HRP-linked antibody를 1시간 반응시켰다. 0.05% TBST로 15분간 3회 membrane을 씻은 후, Chemiluminescence detection kit(EZ-Western Lumi Pico, DoGen, Seoul, Korea)로 단백질을 검출하였다.

2.4.3 TNF-α 분비량 측정

삼내자 열수추출물이 RAW264.7 세포에서 염증성 사이토카인 TNF-α의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포를 1×10^5cells/well로 24 well culture plate에 넣고 16시간 배양하였다. 새로운 배지로 교체한 뒤, LPS(200 ng/mL)와 농도별 삼내자 열수추출물을 처리하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액 내의 TNF-α 분비량을 ELISA kit(BD Biosciences, CA, USA) 분석법을 이용하여 측정하였다.

2.4.4 TNFα와 iNOS mRNA 발현 측정

RAW264.7 세포를 5×10^5 cells/well로 6 well culture plate에 첨가하여 16시간 배양하였다. 새로운 배지로 교체한 뒤, LPS (200 ng/mL)와 농도별 삼내자 열수추출물을 24시간 배양하였다. 세포 배지 제거 후, 5min Cell/Virus RNA isolation kit (BioFactories, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 추출한 RNA(0.5 μg)는 One Step SYBR primeScript RT-PCR Kit(TaKaRa, Tokyo, Japan)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. 본 실험에 사용된 primer는 Table 1과 같다[28].

Table 1. TNF-α, iNOS and GAPDH primer

Target	Forward	Reverse
TNF-α	5'- TGCCTATGTCTCAGCCTCTT -3'	5'- GAGGCCATTTGGGAACTTCT -3'
iNOS	5'- GGAGCCTTTAGACCTCAACAGA -3'	5'- TGAACGAGGAGGGTGGTG -3'
GAPDH	5'- CAATGAATACGGCTACAGCAAC -3'	5'- AGGGAGATGCTCAGTGTTGG -3'

TNF-α; tumor necrosis factor-α, iNOS; inducible nitric oxide synthase, GAPDH; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

2.5 통계분석

본 연구에 표기된 모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 평균값 사이에 대한 유의성은 student's t-test를 이용하여 p-value값을 계산하여 통계적 유의성 검증을 실시하였다. $p<0.05$인 경우 *로 표기하였고 $p<0.01$인 경우 **로 표기하여 유의성을 나타내었다.

3. 연구 결과 및 고찰

3.1 항산화 활성

3.1.1 DPPH 라디컬 소거능

자유 라디컬(free radical)은 홀전자를 가진 분자로, 반응성이 매우 높아 체내에서 세포 손상을 일으키며 활성산소는 대표적인 자유 라디컬 중 하나이다[29]. 삼내자 열수추출물의 DPPH 라디컬 소거능 결과는 Fig. 1과 같다. 양성대조물질 Vitamin C (1 mg/mL)에서 DPPH 라디컬 소거능은 95.6%±0.01이었다. 삼내자 열수추출물 농도(0.625, 1.25, 2.5 및 5 mg/mL)에 따른 라디컬 소거능은 28.1%±1.2, 47.8%±3.5, 65.6%±3.3, 78.1%±3.5로 추출물 처리에 따른 농도의존적 증가를 나타냈다. 이러한 결과는 삼내자 메탄올추출물의 DPPH 라디컬 소거능을 통한 항산화 효능 연구 결과와 유사하였으며 비록 단일 물질인 Vitamin C 보다 항산화 효능이 낮았지만, 천연물로서는 DPPH 소거능이 우수한 것으로 사료된다[30,31].

3.1.2 ABTS 라디컬 소거능

ABTS 라디컬 소거능 측정법은 DPPH 라디컬 소거능법과 달리 친수성, 소수성 시료 모두 항산화 활성 특성이 가능하다[32]. 삼내자 열수추출물의 ABTS 라디컬 소거능 결과는 Fig. 2와 같다. 양성 대조물질 Vitamin C (1 mg/mL)에서 라디컬 소거능은 95.5±0.05%로 나타났으며 삼내자 열수추출물 농도(0.625, 1.25, 2.5 및 5mg/mL)에 따른 라디컬 소거능은 7.4%±1.3, 14.9%±2.5, 27.5%±2.7, 43.9%±1.5로 양성대조군에 비해 다소 낮은 라디컬 소거능을 보였다. 그러나 DPPH 라디컬 소거능 결과와 동일하게 추출물 농도에 따른 라디컬 소거활성이 증가함을 알 수 있었다.

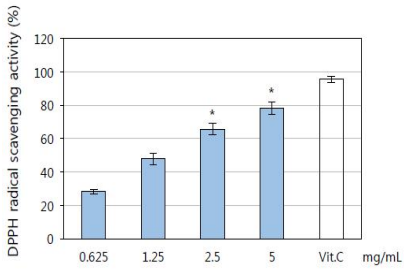


Fig. 1. Effect of KG extracts on the DPPH radical scavenging activity. Results are the mean±S.D. from three independent experiments. $^{*}p<0.05$ compared to the negative control.

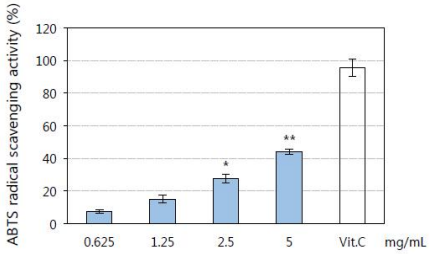


Fig. 2. Effect of KG extracts on the ABTS radical scavenging activity. Results are the mean±S.D. from three independent experiments. $^{*}p<0.05$; $^{**}p<0.001$ compared to the negative control.

3.1.3 FRAP에 의한 환원력

삼내자 열수추출물 내 항산화 유효성분을 DPPH 또는 ABTS 화합물의 라디컬 소거능력 이외에 철이온의 환원력을 이용한 항산화 활성 측정 결과는 Fig. 3과 같다. 삼내자 열수추출물 농도(0.625, 1.25, 2.5 및 5 mg/mL)에 따른 항산화 활성은 11.7 μM±0.40, 18.9 μM±0.41, 22.6 μM±0.79, 24.5 μM±1.31로 증가하였다. 이러한 결과는 삼내자 추출물 내 항산화 활성을 지닌 유효 성분증가에 의한 것으로 사료된다. 따라서 이러한 결과들을 종합해 볼 때

삼내자 열수추출물은 새로운 천연 항산화제로서의 가능성이 있는 것으로 판단된다.

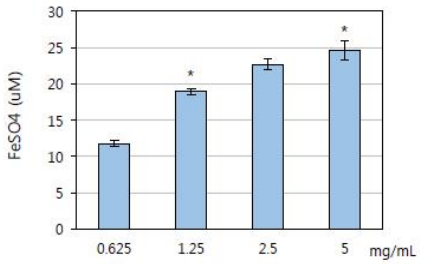


Fig. 3. Ferric reducing antioxidant power assay of KG extracts. Results are the mean±S.D. from three independent experiments. $^{*}p<0.05$ compared to the negative control.

3.1.4 총 폴리페놀 함량

폴리페놀은 하이드록시(-OH, 수산기)가 많아 항산화작용을 하며, 종류는 수없이 많고, 안토시아닌, 카테킨, 탄닌, 클로로겐산등이 대표적이다[33]. 삼내자 열수추출물의 폴리페놀 함량을 Table 2와 같이 나타내었다. 그 결과 총 폴리페놀 함량은 1.28±0.064 mg GAE/g로 확인되었다.

삼내자 메탄올추출물을 이용한 선행 연구 결과에서 총 폴리페놀 함량 0.57 mg GAE/g과 비교했을 때 열수추출법에 의한 총 폴리페놀 함량이 2.2배 높은 것으로 나타났다[30]. 이러한 결과는 동일한 소재라 할지라도 기후조건, 특히 추출방법 등의 요인들이 폴리페놀 함량에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Table 2. Total polyphenol contents (TPC) of KG extracts.

Sample	Polyphenol (mgGAE/g)*
Kaempferia galanga	1.28±0.064

*mgGAE/g: mg Gallic acid equivalent per g
Data represented as mean±S.D.

3.2 세포독성 측정

삼내자 열수추출물의 RAW264.7 세포에 대한 독성을 알아보기 위하여 LPS(200 ng/ml)와 농도별 삼내자 추출물을 24시간 처리한 뒤, MTT assay 결과는 Fig. 4와 같다. LPS 단독 처리시 세포 생존율은 104.4%±1.64%로 나타났으며, 삼내자 추출물 0.625, 1.25, 2.5 mg/mL 농도에 따른 세포 생존율은 각각 100.3%±3.0, 93.7%±3.83, 90.2%±3.86로 나타났다. 그러나 최고 농도인 5 mg/mL에서 세포 생존율이 63.7%±1.09로 감소되는 것을 확인하였다. 피부암(흑색종)세포를 대상으로 삼내자 에탄올 또는 메탄올추출물의 세포 독성 연구결과에서 본 연구결과와 비교하여 낮은 농도에서 매우 높은 세포 독성이 확인되었다.[18,19]. 이러한 결과는 삼내자 추출 시 사용된 용매의 종류, 분획에 따른 성분분리 및 각 세포의 특성에 의한 영향으로 사료된다. 추후 본 연구에서 동일한 세포를 이용한 모든 실험에서 추출물 농도는 2.5 mg/mL이하 조건으로 수행하였다.

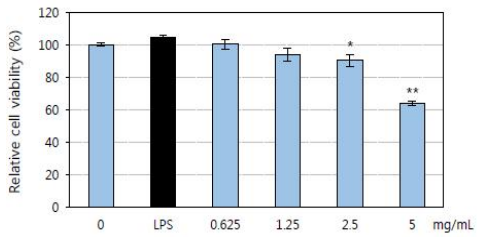


Fig. 4. Effect of KG extracts on RAW264.7 cell viability. Cells were treated with various concentration of KG for 24 h. Cell viability was evaluated using the MTT assay. Results are the mean±S.D. from three independent experiments. $^{*}p<0.05$; $^{**}p<0.001$ compared to the negative control.

3.3. 항염증 활성

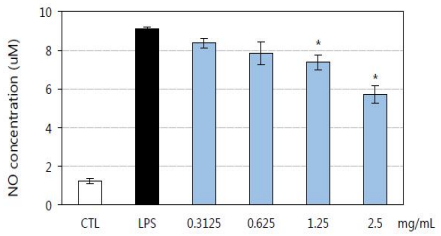
3.3.1 NO 생성 저해

대식세포를 그람 음성 세균의 내독소인 Lipopolysaccharide(LPS)로 자극하면 염증성 사이토카인 TNF-α, NO 등과 같은 염증 매개 물질을 생성하게 된다[34]. 삼내자 열수추출물의 NO 생성에 대한 영향을 확인하기 위하여 LPS로 RAW264.7 세포에 염증을 유도한 후, 각 농도별 추출물을 처리한 결과 Fig. 5a와 같다. LPS(200 ng/ml)만 처리한 세포에서 NO 생성량은 9.08±0.11 μM로 현저히 증가하였으며, 추출물을 0.312, 0.625, 1.25 및 2.5 mg/mL 농도로 처리한 결과, 각 8.37 μM±0.23, 7.84 μM±0.59, 7.37 μM±0.38 및 5.71 μM±0.44로 삼내자 열수추출물 농도 의존적으로 NO 생성이 억제됨을 확인하였다.

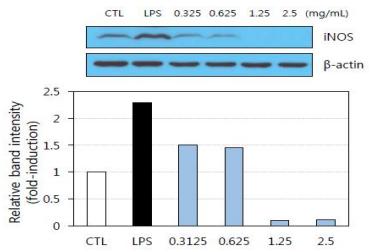
3.3.2 세포 내 iNOS 단백질 발현 억제

Inducible nitric oxide synthase(iNOS) 단백질은 L-arginine으로부터 NO를 형성시키는 촉매효소로 세포

내 중요한 세포신호분자이다[35]. 삼내자 열수추출물이 iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 항원-항체 원리를 이용한 western blot 분석법을 수행하여 측정한 결과 Fig. 5b와 같다. RAW264.7 세포 내 LPS 처리 후 증가된 iNOS의 단백질 발현 수준은 추출물 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 mg/mL 농도로 증가할수록 현저히 감소함을 확인하였다. 따라서 삼내자 추출물에 의한 NO 생성 저해는 iNOS 단백질과 mRNA발현 억제에 의한 것으로 사료된다.



(a)



(b)

Fig. 5. Effect of KG extracts on the NO production and iNOS protein expression in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were incubated with LPS in the presence or absence of KG for 24 h. The NO concentration in medium was determined by Griess reagent assay(a). The whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis(b). Results are the mean±S.D. from three independent experiments. $^{*}p<0.05$ compared to the negative control.

3.3.3 TNF-a 분비 억제

삼내자 열수추출물의 TNF-α 분비에 대한 영향을 확인한 결과 Fig. 6과 같다. 세포만 배양 한 음성대조군에서 TNF-α 분비량은 3.72±0.23 ng/mL로 나타났으며, LPS(200 ng/ml) 단독 처리군에서 TNF-α의 농도는 12.9±0.48 ng/mL로 급격히 증가하였다. 삼내자 열수추출물을 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 mg/mL 농도로 처리한 결과 10.81±0.43 ng/mL, 9.56±0.04 ng/mL, 7.97±0.14 ng/mL, 6.07±0.02 ng/mL로 TNF-α의 분비가 감소되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 염증질환 동물실험에서 삼내자 에탄올추출물의 항염 효능과 함께 천연자원인 삼내자 추출물이 항염 소재로서 활용 가능할 것으로 판단된다[21,22].

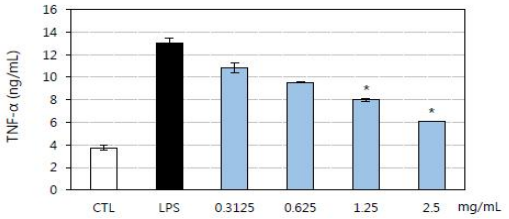
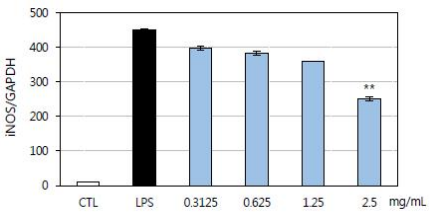


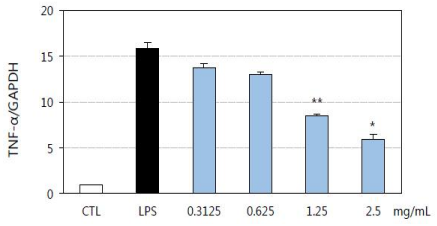
Fig. 6. Effect of KG extracts on TNF-α secretion in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were incubated with LPS in the presence or absence of KG for 24 h. Results are the mean±S.D. from three independent experiments. $^{*}p<0.05$ compared to the negative control.

3.3.4 TNF-α와 iNOS mRNA 발현 억제

염증 매개 물질인 TNF-α와 iNOS의 mRNA 발현 수준 변화를 real-time PCR 정량분석법을 사용하여 조사한 결과 Fig. 7과 같다. 그 결과 삼내자 열수추출물 농도 증가에 따른 세포 내 TNF-α와 iNOS mRNA발현 수준이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 7a and 7b). 이러한 결과는 삼내자의 천연 flavonoid 성분인 kaempferol 단일 물질을 RAW264.7 세포에 처리하여 LPS에 의해 유도된 COX-2, TNF, iNOS 유전자 발현이 억제되었다는 선행연구결과와 유사함을 알 수 있었다[36]. 따라서 삼내자 열수추출물은 LPS에 의해 유도된 염증매개 물질인 TNF-α와 iNOS의 mRNA 합성을 감소시키고 그 결과 iNOS 단백질 발현을 억제함에 따라 NO의 생성을 저해하는 것으로 사료된다.



(a)



(b)

Fig. 7. Effect of KG extracts on iNOS and TNF-α gene expression in LPS-induced RAW264.7 cells. Cells were incubated with LPS in the presence or absence of KG for 12 h. iNOS(a) and TNF-α (b) mRNAlevels were determined using real-time PCR. Results are the mean±S.D. from three independent experiments. $^{*}p<0.05$; $^{**}p<0.001$ compared to the negative control.

4. 결론

본 연구는 삼내자 열수추출물의 화장품 원료로서의 가능성을 조사하기 위해 삼내자 열수추출물을 이용하여 항산화 활성, 세포독성, 항염 활성을 평가하였다. DPPH 또는 ABTS 라디컬 소거능과 FRAP 환원력을 이용한 항산화 활성 연구 결과 추출물 농도 의존적으로 삼내자 열수추출물의 항산화 효능이 증가하는 것으로 나타났다. 또한 총 폴리페놀 함량 측정 결과 1.28±0.064 mg GAE/g로 확인되었다. 열수추출법을 이용한 삼내자 추출물의 항산화 활성 연구는 거의 이루어진 바가 없으며, 현재까지 보고된 선행 연구에서 사용된 다양한 유기용매를 이용한 삼내자추출물과 마찬가지로 삼내자 열수추출물 또한 우수한 항산화 효능을 지닌 천연물질임을 확인하였다. 삼내자 열수추출물의 항염 효능을 평가하기 전 쥐의 대식 세포주인 RAW264.7 세포를 이용하여 세포 생존율을 측정한 결과 저농도에서는 세포 독성이 나타나지 않았으나 5 mg/mL 이상에서는 세포독성이 관찰되었다. 본 연구에서 사용된 삼내자 열수추출물은 미정제 추출물(crude extract)이므로 향후 열수추출 후 분획화에 따른 추출물의 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다. LPS로 활성화된 RAW264.7 세포에 삼내자 열수추출물을 처리한 결과 LPS에 의해 유도된 NO 생성, iNOS 단백질 및 TNF-α 분비가 감소하였으며, 이러한 결과는 추출물 처리에 따른 세포 내 iNOS 또는 TNF-α mRNA 발현억제 기전을 통해 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 삼내자 열수추출물은 세포 안정성과 항산화 및 항염 기능의 유효성분을 포함하여 화장품 천연 원료로서의 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

REFERENCES

[1] Y. M. Seo, L. Shuai & E. K. Kim. (2015). The Influence of National image, Brand Image and Countryof-Origin Image on Purchase attitude and Purchase Intention-Focus on the purchase of korean cosmetics which applied a high and/or convergene technology in chinese consumers. *Journal of Digital Convergence, 13(6),* 69-79.

[2] M. R. Yeom, J. O. Park & D. Y. Jung. (2016). Analysis of Cosmetics App Smart UI convergence Design in Mobile Environments. *Journal of the Korea Conergence Society, 7(2),* 13-17.

[3] L. Baumann. (2007). Skin ageing and its treatment. *Journal of Pathology, 211,* 241-251.

[4] H. R. Park & K. Y. Kim. (2017). Inhibition Effect of TNF-α, IL-1α Production TNF-α, IL-1α mRNA Expression from C*henopodium album* Ethanol Extract, *Journal of the Korean Society of Cosmetology, 23(5),* 971-977.

[5] J. H. Seo, Y. J. Lee, Y. I. Jo, J. Y. Ko, M. J. Mun, K. H. Park & S. E. Choi. (2018). Anti-fungal, anti-oxidant, and anti-inflammatory effects of supercritical fluid extracts from *Ulmus daidiana. Journal of the Korea Convergence Society, 9(8),* 225-233.

[6] H. J. Kim. (2016). Convergence study on the antioxidant effect of crude extracts of Nelumbo nucifera Gaertner. *Journal of the Korea Convergence Society, 7(3),* 53-58.

[7] Y. R. Wang, E. S. Kim & J. A. Lee. (2018). The study of Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Notoginseng Root (NGR) Hot Water Extracts. *Journal of the Korean Society of Cosmetology, 24(5),* 1014-1020.

[8] M. J. Kim, J. H. Kim, S. H. Lee, E. J. Cho & H. Y. Kim. (2018). Determination of Radical Scavenging Activity of *Aster yomena* (Kitam.) Honda. *Journal of the Korea Academia-Industrial, 19(9),* 402-407.

[9] J. H. Kim & D. Y. Kim. (2017). Anti-inflammatory Effect of Ethanol Extracts from *Dioscorea bulbifera. Journal of the Korean Society of Beauty And Art, 17(1),* 91-102.

[10] K. N. Min, G. H. lee, S. J. Park & T. B. Choe. (2019).

Physiological activity and efficacy of cosmetic products in bio-converted soybean embryo extract. *Journal of the Korea Convergence Society, 10(3),* 211-220.

[11] M. I. Umar, M. Z. B. Asmawi, A. Sadikun, R. Altaf & M. A. Iqbal. (2011). Phytochemistry and medical properties of *Kaempferia galanga L.* (Zingiberaceae) extracts. *African journal of Pharmacology, 5(14),* 1638-1647.

[12] H. J. Shetu, K. T. Trisha, S. A. Sikta, R. Anwar, S. S. B. Rashed & R. R. Dash. (2018). Pharmacological importance of *Kaempferia galanga* (Zingiberaceae): A mini review. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3(3),* 32-39.

[13] C. Mekseepralard, N. Kamkaen, & J. M. Wilinson. (2010). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Traditional Thai Herbal Remedies for Aphthous Ulcers. *Phytotherapy Research, 24,* 1514-1519.

[14] A. Amuanuta, T. Plengsuriyakarn, & K. Na-Bangchang. (2017). Anticholangiocarcinoma activity and toxicity of the Kaemphferia galanga Linn. Rhizome ethanolic extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 17(1),* 1-11.

[15] P. C. Jagadish, K. P. latha, J. Mudgal, & G. K. Nampurath. (2016). Extraction, characterization and evaluation of Kaemphferia galanga L. (Zingiberaceae) rhizome extracts against acute and chronic inflammation in rats. *Journal of Ethnopharmacology, 194,* 434-439.

[16] M. I. Umar, M. Z. Asmawi, A. Sadikun, A. M. S. A. Majid, F. S. R. Al-Suede, L. E. A. Hassan, R. Altaf & M. B. K. Ahamed. (2014). Ethyl-*p*-methoxycinnamte isolated from *kaempferia galanga* inhibits inflammation by suppressing interleukin-1, tumor necrosis factor-α, and angiogenesis by blocking endothelial functions. *CLINICS, 69(2),* 134-144.

[17] M. H. In, B. K. Jeon, Y. J. Mun & W. H. Woo. (2016). Hexane extract of *Kaempferia galanga L.* suppresses melanogenesis. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine, 30(1),* 47-53.

[18] H. J. Ko et al. (2014). Hypopigmentary effects of ethyl *P*-methoxycinnamate isolated from *Kaempferia galanga. Phytotherapy Research, 28,* 274-279.

[19] J. W. Yoon, J. M. Han, H. J. Yoon & W. S. Ko. (2013). Inhibitory effects of methanol extract of Kaempferia galanga on melanogenesis in B16/F10 melanoma cells. *The Journal of Korean Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 26(1),* 1-18.

[20] A. M. Vittalrao, T. Shanbhag, M. Kumari K, K. L. Bairy & S. Shenoy. (2011). Evaluation of antiinflammatory and analgesic activities of alcoholic extract of *Kaempferia galanga* in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology, 55(1),* 13-24.

[21] H. Riasari, R. Rachmaniar & Y. Febriani. (2016). Effectiveness of anti-inflammatory plaster from kencur(*Kaempferia galanga* L.) rhizome ethanol extract. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research, 7(4),* 1746-1749.

[22] Y. Nie, L. K. Liana & E. Evacuasiany. (2012). The effect of kencur's rhizome ethanol extract(*Kaempferia galanga* L.) against gastric mucosal to swiss webster mice in induced by asetosal. *Journal Medika Planta, 2(1),* 77-84.

[23] M. S. Blois. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stale free radical. *Nature, 181,* 1199-1200.

[24] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang & C. R. Evans. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26(9-10),* 1231-1237.

[25] I. F. Benzie & J. J. Strain. (1996). The ferric reducing ability of plasma(FRAP) as measurement of "antioxidant power" The FRAP assay. *Analytical Biochemistry, 239,* 70-6.

[26] AOAC. (1980). Official Methods of Analysis. 13 th ed., *Association of Official Analytical Chemists,* Washington D.C, USA 376-384.

[27] A. Murakami et al. (2000). Modifying effects of carotenoids on superoxide and nitric oxide generation from stimulated leukocytes. *Cancer Letters, 149,* 115-123.

[28] W. J. Hossen, W. W. Yang, D. W. Kim, A. Aravinthan, J. H. Kim & J. Y. Cho, (2017). Thymoquinone: An IRAK1 inhibitor with in vivo anti-inflammatory activities. *Scientific reports, 7, 42995.*

[29] M. J. Kim, J. H. Kim, S. Lee, E. J. Cho & H. Y. Kim. (2018). Determination of Radical Scavenging Activity of *Aster yomena*(Kitam.) Honda. *Journal of the Korea Academia-Industrial, 19(9),* 402-407.

[30] E. W. C. Chan et al. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food chemistry, 109,* 477-483.

[31] H. Ali, R. Yesmin, M. A. Satter, R. Habib & T. Yeasmin. (2018). Antioxidant antineoplastic activities of methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn.

Rhizome against Ehrlich ascites carcinoma cells. *Journal of King Saud University-Science, 30(3),* 386-392.

[32] J. S. Moon, J. H. Lee & Y. B. Kim. (2017). Study of antioxidation activity and melanocyte effect of *Pueraria Lobata* Root Extract. *Journal of Korean Oil Chmist's Society, 34(2),* 418-425.

[33] J. M. Awika, L. W. Fooney, K. Wu, R. L. Prior & L. Cisneros-Zevallos. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products. *Journal of agricultural and food chemistry, 51(23),* 665-6662.

[34] E. K. Lee & S. H. Jung. (2018). Anti-inflammatory and antioxidant effect of natural herbs mixture in RAW264.7 cell line. *Journal of the Korean Society of Cosmetology, 24(1),* 42-50.

[35] D. S. Lee, C. S. Yoon, Y. T. Jung, J. H. Yoon, Y. C. Kim & H. C. Oh. (2016). Marine-Derived Secondary Metabolite, Griseusrazin A, Suppresses Inflammation through Heme Oxygenase-1 Induction in Activted RAW264.7 Macrophages. *Journal of Natural Products, 79(4),* 1105-111.

[36] S. H. Kim et al. (2015). The dietary flavonoid kaempferol mediated anti-inflammatory response via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets. *Mediators of Inflammation, 2015, Article ID 904142,* 15 pages.

진정원비너스(Ching Yuen Venus Chan) [학생회원]

· 2017년 2월 : 서경대학교 미용예술학사
· 2017년 3월 ~ 현재 : 서경대학교 미용예술학석사 재학
· 관심분야: 피부미용, 화장품, 미용교육
· E-Mail: yuenyuen1993@daum.net

이 지 안(Ji-An Lee) [정회원]

· 2007년 2월 : 서경대학교 대학원 미용예술학석사
· 2012년 2월 : 원광대학교 대학원 미용학박사
· 2013년 9월 현재 : 서경대학교 뷰티테라피&메이크업학과 조교수, 외국인학생 주임교수
· 관심분야 : 피부미용, 화장품, K-Beauty, 미용교육
· E-mail: jessicajslee@naver.com