



Original Article / 원저

유백피, 토복령 추출물 혼합물의 항산화, 항염, 항균 및 난소세포 보호효과

전상규, 안정윤, 박수미, 박선동*, 이주희*

동국대학교 한의과대학

Antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and ovoprotective effects of mixture of Ulmi cortex and Smilacis rhizoma extracts

Sang Kyu Jeon, Jung Yun Ahn, Su Mi Park, Sun-Dong Park*, Ju-Hee Lee*

College of Korean Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : US extract is a mixture of each extract of *Ulmi cortex* and *Smilacis rhizoma*. In this study, we investigated the antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, and ovoprotective effects of US extract in *in vitro* model to identify potential candidates for improving female reproductive function.

Methods : The antioxidant activity of US extract was measured using 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl free radical and superoxide anion radical scavenging assays. The anti-inflammatory effect of US extract on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells were determined with a nitric oxide (NO) assay, enzyme linked immunosorbent assays, and western blots analysis. The antibacterial activity of US extract against vaginitis infection microorganisms were determined with disc diffusion and minimum inhibitory concentration assays. The ovoprotective effect of US extract on 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD)-induced ovotoxicity in CHO-K1 cells were evaluated with a cell viability assay.

Result : US extract showed good antioxidant capacity and inhibited LPS-induced NO production as well as iNOS and COX-2 expression and secretion of pro-inflammatory cytokine IL-6 without affecting the cell viability. It showed significant clear zones for *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* but did not indicate the clear zones for *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium*. VCD-induced ovotoxicity in CHO-K1 cells was significantly reduced by US extract pre-treatment.

© 2020 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : These results demonstrate that US extract has antioxidant activity, anti-inflammatory effects on the LPS-stimulated macrophages, antibacterial activity against vaginitis infection microorganisms, and protective effects on the ovarian cells against VCD-induced ovotoxicity. These findings suggest that the US extract can be used as new prescriptions, supplements, functional foods, and cosmetics for improving female reproductive function.

Key words : *Ulmi cortex*, *Smilacis rhizoma*, US extract, female reproductive function.

I. 서론

현재 우리나라는 세계 최저수준의 출산율과 기대수명 증가, 고령화의 심화로 인구감소 시대로 전환 중이며, 인구절벽 위기를 대응하기 위하여 저출산 문제가 국가차원의 여젠다로 부각되면서 다양한 저출산 극복 방안을 수립하여 추진하고 있다¹⁾. 여성의 사회활동 증가, 만혼(晩婚), 임신 지연, 고령 출산, 생식 관련 질환 및 만성질환 등으로 여성의 생식능력이 저하되고, 난임이 증가하고 있는 실정이다¹⁾. 여성의 생식 기관은 다른 신체 기관보다 더 빨리 노화되며, 생식 능력은 연령이 증가할수록 감소한다^{2,3)}. 음주, 흡연, 약물 남용, 고열량 식습관, 운동 부족, 스트레스 등의 생활 습관은 생식 건강을 저해하는 요인들이며, 환경오염물질에 지속적인 노출로 인하여 생식 노화를 야기하기도 한다. 최근 한 연구에 의하면 여성의 생식 관련 요인들이 평생 건강에 깊은 영향을 미친다는 연구 결과가 보고되어 생식 건강의 중요성이 주목받고 있다⁴⁾.

생식 건강(reproductive health)은 '생식기계통(reproductive system)과 그 기능 및 변화과정에서 질병이나 쇠약함이 없는 신체적·정신적 및 사회적으로 안녕한 상태'로 정의되어진다⁵⁾. 성인 초기의 여성 생식 건강은 향후 출산이나 건강에 영향을 미칠 수 있어 예방적 차원의 생식 건강관리의 필요성이 증대되고 있다^{5,6)}. 최근 약리작용이 강한 한약재 재배기술의 발달과 건강, 웰빙(well-being), 행복한 삶을 추구하는 라이프 트렌드와 맞물리면서 한약재를 이용한 신약개발, 기능성 식품, 기능성 화장품 및 생활용품 등 다양한 산업에 활용되며 다양한 제품으로 활발

히 개발되고 있다⁷⁾. 특히, 여성의 건강 증진 목적뿐만 아니라 생식 관련 질환의 예방, 개선 및 치료에 있어 안전하고, 효과적인 한약재 기반 제품 개발을 위하여 많은 연구들이 진행되고 있으나, 대부분 갱년기 여성 건강 증진을 위한 연구에 초점을 맞추고 있다. 이에 본 저자들은 난임을 야기하는 배란장애, 조기난소부전, 질염 및 골반염 등의 질병을 예방하여 갱년기 여성뿐만 아니라 가임기 여성의 건강도 함께 관리할 수 있는 한약재를 발굴하고자 하였다.

유백피(楡白皮, *Ulmi cortex*)는 느릅나무과(Ulmaceae) 왕느릅나무(*Ulmus macrocarpa* Hance)의 주피를 제거한 수피로 성미는 감(甘), 평(平)하며, 이수(利水), 통림(通淋), 소종(消腫), 이규(利竅), 활태(滑胎), 이산(易産), 통경맥(通經脈), 행진액(行津液), 벽사기(辟邪氣) 등의 효능이 있고, 주로 소화기 질환과 대하(帶下)와 같은 부인병증을 다스린다⁸⁾. 현대의학적 연구로는 감별, 성분 및 약리 효과와 관련된 연구와 진통억제, 항산화, 항염, 항균 활성을 바탕으로 위궤양, 치주 질환, 염증 등에 응용한 연구와 피부 세포 재생, 피부 주름 억제 등의 피부와 관련된 연구가 보고되었다⁹⁾.

토복령(土茯苓, *Smilacis rhizoma*)은 백합과(百合科, Liliaceae)에 속한 여러해살이 청미래덩굴(*Smilax china* Linné 또는 *Smilax glabra* Roxburgh)의 뿌리줄기로 성미는 감(甘), 담(淡), 평(平)하며, 해독(解毒), 거습이절(祛濕利節)의 효능이 있어 사지 경련, 옹결(癰癤), 열림삼통(熱麻澁痛) 등의 병증에 사용된다고 알려져 있다^{8,10)}. 약리 연구로는 간암 치료 효능, 심근 보호 작용, 세포면역반응 억제 작용, 부정맥 예방 효능, 지질의 산화, 항동맥경화 등의 연구가 있으며,

*Corresponding author : Sun Dong Park, College of Korean Medicine, Dongguk University, 32, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 10326, Republic of Korea.

Tel : +82-31-961-5825, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

*Corresponding author : Ju-Hee Lee, College of Korean Medicine, Dongguk University, 32, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, 10326, Republic of Korea.

Tel : +82-31-961-5839, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : jh1548@dongguk.ac.kr

•Received : February 13, 2020 / Revised : February 19, 2020 / Accepted : February 24, 2020

임상으로는 심장병, 신우신염, 궤양성 결장염, 만성 골수염, 골 결핵, 요도감염, 매독, 건선 및 피부병 등의 다양한 질환에 응용되어 예방 및 치료 효능이 있는 것으로 알려졌다⁸⁾.

본 연구에서는 유백피와 토복령 각 추출물의 혼합물(US)을 이용하여 항산화, 항염, 항균 및 생식세포 보호 효능을 평가하여 여성의 생식 건강 관리를 위한 임상 적용 가능성과 건강보조제, 기능성 식품 및 화장품 소재로서의 활용 가능성을 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Anti-nitric oxide synthase II (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 항체는 EMD Millipore (Temecula, CA, USA)에서 구입하였고, anti-cyclooxygenase (COX)-2, anti- β -actin 항체, horseradish peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), griess 시약, lipopolysaccharides (LPS), 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) 등의 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 유백피 및 토복령 추출물의 제조

본 연구에 사용된 유백피와 토복령은 (주)휴먼허브 (Daegu, Korea)에서 구매하여 선별하여 사용하였다. 건조된 유백피, 토복령 100 g을 800 ml의 70% 에탄올에 침지시켜 4시간 열탕 추출한 후, 잔사를 Whatman Filter paper에 여과시키고, 회전진공농축기(EYELA, Tokyo, Japan)에서 감압 농축한 다음, 농축액을 동결건조기(freeze dryer, EYELA)로 분말화하였으며, 유백피(U) 및 토복령(S) 추출물의 수율은 각각 11.7%, 17.8%이었다. 동결건조한 분말형태의 추출물은 -20°C 에 보관하였고, 실험하기 직전에 유백피 추출물과 토복령 추출물을 1:1의 비율로 혼합한 다음, dimethyl sulfoxide (DMSO; Applichem, Darmstadt, Germany)에 100 mg/ml의 농도로 완전히 녹이고, 0.22 μm Minisart® Syringe filter (Sartorius AG, Weender Landstr., Germany)로 여과하여 실험에 사용하였다.

3. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 자유 라디칼 소거활성 평가

항산화능 평가 방법 중 하나인 DPPH assay를 실시하여 DPPH 자유 라디칼 소거활성능을 측정하였다. 다양한 농도의 US 추출물 50 μl 에 1 M DPPH 용액 1 ml과 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 450 μl 를 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 30분간 반응시킨 다음, microplate reader (VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

4. Superoxide anion 라디칼 소거활성 평가

Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 라디칼에 대한 소거 활성을 nitroblue tetrazolium 환원법을 이용하여 측정하였다. 다양한 농도의 US 추출물 또는 양성대조군 butylated hydroxytoluene (BHT) 30 μl 에 30 mM EDTA (pH 7.4) 10 μl , 30 mM hypoxanthine 1 μl , 1.42 mM nitroblue tetrazolium 200 μl 를 가한 다음 실온에서 3분 반응시키고, 1 U/ml xanthine oxidase 10 μl 를 첨가 후, 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 총 용량을 300 μl 로 맞춰 실온에서 20분간 반응시킨 다음 microplate reader 560 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포 배양

실험에 사용된 마우스 대식세포주 RAW 264.7 세포와 햄스터 난소세포주 Chinese hamster ovary (CHO)-K1 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 세포의 배양을 위해 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; WELGENE, Daegu, Korea) 및 1%의 penicillin/streptomycin (Thermo Fisher, GrandIsland, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; WELGENE) 배지를 사용하여, 37°C , 5% CO_2 로 설정된 인큐베이터 (Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Germany)에서 배양하였다.

6. 세포 생존율 측정

US 추출물이 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향과 VCD 처리에 따른 CHO-K1 세포 손상으로부터 보호 효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 먼저 세포 배양용 96 well plate에 RAW

264.7 및 CHO-K1 세포를 1×10^4 cells/well로 분주하고, 다음 날 다양한 농도의 US 추출물을 24시간 처리하였다. 세포 보호능 평가를 위해 CHO-K1 세포를 96 well plate에 6×10^3 cells/well로 분주하고, 다음 날 4시간 동안 고갈시킨 다음, 무혈청 배지에 US 추출물을 농도별로 1시간 전처리한 후 VCD 2 mM을 24시간 처리하였다. 약물 처리 시간이 종료된 후, MTT 시약(최종 농도 0.2 mg/ml)을 처리하여 37°C에서 반응시켰다. 2시간 후, 배지를 제거하고 DMSO (100 μ l)로 formazan crystals을 녹인 다음, microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 DMSO 처리된 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

7. Nitric Oxide (NO) 측정

무혈청 배지에서 6시간 이상 배양한 RAW 264.7 세포에 US 추출물을 10, 50 및 100 μ g/ml 농도로 1시간동안 전처리하고, LPS 1 μ g/ml를 처리하거나 무처리하여 18시간 배양하였다. 이후 배양 배지를 원심 분리하여 상층액 100 μ l를 분주한 것에 griess 시약을 동량 첨가하여 상온에서 10분 반응시킨 후, microplate reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량은 DMSO 처리된 대조군 대비 배수로 나타내었다.

8. 효소 결합 면역 흡착 분석법 (ELISA)

염증성 사이토카인 interleukin (IL)-6의 분비량을 측정하기 위해, NO 측정 실험에 사용한 상층액 100 μ l를 Cymax Mouse IL-6 ELISA Kit (AbFrontier, Seoul, Korea)에 적용하여 제공된 프로토콜에 따라 실험을 진행한 다음, microplate reader를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 IL-6의 양을 계산하였다.

9. Western blot 분석

무혈청 배지에서 6시간 이상 배양한 RAW 264.7 세포에 US 추출물 (10, 50 및 100 μ g/ml) 또는 양성 대조군 dexamethasone (1 μ M)을 1시간동안 전처리하고, LPS 1 μ g/ml를 처리하거나 무처리하여 18시간 배양한 다음, RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질을

추출하였다. Bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific)으로 단백질의 농도를 측정된 다음, sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질 샘플을 만들었다. 동량의 단백질(30-40 μ g)을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 단백질을 분리시키고 polyvinylidene fluoride membrane (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전이시킨 다음, 5% skim milk로 1시간 이상 blocking을 실시하였다. iNOS, COX-2 및 β -actin에 대한 1차 항체들을 4°C에서 over night 반응시키고, PBST (PBS with Tween 20)로 10분씩 3회 세척한 다음, goat-anti-rabbit 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. Membrane을 PBST로 10분씩 3회 세척 후, enhanced chemiluminescence solution (Amersham, Piscataway, NJ, USA)에 반응시킨 다음 Fusion Solo-2 화상이미지 분석기(Vilber Lourmat, Paris, France)에서 각 단백질의 발현 정도를 관찰하고, 이미지를 획득하였다.

10. 항균 효능 평가

질 감염 균주 4종 *Escherichia coli* (*E. Coli*, CCARM 1428), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, CCARM 3707), *Enterococcus faecium* (*E. faecium*, CCARM 5203), *Candida albicans* (*C. albicans*, CCARM 14021)을 항생제내성균주은행(Culture Collection of Antibiotics Resistant Microbes, Seoul, Korea)에서 분양받아 항균효능 평가에 사용하였다. 모든 실험은 균주를 37°C, nutrient broth에 3회 활성화한 후 시행하였다.

먼저 디스크 확산법(Disc diffusion assay)을 통해 질 감염 균주에 대한 US 추출물의 항균효과를 평가하였다. 활성화된 균주를 nutrient agar 고체 배지에 도말평판 배양법을 이용하여 도말하고, 유백피(U) 추출물, 토복령(S) 추출물, US 추출물(5 mg/디스크) 및 양성대조군 ampicillin 1 μ g/ml를 흡수시킨 8 mm 종이 디스크를 올려 37°C에서 24시간 배양한 후, 디스크 주변의 투명환(clear zone)의 크기를 비교하여 항균효과의 유무를 판별하였다.

디스크 확산법에서 항균효과를 보인 균주에 대해서는 최소생장저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정법을 실시하였다. 96 well plate에 시험

균주를 100 μ l씩 분주한 후, US 추출물을 농도별로 처리하여 0, 4, 12, 18시간 간격으로 600 nm 파장에 서의 흡광도를 측정하여 최소저해농도를 확인하였다.

11. 통계분석

모든 실험 결과들은 평균(mean) \pm 표준편차 (standard deviation, SD)로 나타냈으며, 유의성을 검정하기 위하여 GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 일원분산분석(one way analysis of variance, ANOVA)을 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Tukey's multiple comparison test로 분석하였다.

III. 결과

1. US 추출물의 항산화 효능

US 추출물의 DPPH 자유라디칼 소거활성능을 측정한 결과는 Figure 1A에서 보여주는 바와 같이 농도

가 증가할수록 DPPH 소거능이 증가하는 경향을 나타내었으며, 100 μ g/ml 이상의 농도에서는 약 88%의 높은 효과를 보였다. US 추출물의 반수영향농도 (EC_{50} ; half maximal effective concentration)를 산출한 결과 56.7 μ g/ml이었다. US 추출물과 양성대조군 butylated hydroxytoluene (BHT)을 100 μ g/ml로 처리하였을 때, US 추출물의 DPPH 소거활성능은 $82.62 \pm 0.36\%$, BHT는 $53.45 \pm 1.43\%$ 로 US 추출물이 BHT보다 약 29% 더 우수하였다 (Figure 1B).

항산화 활성의 또 다른 지표인 superoxide anion 라디칼에 대한 소거 활성을 측정한 결과, Figure 1C에서 보여주는 바와 같이 US 추출물은 10 μ g/ml의 농도에서 $79.35 \pm 1.46\%$ 의 superoxide anion 소거활성능을 보였으며, 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었고, 반수영향농도는 6.3 μ g/ml이었다. 반수영향농도를 비교해 보면, US 추출물이 DPPH 자유라디칼보다 superoxide anion 라디칼의 소거능이 더 우수한 것을 알 수 있었다.

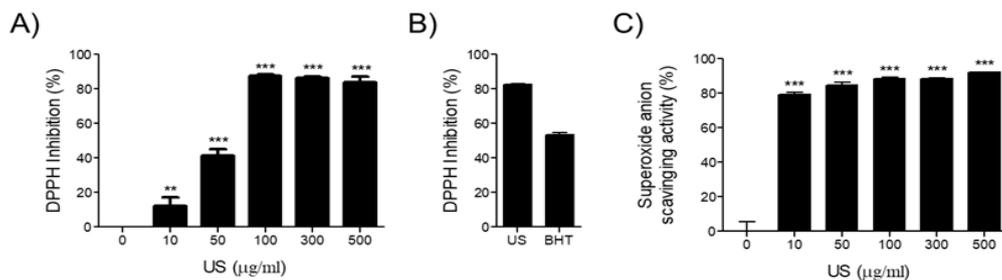


Figure 1. Anti-oxidant effects of US extract (A) DPPH free radical scavenging activity of US extract. (B) Comparison of DPPH free radical scavenging activity of 100 μ g/ml US and BHT. (C) Superoxide anion radical scavenging activity of US extract. (Significant vs. control, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$)

2. RAW 264.7 대식세포주에서 US의 항염증 효능

US 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 증식에 영향을 미치는지 알아보기 위해 먼저 세포 생존율을 MTT 분석법으로 측정하였다. US 추출물을 10, 50, 100, 300 및 500 μ g/ml의 농도로 24시간 처리한 후 세포 생존율을 측정해 본 결과, 100 μ g/ml 이하의 농도 범위에서 RAW 264.7 세포 생존율이 90% 이상을 나타내었다(Figure 2A). 따라서 이후 실험에서는 US 추출물의 투여 농도를 세포 독성이 없는 10-100 μ g/ml로 설정하였다.

다음으로 US 추출물의 항염증 효능을 평가하기 위

해 LPS의 자극으로 유도되는 염증 매개 물질인 NO의 생성에 영향을 미치는지 알아보았다. RAW 264.7 세포에 US 추출물을 10, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 1시간 전처리한 후, LPS 1 μ g/ml를 18시간 동안 처리한 결과, LPS의 처리는 NO의 생성을 현저하게 증가시켰으나, US 추출물의 전처리는 농도 의존적으로 유의하게 NO 생성을 억제하였다(Figure 2B). 50 μ g/ml의 농도에서 유백피와 토복령의 단독 추출물과 US 추출물의 NO 생성 억제 효능을 비교했을 때, 각각의 단독 추출물보다 단독 추출물들을 1:1로 혼합한 US 추출물이 NO 생성을 통계학적으로 유의하게 더 억제시

켰다(Figure 2C).

NO의 생성을 유도하는 것으로 잘 알려진 iNOS 단백질의 발현양상을 western blot으로 확인해본 결과, 위의 NO 생성 결과와 유사하게, LPS 처리는 iNOS의 발현을 증가시켰으나, US 추출물의 전처리는 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 실험에 사용된 US 추출물의 모든 농도에서 양성대조군인 dexamethasone 1 μ M 보다 iNOS의 발현을 더 잘 억제하였다(Figure 2D). 또 다른 대표 염증성 매개인자인 프로스타글란딘 E2 (prostaglandin E2, PGE₂)의 합성에 관여하는 COX-2 단백질의 발현을 분석해 본 결과, US 추출물의 전처리가 LPS로 인한 COX-2 단백질의 증가를 억제시키는 양상을 보였다(Figure 2D).

US 추출물이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 염증성 사이토카인 IL-6에 영향을 미치

는지 알아보기 위해 ELISA kit를 이용하여 분비량을 측정하였다. RAW 264.7 세포가 배양액 속으로 분비한 IL-6의 양은 대조군이 7.67 ± 0.86 pg/ml이었고, LPS 처리는 701.83 ± 17.13 pg/ml로 현저히 증가하였다. 반면, US 추출물을 10, 50 또는 100 μ g/ml 농도로 전처리시, 각각 660.28 ± 84.62 , 534.86 ± 27.62 , 103.14 ± 2.24 pg/ml로 농도 의존적으로 IL-6의 생성을 현저하게 억제시켰다(Figure 2E). 즉, LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포는 IL-6의 분비량을 현저히 증가시켰으나, US 추출물의 전처리는 50 μ g/ml의 농도에서부터 통계학적으로 유의하게 IL-6의 분비를 억제하기 시작하여 100 μ g/ml에서 최대 억제 효과를 보였다. 따라서, US 추출물은 항염증 효능이 우수한 것을 알 수 있었다.

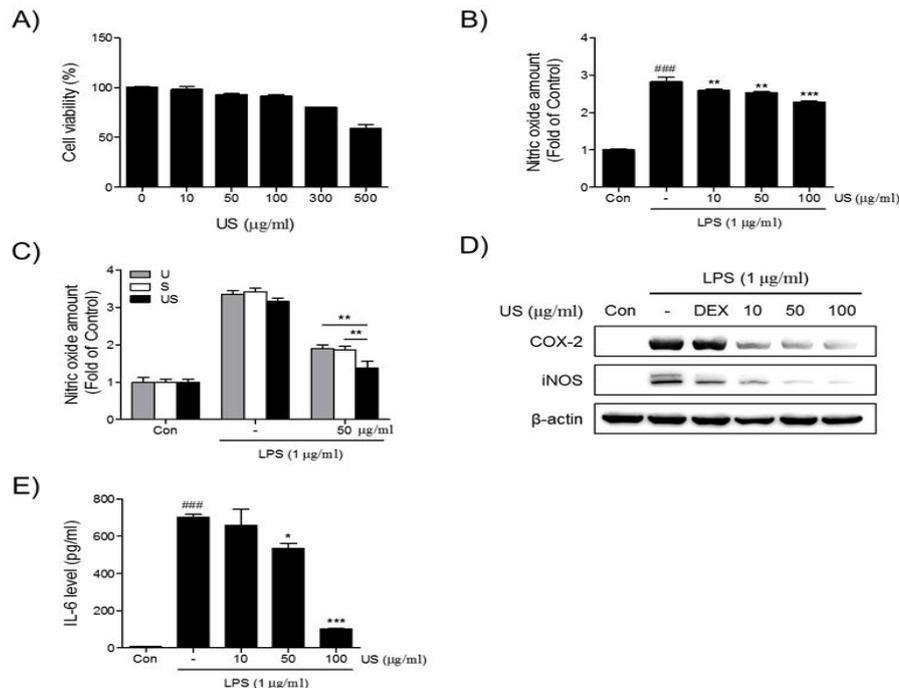


Figure 2. Effects of US extract on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. (A) Effect of US extract on RAW 264.7 cells viability. Cells were treated with various concentrations of US (10, 50, 100, 300, or 500 μ g/ml) for 24 h. Cell viability was determined by an MTT assay. Values were expressed as percentages of the non-treated control. (B) Effect of US extract on NO production. (C) Comparison of inhibitory effects of U, S, or US extracts on NO production. (U, Ulmi cortex extract; S, Smilacis Rhizoma extract; US, US extract) (D) Effect of US extract on expression of COX-2 and iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (F) Effect of US extract on IL-6 secretion. RAW 264.7 cells were pretreated with US (10, 50, or 100 μ g/ml) or dexamethasone (1 μ M) for 1 h and then treated with LPS (1 μ g/ml) for 18 h. (Significant vs. control, ### $p < 0.001$; significant vs. LPS treatment, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

3. 질 감염 균주에 대한 US 추출물의 항균효능

US 추출물의 항균효능을 평가하기 위하여 질 감염 균주로 알려진 *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium* 및 *C. albicans* 4종에 대해 디스크 확산법을 실시하였다. Clear zone 형성을 관찰하여 비교해 본 결과, Figure 3에서 보여주는 바와 같이 *S. aureus* 와 *C. albicans*에서 유백피(U), 토복령(S) 추출물, US 추출

물, 양성대조군으로 사용된 ampicillin 모두 clear zone이 잘 생성된 것으로 보아 항균효과가 있음을 확인하였고, US 추출물은 유백피 및 토복령 단독 추출물과 양성대조군보다 더 우수함을 확인하였다 (Figure 3A-B). 반면, *E. coli*와 *E. faecium* 균주에서는 항균효과를 나타내지 않았다(Figure 3C-D).

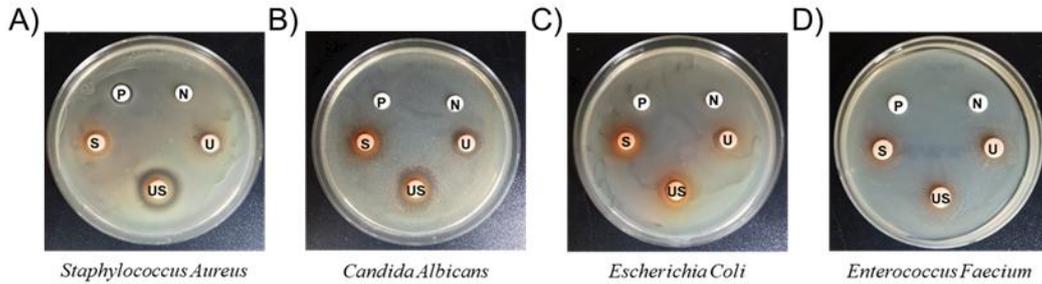


Figure 3. Antimicrobial activity of US extract against microorganisms using a disc diffusion assay. (A) *S. aureus* (B) *C. albicans* (C) *E. coli* (D) *E. faecium* (N, negative control; P, positive control-ampicillin 1 µg/ml; U, Ulmi cortex extract; S, Smilacis Rhizoma extract; US, US extract)

다음으로, 우수한 항균 효과를 보인 *S. aureus*와 *C. albicans*에 대해서만 추가적으로 최소성장저해농도 측정법(MIC assay)을 수행하여 최소 억제 농도를

측정하였다. 그 결과, *S. aureus*와 *C. albicans*에 대하여 US 추출물은 최소 5 mg/ml 이상의 농도에서 균의 성장이 저해되는 것을 확인하였다(Figure 4).

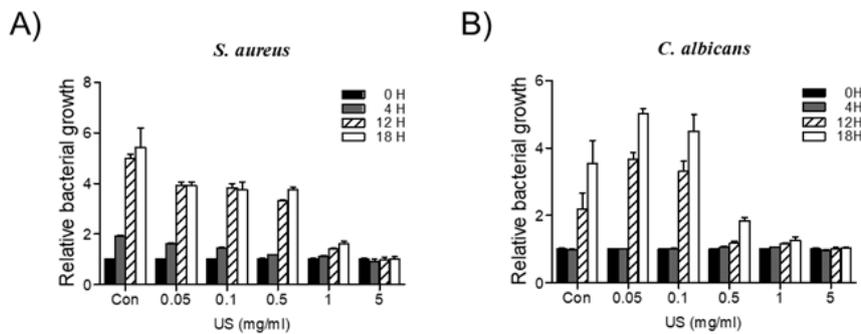


Figure 4. The minimum inhibitory concentration (MIC) assay with *S. aureus* (A) and *C. albicans* (B)

4. CHO-K1 세포에서 VCD로 유도된 난소독성으로부터 US 추출물의 보호효과

US 추출물이 CHO-K1 세포에서 난소독성에 대한 보호 효능이 있는지 알아보기 위해, 먼저 US 추출물의 농도 범위를 설정하고자 MTT 분석법을 이용하여 독성을 평가하였다. Figure 5A에서 나타내는 바와 같이, US 추출물을 0~100 µg/ml의 농도로 처리하였

을 때, 50 µg/ml 이하의 농도에서 세포 생존율이 90% 이상으로 CHO-K1 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였고, 100 µg/ml의 농도에서는 80.4 ± 1.7%로 약간의 독성을 보였다. 따라서, 다음 실험에서는 50 µg/ml 이하의 농도 범위를 사용하였다.

VCD 2 mM로 유도된 세포 독성으로부터 US 추출

물의 난소세포 보호효과를 평가하기 위하여 CHO-K1 세포에 US 추출물을 0.1, 1, 10, 30 및 50 µg/ml의 농도로 2시간 동안 전처리하고, 2 mM의 VCD를 처리하여 24시간 후 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 VCD 처리는 대조군과 비교하여 세포 생존율을 44.5 ± 1.7%로 현저히 감소시키며 독성을 유발하였다. 반면, US 추출물의 전처리는 VCD 처리군과 비

교하여 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하여 10 µg/ml의 농도에서 최고의 생존율(78.7 ± 7.0%)을 보였고, 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였지만, VCD 처리군보다 높았다(Figure 5B). 특히, US 추출물 1, 10 및 30 µg/ml의 농도는 VCD에 대한 난소 세포 독성으로부터 통계적으로 유의하게 세포 생존율을 증가시켰다.

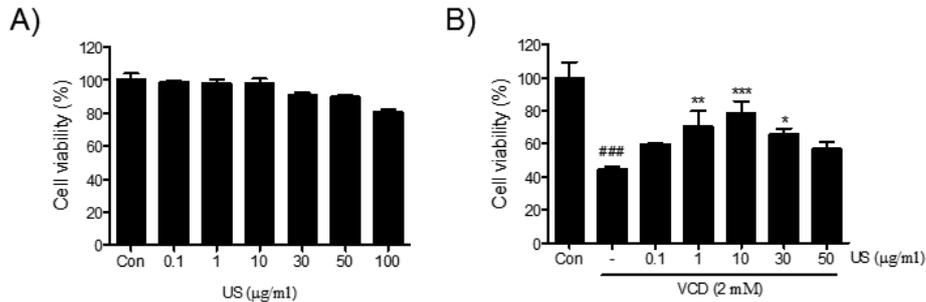


Figure 5. Protective effects of US extract against VCD-induced ovotoxicity in CHO-K1 cells. (A) Effect of US extract on CHO-K1 cell viability. Cells were treated with various concentrations of US extract (0.1, 1, 10, 30, 50, or 100 µg/ml) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Values were expressed as percentages of the vehicle (DMSO)-treated control. (B) Effect of US extract against VCD-induced ovotoxicity in CHO-K1 cells. CHO-K1 cells were treated with US (0.1, 1, 10, 30, or 50 µg/ml) in the absence or presence of 2 mM VCD for 24 h. The cell viability was measured using an MTT assay. (Significant vs. control, ###*p* < 0.001; significant vs. VCD treatment, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001)

IV. 고찰

현재 우리나라는 초저출산 현상이 지속되고 고령화 문제가 더욱 심각해지는 가운데 난임부부까지 급증하고 있어 인구절벽의 위기에 당면해 있다. 이에 국가 차원에서 저출산, 고령화 대응을 위한 대책을 수립하고, 난임 지원 및 가임기 여성의 건강증진사업 등의 다양한 정책을 추진하고 있으며, 여성의 생식 건강에 대한 관심도 고조되어 여성 생식 기능 증진을 위한 건강보조제, 기능성 식품 및 생활 제품들의 수요가 높아져 관련 시장도 성장하고 있는 추세이다¹⁾. 업계에선 여성 생식 건강 증진을 위한 제품 개발에 주력하고 있으나, 대부분 갱년기 여성을 대상으로 하는 제품들이며, 가임기 여성 또는 전 연령대의 여성을 대상으로 하는 연구나 제품 개발은 미흡한 실정이다. 게다가 여성 난임의 양방치료가 원인에 따라 외과적 치료, 약물치료 및 보조생식술로 진행되는데, 이로

인한 스트레스와 고통, 호르몬제 부작용 등으로 안전하고 효과가 우수한 한의학 및 보완대체요법에 대한 관심이 높아지면서 생식건강증진 및 난임치료효과를 과학적이고 객관적으로 입증하는 연구들도 활발하다. 또한, 일상생활에서도 생식 건강을 관리할 수 있는 제품에 대한 요구도 늘어날 것으로 예상되어 관련 제품의 후보 소재를 발굴하기 위하여 본 연구를 진행한 결과, 유백피 및 토복령 단독 추출물보다 유백피와 토복령 추출물을 1:1의 비율로 배합한 혼합물, US 추출물이 생리활성이 더 우수하다는 것을 확인하였다.

활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 과잉 생산 또는 항산화제(antioxidant)의 결핍으로 발생하는 산화적 스트레스(oxidative stress)는 여성의 생식 기능과 밀접한 연관이 있는데, 이는 원시난포(primordial follicle)의 감소, 원시난포와 1차 난포(primary follicle)의 세포 사멸(apoptosis) 유발 및 성숙난포(mature follicle)의 돌연변이 유발 등 난소 독성을 유발하여 난임의 주요 원인이 된다¹¹⁻¹³⁾. 식품첨가물, 환경오염 물질 및 독성물질로 인하여 활성산소종이 발생되는

데, 난소기능저하가 심한 여성은 체내에 활성산소가 많아 난소의 노화와 난자의 질 저하를 야기할 수 있으며, 다낭성 난소증후군, 자궁내막증, 원인불명의 난임 등의 가능성이 높아질 수 있다^{14,15}. 자궁내막염, 자궁경부염, 난소염, 질염, 외음염 및 골반염 등의 여성 생식 기관 관련 염증(炎症, inflammation) 또한 여성의 생식기능을 저하시키는 요인이 된다. 따라서 본 연구는 여성의 건강 관리를 위한 한약재 유래 천연 소재를 발굴하고자 유백피와 토복령 추출물의 혼합물인 US 추출물을 이용하여 항산화, 항염, 항균 및 난소세포 보호 효능을 평가하였다.

먼저 산화적 스트레스를 야기하는 활성산소종을 억제할 수 있는 항산화 활성을 측정해 본 결과, US 추출물은 DPPH 자유 라디칼 및 superoxide anion 라디칼에 대한 소거 활성을 가지고 있으며, DPPH 라디칼 소거능은 양성대조군 BHT 보다 우수하였고, DPPH 라디칼 소거능보다 superoxide anion 라디칼의 소거능이 더 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 항산화제로 잘 알려진 N-acetyl-L-cysteine (NAC) 이 마우스에서 난자의 노화를 지연시킨다는 연구결과¹⁶와 항산화능과 항염효과가 우수한 레스베라트롤이 마우스에서 난자의 수와 질을 개선시킨다는 연구 결과¹⁷로 미루어 보아 항산화능이 우수한 US 추출물이 여성 생식 세포에 유익한 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

염증 반응(inflammatory response)은 미생물의 감염이나 외부의 손상으로부터 생체를 보호하기 위한 방어기전으로 미생물이나 손상을 유발하는 신호가 오게 되면 대식세포(macrophage), 호중성구(neutrophils), 호산성구(eosinophils) 등의 면역 세포(immune cells) 들이 염증반응을 매개하는 염증매개체들(inflammatory mediators)과 사이토카인들을 빠르게 대량으로 생산하여 분비하게 된다¹⁸. 염증매개체 생성을 매개하는 대표적인 효소인 COX-2, iNOS와 염증성 사이토카인으로는 tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon (IFN) 등이 잘 알려져 있다¹⁸. 일반적으로 항염 효능 평가는 대식세포를 활성화시킨다고 잘 알려진 박테리아나 진균의 세포막 성분인 LPS를 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에 처리하여 염증 반응을 유도한 세포 모델을 많이 이용해 왔으며, 본 연구에서도 이 모델을 이용하여 US 추출물의 항염 효능을 평가하였다. 본 연구 결과에 따르면, US

추출물은 대식세포에 독성을 일으키지 않는 농도 범위에서 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 COX-2 및 iNOS 단백질 발현을 현저히 억제하였고, 이를 통하여 염증 반응에 중요한 매개체 NO의 생성 및 염증성 사이토카인 IL-6의 분비를 효과적으로 억제하였기에 항염 효능이 우수함을 알 수 있었다. 특히, 50 μ g/ml의 농도로, 유백피와 토복령의 단독 추출물과 US 추출물의 NO 생성 억제 효능을 비교했을 때, 각각의 단독 추출물보다 단독 추출물들을 1:1로 혼합한 US 추출물의 효능이 더 우수한 것을 확인할 수 있었다.

질염(vaginitis)은 자궁과 외부에 있는 생식 기관인 질에 염증이 생기는 것으로, 여성의 대부분은 일생에 한 번 이상 질염을 겪는다고 보고되었으며, 증상이 심해지면 자궁내막염이나 골반염 등 각종 합병증으로 이어질 수 있다¹⁹. 질염은 감염원에 따라 세균성 질염(bacterial vaginosis), 칸디다성 질염(vulvovaginal candidiasis), 트리코모나스 질염(trichomonal vaginitis)으로 나누어지며, 세균성 질염은 40-50%로 가장 흔하고, 그 다음으로 칸디다성 질염 20-25%, 트리코모나스증 15-20%이며, 위축성, 자극성, 알레르기성 및 염증성 질염을 포함한 비감염성 질염은 덜 일반적으로 질염 전체의 5-10%를 차지한다고 알려져 있다²⁰. 본 연구에서는 질염을 유발하는 대표적인 유해 미생물로 그람 음성균인 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*)과 그람 양성균인 포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*), 장내구균(*Enterococcus faecium*, *E. faecium*), 그리고 칸디다성 질염의 약 90%를 차지하는 원인균인 칸디다균(*Candida albicans*, *C. albicans*) 총 4종의 균주를 이용하여 디스크 확산법으로 US 추출물의 항균 효능을 평가하였으며, US 추출물은 *S. aureus*와 *C. albicans*에서 항균효능을 보였다. 특히 유백피와 토복령 단독 추출물보다 효능이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이는 US 추출물이 질염의 예방 및 치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

한편, 난소 독성(ovotoxicity)을 유발하는 물질로 bisphenol A, trichloroethylene, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, 4-vinylcyclohexene, 3-Methylcholanthrene, 항암제인 cyclophosphamide, 5-fluorouracil 등이 알려져 있다²¹⁻²³. 여성 생식 관련 연구는 난소 독성 물질을 이용하여 주로 동물을 대상으로 연구가 진행되어왔는데, 이는 효능의 신속한 선별에 제한이 있기

에 약물이나 소재 개발에 적극적으로 활용하기 어려운 점이 있었다. 이에 본 저자들은 개발 초기 단계에 많은 후보물질들을 빠르게 선별하고 비용을 절감할 수 있는 세포 모델을 VCD (4-vinylcyclohexene diepoxide)를 이용하여 구축한 바 있다²⁴⁾. VCD는 4-vinylcyclohexene의 대사산물로 고무 타이어, 폴리에스테르, 플라스틱을 제조하는데 사용되어온 물질이며, 생식노화와 관련된 환경적 요인의 화학물질로서 주목받아왔다²⁵⁾. 따라서, 본 연구에서도 CHO-K1 세포에 VCD를 처리하여 난소독성(ovotoxicity)을 유발하는 세포 모델을 적용하여 US 추출물의 난소세포 보호 효능을 평가하였다. 그 결과, VCD 처리로 인한 세포 생존율의 감소가 US 추출물 전처리에 의해 효과적으로 억제되었고, 10 µg/ml의 농도에서 최고의 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이는 US 추출물이 난소 독성으로부터 난소 세포를 보호함으로써 난소기능저하 즉, 생식 기능의 저하를 예방할 수 있다는 것을 시사한다.

V. 결론

본 연구의 결과를 요약해보면, US 추출물이 항산화 및 항염 효과가 우수하고, 질염 유발 균주 *S. aureus*와 *C. albicans*에 대한 항균효능을 가지며, 생식(난소)독성으로부터 생식(난소)세포를 보호하는 효능도 발휘한다는 것을 다양한 실험을 통해 입증하였다. 따라서, 본 연구 결과들은 여성의 생식 기능 저하에 US 추출물의 임상 활용 가능성에 대한 근거로 제시될 수 있으며, 더 나아가 생식 건강 관리를 위한 건강보조제, 기능성 식품 및 여성청결제와 같은 화장품 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2018년도 중소기업벤처부의 기술개발사업 지원에 의한 연구임 (과제번호 S2600588).

References

1. Government of the Republic of Korea. The 3rd plan for ageing society and population (2016–2020). Sejong: Government of the Republic of Korea. 2015.
2. Li Q, Geng X, Zheng W, Tang J, Xu B, Shi Q. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci* 2012;55(8):659–69.
3. Stoop D, Cobo A, Silber S. Fertility preservation for age-related fertility decline. *Lancet* 2014;384(9950):1311–9.
4. Merritt MA, Riboli E, Murphy N, Kadi M, Tjønneland A, Olsen A et al. Reproductive factors and risk of mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition; a cohort study. *BMC Med* 2015; 13:252.
5. Ministry of Health and Welfare (2012). Guide of family health services.
6. Lee YR, Chu MS. Trends in reproductive health-related research on women in Korea: A systematic review of published studies since 1995*. *J Korean Acad Soc Home Care Nurs* 2015;22(2):237–245.
7. Lee IC, Kim MK. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory of mixed medicinal herb extract. *Kor J Herbol* 2015;30(5):51–8.
8. Shin MK. *Clinical Traditional Herbalogy*. Seoul:Yeong Lim's Publisher. 2000:441–2,668–9.
9. Korea institute of oriental medicine. Ulmi cortex B. Korean intellectual property office. 2007 Dec[Cited 2020 Feb 3]. Available from: <https://doi.org/10.20929/KTKP.MED.0000079468>
10. Kim YH. *Herbalogy*. Seoul:Hanol Publisher 2014:154–7.
11. Luderer U. Ovarian toxicity from reactive oxygen species. *Vitam Horm* 2014;94:99–127.
12. Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol Reprod* 2012;86(2):27.
13. Kang JE, Kim HD, Park SY, Pan JG, Kim JH, Yum DY. Dietary supplementation with a *Bacillus superoxide dismutase* protects against γ -radiation-induced oxidative stress and ameliorates dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in Mice. *J Crohns Colitis* 2018;12(7):860–9.

14. Li YJ, Han Z, Ge L, Zhou CJ, Zhao YF, Wang DH, Ren J, Niu XX, Liang CG. C-phycoyanin protects against low fertility by inhibiting reactive oxygen species in aging mice. *Oncotarget* 2016;7(14):17393-409.
15. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28.
16. Liu J, Liu M, Ye X, Liu K, Huang J, Wang L et al. Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC). *Hum Reprod* 2012; 27(5):1411-20.
17. Liu M, Yin Y, Ye X, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum Reprod* 2013;28(3):707-17.
18. Fortier AH. Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 14:Unit 14.4.
19. Cho SN. Updated treatment of vaginitis. *Kor J Obstet Gynecol* 2005;48(2):261-8.
20. Paladine HL, Desai UA. Vaginitis: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* 2018;97(5): 321-9.
21. Bhattacharya P, Keating AF. Impact of environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;261(3): 227-35.
22. Sobinoff AP, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA. Staying alive: PI3K pathway promotes primordial follicle activation and survival in response to 3MC-induced ovotoxicity. *Toxicol Sci*. 2012;128(1):258-71.
23. Lambouras M, Liew SH, Horvay K, Abud HE, Stringer JM, Hutt KJ. Examination of the ovotoxicity of 5-fluorouracil in mice. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(6):1053-1060.
24. Nam EY, Kim SA, Kim H, Kim SH, Han JH, Lee JH, Kim DI. Akt activation by Evodiae Fructus extract protects ovary against 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity. *J Ethnopharmacol*. 2016;194:733-9.
25. Hoyer PB, Devine PJ, Hu X, Thompson KE, Sipes IG. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicol Pathol*. 2001;29(1):91-9.