

지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 추출물의 항염증, 피부장벽개선, 항노화 효능 비교

한 지원^{*†} · 남 보 미^{**†} · 이 범 석^{*} · 고 진 아^{*} · 황 지 영^{*††}

^{*}(재)남원시화장품산업지원센터

^{**}국립호남권생물자원관 자원은행부

(2022년 12월 6일 접수, 2022년 12월 26일 수정, 2022년 12월 29일 채택)

Comparison of Anti-inflammatory, Skin Barrier Improvement, and Anti-aging Efficacy of *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis* and various *Eleutherococcus* Genus Extract

Jiwon Han^{1,†}, Bomi Nam^{2,†}, Beom seok Lee¹, Jin-A Ko¹, and Jiyoung Hwang^{1,††}

¹Institute of Natural Cosmetic Industry for Namwon, Namwon-si, Jeollabuk-do 55801, Korea

²Division of Bioresources Bank, Honam National Institute of Biological Resources

(Received December 6, 2022; Revised December 26, 2022; Accepted December 29, 2022)

요약: 활성산소로 인한 염증 유발과 그로 인한 장벽손상은 꾸준히 주름생성의 원인으로 지목되어 왔다. 본 연구에서는 오갈피나무속에 속해있는 지리산오갈피와 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 4종의 추출물에 대한 항산화, 항염증 및 피부 장벽개선, 항노화 관련 기능성 화장품 소재로서의 활용가치를 검증하고자 유효 지표성분 탐색과 효능 분석을 수행하였다. 먼저, 오갈피나무속 식물인 지리산오갈피와 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 각각을 50% 에탄올을 용매로 추출, 농축, 동결건조 하여 시료를 제조하였다. 유효 지표성분탐색을 위해 주요 지표 성분인 eleutheroside E와 오갈피나무속에서 주로 검출되는 폴리페놀류 중 chlorogenic acid, caffeic acid에 대하여 고성능 액체크로마토그래피를 통해 성분 함량을 측정하였으며, 오갈피나무속 중 지리산오갈피에서 eleutheroside E와 chlorogenic acid의 함량이 가장 높은 것을 확인하였다. 항산화활성은 DPPH 라디칼 소거활성이 지리산오갈피에서 가장 높았으며, 항염증 효능의 경우 LPS로 염증이 유발된 대식세포 내 NO 생성 억제 효능은 가시오갈피, 오가나무, 오갈피나무 추출물 100 µg/mL에서 각각 25%, 26%, 32% 일 때 지리산오갈피 추출물 100 µg/mL는 40% 억제 효능을 보였고 pro-inflammatory cytokine으로 알려진 IL-6 발현 억제 효능은 가시오갈피, 오가나무, 오갈피나무 추출물 100 µg/mL 농도에서 각각 20%, 36%, 23% 일 때 지리산오갈피 추출물 100 µg/mL는 41% 억제 효능을 보였다. 또한, 지리산오갈피 추출물 100 µg/mL에서 피부장벽 관련 인자인 filaggrin, involucrin의 발현이 각각 2.5 배, 1.6 배 증가되었으며, 주름관련 인자인 콜라겐분해효소는 29% 억제 효능을 나타내어 오갈피나무속 4 종 중 지리산오갈피는 피부의 염증 억제와 장벽강화, 주름개선용 화장품소재로써 활용가능하리라 판단된다.

Abstract: Inflammation caused by active oxygen and the resulting barrier damage have been consistently pointed out as the cause of wrinkle formation. In this study, effective index ingredient search and efficacy analysis were performed to verify the value of use as a functional cosmetic material related to antioxidant, anti-inflammatory and skin barrier

†주 저자 (e-mail: seren86@ncn.re.kr)
call: 063-633-8602

†† 교신저자 (e-mail: hjyhjy123@ncn.re.kr)
call: 063-633-8602

improvement, and anti-aging for extracts of four types of *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis* (ED), *Eleutherococcus senticosus* (EN), *Eleutherococcus sessiliflorus* (ES), and *Eleutherococcus sieboldianus* (EI) belonging to the *Eleutherococcus* genus. To identify the effective index composition, the content of the ingredients was measured by high-performance liquid chromatography. The content of eleutheroside E and chlorogenic acid was the highest in ED among the *Eleutherococcus* genus. As for anti-oxidant activity, DPPH radical scavenging activity was the highest in ED. In anti-inflammatory effects, ED extracts inhibited nitric oxide generation in inflammatory macrophage cells due to lipopolysaccharide by 40% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the case of IL-6 inhibition, which is known as a pro-inflammatory cytokine, ED showed 41% inhibition at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In addition, filaggrin and involucrin, which are skin barrier-related factors, were increased by 2.5 times and 1.6 times, respectively, in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ED extracts, and as for the collagenase, which is a wrinkle-related factor, ED extract showed 29% efficacy at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Thus, these result suggested that ED extract, among the four *Eleutherococcus* genus, can be used as a cosmetic ingredient for suppressing inflammation in the skin, reinforcing the skin barrier, and reducing wrinkles.

Keywords: inflammation, skin barrier, anti-wrinkle, *eleutherococcus* genus, *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*

1. 서 론

우리나라 산야에 자생하는 오갈피나무속은 ‘나무인삼’이라고 불릴 정도로 약효가 좋아 대중에게 많이 쓰이는 한약재 중 하나로 ‘동의보감’에서도 그 효능에 대한 여러 사례 및 처방이 나와 있을 정도로 그 효능을 인정받았다. 한약재 오가피의 기원식물이 되는 오갈피나무속(*Eleutherococcus*) 식물은 두릅나무과에 속하며, *Acanthopanax*로도 많이 알려져 있으나 정명은 *Eleutherococcus*이다[1].

오갈피나무속에 관한 연구는 1965년 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*)의 근피로부터 lignan계 배당체인 eleutheroside A ~ G의 분리를 시작[2,3]으로, 면역 및 항암작용, 당뇨 개선, 간 장애 개선, 성기능 정상화, 진정작용, 항스트레스 작용 등의 효능이 밝혀졌으며[4], 오가피 성분 중 eleutheroside B와 E가 인삼배당체보다 생리활성능력이 더 강하다는 연구 결과[5]와 작용기전[6,7]에 대해서도 보고된 바 있다.

오가피는 ‘대한민국 약전(KP)’에 ‘오갈피나무 또는 기타 동속식물(*Araliaceae*)의 뿌리, 줄기 및 가지의 껍질’로 기재되어 있어, 국내에서는 오갈피나무뿐만 아니라 기타 동속식물의 속껍질도 큰 구분 없이 사용하고 있다. 그러나 오갈피나무속 식물의 열매와 잎의 페놀성 식물화학 성분에 대한 비교연구[8]에 따르면 동속이라 할지라도 각 오갈피나무속 별 성분의 차이가 두드러지는 것을 확인할 수 있어 동속 근연종이라 하더라도 효능이 다를 것을 예측할 수 있다.

최근 제주도의 특산 식물로서 섬오갈피나무에 대해서는 성분 및 피부 관련 생리활성연구에 대한 연구가 보고[9,10]되었지만, 학명에 지리적 특성을 나타낸 것으로 한반도 고유종이자 국내 특산식물로도 잘 알려져 있는 지리산오갈

피(*Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*) [*chiisanensis*, 지리산엔시스; ‘지리산에 분포하다’의 뜻으로 사용]의 화장품 소재로서의 효능 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 지리산오갈피와 오갈피나무 동속 근연종에 해당하는 가시오갈피, 오갈피나무(*Eleutherococcus sessiliflorus*), 오가나무(*Eleutherococcus sieboldianus*) 3종의 유효성분 함량과 화장품적 효능을 비교하여 오갈피나무속 추출물의 세분화된 활용을 모색하고, 토종식물이자 멸종위기종인 지리산오갈피 추출물을 주원료로 하는 기능성 화장품 개발에 필요한 기초 연구를 수행하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 시험에서 사용한 지리산오갈피와 가시오갈피는 전라북도 남원시 산내면(Korea)에서 채취하여 사용하였고, 오갈피나무는 전라북도 운봉읍(Korea), 오가나무는 전라북도 대강면(Korea)에서 2021년 10월에 채취하였으며 부위는 가지를 사용하였다. 채취한 원물은 40 °C에서 72 h 건조(LD9013, L'EQUIP, Korea)한 후 4 °C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2.2. 시료 추출물 제조

건조된 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무를 분쇄기(HMF-3600TG, Haniil, Korea)를 이용하여 분쇄한 후 50% 에탄올을 용매로 하여 80 °C에서 각각 4 h 동안 추출하였다. 추출물은 부직포와 종이여과지를 이용하여 2 회 여과하였으며, 여과된 추출물은 김압농축기(R-100,

Table 1. Retention Time and Maximum Absorbance Wavelength of 20 Standard Phenolic Compounds

NO.	Compound	RT (min)	λ_{\max} (nm)	NO.	Compound	RT (min)	λ_{\max} (nm)
1	Gallic acid	12.491	271	11	Ferulic acid	27.359	323, 217
2	Chlorogenic acid	20.062	325, 217	12	Astragalin	28.610	347, 265
3	Methyl gallate	20.401	272	13	Quercitrin hydrate	28.798	348, 255
4	Caffeic acid	21.862	323, 217	14	Rosmarinic acid	30.659	329
5	EGCG	22.323	274	15	Myricetin	30.877	363, 253
6	Syringic acid	22.584	274	16	Luteolin	35.384	348, 253
7	Elutheroside E	24.061	271	17	Quercetin	35.606	363, 255
8	<i>p</i> -Coumaric acid	25.686	210, 226	18	Apigenin	39.220	336, 267
9	Rutin	25.686	354, 255	19	Kaempferol	40.032	363, 265
10	Ellagic acid	26.174	363, 253	20	Hesperetin	40.730	287

RT, Retention time

BUCHI, Switzerland)를 이용하여 50 °C에서 농축하고, 동결 건조기(MCFD8508, IlshinBiobase, Korea)를 이용하여 동결 건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

2.3. 페놀성 화합물에 대한 HPLC 분석

지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물에 대한 20 종 페놀성화합물(phenolic compounds)의 함량 분석은 HPLC (Alliance e2695, Waters, USA)를 이용하여 함량을 분석하였다. 시료 10 mg 또는 표준품 1 mg을 취하여 50% 에탄올 1 mL에 용해하였고, 시료 10 μ L를 HPLC에 주입하고 0.8 mL/min 속도로 분석하였다. 이동상으로는 water (0.1% formic acid)와 acetonitrile (0.1% formic acid)를 사용하였고, column은 Shim-pack VP-ODS (4.6 mm x 250 mm, 5 μ m) (Shimadzu, Japan)를 이용하여 흡광도 280 nm에서 분석하였다. 20 종 표준품은 gallic acid, chlorogenic acid, methyl gallate, caffeic acid, EGCG, syringic acid, elutheroside E, *p*-coumaric acid, rutin, ellagic acid, ferulic acid, astragalin, quercitrin hydrate, rosmarinic acid, myricetin, luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol, hesperetin (Sigma, USA)을 이용하였다. 20 종 페놀성 화합물의 retention time과 최대흡수파장은 Table 1과 같다.

2.4. DPPH 라디칼 소거 활성 측정

지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 항산화 능력을 확인하기 위한 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성을 Blis [11] 법을

변형하여 측정하였다. 일정 농도로 희석한 시료 2.5 μ L에 10 μ M DPPH (Sigma-Aldrich) 용액 247.5 μ L를 혼합하고, 차광하여 실온에서 20 min 반응시킨 후 ELISA reader (Bio-Rad, Hercules, USA)를 사용하여 517 nm에서 측정하였다. DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 구하였으며, 각 시료는 3 회 반복 실험을 실시하였다. 양성대조군은 L-ascorbic acid (Amresco, Solon, USA)을 사용하였다.

2.5. 세포주 및 세포배양

인간 피부각질형성세포주(HaCaT)는 서울아산병원(Seoul Asan Medical Center, Korea)에서, 인간 피부섬유아세포주(HS27), 마우스 대식세포(Raw 264.7)는 american type culture collection (ATCC; Manassas, USA)에서 분양받아 사용하였다. 각 세포를 56 °C에서 30 min 동안 열처리된 fetal bovine serum (Merck Millipore, Burlington, USA) 10%와 항생제인 penicillin/streptomycin (Gibco Life Technologies, USA)를 함유한 Dulbescco's modified Eagle's media (Welgene, Korea)를 사용하여 37 °C에서 배양하였다.

2.6. 세포 생존율 측정

WST-1 assay[12]를 이용하여 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 세포 생존율을 측정하였다. 48 well plate에 HS27 세포를 6×10^4 cells/mL, 96 well plate에 HaCaT 세포는 1.5×10^5 cells/mL, RAW 264.7 세포는 1.0×10^5 cells/mL로 분주한 후 24 h 동안 5% CO₂, 37 °C 조건에서 부착 및 안정화를 시킨 후, 지리산오갈피,

가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물을 농도별로 처리하여 48 h 동안 배양하였다. WST-1 assay는 cell viability assay kit (EZ-Cytox, Dogen, Korea)를 이용하였고, 모든 well에 EZ-Cytox 용액 10 μ L를 가해주고 다시 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 2 h 배양한 뒤 흡광도 측정을 위해 1 min 정도 부드럽게 shaking을 한 뒤 microplate reader (Tecan, Seestrasse, Switzerland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. Nitric Oxide 생성 억제 평가

RAW 264.7 세포를 5×10^4 cells/well씩 96 well plate에 접종하고, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 18 h 동안 전 배양하였다. 세포에 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물을 25, 50, 100 μ g/mL의 세 가지 농도로 각각 처리하고, 1 h 뒤 1 μ g/mL의 LPS를 추가로 처리한 뒤 24 h 재 배양하였다. 세포배양 상등액 100 μ L와 griess 시약(Promega, USA) 100 μ L를 96 well plate에서 혼합하여 10 min 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 griess 시약을 이용하여 세포배양액 중 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였고, standard로는 sodium nitrite (Promega, USA)를 사용하였다.

2.8. Pro-inflammatory Cytokine IL-6 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 세포를 5×10^4 cells/well씩 96 well plate에

접종하고, 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 18 h 동안 전 배양하였다. 세포에 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물을 25, 50, 100 μ g/mL의 세 가지 농도로 각각 처리하고, 1 h 뒤 1 μ g/mL의 LPS를 추가로 처리한 뒤 24 h 재 배양하였다. 배양액 내의 IL-6 cytokine 분비량을 ELISA kit (R&D System Inc., USA)를 이용하여 정량하였으며, standard에 대한 표준곡선의 상관계수값은 0.9 이상이었다.

2.9. 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통한 유전자 발현

6 well plate에 HaCaT 세포를 6×10^5 cells로 분주한 후 24 h 동안 배양하고, FBS 미포함 DMEM 배지로 2 번 세척한 후 FBS 미포함 DMEM 배지로 교체하고 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물을 48 h 동안 처리하였다. 48 h 후에 세포에서 RNA를 추출하기 위해 total RNA extraction reagent인 tri reagent (RNAiso PLUS, Takara, Japan)를 이용하였다. Tri reagent 1 mL을 세포에 넣은 후 15 s 동안 vortex하였다. 이어 15,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리한 후 chloroform 200 μ L를 넣고 20 s 동안 vortex한 후 원심 분리한 다음 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 차가운 isopropanol 동량을 넣고 상온에서 10 min 동안 방치하였다. 이를 다시 15,000 rpm에서 20 min 동안 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. RNA 침전물을 75% ethanol로 씻은 후, 침전물을 2 ~ 3 min 동안 실온에서 건

Table 2. PCR Primers for Real-time PCR

Gene	NCBI Reference Sequence	Species	Forward/Reverse	Sequences(5'→3')	CDS	Location	Size (bp)
Filaggrin	AH002947.2	human	F	GGCTAAGTGAAAGACTTGAAGAGA	2586 - 4929	3751 3774	157
			R	AATAGACTATCAGTGGTGCATAGG			
Involucrin	AH002845.2	human	F	GGCAGCTGAAGTACCTGGAA	964 - 2721	1805 1824	169
			R	TCCAGCTGCTCCAGTTG			
β -actin	NM_001101.4	human	F	CACTGTGCCCATCTACG	193 - 1320	675 691	157
			R	CTTAATGTCACGCACGATTC			

Table 3. Real-time PCR Conditions

Gene	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
Filaggrin	95 $^{\circ}$ C, 10 min	95 $^{\circ}$ C, 15 s	60 $^{\circ}$ C, 10 s	72 $^{\circ}$ C, 10 s	45
Involucrin	95 $^{\circ}$ C, 10 min	95 $^{\circ}$ C, 15 s	64 $^{\circ}$ C, 10 s	72 $^{\circ}$ C, 10 s	45
β -actin	95 $^{\circ}$ C, 10 min	95 $^{\circ}$ C, 15 s	60 $^{\circ}$ C, 10 s	72 $^{\circ}$ C, 10 s	40

조시커 0.1% DEPC water에 녹였다. RNA 농도(1 OD = 40 $\mu\text{g/mL}$)는 Evloution 260 Bio UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 260 nm에서 측정된 후, reverse transcription kit (RNA to cDNA EcoDry Premix (Oligo dT), Clontech, USA)를 이용하여 1 μg RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 멸균된 3 차 증류수로 5 배 희석한 후 실시간 PCR은 Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I kit (Roche, Germany)을 이용하여 Light Cycler 2.0 (Roche)에서 증폭하였다. 사용한 primer와 PCR 조건은 Table 2, 3과 같으며 유전자의 정량분석은 Light Cycler Software 4.0 (Roche)을 이용하였다. 피부장벽에 대한 양성대조군은 2 mM의 calcium chloride (CaCl_2)를 사용하였다.

2.10. Matrix Metalloproteinase-1 및 Pro-collagen 1 생성측정

지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 발현저해능과 pro-collagen 1 합성능을 측정하기 위해 섬유아세포주인 HS27 세포를 24 well plate에 2×10^5 cells로 분주한 후 24 h 동안 배양하였다. 배양한 세포는 serum free DMEM 배지로 2 번 세척 후 serum free DMEM 배지로 교체한 뒤 시료를 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 48 h 처리한 후, 배지를 수거하여 13,000 rpm에서 5 min 동안 원심분리하였다. ELISA는 시료를 적정 농도로 희석한 후 MMP-1 ELISA (R&D systems, USA)와 pro-collagen ELISA를 이용하였으며 제조사에서 제공한 방법에 의해 측정하였다. 양성대조군으로 retinyl palmitate 100 $\mu\text{g/mL}$ 와 TGF- β 10 ng/mL를 각각 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 페놀성 화합물 분석

지리산오갈피(*Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*, ED), 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*, EN), 오갈피나무(*Eleutherococcus sessiliflorus*, ES), 오가나무(*Eleutherococcus sieboldianus*, EI) 에탄올추출물에 대한 페놀성 화합물을 검출하기 위하여 고성능액체크로마토그래피를 이용한 20 종 페놀 화합물의 동시분석을 수행하였다. 20 종의 표준물질 을 이용하여 혼합 표준원액을 조제하고 표준검량선을 작성하였으며, 표준물질과 각 시료의 UV spectrum을 비교분석 하여 각 시료의 검출선에 대해 retention time을 고려하여 표

준물질과의 일치여부를 확인하였다(Table 1). 이를 이용한 20 종 표준물질의 동시분석 결과 크로마토그램 Figure 1A에 나타내었으며, 시료에서 검출된 주요 페놀성 화합물을 정량한 값은 Table 4 에 나타내었다[13]. ED에서 elutheroside E 9.29 mg/g, chlorogenic acid 1.74 mg/g, caffeic acid 2.19 mg/g 검출되었으며(Figure 1B), EN에서 elutheroside E 6.92 mg/g, chlorogenic acid 1.72 mg/g, caffeic acid 0.35 mg/g (Figure 1C), ES에서 elutheroside E 8.92 mg/g, chlorogenic acid 0.87 mg/g, caffeic acid 2.80 mg/g (Figure 1D), EI에서 elutheroside E 8.63 mg/g, chlorogenic acid 0.71 mg/g, caffeic acid 4.72 mg/g이 검출되었다(Figure 1E). 이 중 오갈피나무속의 주성분인 elutheroside E는 관절염을 비롯한 염증 억제 효능이 보고되어 있으며[14], chlorogenic acid의 경우 항산화, 미백, 주름, 보습 효과가 있을 뿐만 아니라, 장벽에 관여하는 지방산 구성과 염증완화 효능[15], caffeic acid는 주름개선에 효능[16]에 대하여 보고되어 있다. 본 연구진은 오갈피나무속 4 종에서 검출된 페놀성화합물 결과를 바탕으로 항산화와, 항염증, 피부장벽강화, 주름개선 효능이 있을 것으로 추측되어 연구를 진행하였다.

3.2. 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 항산화 효능

ED, EN, ES, EI의 항산화 능력을 측정하기 위하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능을 측정하였다. 실험 결과 DPPH 라디칼 소거능의 SC_{50} 값은 양성대조군인 L-ascorbic acid가 5 $\mu\text{g/mL}$ 일 때, ED 54 $\mu\text{g/mL}$,

Table 4. Profile of Phenolic Compounds in ED, EN, ES and EI Ethanol Extract

Botanical name	Phenolic compound	Amount (mg/g)
<i>Eleutherococcus divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i> (ED)	Elutheroside E	9.29 \pm 0.12
	Chlorogenic acid	1.74 \pm 0.02
	Caffeic acid	2.19 \pm 0.01
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (EN)	Elutheroside E	6.92 \pm 0.03
	Chlorogenic acid	1.72 \pm 0.01
	Caffeic acid	0.35 \pm 0.01
<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i> (ES)	Elutheroside E	8.92 \pm 0.08
	Chlorogenic acid	0.87 \pm 0.02
	Caffeic acid	2.80 \pm 0.01
<i>Eleutherococcus sieboldianus</i> (EI)	Elutheroside E	8.63 \pm 0.09
	Chlorogenic acid	0.71 \pm 0.01
	Caffeic acid	4.72 \pm 0.02

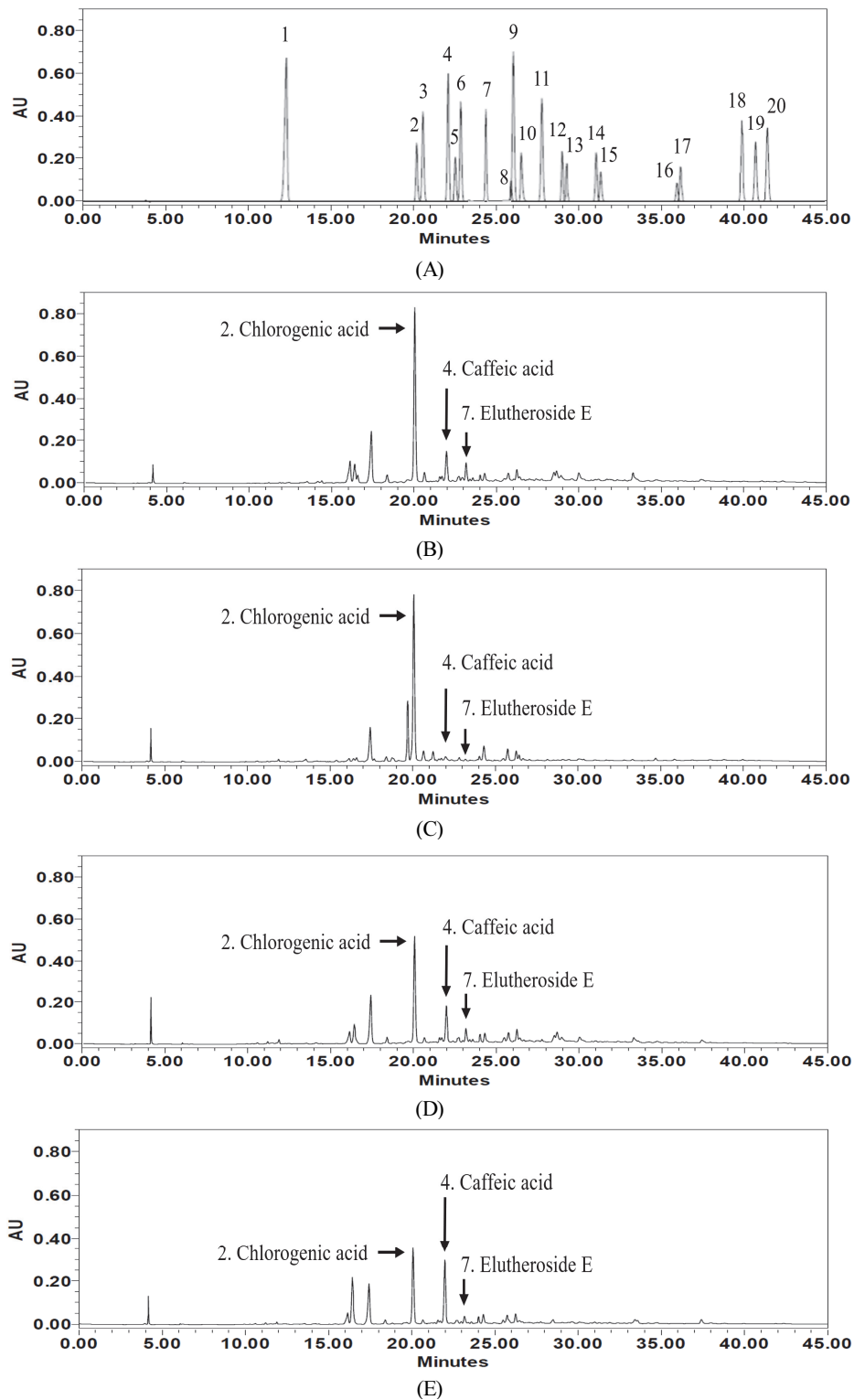


Figure 1. HPLC chromatogram of (A); 20 standard phenolic compounds (Refer to Table 1 for each number), (B); ED, (C); EN, (D); ES, (E); EI ethanol extracts with detection at 280 nm. ED; *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*, EN; *Eleutherococcus senticosus*, ES; *Eleutherococcus sessiliflorus*, EI; *Eleutherococcus sieboldianus*.

Table 5. DPPH Radical Scavenging Activity in ED, EN, ES and EI Ethanol Extract

Botanical name	DPPH (SC ₅₀ ¹), $\mu\text{g/mL}$
-	Ascorbic acid, 5 ± 0.33
<i>Eleutherococcus divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i> (ED)	$54 \pm 3.7^*$
<i>Eleutherococcus senticosus</i> (EN)	$118 \pm 0.7^*$
<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i> (ES)	$112 \pm 17.6^*$
<i>Eleutherococcus sieboldianus</i> (EI)	$221 \pm 14.1^*$

*Value of Pearson's correlation coefficients is calculated by correlation option in data analysis tools using Tukey-Kramer multiple comparison test. significant at the 5 % levels of probability ($p < 0.05$ versus ascorbic acid). Values are expressed as means \pm SD (N = 3). ¹SC₅₀ : half maximal scavenging concentration, SC₅₀ values were calculated from regression lines using different concentrations in triplicate experiments.

EN 118 $\mu\text{g/mL}$, ES 112 $\mu\text{g/mL}$, EI 221 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며 ED, ES, EN, EI 순으로 항산화 효능이 우수하였다 (Table 5). 국내 자생 식물 86 종 메탄올추출물의 항산화활성에 대한 연구[17]에 의하면 국내 자생 식물의 DPPH SC₅₀ 값은 5.8 ~ 472 $\mu\text{g/mL}$ 사이에 위치하며, 86 종 중 42 위에 해당하는 식물의 DPPH SC₅₀ 값이 96 $\mu\text{g/mL}$ 인 것으로 미루어보아, 54 $\mu\text{g/mL}$ 의 SC₅₀ 값을 가지는 ED는 타 오갈피나무속 및 자생 식물 중 평균 대비 우수한 항산화 효능을 가지는 것으로 판단된다.

3.3. 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 세포생존율 측정

오갈피나무속 4 종의 항염증, 피부장벽개선, 항노화 효능을 각 세포주를 이용하여 분석하기 전에 적정 처리 농도 설정을 위한 세포생존율을 측정하였다. 세포생존율은 WST-1 assay를 이용하여 측정하였으며, ED, ES, EN, EI를 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 RAW 264.7 세포, HaCaT 세포, HS27 세포에 처리하였을 때, Figure 2와 같이 최고농도 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 90% 이상의 세포 생존율을 보여 이를 토대로 세포 실험에 적용하여 진행하였다.

3.4. 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 항염증 효능

Nitric oxide (NO)와 interleukin-6 (IL-6)는 대표적인 염증 매개물질로, 대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS) 등의 자

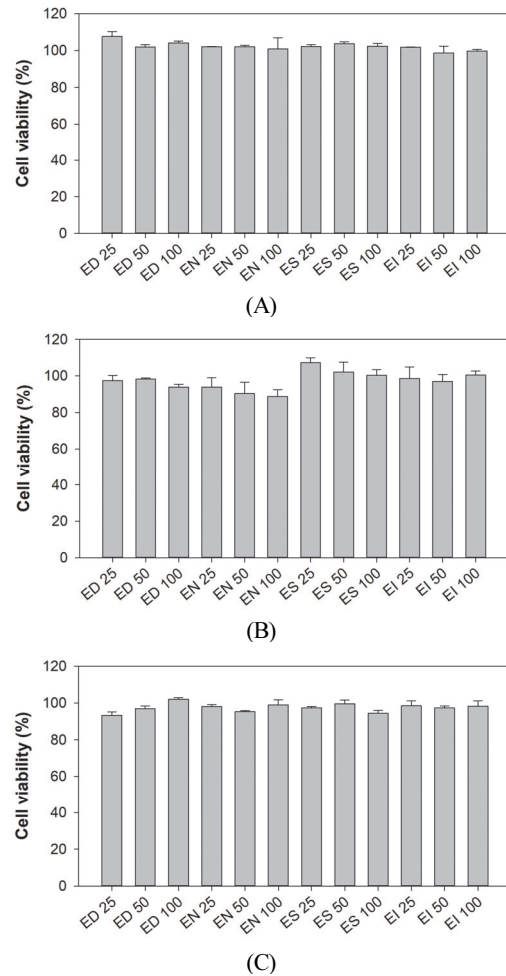


Figure 2. Cytotoxicity effect of ED, EN, ES, and EI in (A) RAW 264.7 cells, (B) HaCaT cells, and (C) HS27 cells. Values are expressed as mean \pm SD. 25; 25 $\mu\text{g/mL}$, 50; 50 $\mu\text{g/mL}$, 100; 100 $\mu\text{g/mL}$, ED; *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*, EN; *Eleutherococcus senticosus*, ES; *Eleutherococcus sessiliflorus*, EI; *Eleutherococcus sieboldianus*.

극에 의하여 IL-6와 같은 proinflammatory cytokines와 친염증성 매개물질인 NO의 증가는 해당 부위에서의 염증이 일어나고 있는 상황을 나타낸다[18]. ED, EN, ES, EI이 가지는 항염증 효능을 측정하기 위하여 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에 각각의 에탄올추출물을 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 세 가지 농도로 처리하고 NO와 IL-6의 생산량을 알아보았다. 그 결과, ED의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 일 때 40%로 가장 높은 NO 억제율을 보였으며 그 외 추출물은 각각 ES 32%, EI 26%, EN 25% 순서로 나타났다(Figure 3A). 염증성 사이토카인인 IL-6에서도 NO와 유사한 생성 억제 효

능을 보였으며, ED의 경우 100 µg/mL일 때 41%로 가장 높은 IL-6 억제율을 보였고 그 외 추출물은 ES 36%, EI 23%, EN 20% 순서로 나타났다(Figure 3B). NO와 IL-6 모두 오갈피나무속 4 종에서 농도의존적으로 생산량이 감소하였으나, ED에서 항염증 효능이 가장 우수한 것을 확인하였다.

3.5. 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 피부장벽 개선 효능

피부장벽으로 구성되는 단백질로 involucrin, loricrin, filaggrin, cornifin, small proline-rich protein, transglutaminase 1, 3 등의 단백질들이 알려져 있다[19-21]. 이들은 각질형성세포의 분화와 함께 발현량이 증가되어 피부장벽 중 핵심기능을 수행하는 각질세포막의 주요 구성원으로써 위치한다[22].

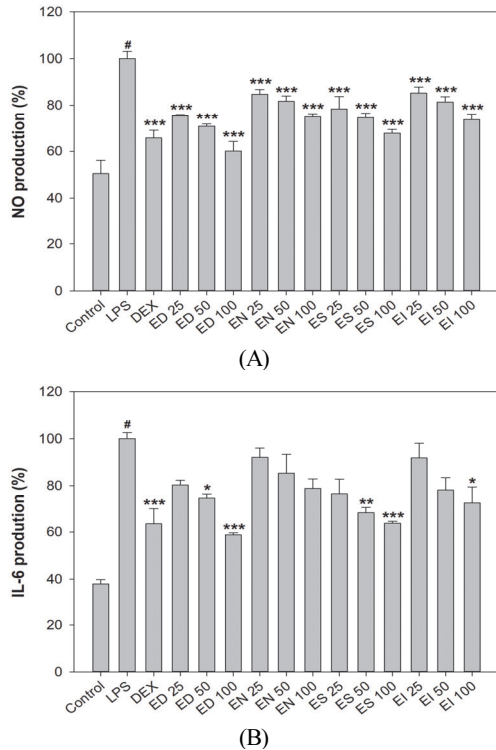


Figure 3. NO (A) and IL-6 (B) production in ED, EN, ES and EI ethanol extracts. Value of Pearson’s correlation coefficients is calculated by correlation option in data analysis tools using Tukey-Kramer multiple comparison test. significant at the 5 % levels of probability (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ versus LPS treated). LPS; Lipopolysaccharide, DEX;Dexamethasone, 25; 25 µg/mL, 50; 50 µg/mL, 100; 100 µg/mL, ED; *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*, EN; *Eleutherococcus senticosus*, ES; *Eleutherococcus sessiliflorus*, EI; *Eleutherococcus sieboldianus*.

이러한 피부장벽기능의 손상은 건조증 및 아토피 등의 질병으로 연결되지만 피부는 장벽의 손상을 회복하기 위해 표피의 칼슘농도변화, 지질합성, 지질이중막 형성 등으로 이를 극복하는 시스템을 가지고 있다. 이처럼, 피부장벽 관련 주요 인자의 발현은 피부 가장 바깥쪽에서 장벽 역할을 수행하는 화학적·물리적 방어막으로 유수분 조절 및 유해물질 침투를 막아 내부를 보호하는 역할을 수행하게 된다. ED, EN, ES, EI의 피부장벽개선 효능을 규명하기 위하여 피부각질형성세포주인 HaCaT 세포에 ED, EN, ES, EI의 에탄올추출물 100 µg/mL을 48 h 동안 처리하고 피부장벽기능 개선의 지표인 filaggrin, involucrin의 mRNA 발현 정도를 real-time PCR을 이용하여 확인하였다. 실험 결과, 양성대조군인 CaCl₂ 2 mM에서 filaggrin 발현이 대조군 대비 5.7 배 증가

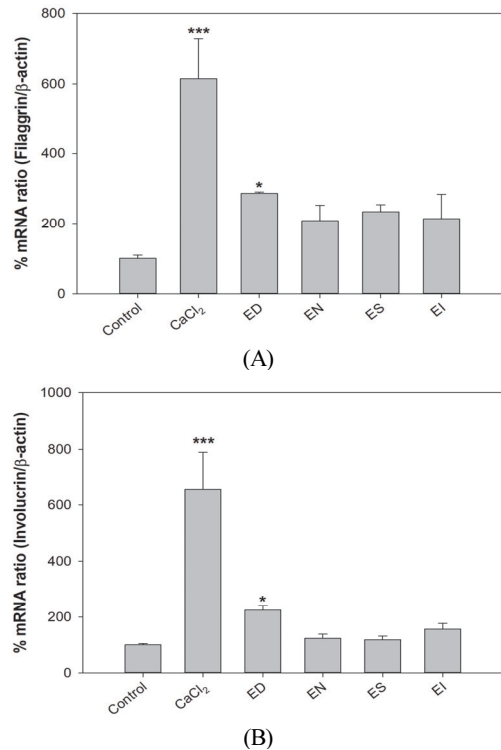


Figure 4. Expression of filaggrin (A) and involucrin (B) mRNA in ED, EN, ES and EI ethanol extracts. Value of Pearson’s correlation coefficients is calculated by correlation option in data analysis tools using Tukey-Kramer multiple comparison test. Significant at the 5 % levels of probability (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ versus control). CaCl₂; Calcium chloride, ED; *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*, EN; *Eleutherococcus senticosus*, ES; *Eleutherococcus sessiliflorus*, EI; *Eleutherococcus sieboldianus*.

하였을 때, ED가 대조군 대비 2.5 배 증가하였고 involucrin 은 양성대조군인 CaCl_2 2 mM에서 4.7 배 증가하였을 때, ED가 대조군 대비 1.6 배 증가하여 오갈피나무속 4종 중 ED에서 두 유전자 모두 유의한 발현증가 양상을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 오갈피나무속 4 종 중 ED에서 피부 장벽개선 효과가 가장 우수한 것을 확인하였다.

3.6. 지리산오갈피, 가시오갈피, 오갈피나무, 오가나무 에탄올추출물의 주름 개선 효능

피부가 노화하게 되면 피부에서 전사인자인 activator protein-1의 활성도가 증가되고, 그로 인해 콜라겐분해효소 중 가장 중요한 역할을 수행하는 MMP-1의 발현이 증가된다. MMP-1이 증가되면 피부에 존재하는 I 형과 III 형의

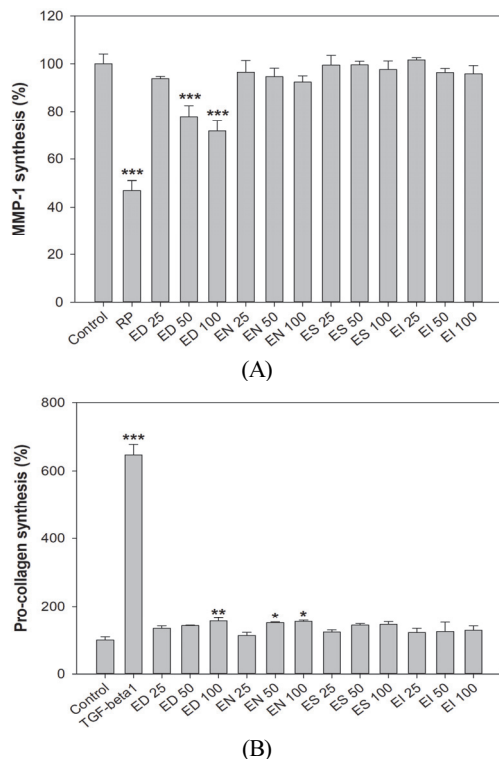


Figure 5. MMP-1 (A) and Pro-collagen (B) production in in ED, EN, ES and EI ethanol extracts. Value of Pearson's correlation coefficients is calculated by correlation option in data analysis tools using Tukey-Kramer multiple comparison test. significant at the 5 % levels of probability (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, $p < 0.05$ versus control). RP; retinyl palmitate, TGF-beta1: Tumor growth factor-beta, ED; *Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*, EN; *Eleutherococcus senticosus*, ES; *Eleutherococcus sessiliflorus*, EI; *Eleutherococcus sieboldianus*.

콜라겐 등이 분해되어 교원질의 결핍을 초래하여 피부에 주름을 형성하게 된다[23,24]. ED, EN, ES, EI에 의한 주름 개선 효과를 측정하기 위하여 피부섬유아세포인 HS27 세포에서 MMP-1과 pro-collagen I의 발현을 측정하였다. 홍미 룩계도, 항염증과 장벽개선 효능에서는 효능 차는 있어도 ED, EN, ES, EI 4 종 모두에서 효능이 나타났던 것과 달리, MMP-1의 발현은 ED에서만 억제 효능을 나타내는 것으로 확인되었다. ED 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 6%, 19%, 29%로 ED의 함량이 증가함에 따라 농도의존적으로 억제율이 높아지는 것으로 주름 개선 효능이 ED에 의한 것임을 확인하였다. 교원섬유의 전구체인 pro-collagen I의 발현은 ED와 EN은 100 $\mu\text{g/mL}$ 일 때 18% 증가, ES는 10% 증가하였으나 EI에서는 증가양상을 나타내지 않았다. 이를 종합하여, MMP-1 억제능과 pro-collagen I 합성능의 결과를 통해 ED는 주름억제 기능성화장품 성분으로서 항노화 효능을 가진 화장품원료로서 개발 가치가 높다고 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 전라북도 남원시 일대에서 채취한 오갈 피나무속 에탄올추출물 4 종 (ED, EN, ES, EI)에 대한 유효성분 분석 및 화장품적 효능인 항산화, 항염증, 주름개선, 피부장벽강화에 관련된 시험분석을 진행하였다.

오갈피나무속 에탄올추출물 4 종에 대한 HPLC를 이용한 주요 페놀성화합물 동시분석 결과, elutheroside E, chlorogenic acid, caffeic acid가 검출되었으며 특히, 오갈피나무속의 대표 지표성분인 elutheroside E의 경우 ED에서 가장 높은 함량을 나타내어 염증억제 등의 효과에 뛰어날 것이라 판단 되었다.

항산화 효능을 확인하기 위해 오갈피나무속 4 종에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인한 결과 ED에서 SC_{50} 값 54로 가장 우수하였으며 이후 NO 억제능, IL-6 억제능, filaggrin 발현량, involucrin 발현량, MMP-1 억제능, pro-collagen I 합성능을 확인하기 위해 각 세포주별 세포생존율을 측정한 결과 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리구에서 모두 90% 이상의 세포생존율을 나타내어 이 결과를 토대로 실험에 적용 하였다. 마우스 대식세포를 이용한 NO 억제능은 오갈피나무속 4종 중 ED에서 LPS 처리구 대비 40%로 가장 우수하였으며 IL-6 또한 ED에서 LPS 처리구 대비 41%로 가장 우수하였다. 피부각질형성세포 세포를 이용한 피부장벽관련 유전자 발현량을 확인한 결과, filaggrin과 involucrin이

오갈피나무속 4종 중 ED에서 대조군 대비 각각 2.5 배, 1.6 배 증가되어 가장 우수하였다. 또한 피부섬유아세포를 이용한 MMP-1 억제능은 오갈피나무속 4 종 중 ED에서 대조군 대비 29%로 나타났으며 pro-collagen 합성능 역시 ED에서 대조군 대비 18% 증가하여 가장 우수하였다.

따라서 본 연구의 결과를 통해 오갈피나무속 4 종은 항산화, 항염증 효능이 우수한 것으로 나타났으며, 그 중에서도 한반도고유종이자 특산식물인 지리산오갈피는 피부장벽개선과 항노화 효능까지 우수하여 해당 기능성 화장품소재로서 활용가치가 가장 높을 것으로 판단된다.

Acknowledgment

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 농생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었으며 이에 감사드립니다(과제번호: 317024-5).

References

1. A. J. Choi, H. Jeong and D. Y. Kim, History of Korean Horticulture, 420, Korean Society for Horticultural Science, Jeonju-si, Jeollabuk-do (2013).
2. Yu. S. Ovodov, R. G. Ovodova, T. F. Solov'eva, G. B. Elyakov, and N. K. Kochetkov, The glycosides of *Eleutherococcus senticosus* max. I. isolation and some properties of eleutherosides B and E, *Chemistry of Natural Compounds*, **1**(1), 1 (1965).
3. Yu. S. Ovodov, G. M. Frolova, M. Yu. Nefedova, and G. B. Elyakov, The glycosides of *Eleutherococcus senticosus* II. The structure of eleutherosides A, B1, C, and D, *Chemistry of Natural Compounds*, **3**, 53 (1967).
4. J. Ahn, M. Y. Um, H. Lee, C. H. Jung, S. H. Heo, and T. Y. Ha, Eleutheroside E, an active component of *Eleutherococcus senticosus*, ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2013** (2013).
5. I. I. Brekhman, Ancient ginseng and pharmacology of the future, *Symp Gerontol*, **9** (1975).
6. A. Arouca and D. M. Grassi-Kassisse, *Eleutherococcus senticosus*: studies and effects, *Health*, **2013** (2013).
7. G. N. Benzdetko, I. V. Dardymov, M. L. Zilber, and V. A. Rogozkin, Effect of *Eleutherococcus glycosides* on nuclear activity of RNA-polymerase in skeletal muscle and liver after physical load, *Veprosy Med. Khimii*, **19**, 245, (1973).
8. H. J. An, C. S. Yook, H. C. Kim, and S. K. Ko, Measurement of characteristic phytochemical levels in different *Acanthopanax* species by HPLC, *Yakhak Hoeji*, **61**(2), 90 (2017).
9. M. J. Park and Y. S. Bae, Fermented *Acanthopanax koreanum* root extract reduces UVB-and H₂O₂-induced senescence in human skin fibroblast cells, *J. Microbiol. Biotechnol*, **26**(7), 1224 (2016).
10. C. Wei, C. K. Tan, H. Xiaoping, and J. Junqiang, Acanthoic acid inhibits LPS-induced inflammatory response in human gingival fibroblasts, *Inflammation*, **38**(2), 896 (2015).
11. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**(4617), 1199 (1958).
12. H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto, K. Sasamoto, T. Hamamoto, K. Suzuki, and M. Watanabe, A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay, *Anal Commun*, **36**(2), 47 (1999).
13. T. B. Lee, Y. K. So, S. Y. Kim, and J. Y. Hwang, Biological activities of cosmetic material from ten kinds of flower ethanol extracts, *KOREAN J. CROP Sci*, **28**(4), 260 (2020).
14. C. He, X. Chen, C. Zhao, Y. Qie, Z. Yan, and X. Zhu, Eleutheroside E ameliorates arthritis severity in collagen-induced arthritis mice model by suppressing inflammatory cytokine release, *Inflammation*, **37**(5), 1533 (2014).
15. M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas, A. A. Kamboh, G. J. Khan, M. Shumzaid, and Z. XiaoHui, Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research, *Biomed Pharmacother*, **97**, 67 (2018).
16. E. J. Shin, S. Jo, H. K. Choi, S. Choi, S. Byun, and T. G. Lim, Caffeic acid phenethyl ester inhibits UV-induced MMP-1 expression by targeting histone acetyltransferases in human skin, *Int. J. Mol. Sci*, **20**(12), 3055 (2019).
17. Y. S. Rim, Y. M. Park, M. S. Park, K. Y. Kim, M. J. Kim, and Y. H. Choi, Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants, *KOREAN J. CROP*

- Sci*, **8**(4), 342 (2000).
18. C. Xie, J. Kang, Z. Li, A. G. Schauss, T. M. Badger, S. Nagarajan, T. Wu, and X. Wu, The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway, *J Nutr Biochem*, **23**(9), 1184 (2012).
 19. E. Fuchs, Epidermal differentiation and keratin gene expression, *J Cell Sci*, **17**, 197 (1993).
 20. P. M. Steinert and L. N. Marekov, The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope, *J Biol Chem*, **270**(30), 17702 (1995).
 21. S. Natesan, N. L. Wrice, and R. J. Christy, Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist and all-trans retinoic acid induce epithelial differentiation of subcutaneous adipose-derived stem cells from debrided burn skin, *J Cell Biochem*, **120**(6), 9213 (2019).
 22. Y. B. Kwon, D. K. Choi, K. C. Sohn, E. K. Jeon, M. S. Nam, J. H. Lee, and C. D. Kim, Effects of colostrum on keratinocyte differentiation and wound healing, *J Korean Invest Dermatol*, **14**(2), 45 (2007).
 23. N. Tsuji, S. Moriwaki, Y. Suzuki, Y. Takema, and G. Imokawa, The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity, *Photochem Photobiol*, **74**(2), 283 (2001).
 24. C. S. Kwak and J. Yang, Prevention effect of *Prunus persica* flos extract from reactive oxygen species generation and matrix metalloproteinases production induced by UVB irradiation in human skin cells, *Asian J Beauty Cosmetol*, **14**(2), 179 (2016).