

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2022.8.6.849

JCCT 2022-11-104

참당귀 초임계 이산화탄소 선택 추출물의 항염 효능

The Anti-inflammatory Effect of *Angelica gigas* Nakai Supercritical Carbon Dioxide Selective Extracts

박소현*, 이광원**, 박신성***, 신문삼****, 박수인*****

So Hyeon Park*, Kwang Won Lee**, Shinsung Park***,
Moon Sam Shin****, Su In Park*****

요약 본 연구에서는 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)의 핵심 유효 성분인 decursin과 decursinol angelate를 높은 수율로 추출한 초임계 이산화탄소 선택 추출물의 항염증 효능을 에탄올 추출물과 비교하여 측정하였다. 항염증 효능을 측정하기 위해 염증 매개 인자인 nitric oxide(NO), 염증성 사이토카인인 interleukin(IL)-6, IL-8 생성량을 측정하였다. NO 생성량은 lipopolysaccharide(LPS)로 염증 반응을 유도한 Raw 264.7 세포를 대상으로 Griess assay를 통해 측정하였고, IL-6 및 IL-8 생성량은 tumor necrosis factor(TNF)- α 로 염증 반응을 유도한 human keratinocyte cell line(HaCaT) 세포를 대상으로 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 통해 측정하였다. NO 생성량은 초임계 이산화탄소 추출물이 에탄올 추출물에 비해 뛰어나게 억제하였다. IL-6 및 IL-8 생성량 또한 에탄올 추출물은 오히려 증가시키는 반면, 초임계 이산화탄소 추출물은 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 통계적으로 유의하게 억제하였다 ($P<0.01$). 우리는 이러한 결과를 통해 참당귀 초임계 이산화탄소 선택 추출물이 아토피 피부염을 완화시키는 항염증 코스메슈티컬 소재로써 활용 가능성을 확인하였다.

주요어 : 참당귀, 초임계 이산화탄소 추출, 항염증, 염증성 사이토카인, 코스메슈티컬

Abstract In this study, the anti-inflammatory effect of supercritical carbon dioxide selective extracts, which extract decursin and decursinol angelate, the vital active ingredients of *Angelica gigas* Nakai, in high yield, was measured compared to that of ethanol extracts. To measure the anti-inflammatory effect, the production of nitric oxide(NO), an inflammatory mediator, and interleukin(IL)-6 and IL-8, inflammatory cytokines, was measured. NO production was measured by Griess assay on Raw 264.7 cells induced inflammatory response by lipopolysaccharide(LPS), and IL-6 and IL-8 production was measured by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) on human keratinocyte cell line(HaCaT) cells induced inflammatory response by tumor necrosis factor(TNF)- α . The amount of NO production was suppressed outstandingly by the supercritical carbon dioxide extracts compared to the ethanol extracts. The amount of IL-6 and IL-8 production was increased by the ethanol extracts, whereas statistically significantly inhibited by supercritical carbon dioxide extracts at the concentration of 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ($P<0.01$). Through these results, we confirmed that the supercritical carbon dioxide selective extracts of *Angelica gigas* Nakai could be used as an anti-inflammatory cosmeceutical material to alleviate atopic dermatitis.

Key words : *Angelica gigas* Nakai, Supercritical Carbon Dioxide Extraction, Anti-inflammation, Inflammatory Cytokine, Cosmeceutical

*정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 학사과정 (제1저자)

**정회원, 을지대학교 시니어헬스케어학과 석사과정 (참여저자)

***정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 석사과정 (참여저자)

****정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 교수 (참여저자)

*****정회원, 을지대학교 미용화장품과학과 연구교수

(교신저자)

접수일: 2022년 9월 30일, 수정완료일: 2022년 10월 25일

게재확정일: 2022년 11월 1일

Received: September 30, 2022 / Revised: October 25, 2022

Accepted: November 1, 2022

*****Corresponding Author: suinpark@eulji.ac.kr

Dept. of Beauty & Cosmetic Science, Eulji Univ., Korea

I. 서 론

최근 화장품 산업에서는 안전성뿐만 아니라 기능적인 부분을 강화하여 실질적인 효능, 효과를 나타내는 코스메슈티컬 시장이 각광받고 있다. 아토피 피부염은 만성 염증성 피부 질환으로 그 유병률은 매우 흔하여 소아의 10-20 %, 성인의 1-3 % 정도로 보고되고 있으며, 지속적으로 증가하는 추세에 있어 현 사회에서 해결해야 할 문제로 인식된다. 이에 따라 아토피 피부염 관련 코스메슈티컬 시장도 계속적으로 성장하고 있어 확고한 수익 시장으로 자리 잡고 있다[1-3].

아토피 피부염은 만성 염증성 피부 질환으로 아직 정확한 원인 및 발병기전이 밝혀져 있지 않으나, 유전적, 환경적, 면역학적 요인 등이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 특히 면역 조절 이상으로 과잉의 면역 반응에 의해 유발된 염증 반응은 핵심 요인이며, 사이토카인은 면역 및 염증 반응을 조절하는 데 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 사이토카인은 항염증 소재 개발의 주된 표적으로, 아토피 피부염 개선을 위한 연구의 일환으로 사이토카인의 활성을 억제하는 물질이 개발되고 있다[4, 5].

당귀는 미나리과(*Apiaceae*)에 속하는 다년생 초본 식물로 항염증, 항산화 등 다양한 생리 활성을 보여 한국, 중국, 일본 등에서 약제로 널리 사용되고 있다. 당귀는 재배지에 따라 우리나라의 참당귀(*Angelica gigas* Nakai), 중국당귀(*Angelica acutiloba* Kitagawa), 일본당귀(*Angelica sinensis* Diels)로 분류된다. 참당귀는 중국이나 일본의 당귀와는 달리 생리 활성을 나타내는 핵심 유효 성분인 pyranocoumarin계의 decursin, decursinol angelate를 다량 함유하고 있다[6, 7]. 따라서 참당귀에서 decursin 및 decursinol angelate를 높은 수율로 추출하고자 하는 많은 시도가 있어왔다[8, 9].

초임계 유체 기술을 천연물의 유효 성분을 선택 추출하는데 적용할 수 있다. 초임계 유체는 임계 온도와 임계 압력 이상에서 존재하는 기체와 액체의 중간적인 성격을 갖는 유체이다. 초임계 유체를 이용한 추출은 기체의 확산성과 액체의 용해력을 모두 지니므로 신속하면서도 선택적인 추출이 가능하다. 특히 초임계 이산화탄소는 임계 온도 및 압력이 31.1 °C, 73.8 bar로 비교적 낮을 뿐만 아니라 무색, 무취, 무독성, 비폭발성, 비반응성, 환경친화성, 경제성 등 다양한 장점을 지니

가장 많이 사용된다[10-12]. 또한 초임계 유체의 온도 및 압력 조건을 조절하며 유효 성분의 선택 추출 수율을 높일 수 있다[13].

본 저자들은 45 °C, 350 bar의 초임계 이산화탄소를 이용한 추출법이 참당귀에서 decursin과 decursinol angelate를 선택 추출하는데 최적의 조건이라는 연구 결과를 보고한 바 있다[14][15]. 본 연구에서는 최적의 참당귀 초임계 추출물과 에탄올 추출물의 항염증 효과를 염증 매개 인자인 nitric oxide(NO)와 염증성 사이토카인인 interleukin(IL)-6, IL-8 생성량을 바탕으로 비교하여, 초임계 추출법이 기존의 에탄올 추출법에 비해 유효 성분의 선택 추출을 통해 우수한 항염증 효과를 나타낼 수 있음을 보이고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에서 추출에 이용한 참당귀는 강원도 평창군 진부면에서 채취하여 세척 및 건조 과정을 거친 것을 분쇄 후 사용하였다.

2. 시약 및 기기

본 실험에서 시약은 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM; Welgene, Korea), fetal bovine serum (FBS; Gibco, USA), FBS(Samchun, Korea), penicillin/streptomycin (Lonza, Switzerland), water-soluble tetrazolium salt(WST)-8 (Biomax, Korea), lipopolysaccharide (LPS; SigmaAldrich, USA), Griess reagent system (Promega, USA), tumor necrosis factor(TNF)- α (R&D Systems, USA), human IL-8/CXCL8 and IL-6 DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kits (R&D Systems, USA)를 사용하였다.

본 실험에서 기기는 감압농축기(Eyela, USA), 동결 건조기(Ilshin Bio Base, Korea), 초임계 이산화탄소 추출 장치(ARI instrument, Korea), incubator(Thermo, USA), microplate reader(BioTek, USA), pipette(Eppendorf, Germany)이 사용되었다.

3. 시료의 추출

에탄올 추출물(AGE)은 상온에서 24시간 동안 80 % 에탄올에 침지시킨 액을 여과한 후 농축 및 동결건조

과정을 거쳐 용매가 모두 제거된 분말 형태로 얻었다.

초임계 이산화탄소 추출물(AGS)은 이산화탄소(유속 60 mL/min) 및 보조용매로 에탄올(유속 5 mL/min)을 사용하여 온도 45 °C, 압력 350 bar의 조건으로 150분간 추출한 액을 여과한 후 농축 과정을 거쳐 보조용매가 모두 제거된 페이스트 형태로 얻었다.

4. 세포주 및 세포 배양

Raw 264.7 세포는 Korea cell line bank(KCLB; Seoul, Korea)에서 분양받았고, human keratinocyte cell line(HaCaT) 세포는 Amore Pacific (Korea)으로부터 제공받았다. 세포 배양을 위해 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin을 함유한 DMEM을 사용하였고, 5% 이산화탄소 및 37°C를 유지하는 incubator에서 배양하였다.

5. 세포 생존율

세포를 96 well plate에 1×10^4 cell/well로 분주하고 incubator에서 24시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, 시료를 48시간 처리하였다. WST-8을 10%의 농도로 첨가하여 2시간 동안 반응시킨 후 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. NO 생성량

Raw 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^4 cell/well로 분주한 뒤에 incubator에서 24시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, 시료를 48시간 동안 처리하였다. 자극원은 10 ng/mL 농도의 LPS로 하였다. 배양 상층액을 취해 Griess reagent system으로 제조사의 매뉴얼에 따라 NO 생성량을 정량하였다.

7. IL-6 및 IL-8 생성량

HaCaT 세포를 24 well plate에 4×10^4 cell/well로 분주한 뒤에 incubator에서 24시간 동안 배양하면서 세포를 완전히 부착시키고, 시료를 48시간 동안 처리하였다. 자극원은 10 ng/mL 농도의 TNF- α 로 하였다. 배양 상층액을 취해 ELISA kit으로 제조사의 매뉴얼에 따라 IL-6 및 IL-8 생성량을 정량하였다.

8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. Student's t-test를 실시하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

III. 실험 결과

1. Raw 264.7 세포 생존율

참당귀 에탄올 추출물과 초임계 이산화탄소 추출물이 Raw 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하고자 WST-8 assay를 진행하였고, 그 결과를 그림 1에 제시하였다. AGE와 AGS 모두 농도를 6.25, 12.5, 25, 50 μ g/mL로 설정하였다. AGE는 모든 실험 농도에서 독성을 나타내지 않았고, AGS는 AGE에 비하여 독성이 높아 IC₂₀ 값이 13.6 μ g/mL이었다. 따라서 AGE와 AGS의 최대 농도를 12.5 μ g/mL의로 설정하여 NO 생성량을 측정하였다.

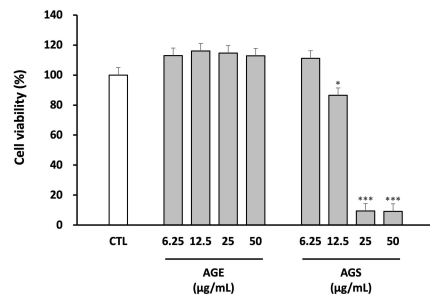


그림 1. Raw 264.7 세포 생존율(%)

Figure 1. Raw 264.7 cell viability treated with *Angelica gigas* Nakai extracts. **P*<0.05 and ****P*<0.001 vs. CTL, CTL: non-treated control, AGE: *Angelica gigas* Nakai ethanol extract, AGS: *Angelica gigas* Nakai supercritical carbon dioxide extract.

2. HaCaT 세포 생존율

그림 2는 참당귀 에탄올 추출물과 초임계 이산화탄소 추출물이 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하고자, WST-8 assay를 진행한 결과이다. AGE와 AGS 모두 농도를 6.25, 12.5, 25, 50 μ g/mL로 설정하였다. AGE는 모든 실험 농도에서 독성을 나타내지 않았고, AGS는 AGE에 비하여 독성이 높아 IC₂₀ 값이 15.9 μ g/mL이었다. 따라서 AGE와 AGS의 최대 농도를 12.5 μ g/mL의로 설정하여 IL-6 및 IL-8 생성량을 측정하였다.

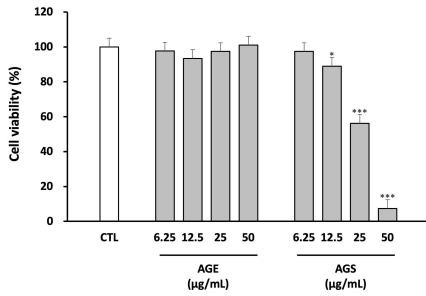


그림 2. HaCaT 세포 생존율(%)
Figure 2. HaCaT cell viability treated with *Angelica gigas* Nakai extracts. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs. CTL, CTL: non-treated control, AGE: *Angelica gigas* Nakai ethanol extract, AGS: *Angelica gigas* Nakai supercritical carbon dioxide extract.

3. Raw 264.7 세포의 NO 생성량

참당귀 에탄올 추출물과 초임계 이산화탄소 추출물이 NO 생성량에 미치는 영향을 비교하기 위해 LPS로 염증반응을 유도한 Raw 264.7 세포에 AGE와 AGS를 3.125, 6.25, 12.5 µg/mL의 농도로 처리하여 Griess assay를 진행하였다. 그림 3에서 제시된 바와 같이 NO 생성 억제능은 AGS가 AGE보다 월등하게 높았다. AGS는 3.125 µg/mL의 농도에서도 LPS 처리군 대비 85 % 가량의 통계적으로 유의한 억제능을 보인 반면, AGE는 동일한 농도에서 LPS 처리군 대비 통계적으로 유의한 억제능을 보이지 않았다.

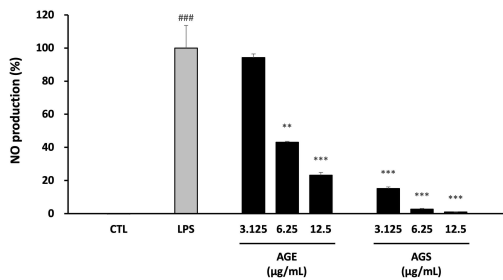


그림 3. Raw 264.7 세포의 NO 생성량(%)
Figure 3. The inhibitory effect *Angelica gigas* Nakai extracts on NO production in LPS treated Raw 264.7 cell. ### $P < 0.001$ vs. CTL, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. LPS, CTL: non-treated control, LPS: LPS treated control, AGE: *Angelica gigas* Nakai ethanol extract, AGS: *Angelica gigas* Nakai supercritical carbon dioxide extract.

4. HaCaT 세포의 IL-6 및 IL-8 생성량

그림 4는 참당귀 에탄올 추출물과 초임계 이산화탄소 추출물이 IL-6 생성량에 미치는 영향을 비교하기 위해 TNF-α로 염증반응을 유도한 HaCaT세포에 AGE와 AGS를 3.125, 6.25, 12.5 µg/mL의 농도로 처리하여 ELISA를 진행한 결과를 나타낸 것이다. IL-6 생성 억제능 역시 AGS가 AGE보다 월등하게 높았다. AGE는 모든 실험 농도에서 TNF-α 처리군 대비 오히려 통계적으로 유의하게 발현을 증가시킨 반면, AGS는 6.25 µg/mL의 농도에서 TNF-α 처리군 대비 41 % 가량의 통계적으로 유의한 억제능을 보였다.

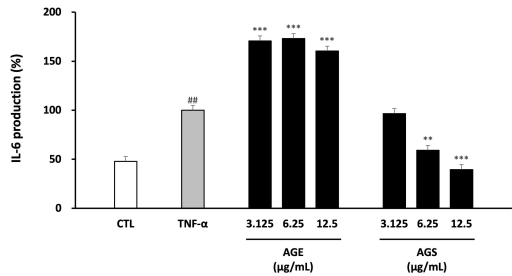


그림 4. HaCaT 세포의 IL-6 생성량(%)
Figure 4. The inhibitory effect *Angelica gigas* Nakai extracts on IL-6 production in TNF-α treated HaCaT cell. ## $P < 0.001$ vs. CTL, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. TNF-α, CTL: non-treated control, TNF-α: TNF-α treated control, AGE: *Angelica gigas* Nakai ethanol extract, AGS: *Angelica gigas* Nakai supercritical carbon dioxide extract.

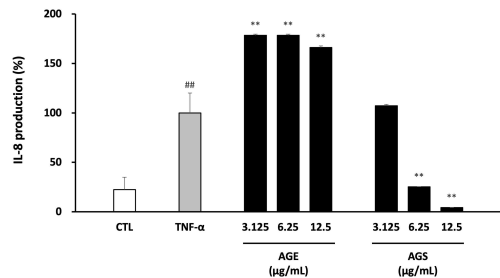


그림 5. HaCaT 세포의 IL-8 생성량(%)
Figure 5. The inhibitory effect *Angelica gigas* Nakai extracts on IL-8 production in TNF-α treated HaCaT cell. ## $P < 0.001$ vs. CTL, ** $P < 0.01$ vs. TNF-α, CTL: non-treated control, TNF-α: TNF-α treated control, AGE: *Angelica gigas* Nakai ethanol extract, AGS: *Angelica gigas* Nakai supercritical carbon dioxide extract.

그림 5에는 참당귀 에탄올 추출물과 초임계 이산화탄소 추출물이 IL-8 생성량에 미치는 영향을 비교하기 위해 TNF- α 로 염증반응을 유도한 HaCaT세포에 AGE와 AGS를 3.125, 6.25, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 ELISA를 진행한 결과를 나타내었다. IL-8 생성 억제능 또한 AGS가 AGE보다 월등하게 높았다. AGE는 모든 실험 농도에서 TNF- α 처리군 대비 오히려 통계적으로 유의하게 발현을 증가시킨 반면, AGS는 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 TNF- α 처리군 대비 75 % 가량의 통계적으로 유의한 억제능을 보였다.

IV. 고 찰

NO 생성량 측정 결과는 초임계 이산화탄소 추출법이 에탄올 추출법보다 항염증 효능을 나타내는 핵심 유효 성분인 decursin과 decursinol angelate를 5배 이상 높은 수율로 선택 추출한다는 본 저자들의 선행 연구에 상응하는 결과이며[14, 15], IL-6 및 IL-8 생성량 측정 결과는 에탄올 추출법의 경우는 염증 유발 물질을 포함하는 다양한 성분을 비선택적으로 추출하는 반면, 초임계 이산화탄소 추출법은 항염증 효능을 나타내는 핵심 유효 성분인 decursin과 decursinol angelate를 선택적으로 추출하기 때문으로 생각된다.

V. 결 론

참당귀는 decursin과 decursinol angelate를 다량 함유하고 있어 항염증 효능이 뛰어나다고 알려져 있다. 초임계 이산화탄소 추출법으로 이러한 decursin 및 decursinol angelate를 에탄올 추출법에 비해 5배 이상 높은 수율로 얻었고[14][15], 이에 따라 항염증 효능도 월등히 증가시킬 수 있었다. 염증 매개 인자인 NO 억제능에서 초임계 이산화탄소 추출물은 에탄올 추출물에 비해 뛰어난 효능을 보였다. 또한 염증성 사이토카인인 IL-6 및 IL-8은 에탄올 추출물에 의해서 발현이 오히려 증가된 반면, 초임계 이산화탄소 추출물에 의해서는 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도에서도 억제되었다. 우리는 본 연구에서 염증 반응의 억제를 통해 아토피 피부염을 완화시키는 소재로써 참당귀 초임계 이산화탄소 선택 추출물이 충분한 가능성을 가짐을 확인하였으므로 본 항염증 소재를 코스메슈티컬 제품에 활용할 것을 제안한다.

References

- [1] S.P. Yoon, B.S. kim, J.H. Ree, S.C. Lee, and Y.K. Kim, "The environment and lifestyles of atopic dermatitis patients," *Korean Journal of Dermatology*, Vol. 37, No. 8, pp. 983-991, 1999.
- [2] S.K. Park and B.J Lee, "Market trends for atopy treatment cosmetics," *Korean Industrial Chemistry News*, Vol. 22, No. 1, pp. 3-11, 2019.
- [3] K.H. Kim, "Overview of atopic dermatitis," *Asia Pacific Allergy*, Vol. 3, No. 2, pp. 79-87, 2013.
- [4] J.M. Spergel and A.S. Paller, "Atopic dermatitis and the atopic march," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 112, No. 6, pp. S118-S127, 2003.
- [5] D.Y. Leung, M. Boguniewicz, M.D. Howell, I. Nomura, and Q.A. Hamid, "New insights into atopic dermatitis," *The Journal of clinical investigation*, Vol. 113, No. 5, pp. 651-657, 2004.
- [6] J.S. Kang, "Pharmacological effect of decursin, decursinol angelate, and decursinol derived from *Angelica gigas* Nakai," *Journal of Life Science*, Vol. 31, No. 12, pp. 1128-1141, 2021.
- [7] J.S. Heo, J.Y. Cha, H.W. Kim, H.Y. Ahn, K.E. Eom, S.J. Heo, and Y.S. Cho, "Bioactive materials and biological activity in the extracts of leaf, stem mixture and root from *Angelica gigas* Nakai," *Journal of Life science*, Vol. 20, No. 5, pp. 750-759, 2010.
- [8] N.S. Seong, K.S. Kim, S.T. Lee, and S.W. Lee, "Environmental variation of decursin content in *Angelica gigas*," *Korean Journal of Crop Science*, Vol. 38, No. 1, pp. 60-65, 1993.
- [9] K.M. Kim, J.Y. Jung, S.W. Hwang, M.J. Kim, and J.S. Kang, "Isolation and purification of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* Nakai," *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 38, No. 5, pp. 653-656, 2009.
- [10] Y.H. Choi, E.J. Park, Y.L. Kim, Y.W. Chin, S.H. Jeon, S.N. Joung, ... and J.W. Kim, "Selective extraction of cytotoxic substances from medicinal plants using supercritical carbon dioxide," *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol 30, No. 1, pp. 59-64, 1999.
- [11] C.G. Pereira and M.A.A. Meireles, "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives," *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 3, No. 3, pp. 340-372, 2010.

- [12]J.L. Hedrick, L.J. Mulcahey, and L.T. Taylor, "Supercritical fluid extraction," *Microchimica Acta*, Vol. 108, No. 3, pp. 115-132, 1992.
- [13]E. Reverchon, "Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products," *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol. 10, No. 1, pp. 1-37, 1997.
- [14]S.I. Park, S.H. Heo, J. Lee, and M.S. Shin, "Extraction of active compounds from *Angelica gigas* using supercritical carbon dioxide and its physiological activity," *Journal of Convergence for Information Technology*, Vol. 11, No. 6, pp. 206-212, 2021.
- [15]S.I. Park, S.H. Heo, K.W. Lee, J.L. Kim, and M.S. Shin, "Antimicrobial effects of supercritical *Angelica gigas* extracts and enhancement of skin permeability using cell penetrating peptide," *Turkish Journal of Computer and Mathematics Education*, Vol. 12, No. 13, pp. 6063-6071, 2021.

※ 본 연구는 을지대학교의 지원을 받아 수행하였습니다.