

Verification of the Physiological Activity of *Geranium thunbergii* Extract and Anti-inflammatory Activity in Raw 264.7 Cells

Seung-Mi Park¹, Min-Jeong Oh² and Jin-Young Lee^{2*}

¹Department of Nursing Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

²Department of Cosmetic and Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Korea

Received October 22, 2023 / Revised November 22, 2023 / Accepted November 22, 2023

We evaluated the efficacy of *Geranium thunbergii* (GT), which has so far been understudied as a cosmetic material, and conducted anti-inflammatory-related activity studies. We measured the electron donation ability and ABTS⁺ radical scavenging ability to confirm the antioxidant ability of GT and found values of 91% and 94% at a concentration of 50 µg/ml, respectively, confirming that GT had excellent antioxidant ability. Tyrosinase inhibitory activity was measured to evaluate whitening activity, and it was found that inhibitory activity was 24.8% at the highest concentration of 1,000 µg/ml. Elastase and collagenase inhibitory activity were measured to determine the wrinkle improvement activity of the GT; 30.6% and 90% inhibitory activity were shown at the highest concentration of 1,000 µg/ml, respectively. Excellent inhibitory activity was confirmed through the measurement of collagenase inhibitory activity. Before the cell experiments were conducted, the survival rate of the macrophages Raw 264.7 according to GT treatment was determined based on the MTT assay, and the cell survival rate was greater than 83.6% at a concentration of 100 µg/ml. Subsequent cell-related experiments were conducted at concentrations of 100 µg/ml or less. The NO production inhibitory activity according to the GT treatment by NO assay was measured, and a 74.9% inhibitory rate was confirmed at a concentration of 100 µg/ml. Western blotting was performed to determine protein expression inhibition, and both COX-2 and iNOS factors were concentration-dependently inhibited in GT. Based on these results, GT is considered to have potential as an anti-inflammatory functional cosmetic material.

Key words : Anti-inflammatory, COX-2, functional cosmetics, *Geranium thunbergii*, iNOS

서 론

염증(inflammation)은 박테리아 같은 병원균이나 자극 물질, 조직 변질 및 상해와 같은 해로움이 있는 자극에 대한 생체의 방어 반응이라 할 수 있다[2].

대식세포(macrophage)는 신체의 면역세포 중 하나로 면역조절, 염증유도, 식세포 작용 및 세포 활성화 등의 기능을 수행하며 염증 매개물질을 방출한다[1, 7, 29]. 또한, 대식세포는 동물체의 숙주 반응에 관계하여 외부로부터 침투하는 바이러스 등의 방어와 항상성을 유지하며 감염 초기 염증반응 발달에 매우 중요한 역할을 한다[9, 11, 20]. 대식세포가 지방과 다당류의 복합체인 지질다당류 lip-

opolysaccharide (LPS)에 의하여 자극이 되어 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 발현이 되는데[10] 염증 매개 물질인 iNOS는 산화질소 합성효소이며 산화질소인 nitric oxide (NO)는 iNOS에서 만들어지게 된다[38]. 또한, 염증 및 통증을 야기하는 물질을 형성하는 효소인 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 발생하는 prostaglandin E₂ (PGE₂)는 염증 및 면역반응에 관여하고 종양의 세포 사멸을 제한하며 혈관생성을 유도하는 등 암과 종양 발생 등에도 기여하고 있는 것으로 알려진 바 있다[6, 15, 24, 28, 33].

현지초(*Geranium thunbergii*)는 쥐손이풀과에 속하는 여러해살이 풀이다. 아시아 온대 지방인 한국, 일본, 중국, 타이완 등에 분포하며 주로 산과 들에서 자란다. 줄기는 30~100 cm가량의 높이로 자라며 3~5개의 갈래로 깊이 갈라진 잎모양의 형태를 띠며 개화기는 8~9월로 홍색 또는 흰색의 작은 꽃이 핀다. 열매는 속이 여러 칸으로 나뉘어 각 칸 속에 종자가 들어있는 삭과(蒴果)의 구조로 이루어져 있으며 맛은 쓰고 약간 매우며 따뜻한 성질을 지니고 있다. 현지초는 이질풀이라고도 불리는데 말 그대로 이질(痢疾)에 효능이 있다고 알려져 있어 복통, 설사, 변비, 장

*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9552, Fax : +82-41-540-9538

E-mail : jylee@hoseo.edu

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

염 및 위궤양 등에 사용된다고 한다[25]. 현지초는 kaempferitrin, geraniin 및 quercetin 등의 페놀성 화합물로 구성되어 있으며 항산화에 효과가 있다고 연구되어진 바 있다 [23, 26, 31, 32, 36]. 또한, 현지초에 함유된 tannin 및 flavonoid 성분은 항비만과 항고지혈증에 효능[17]이 있다고 밝혀졌지만 현지초와 관련하여 화장품 소재개발 연구는 아직까지 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 현재까지 다양한 연구가 활발히 진행되지는 않은 현지초를 효소 활성을 통하여 항산화, 미백 및 주름개선 효능에 대해 스크리닝 후 항염과 관련하여 세포차원에서 기능성 메커니즘을 분석한 뒤 화장품 소재로서의 적용 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 연구의 진행을 위해 시료로써 사용된 현지초는 동광 한방물에서 구매하였다. 시료를 세척 후 건조하여 분쇄하였으며 시료 무게 10배 정도의 70% ethyl alcohol을 가하여 상온의 조건에서 24시간 동안 침지 과정을 거쳤다. 그 후 상등액과 침전물을 분리시켜 추출하였으며 시료 추출물은 Whatman No.2 여과지를 이용해 여과를 진행하였다. 여과를 마친 후 용매 제거를 위해 EYELA evaporator를 이용하여 감압농축 하였으며, freeze drier를 이용하여 동결건조를 진행하였다. 파우더 상태가 된 시료 추출물은 -20℃의 조건으로 냉동 보관하여 본 연구에 사용하였다.

시약 및 기기

전자공여능 측정을 위해 실험에 사용된 시약 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)과 ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정을 위해 사용된 시약 potassium persulfate는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)는 Wako Pure Chemical Industries. Ltd. (Japan)에서 구입 후 사용하였다. 미백활성 측정을 위해 사용된 시약 L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA), tyrosinase from mushroom, kojic acid 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였고, 주름개선 활성 측정에 사용된 시약 N-succinyl-L-ala-ala-p-nitroanilide, elastase from porcine pancreas 및 collagenase from clostridium histolyticum 및 epigallocatechin gallate (EGCG)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입, Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH trifluoroacetate salt는 Bachem Holding AG (Switzerland)에서 구입 후 실험을 진행하였다.

세포실험을 진행하기 위해 대식세포 Raw 264.7은 ATCC (USA)사에서 구입하였으며, Thermo Scientific Hyclone (USA)에서 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fe-

tal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin 및 trypsin을 구매, phosphate buffered saline (PBS)는 Lonza (Switzerland)에서 구입 후 세포 배양에 사용하였다. 세포 생존을 측정을 위해 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO)와 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입 후 실험에 사용하였다. LPS 및 griess reagent 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입 후 항염증 측정 실험에 사용하였으며, 단백질 발현 억제능을 측정하기 위해 실험에 사용하게 된 M-PER™ mammalian protein extraction reagent는 Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)에서 구매하였다. 1차 항체 β-actin, COX-2 및 iNOS 와 2차 항체 anti-mouse는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하여 실험을 진행하였다.

본 연구 진행을 위해 CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), autoclave (JS Research Inc., Korea), digital shaker (Daihan Scientific, Korea), freeze drier (ILShin BioBase Co., Korea), hot & stirrer (Daihan Scientific Co., Korea), microscope (Olympus, Japan), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), Mini-PROTEAN® tetra cell (Bio-Rad, USA), Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co, Korea), vortex (Scientific Industries, Inc., USA), UV/VIS spectrophotometer (Hitachi, Japan), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), microplate reader (Tecan, Austria), microcentrifuge (Gyrozen, Korea), centrifuge (Hanil Science Industrial Co., Korea), Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA) 등의 기기를 사용하였다.

실험 방법

전자공여능 측정

항산화능을 알아보기 위해 진행된 전자공여능(EDA: electron donating abilities) 측정은 Blois의 방법[3]을 변형하여 진행하였다. 실험조건에 맞게 희석한 DPPH용액 60 μl와 농도별로 희석한 현지초 추출물 120 μl를 넣어 혼합하고 상온의 암실 조건에서 15분간 반응시켰다. 그 후 microplate reader를 이용하여 517 nm의 흡광도에서 전자공여능을 측정하였으며, 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 확인하였다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

ABTS⁺ 라디칼 소거능 측정

또 다른 항산화능을 측정하기 위해 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정하였으며, ABTS⁺ decolorization assay 방법[27]에 의거하여 실험을 진행하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) 시약과 2.45 mM potassium persulfate를 실험 조건 비율에 맞게 혼합하여 상온에서 24

시간 동안 반응시켜 라디칼 생성을 유도한 후 ABTS⁺를 형성시켰다. 그 후 99.9% ethyl alcohol로 희석하여 실험 조건을 맞췄으며, ABTS⁺ 100 μ l에 농도별로 희석된 현지초 추출물 100 μ l를 가하여 700 nm의 흡광도에서 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정하였다. ABTS⁺ 라디칼 소거능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 확인하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ 라디칼 소거능(\%)} = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

Tyrosinase 저해활성 측정

티백활성 측정을 위해 Yagi 등[37]의 방법을 이용하여 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 67 mM의 sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 μ l와 10 mM의 L-DOPA를 용해한 40 μ l의 기질액 및 농도별로 희석한 현지초 추출물 40 μ l를 혼합하였다. 이 후 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase를 40 μ l씩 첨가하여 37°C의 조건에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 후 생성된 DOPA chrome을 흡광도 492 nm에서 측정하였으며, tyrosinase 저해활성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

Elastase 저해활성 측정

주름개선 측정을 위해 elastase 저해활성을 측정하였으며, Cannell 등의 방법[4]에 의거하여 실험을 진행하였다. 현지초 추출물을 농도별로 희석한 후 40 μ l씩 96 well plate에 가하고, pH 8.6인 50 mM tris-HCl buffer에 용해한 porcine pancreas elastase (2.5 U/ml)를 현지초 추출물을 가한 곳에 40 μ l씩 취하였다. 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 기질을 용해한 후 N-succinyl-L-ala-ala-ala-p-nitroanilide (0.5 mg/ml)을 80 μ l 가하여 30분 동안 37°C의 조건에서 반응시킨 후 흡광도 445 nm에서 elastase 저해활성을 확인하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성에 따른 주름개선 측정은 Wunsch E와 Heindrich HG의 방법[35]에 의거하여 실험을 진행하였다. 반응구는 pH 7.5의 0.1 M인 tris-HCl buffer에 4 mM CaCl₂를 첨가, Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH trifluoroacetate salt (0.3 mg/ml)를 용해한 기질 125 μ l 및 농도별로 희석한 시료 추출물 50 μ l의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/ml) 75 μ l를 첨가하여 상온의 조건에서 20분간 반응하였다. 그 후 반응 정지 시약으로써 사용된 6% citric acid 250 μ l를

첨가하고 ethyl acetate 1.5 ml를 취한 후 UV/VIS spectrophotometer기기를 사용하여 흡광도 320 nm에서 collagenase 저해활성을 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

세포 배양

본 연구의 세포 실험을 진행하기 위해 사용된 대식세포 Raw 264.7의 배양은 1%의 penicillin/streptomycin (100 U/ml)과 10%의 FBS로 조합된 DMEM 배지를 사용하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

Carmichael의 방법[5]에 따라 현지초 추출물의 세포 생존율 측정을 MTT assay에 의해 측정하였다. 대식세포 Raw 264.7을 seeding하기 위해 1×10⁵ cells/well의 갯수가 되도록 96 well plate에 180 μ l씩 분주하였다. 농도구간 별로 희석한 현지초 추출물을 20 μ l씩 가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다. 2.5 mg/ml 농도로 MTT 시약을 희석한 용액을 전 구간에 40 μ l 첨가하여 3시간 동안 동일 조건인 37°C, 5% CO₂ incubator에서 반응시켰다. 이 후 배양액을 suction하고 DMSO 100 μ l를 반응시킨 well 구간에 가하여 상온에서 10분 반응하였다. ELISA reader 기기를 이용하여 540 nm의 흡광도에서 생존율을 확인하였으며, 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = (\text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

Nitric oxide (NO) 생성 저해 활성 측정

현지초 추출물에 따른 Raw 264.7로부터 생성된 NO의 양을 Green 등의 방법[8]에 의거하여 측정하였다. Griess 시약을 사용하여 세포 배양액에 존재하는 NO₂의 형태를 확인하였으며, 측정 진행을 위해 96 well plate에 cell을 1×10⁵ cells/well의 갯수로 분주하여 24시간 동안 37°C의 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이 후 1X로 제조한 PBS를 이용하여 2회 washing 하였으며, normal 구간을 제외한 모든 구간에 LPS를 20 μ g/ml씩 처리, 2시간 반응시킨 후 농도 별로 희석한 현지초 추출물을 가하였다. 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 뒤 얻은 상등액과 griess 시약을 96 well plate에 1:1 비율로 가하여 상온에서 10분 동안 반응 후 540 nm에서 흡광도를 확인하였다. NO 생성 저해 활성 측정은 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{NO 억제능(\%)} = (\text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

현지초 추출물의 단백질 발현 억제능을 알아보기 위해 western blot을 진행하였다. 염증관련 인자 COX-2 및 iNOS로부터의 단백질 발현 억제능을 확인하기 위해 100 mm tissue culture dish에 1×10⁶ cells/dish의 갯수가 되도록 Raw 264.7을 seeding 후 배양하여 24시간 동안 37°C의 5% CO₂ incubator에서 안정화시켰다. 배양한 dish의 배지를 모두 suction하여 제거한 후 자극군으로써 LPS를 사용하여 1 µg/ml의 농도로 2시간 동안 처리하였다. 농도 구간별로 희석된 현지초 추출물을 처리한 배지로 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 가하였고, 이 후 배지를 suction하여 제거한 뒤 1× PBS washing을 2회 진행하였다. 단백질 정량은 M-PER™ mammalian protein extraction reagent를 이용하였으며, 100 µl로 용해하여 4°C, 13,200 rpm의 centrifuge를 이용하여 20분간 원심 분리를 진행하였다. BCA protein assay kit를 활용하여 분리된 상층액을 정량하였으며, 20 µl의 단백질 질량의 차이를 이용하여 10%의 SDS-PAGE 상에서 전기영동을 진행하였다. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 분리된 단백질은 transfer 기기를 사용하여 옮겼으며, 5% blocking buffer는 skim milk와 1X로 희석된 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)를 합하여 제조 후 사용하였다. 이 후 상온의 조건에서 1시간 blocking을 실시하였다. 1차 항체인 COX-2 및 iNOS를 알맞은 비율로 조제하여 4°C의 조건에서 over night하여 반응시켰으며, 이 후 1× TBST로 3회 washing을 10분 간격으로 진행하였다. 2차 항체로써는 anti-mouse를 사용하였고 1:1,000의 비율로 조제하여 실온에서 1시간 30분동안 반응시켰다. 이 후 다시 1× TBST로 3회 washing을 한 뒤, 이 후 단백질 발현 억제능을 확인할 수 있는 밴드를 현상하기 위해 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM 기기를 이용하여 단백질 발현 억제능을 확인하였다.

결과 및 고찰

현지초 추출물의 전자공여능

안정화된 자유 라디칼 구조를 지닌 DPPH는 수용성 물질으로써 항산화력이 있는 물질 등의 전자공여능으로 인해 환원이 되면 보라색에서 탈색이 되는 현상이 나타난다 [16]. 현지초 추출물의 항산화능을 알아보기 위해 전자공여능 측정을 실시한 결과, Fig. 1과 같이 나타났다. 현지초 추출물의 농도가 증가할수록 항산화능도 증가하였으며, 50 µg/ml의 농도에서는 91%의 효과를 나타내었다. 이후의 농도에서도 90% 이상의 우수한 항산화능을 확인할 수 있었으며, 대조군으로 사용된 butylated hydroxy anisole (BHA)와 비교하였을 때 50 µg/ml 농도 이상부터 유의한 효능이 나타났다. 또한, Lee 등[19]의 연구에서 3,000 µg/ml 농도의 산약 추출물이 60.89%의 효능을 나타내었다는

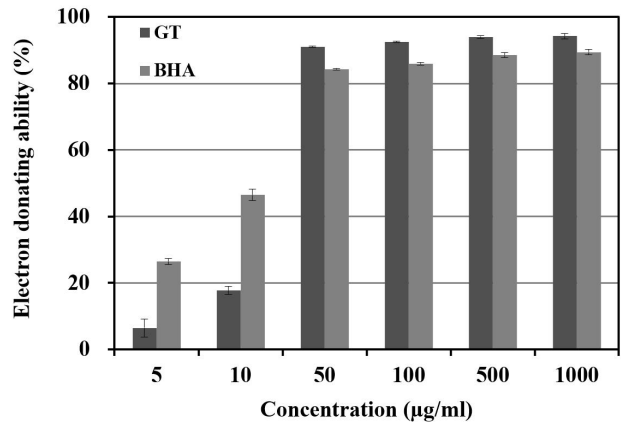


Fig. 1. Electron donating ability of *Geranium thunbergii* extract. Electron donating ability for *Geranium thunbergii* from various concentration was determined with 0.2 mM DPPH ethanolic solution. Result are means ± SD of triplicate data. ■ GT: *Geranium thunbergii*, □ BHA: Butylated hydroxy anisole.

결과와 비교하였을 때 현지초 추출물이 항산화력이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

현지초 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능

현지초 추출물의 ABTS⁺ 라디칼 소거능은 2.45 mM potassium persulfate 시약과 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) 시약을 반응시켜 생성되는 ABTS⁺ 라디칼이 항산화력을 가진 물질이 전자를 얻어 청록색에서 탈색되는 것[14]을 측정하여 항산화능을 알아보았으며 그 결과, Fig. 2와 같이 나타났다. 현지초 추출물의 농도가 증가함에 따라 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 우수함을 확인할 수 있었으며, 50 µg/ml의 농도에서는 94%의 소거능이 나

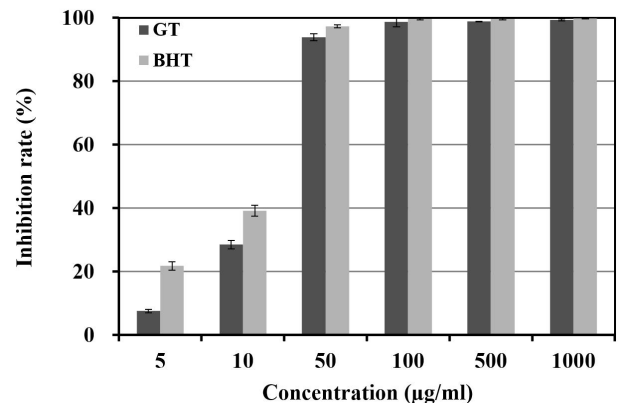


Fig. 2. ABTS⁺ radical scavenging ability of *Geranium thunbergii* extract. ABTS⁺ radical scavenging activity for *Geranium thunbergii* from various concentration was determined with ABTS⁺ radical solution. Result are means ± SD of triplicate data. ■ GT: *Geranium thunbergii*, □ BHT: Butylated hydroxytoluene.

타났다. 이후의 농도에서도 95% 이상의 우수한 소거능이 나타났고 대조군으로써 사용된 butylated hydroxytoluene (BHT)와 비교하였을 때 50 µg/ml 농도 이상부터 유의하게 우수한 소거능이 나타났다. 이는 Kim 등[13]의 연구에 의하면 400 µg/ml 농도에서의 노각나무 가지 70% ethanol 추출물은 44.9% 소거능이 나타났다는 결과와 비교하였을 때 현지초 추출물은 노각나무 가지 70% ethanol 추출물보다 ABTS⁺ 라디칼 소거능이 더 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

현지초 추출물의 Tyrosinase 저해활성

인간의 피부색을 결정짓는 색소인 멜라닌은 DOPA와 DOPA quinone으로 tyrosinase 효소에 의해 산화반응이 일어나 생합성되며[34] 현지초 추출물의 미백활성을 확인하기 위해 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과, Fig. 3과 같이 나타났다. 현지초 추출물의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 저해능이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 24.8%의 저해능이 나타났다. Kwak [18]의 연구에서 선화 뿌리 추출물은 1,000 µg/ml의 농도에서 14.9%의 저해능을 나타났다고 보고되었으며, 이는 현지초 추출물과 비교하였을 때 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

현지초 추출물의 Elastase 저해활성

노화의 주된 원인으로 알려진 피부 탄력의 손실은 탄성 섬유로 구성된 경단백질인 elastin을 분해하는 elastase가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[12, 22]. 현지초 추출물의 주름개선 활성을 측정하기 위해 elastase 저해활성 측정을 실시하였으며 그 결과, Fig. 4와 같이 확인되었다. 현지

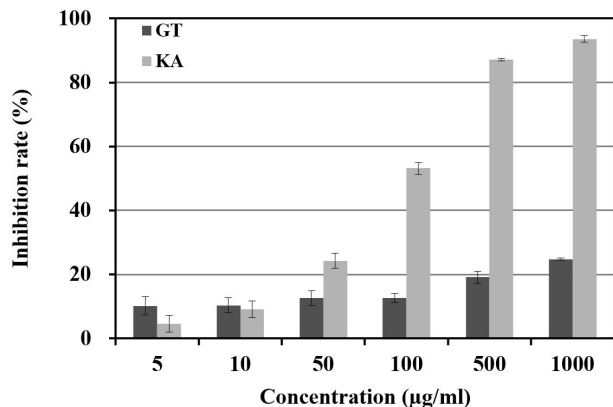


Fig. 3. Inhibition rate of extract from *Geranium thunbergii* on tyrosinase. Inhibition rate of tyrosinase for *Geranium thunbergii* from various concentration was determined with 200 U/ml mushroom tyrosinase solution. Result are means ± SD of triplicate data. ■ GT: *Geranium thunbergii*, □ KA: Kojic acid.

초 추출물의 농도가 증가할수록 elastase 저해능도 증가하였으며, 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 30.6%의 저해능을 확인하였다. Lim 등[21]의 연구 결과에 따르면 포공영에 탄을 추출물은 현지초 추출물과 같은 농도인 1,000 µg/ml에서 21.6%의 저해율이 나타났다고 보고되었으며, 이는 현지초 추출물과 비교하였을 때 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

현지초 추출물의 Collagenase 저해활성

Collagenase는 교원질인 collagen을 가수 분해를 촉매하는 효소로써 주름생성 유발을 촉진한다[30]. Collagenase 저해활성 측정을 통해 현지초 추출물의 주름개선 활성을

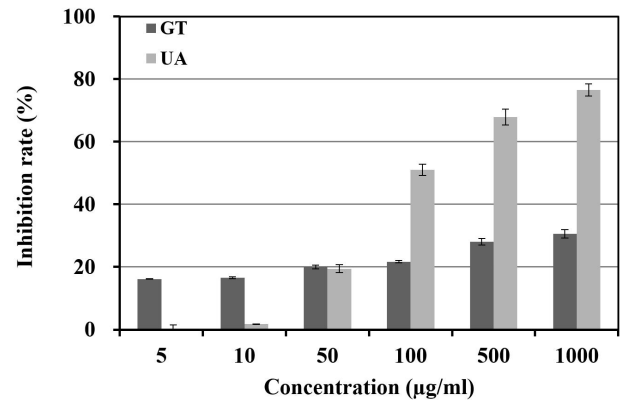


Fig. 4. Inhibition rate of extract from *Geranium thunbergii* on elastase. Inhibition rate of elastase for *Geranium thunbergii* from various concentration was determined with 2.5 U/ml porcine pancreas elastase solution. Result are means ± SD of triplicate data. ■ GT: *Geranium thunbergii*, □ UA: Ursolic acid.

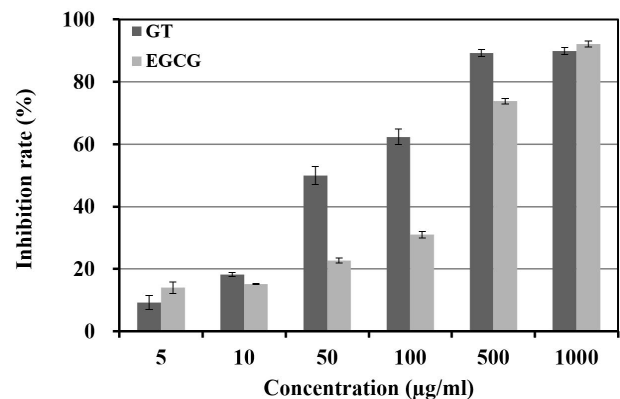


Fig. 5. Inhibition rate of extract from *Geranium thunbergii* on collagenase. Inhibition rate of collagenase for *Geranium thunbergii* from various concentration was determined with 0.2 mg/ml collagenase solution. Result are means ± SD of triplicate data. ■ GT: *Geranium thunbergii*, □ EGCG: Epigallocatechin gallate.

확인하였으며 그 결과, Fig. 5와 같이 나타났다. 현지초 추출물의 농도가 증가함에 따라 collagenase 저해능도 증가하였으며, 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 90%의 저해능이 나타났다. 대조군으로 사용된 EGCG는 최고농도인 1,000 µg/ml에서 92.1%의 저해능이 나타났으며 현지초 추출물과 유의한 결과를 나타내어 현지초 추출물이 collagenase 저해활성에 효능이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

현지초 추출물의 MTT assay에 의한 세포 생존율

현지초 추출물 처리에 따른 대식세포 Raw 264.7의 생존율을 알아보기 위해 MTT assay를 진행하였으며 그 결과, Fig. 6과 같이 나타났다. 현지초 추출물은 100 µg/ml의 농도에서 83.6% 이상의 세포 생존율이 나타났으며 독성이 미미한 것으로 판명되어졌다. 따라서, 이하의 세포 관련 실험 진행은 100 µg/ml 이하 농도의 현지초 추출물을 가하여 실험을 실시하였다.

현지초 추출물의 Nitric oxide (NO) 생성 저해 활성

현지초 추출물 처리에 따른 항염증 활성을 확인하기 위해 NO assay에 의하여 NO 생성 저해능을 측정된 결과, Fig. 7과 같이 확인되었다. LPS를 자극군으로 사용함으로써 LPS를 처리한 구간은 처리하지 않은 구간에 비해 NO 발현량이 높았음을 확인할 수 있었고 현지초 추출물 처리의 농도가 증가함에 따라 NO 발현이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 현지초 추출물은 100 µg/ml의 농도에서 74.9%의 저해율을 확인할 수 있었으며, 이에 따라 항염증 작용에 효능이 있을 것으로 생각된다.

Western blot을 통한 현지초 추출물의 단백질 발현

현지초 추출물의 단백질 발현 억제능을 알아보기 위해

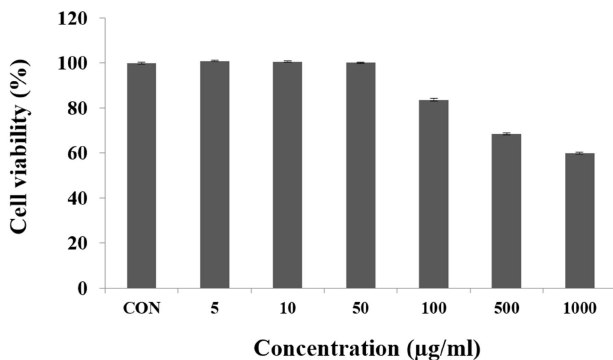


Fig. 6. Cell viability of extract from *Geranium thunbergii* on macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated for 24 hr in DMEM containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *Geranium thunbergii* for 24 hr and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean ± SD of three individual experiments.

western blot을 진행하였으며, 현지초 추출물 처리에 따른 염증관련 인자 COX-2 및 iNOS로부터의 단백질 발현 억제능을 Fig. 8, 9와 같이 나타났다. 현지초 추출물은 25, 50 및 100 µg/ml의 농도로 처리하였으며, COX-2 및 iNOS 두 인자 모두 농도의존적으로 단백질 발현량이 저해되었으며, COX-2 인자는 100 µg/ml의 농도에서 41.3% 감소, iNOS 인자는 같은 농도에서 8.9%가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, iNOS 인자에서는 대조군인 allantoin 과 동일한 100 µg/ml의 농도에서 단백질 발현이 더욱 감소되어 우수한 저해능을 확인할 수 있었다.

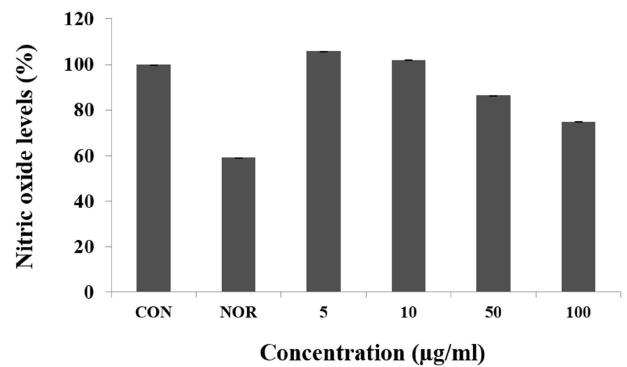


Fig. 7. Effect of *Geranium thunbergii* extract on production of nitric oxide in macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated with 1 µg/ml of LPS for 24 hr and then treated with six concentrations of extract for 24 hr. CON: control, treated with LPS, NOR: normal, not treated with LPS. Each values represents mean ± SD of three individual experiments.

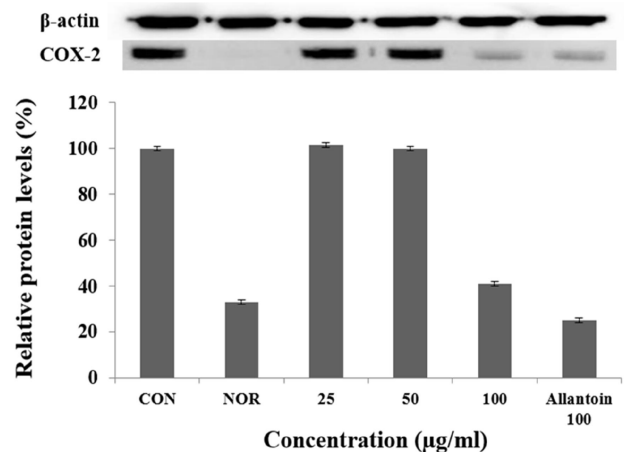


Fig. 8. COX-2 protein expression rate of extract from *Geranium thunbergii* on macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated with 1 µg/ml of LPS for 24 hr and then treated with three concentrations of extract for 24 hr. CON: control, treated with LPS, NOR: normal, not treated with LPS. Each values represents mean ± SD of three individual experiments.

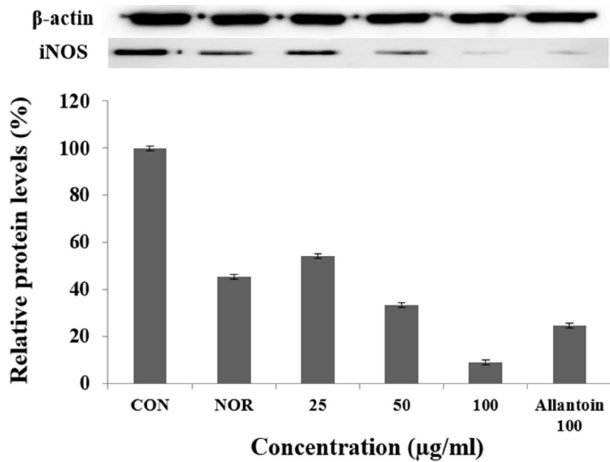


Fig. 9. iNOS protein expression rate of extract from *Geranium thunbergii* on macrophage cell (Raw 264.7). Raw 264.7 cells were incubated with 1 µg/ml of LPS for 24 hr and then treated with three concentrations of extract for 24 hr. CON: control, treated with LPS, NOR: normal, not treated with LPS. Each values represents mean ± SD of three individual experiments.

감사의 글

본 과제(결과물)는 2023년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다. (2021RIS-001)

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology* **4**, 499-511.
- Albina, J. E. and Reichner, J. S. 1995. Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horizons* **3**, 46-64.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1120.
- Cannell, R. J. P., Kellan, S. J., Owsianks, A. M. and Walker, J. M. 1988. Results of a largescale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**, 10-14.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**, 271-277.

- Gomez, P. F., Pillinger, M. H., Attur, M., Marjanovic, N., Dave, M., Park, J., Binagham, C. O., Al Mussawir, H. and Abramson, S. B. 2005. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Immunol.* **175**, 6924-6930.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- Guo, L. Y., Hung, T. M., Bae, K. H., Shin, E. M., Zhou, H. Y., Hong, Y. N., Kang, S. S., Kim, H. P. and Kim, Y. S. 2008. Anti-inflammatory effects of schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Eur. J. Pharmacol.* **591**, 293-299.
- Guzik, T. J., Korbout, R. and Adamek-Guzik, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* **54**, 469-487.
- Higuchi, M., Higashi, N., Tak, H. and Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1425-1431.
- Kang, H., Lee, S. G., Song, G. J. and Jung, M. S. 2018. Antioxidant and anti-aging activities of ethanol extracts from defatted *Perilla frutescens*. *J. Naturopathy* **7**, 70-74.
- Kim, H. S., Park, M. J., Kim, S. J., Kim, B. K., Park, J. H., Kim, D. H. and Cho, S. J. 2021. Antioxidant effects of *Stewartia koreana* Nakai leaves and branch extracts. *J. Life Sci.* **31**, 229-236.
- Kim, J. E., Ko, Y. R., Boo, S. H., Kang, S. H. and Lee, N. H. 2022. Anti-inflammatory and anti-oxidative activities for the subcritical water extract of *Camellia japonica* flowers. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **48**, 97- 104.
- Kim, J. Y., Jung, K. S, and Jeong, H. G. 2004. Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *FEBS Lett.* **569**, 321-326.
- Kim, O. K. 2005. Antidiabetic and antioxidative effects of *Corni fructus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *KSAST.* **22**, 157-167.
- Kim, S. G., Lamichhane, B., Sharma, D. K., Lee, K. H., Cho, J. W. and Jung, H. J. 2014. Anti-obesity and anti-hyperlipidemic effects of butanol soluble fraction from methanol extract of *Geranium thunbergii* in sprague-dawley rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**, 69-76.
- Kwak, C. G. 2009. Analysis on the contents and tyrosinase inhibitory effect of *Calystegia japonica*. *Daegu Haany Univ., master's thesis.*
- Lee, H. J. 2009. General experiment and antioxidant activity of *Dioscorea rhizoma* and *Polygonum multiflorum* thunb in study. *Daegu Haany Univ., master's thesis.*
- Lee, Y. S., Kim, H. S., Kim, S. K. and Kim, S. D. 2000. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblasts in response to *Candida albicans*.

- J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 8-15.
21. Lim, A. K., Kim, J. O., Jung, M. J., Jung, H. K., Hong, J. H. and Kim, D. I. 2008. Functional biological activity of hot water and ethanol extracts from *Taraxaci herba*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**,1231-1237.
 22. Lim, S. M., Park, H. J. and Cho, Y. J. 2017. Antioxidative and biological activity of extracts from *Orostachys japonicus*. *J. Appl. Biol. Chem.* **60**, 293.
 23. Liu, Q. H., Jeong, J. E., Choi, E. J., Moon, Y. H. and Woo, E. R. 2006. A new furofuran lignan from *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc. *Arch. Pharm. Res.* **29**, 1109-1113.
 24. Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Isakson, P. C. and Seibert, K. 1994. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3228-3232.
 25. Moon, E. J., Youn, Y. S., Choi, B. Y., Jeong, H. U., Park, J. H., Oh, M. S., Soh, Y. J. and Kim, S. Y. 2010. Extracts of *Sorbus commixta* and *Geranium thunbergii* inhibit osteoclastogenesis and stimulate chondrogenesis. *JKAIS.* **11**, 3358-3365.
 26. Pokharel, Y. R., Liu, Q. H., Oh, J. W., Woo, E. R. and Kang, K. W. 2007. 4-Hydroxykobusin inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1097-1101.
 27. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
 28. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W. Lee, L. and Isakson, P. 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12013-12017.
 29. Shim, J. H. 2019. Anti-inflammatory effect of zeaxanthin in RAW264.7 cells. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **17**, 431-439.
 30. Suzanne, E. G. F., James, V., Subhash, C. D., Sewon, K., Gary, J. F. and John, J. 2003. Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 842-848.
 31. Takuo, O., Kazuko, M., Kaoru, S. and Tsutomu, H. 1979. Constituents of *Geranium thunbergii* Sieb. et Zucc. : VII. High-Performance reversed-phase liquid chromatography of hydrolysable tannins and related polyphenols. *J. Chromatogr. A.* **171**, 313-320.
 32. Takuo, O., Takashi, Y. and Kazuko, M. 1975. Brevifolin, corilagin and other phenols from *Geranium thunbergia*. *Phytochemistry* **14**, 1877-1878.
 33. Vane, J. R., Mitchell, J. A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J. and Willoughby, D. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2046-2050.
 34. Vile, G. F. and Tyrrell, R. M. 1995. UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein in vitro and in human skin fibroblast is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 721-730.
 35. Wünsch, E. and Heidrich, H. C. 1963. Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* **333**, 149-151.
 36. Xiufen, W., Hiramatsu, N. and Matsubara, M. 2004. The antioxidative activity of traditional Japanese herbs. *Biofactors* **21**, 281-284.
 37. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by Aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.
 38. Yi, H. S., Yun, H. J., Heo, S. K., Choi, J. W., Jung, J. H. and Park, S. D. 2008. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Draconis resina* in mouse macrophage cells. *Kor. J. Herbology* **23**, 179-192.

초록 : 현지초(*Geranium thunbergii*) 추출물의 생리활성 및 Raw 264.7 cells에서의 항염활성 검증

박승미¹ · 오민정² · 이진영^{2*}

(¹충북대학교 간호학과, ²호서대학교 화장품생명공학부)

본 연구에서는 현재까지 화장품 소재로써 다양한 연구가 진행되지 않은 현지초 추출물의 효능평가 및 항염 관련 활성 연구를 진행하였다. 현지초 추출물의 항산화능을 확인하기 위해 전자공여능 및 ABTS⁺ 라디칼 소거능을 측정된 결과, 각각 50 µg/ml의 농도에서 91%, 94%를 나타내어 항산화능이 우수함을 확인할 수 있었다. 미백활성 측정을 위해 tyrosinase 저해활성 측정을 실시하였으며 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 24.8%의 저해능이 나타났다. 현지초 추출물의 주름개선 활성을 알아보기 위해 elastase 및 collagenase 저해활성 측정을 실시하였으며 그 결과, 각각 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 30.6%, 90%의 저해능이 나타났고 collagenase 저해활성에서 우수한 저해능을 확인할 수 있었다. 세포 실험 진행을 위해 현지초 추출물 처리에 따른 대식세포 Raw 264.7의 생존율을 MTT assay에 의거하여 진행하였으며 100 µg/ml의 농도에서 83.6% 이상의 세포 생존율을 나타내어 이하의 세포 관련 실험 진행은 100 µg/ml 이하의 농도의 현지초 추출물을 가하여 실험을 실시하였다. NO assay에 의하여 현지초 추출물 처리에 따른 NO 생성 저해 활성을 측정된 결과, 100 µg/ml의 농도에서 74.9%의 저해율을 확인하였다. 단백질 발현 억제능을 알아보기 위해 western blot을 진행하였으며 현지초 추출물은 COX-2 및 iNOS 두 인자 모두 농도의존적으로 단백질 발현량이 저해됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들에 의해 현지초 추출물은 항염 관련 기능성 화장품 소재로써 활용 가능성이 있다고 사료된다.