

Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of *Codonopsis lanceolata* Skin Extracts

Yun Hee Jung, Min Jeong Ryu*

Department of Cosmetology Science, Nambu University, Gwangju, Korea

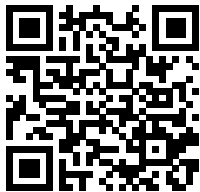
*Corresponding author: Min Jeong Ryu,
Department of Cosmetology Science,
Nambu University, 23 advanced Jungang-ro,
Gwangsan-gu, Gwangju 62271, Korea
Tel.: +82 62 970 0137
Fax: +82 62 972 6200
Email: jemine0806@hanmail.net

Received April 1, 2018

Revised July 20, 2018

Accepted July 26, 2018

Published September 30, 2018



Abstract

Purpose: The aim of this study was to investigate the biological and cosmetic properties and industrial value of *Codonopsis lanceolata* (*C. lanceolata*, Deodeok) skin extract. **Methods:** 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity, total polyphenol content, flavonoid content and superoxide dismutase (SOD)-like activity were measured to investigate the anti-oxidative effect of *C. lanceolata* skin extract, while its cytoprotective effect was studied on HaCaT cells treated with hydrogen peroxide. Nitric oxide (NO) production inhibition was evaluated using Griess' method, after inducing an inflammatory response in RAW 264.7 cells using lipopolysaccharides (LPS). **Results:** DPPH radical-scavenging ability at 500 µg/mL was 74.93% and 85.25% for hot water and ethanol extracts, respectively, while total polyphenol contents were 70.22 and 75.27 µg/mL and total flavonoid contents were 16.12 and 22.65 µg/mL; SOD-like activities of the extracts were 62.2% and 69.93% at 500 µg/mL. The extracts exhibited a 30% and 36% protective effect at 100 µg/mL on hydrogen peroxide-treated HaCaT keratinocytes, respectively, and NO inhibition in RAW 264.7 cells induced with LPS was 14.57 and 11.45 µM at 100 µg/mL concentration. **Conclusion:** These results suggest that the ethanol extract of *C. lanceolata* skin has higher anti-oxidative, cytoprotective, and anti-inflammatory effects than the hot water extract, and is a candidate for a natural, functional cosmetic material.

Keywords: Anti-oxidative, Anti-inflammatory, *Codonopsis lanceolata*, Cosmetic, Hydrogen peroxide

Introduction

현대 사회의 급격한 산업 발달로 인해 생활환경 및 식생활의 변화 그리고 이에 따른 스트레스가 증가하고 있다. 이로 인해 여드름, 아토피, 과민성 피부, 천식 등의 만성 염증 질환이 증가하면서 다양한 요인으로 인한 면역 조절 이상으로 유발된 염증이 지속되고 있다. 그러나 지속적으로 또는 과도하게 발생된 만성염증반응은 조직의 손상을 유발하며 이와 관련한 활성 산소종과 염증성 cytokine은 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 매개체로서 중요한 역할을 한다(Kim *et al.*, 2015a). 항산화 물질(antioxidant)은 불포화지방산의 자동산화에 의해 생성되는 지질과 산화물을 억제하여 식품의 산패를 억제해 줄 뿐만 아니라 생체 내에서 생성되는 각종 활성산소종(1O_2 , O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$)에

의한 지질과산화반응을 억제하여 암, 동맥경화증, 염증, 당뇨, 및 노화를 예방해주는 생리활성물질로서 크게 각광을 받고 있다(Leem *et al.*, 2011). 천연물질로부터 생리활성 물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항산화제로는 α -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids와 같은 천연 항산화제와 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) 및 t-butylhydroquinone (TBHQ) 등과 같은 여러 합성 항산화제가 널리 사용되고 있으나, 천연 항산화제의 높은 가격 및 낮은 항산화 활성, 그리고 합성 항산화제의 발암성 및 독성 등의 안전성 문제가 제기되면서 보다 안전하고 효과 있는 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다(Kim *et al.*, 2015b). 세포사는 노화나 염증 등의 질병으로 진행이 되며 특히 염증성 질환과 밀접한 관계를 갖고 있는데 산화적 손상 및 자극에 대하

여 염증성 사이토카인이나 단백질이 발현하여 염증을 유발한다고 알려져 있다(Kang, 2012). 염증반응은 생체에 이물질이 감염 또는 침입하였거나 물리 화학적 손상을 입었을 때 이를 방어하기 위한 국소적 현상이지만, 과잉의 생체 방어 반응은 염증 국소 주위에 있는 정상조직을 손상시켜 염증질환을 일으킨다(Kim & Ryu, 2017; Park *et al.*, 2011). 염증반응과 관련하여 혈관이 확장되어 감염부위로 혈류량이 증가함에 따라 혈관의 투과성이 향상되고, 면역 세포들이 손상된 조직으로 이동하면서 발열, 통증, 홍반 및 부종 등의 증상이 나타난다. 염증반응에 관여하는 주요 세포는 대식세포로 알려져 있으며, 여러 자극이나 면역세포들이 분비하는 사이토카인 등에 의해 활성화된다(Park & Kang, 2016). 생체 내 염증을 촉진하는 효소로는 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 lipoxygenase (LOX)가 잘 알려져 있으며, 이들 효소를 저해하는 물질은 염증성 질환을 저해하는 항염증제로서 개발 가능성이 높다(Kim & Jeong, 2014). 지금까지 개발된 항염증제는 크게 스테로이드계(히드로코르티손, 프레드니솔론, 베타메타손)와 비스테로이드계(아스피린, 인도메타신, 이부프로펜)로 나눌 수가 있는데, 모두 염증반응의 주요 매개체인 프로스타글란딘의 생합성을 억제해줌으로써 항염증 작용을 나타내는 약제이다. 그러나 이들 항염증제는 위염, 신장염 및 심장질환 등을 초래함으로써 인체 안전성 면에서 대부분 문제점을 안고 있어 그 사용이 일부 제한되고 있기에 현재 천연으로부터 보다 안전한 항염증 치료제의 개발이 활발히 이루어지고 있다(Lee *et al.*, 2017). 더덕(沙蔘, *Codonopsis lanceolata*)은 한국, 중국 및 일본의 산간지방에서 야생하는 다년생 초본으로 도라지와 함께 일반식용으로 널리 이용되고 있는 산채식품이다. 더덕은 기호품으로도 상당한 호평을 받는 식품일 뿐 아니라 진해(鎮咳), 거담(祛痰) 등의 약효가 있다고 古來부터 식이요법이 전해지며, 혈적(血積), 경기(驚氣), 두통(頭痛) 및 소화약(消炎藥)으로 또는 인삼의 대용약으로 사용되어 왔으며, 더덕의 성분 관해서는 일종의 saponin이 존재한다는 것이 확인되었다(Kim & Chung, 1975; Kim *et al.*, 2010a). 더덕의 국내 연구는 항산화 효과(Maeng & Park, 1991; Park *et al.*, 2010), 면역효과(Suh, 1996), 미백효과(Kim *et al.*, 2010b; Lee *et al.*, 2002) 등이 진행되고 있지만 더덕 껍질을 이용한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 더덕 껍질 열수 그리고 에탄올 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거활성 및 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량, SOD 유사활성을 조사하여 항산화 효과를 확인하고, HaCaT 세포에서 H₂O₂에 대한 세포 보호 효과를 측정하였다. 그리고 LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포를 통해 NO 생성을 억제하는 효과를 Griess의 방법으로 조사하였다.

Methods

1. 시약 및 기기

본 연구에 사용한 시약은 DPPH (Sigma-Aldrich, USA), BHT (Sigma-Aldrich), ascorbic acid (vitamin C; Sigma-Aldrich), Folin-Denis' reagent (Sigma-Aldrich), sodium carbonate (Sigma-Aldrich), sodium hydroxide (Sigma-Aldrich), tannic acid (Sigma-Aldrich), diethylene glycol (Sigma-Aldrich), pyrogallol (Sigma-Aldrich), naringin (Sigma-Aldrich), hydrogen peroxide solution (Sigma-Aldrich), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich), trypan blue (Sigma-Aldrich), lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5 (LPS; Sigma-Aldrich)이고, 세포배양에는 Dulbeccos modified Eaglesmedium (DMEM; Gibco BRL, USA), 10% 우태아혈청 fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), penicillin-streptomycin (P/S; Gibco BRL)을 구입하여 사용하였다.

2. 시료 제조

전라도 화순에서 재배한 더덕(*Codonopsis lanceolata*)을 채취하여, 더덕 표면에 있는 흙은 충분히 털어낸 후 증류수로 세척하여 껍질과 육질을 분리하여 껍질은 자연 건조하여 사용하였다. 열수 추출방법(water extraction, WE)은 더덕 껍질을 60℃에서 증류수를 가해서 24 h 추출하였으며, 에탄올 추출방법(ethanol extraction, EE)은 더덕 껍질을 60℃에서 70% 에탄올을 가해서 24 h 추출하고, 추출액을 여과(Whatman filter paper No.1; Whatman, UK)한 후에 회전식 감압농축기(EYELA N-1000; Tokyo Rikakikai Co, Japan)로 농축한 후, 동결건조기(PVTF 10AT; ILSIN, Korea)에 72 h 동안 동결 건조하여 분말로 만들어 실험을 진행하였다.

3. 전자 공여능

DPPH radical을 이용한 항산화 활성은 Blois (1958) 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 1 mM DPPH 용액 100 µL와 추출물(15.7-500 µg/mL)을 100 µL씩 취하여 혼합한 후 30 min 암 상태에서 방치한 후 잔존 radical 농도를 Microplate Reader (iMARK™; BIO-RAD, USA)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 활성비교를 위하여 항산화 물질로 잘 알려진 BHT, ascorbic acid와 비교하였다. 전자공여능(%)은 (1-시료의 흡광도/대조군의 흡광도)×100에 의하여 산출하였다.

4. 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin & Denis (1915) 방법에 따라, 추

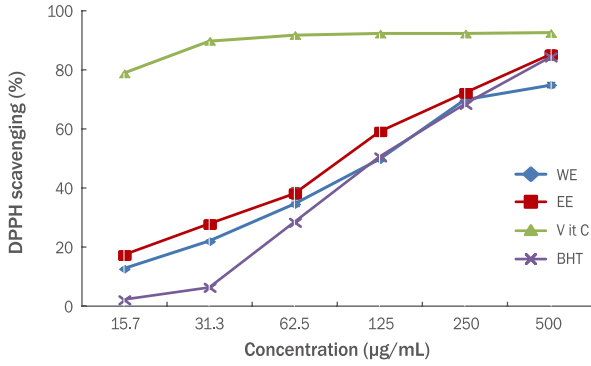


Figure 1. DPPH radical scavenging activities of *C. lanceolata* skin extracts.

DPPH radical scavenging assays were conducted to investigate the anti-oxidant effects of *C. lanceolata* skin in water and ethanol extracts at varying concentrations of 15.7, 31.3, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL, respectively. WE, water extracts; EE, 70% ethanol extracts; Vit C, ascorbic acid; BHT, butylated hydroxytoluene group; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; *C. lanceolata*, *Codonopsis lanceolata*.

출물(1 mg/mL) 50 µL에 증류수 650 µL 넣고 Folin-Denis' reagent 50 µL를 가하여 3 min 동안 실온에서 반응시킨다. 반응시킨 후 10% sodium carbonate (Na₂CO₃; Sigma-Aldrich) 포화용액을 100 µL 첨가하고, 최종 볼륨을 1 mL 맞추기 위해 증류수 150 µL 넣어 잘 혼합시켰다. 37°C water bath에 1 h 반응시킨 후 Microplate Reader (iMARK™)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 tannic acid 농도 0-500 µg/mL이 되도록 하고 이로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

5. 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 추출물(1 mg/mL) 100 µL에 1 mL diethylene glycol을 첨가하고, 다시 1 N sodium hydroxide (NaOH; Sigma-Aldrich) 100 µL 넣어 잘 혼합시켜 37°C water bath에 1 h 반응시킨 후 Microplate Reader (iMARK™)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 naringin 농도를 0-300 µg/mL이 되도록 하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

6. SOD 유사활성

SOD 유사활성은 Marklund & Marklund (1974)의 방법에 따라 과산화수소(H₂O₂)로 전화시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 추출물(15.7-500 µg/mL) 2 mL에 Tris-HCl의 완충용액 (50 mM Tris+10 mM EDTA, pH 8.5) (Sigma-Aldrich) 3.0 mL과 7.2 mM pyrogallol (Sigma-Aldrich) 0.2 mL을 가하여

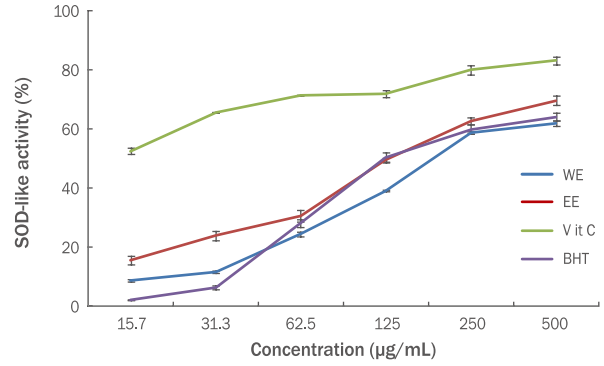


Figure 2. SOD-like activity of *C. lanceolata* skin extracts.

SOD-like activity assays were conducted to investigate the anti-oxidant effects of *C. lanceolata* skin in WE and EE at varying concentrations of 15.7, 31.3, 62.5, 125, 250, and 500 µg/mL, respectively. SOD, superoxide dismutase; WE, water extracts; EE, 70% ethanol extracts; Vit C, ascorbic acid; BHT, butylated hydroxytoluene group; *C. lanceolata*, *Codonopsis lanceolata*.

25°C에서 10 min 반응시킨 후 1N HCl 0.1 mL을 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 %로 나타내었다.

7. HaCaT 세포에서 H₂O₂에 대한 세포 보호 효과 측정

1) 세포배양

HaCaT 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB, Korea)에서 분양 받아 사용하였으며 세포는 10% FBS과 P/S을 첨가한 DMEM 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포 배양배지는 세포가 80% 이상 자란 시점에서 2-3 일마다 교환하였다.

2) 세포 생존율 측정

HaCaT 세포의 생존율 측정은 96 well plate의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 세포를 1×10⁵ cells/well의 농도가 되도록 조절하여 분주하여 24 h 배양하여 부착화 및 안정화를 시행하였다. 24 h 배양이 끝난 후 추출물을 최종 농도 5-200 µg/mL가 되도록 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포에 공급하고 24-48 h 동안 배양하였다. 배양완료 후 well에 MTT 용액(5 mg/mL in phosphate buffered saline)을 10 µL씩 가해주고, 다시 37°C, 5% CO₂의 습윤 배양기에서 4 h 동안 반응하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) 150 µL로 잘 녹여서 Microplate Reader (iMARK™)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

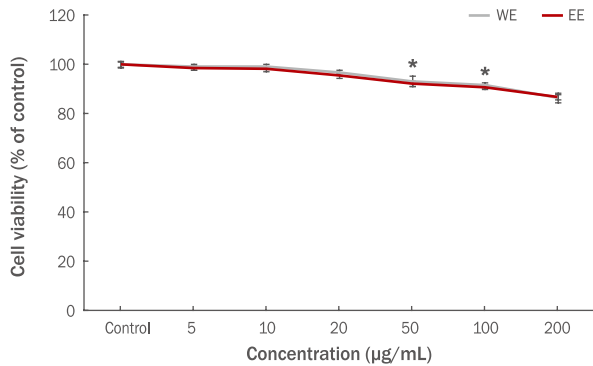


Figure 3. Effect of *C. lanceolata* skin extracts on human HaCaT keratinocytes viability.

Human HaCaT cells were incubated with *C. lanceolata* skin extracts at varying concentrations (5, 10, 20, 50, 100, and 200 µg/mL) for 24 h and cell viability was measured using MTT assay. Values represent the mean standard deviation of three independent experiments. Statistically significant differences are indicated with an asterisk (**p*<0.05, compared with untreated control cells). WE, water extracts; EE, 70% ethanol extracts; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; *C. lanceolata*, *Codonopsis lanceolata*.

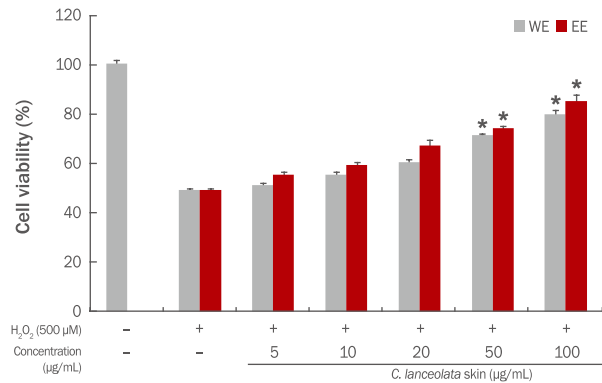


Figure 4. Protective effect of the *C. lanceolata* skin extracts against oxidative stress induced by H₂O₂ in human HaCaT keratinocytes.

Human HaCaT cells were incubated with *C. lanceolata* skin extracts for 2 h followed by treatment with 500 µM H₂O₂ for 24 h and cell viability was measured using MTT assay. Results are represented as mean standard deviation of the three independent experiments. Statistically significant differences are indicated with asterisks (**p*<0.05, compared with controls). WE, water extracts; EE, 70% ethanol extracts; H₂O₂, hydrogen peroxide; MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; *C. lanceolata*, *Codonopsis lanceolata*.

3) H₂O₂에 대한 세포 보호 효과 측정

24 well plate에 HaCaT 세포를 각 well 당 1×10⁵ cell/well로 분주하고, 24 h를 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24 h의 배양이 끝난 후, 더덕 열수 추출물과 에탄올 추출물을 세포 독성이 없는 5, 10, 50, 25 µg/mL의 농도로 4 h 전 처리하여 배양액을 씻어낸 후, hydrogen peroxide solution (H₂O₂; Sigma-Aldrich) 500 µM를 투여하여 24 h 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader (iMARK™)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. RAW 264.7 세포에서LPS에 대한 항염증 효과 측정

1) 세포배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였으며 세포는 10% FBS과 P/S를 첨가한 DMEM 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포 배양배지는 세포가 80% 이상 자란 시점에서 2-3 일마다 교환하였다.

2) 세포 생존율 측정

RAW 264.7 대식세포의 생존율 측정은 96 well plate의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 세포를 1×10⁵ cells/well의 농도가 되도록 조절하여 분주하여 24 h 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24 h 배양이 끝난 후 추출물을 최종 농

도 5-200 µg/mL가 되도록 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포에 공급하고 24 h 동안 배양하였다. 배양완료 후 well에 MTT 용액(5 mg/mL in phosphate buffered saline)을 10 µL씩 가해주고, 다시 37°C, 5% CO₂의 습윤 배양기에서 4 h 동안 반응하여 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide 150 µL로 잘 녹여서 Microplate Reader (iMARK™)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) RAW 264.7 세포에서 NO 저해 효과 측정

최근 자외선과 같은 외부 환경요인에 의해 과다 생성되어 과색소 생성 및 염증 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NO 생성(Bu & Lee, 2016)에 대한 더덕 추출물의 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고 더덕 열수 추출물과 에탄올 추출물을 세포 독성이 없는 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다.

9. 통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복하여 평균값으로 나타내었으며, 통계학적 유의성은 Student's *t*-test로 분석하였으며, *p* value가 0.05 미만일 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다(**p*<0.05, ***p*<0.01).

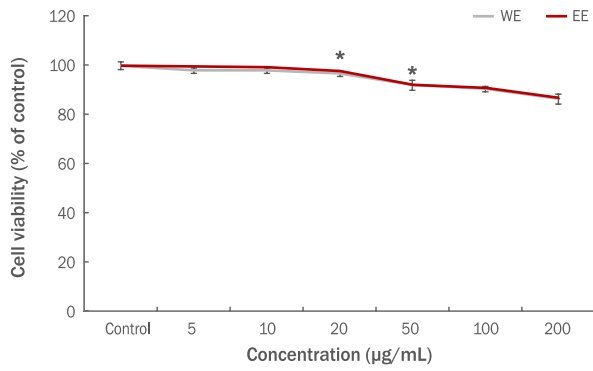


Figure 5. Effects of *C. lanceolata* skin extracts on the viability of RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with *C. lanceolata* skin extracts at varying concentrations (5, 10, 20, 50, 100, and 200 µg/mL) for 24 h. Values represent the mean standard deviation M±S.D. of three independent experiments. Statistically significant differences are indicated with an asterisk (**p*<0.05 compared with control). WE, water extracts; EE, 70% ethanol extracts; *C. lanceolata*, *Codonopsis lanceolata*.

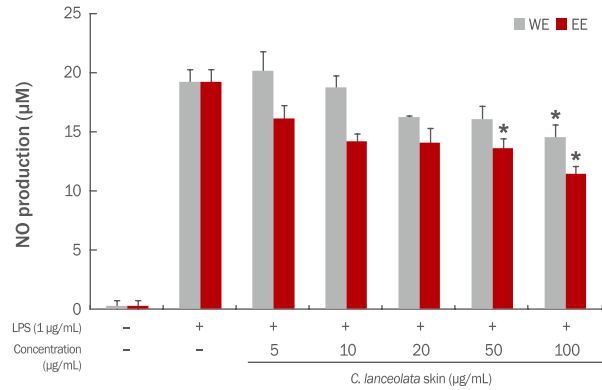


Figure 6. Effects of *C. lanceolata* skin extracts on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with varying concentrations of *C. lanceolata* skin extracts for 1 h, and then treated with or without LPS (1 µg/mL) for 24 h. NO concentration in the medium was determined using the Griess' assay. Results are represented as the mean standard deviation of three independent experiments. Statistically significant differences are indicated with asterisks (**p*<0.05, compared with controls). WE, water extracts; EE, 70% ethanol extracts; LPS, lipopolysaccharide; NO, nitric oxide; *C. lanceolata*, *Codonopsis lanceolata*.

Results and Discussion

1. DPPH radical 소거능

전자공여능 측정은 DPPH radical 소거 활성을 이용하여 측정하였다. DPPH는 비교적 안정한 free radical로써, ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 방법이다(Jin *et al.*, 2013). 더덕 껍질 열수, 에탄올 추출물을 농도 별(15.7–500 µg/mL)로 DPPH 용액에 첨가하여 free radical 소거 활성 능력을 측정할 결과, 열수 추출물은 12.6, 21.95, 34.55, 49.72, 69.91, 74.93%의 소거능이, 그리고 에탄올 추출물은 17.26, 27.75, 38.22, 59.14, 72.21, 85.25%의 소거능이 확인 되었다. 양성대조군으로 사용된 Vit C의 DPPH radical 소거능은 78.81, 89.84, 91.81, 92.29, 92.3, 92.5%로 확인되었고, BHT의 경우 2.08, 6.32, 28.36, 50.49, 68.31, 84.38%로 확인되었다(Figure 1). 더덕 껍질 에탄올 추출물은 Vit C 보다는 소거능이 낮지만 500 µg/mL의 농도에서는 BHT 보다 높은 소거능이 확인되었다.

2. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

폴리페놀계 물질들은 다양한 구조와 분자량을 가지며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl (OH) 기를 가진 benzene 화합물을 가리킨다. 이는 색소 화합물인 플라보노이드와 탄닌이 주성분으로 항산화, 항균, 항암, 충치예방 등의 생리기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Eun *et al.*, 2016). 본 실험에서는 더덕 껍질 추출물에 존재하는 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 tannic acid, naringin을 기준 물질로 하여 측정하였다. 더덕 껍질 열수, 에탄올 추출물 1 mg/mL 농도에서 총 폴리페놀 함량은 tannic acid 표준 곡선으로 하여 측정된 결과, 70.22±1.03, 75.27±1.23 µg/mL으로 나타났다(Table 1). Naringin을 표준 곡선으로 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 더덕 껍질 열수, 에탄올 추출물 1 mg/mL 농도에서 16.12±1.01, 22.65±1.13 µg/mL로 나타났다(Table 1). 이는 Kim *et al.* (2010a)의 연구 결과, 즉, 총 페놀화합물 함량은 24.65 µg/mL, 플라보노이드 함량은 6.19 µg/mL에서 보다 높은 함량을 보였다.

Table 1. Total phenolic and flavonoid contents of water and ethanol extracts from *C. lanceolata* shells

Component	WE	EE
Total phenolic	70.22±1.03 µg/mL	75.27±1.23 µg/mL
Total flavonoid	16.12±1.01 µg/mL	22.65±1.13 µg/mL

Values represent the M±S.D. of three independent experiments.

WE, water extraction; EE, 70% ethanol extraction; *C. lanceolata*, *Codonopsis lanceolata*; M±S.D., mean±standard deviation.

3. SOD 유사활성

SOD는 자유 라디칼을 근본적으로 제거하는 효소이고 다른 종류의 항산화제보다 우수한 효과를 나타내기 때문에 의약제제로서 많은 관심을 일으키고 있으며, 현재 항염증 제제나 피부 노화방지를 위한 미용제제로 화장품 등에 이용 되고 있다(Shin *et al.*, 2006). Superoxide (O_2^-)의 산화 억제작용을 알아보기 위하여 superoxide와 반응하여 갈변물질을 내는 pyrogallol의 자동산화 반응을 측정한 결과, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 열수 추출물의 경우 62.20% 유사활성을 나타내었고, 에탄올 추출물의 경우 69.93%의 유사활성을 나타내었다(Figure 2). 더덕 껍질의 열수 및 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 SOD 유사활성이 증가함을 볼 수 있고, 열수 추출물보다는 에탄올 추출물에서 더 효과적인 것을 확인할 수 있었다.

4. HaCaT 세포에서 더덕 껍질 추출물의 H_2O_2 에 대한 세포 보호 효과

1) 세포 생존율

MTT 방법으로 더덕 껍질 추출물이 사람각질형성세포에 대한 세포독성을 확인함으로써 실험에 사용될 시료의 농도범위를 결정하였다. 5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 다양한 농도로 처리하여 세포생존율을 확인한 결과, 시료의 처리 농도 의존적으로 세포 독성이 더 강해지는 것을 관찰하였으며, 다음 실험에 적용할 더덕 껍질 추출물의 농도는 생존율이 90% 이상(열수 추출물: 91.63%, 에탄올 추출물 90.8%)이 되는 100, 50, 20, 10, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 적용하였다(Figure 3). Kim *et al.* (2013)의 연구 결과에 따르면 더덕 추출물의 경우 인간 피부 섬유아세포 CCD-986sk에서 1,000 mg/mL 의 농도에서 10% 내외의 세포독성을 보여 더덕 추출물의 경우 세포독성이 높지 않은 것을 확인할 수 있었다.

2) 과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 세포 보호 효과

과산화물 음이온(superoxide anion), 과산화수소(H_2O_2), 수산화 라디칼(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$) 등과 같은 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산화적 스트레스를 유발한다. 반응성 산소종은 염증, 노화, 암 발생과 같은 다양한 병리학적 요인으로 알려져 있다(Jeong, 2017; Shin *et al.*, 2006). 더덕 껍질 추출물이 과산화수소로 유도된 HaCaT 세포의 보호 효과를 Figure 4에 나타내었다. 실험결과, 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 군에 비하여 약 49%의 생존율을 나타내었다. 더덕 껍질 열수 추출물 처리군의 세포생존율은 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 51.22, 55.32, 60.41, 71.41, 79.90%의 생존율이 확인 되었으며, 더덕 껍질 에탄올 추출물은 55.18, 59.21, 67.21, 74.12, 85.24%의 생존율이 확인 되었다. 위의 실험결과 더덕 껍질 추출물은 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의성 있는($p < 0.05$) 보호 효과를 보였으며, 특히 더덕

껍질 에탄올 추출물이 보호효과가 더 뛰어난 것으로 추측할 수 있다(Figure 4).

5. RAW 264.7 세포에서 LPS에 대한 항염증 효과

1) 세포 생존율

더덕 껍질 추출물이 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 다양한 농도로 처리하여 세포생존율을 확인한 결과, 시료의 처리 농도 의존적으로 세포 독성이 더 강해지는 것을 관찰하였으며, 다음 실험에 적용할 더덕 추출물의 농도는 생존율이 90% 이상(열수 추출물: 90.63%, 에탄올 추출물: 90.8%)이 되는 100, 50, 20, 10, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도를 적용하였다(Figure 5).

2) RAW 264.7 세포에서 NO 저해 효과 측정

산화질소(nitric oxide, NO)는 세포 사이의 작용을 매개하는 물질로 대식세포나 간세포에서 면역적인 자극에 의해 생성된다(Jang *et al.*, 2011). NO의 생성량은 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 LPS 자극으로 유도된 NO의 함량을 측정하는 것으로 세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 더덕 껍질 추출물을 처리하여 배양한 후, 세포 배양액에 Griess 시약을 반응시켜 확인하였다. 시료는 5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였으며, 대조군으로는 시료대신 PBS를 사용하여 LPS를 처리 한 control과 시료 및 LPS를 처리하지 않은 blank를 사용하였다. LPS를 처리한 control은 NO 생성량이 19.21 μM 로 높게 나타났으며, LPS를 처리하지 않은 blank는 NO의 생성량이 0.21 μM 로 상대적으로 매우 낮게 나타났다. LPS에 의해 염증 반응이 유도된 세포에 더덕 껍질 추출물을 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리한 결과, 열수 추출물에서는 농도별로 각각 20.14, 18.78, 16.25, 16.08, 14.57 μM 까지 NO 생성량이 감소하였고, 에탄올 추출물에서는 농도별로 각각 16.15, 14.18, 14.05, 13.58, 11.45 μM 까지 NO 생성량이 감소하였다. LPS에 의해 NO의 생성량이 19.21 μM 까지 증가된 것에 비해 더덕 껍질 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 11.45 μM 까지 감소된 것으로 보아, 더덕 껍질 에탄올 추출물이 유의성($p < 0.05$) 있는 NO 생성 억제 효과를 확인할 수 있었다(Figure 6).

Conclusion

본 연구에서는 더덕 껍질의 생리활성 물질 중 천연 기능성 화장품 소재로서의 사용 가능성에 대하여 확인하고자 하였다. 더덕 껍질 열수 그리고 에탄올 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거활성 및 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량, SOD 유사활성을 조

사하여 항산화 효과를 확인하고, HaCaT 세포에서 H₂O₂에 대한 세포 보호 효과를 측정하였다. 그리고 LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포를 통해 NO 생성 저해 효과를 알아보았다. 항산화 효과 측정 결과, DPPH 소거활성은 500 µg/mL에서 열수 추출물은 74.93%, 에탄올 추출물은 85.25%의 소거능이 확인 되었으며, 총 폴리페놀 함량은 각각 70.22, 75.27 µg/mL 이고, 총 플라보노이드 함량은 16.12, 22.65 µg/mL 의 함량이 확인 되었다. SOD 유사활성 측정 결과, 500 µg/mL에서 열수 추출물은 62.20, 에탄올 추출물은 69.93%의 활성능이 확인 되었다. HaCaT 세포에서 H₂O₂에 대한 세포 보호 효과 측정결과, 100 µg/mL 농도에서 각각 30, 36%의 보호 효과가 확인 되었다. LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포를 통해 NO 저해 효과 측정 결과, 100 µg/mL 농도에서 열수 및 에탄올 추출물의 NO 생성량은 각각 14.57, 11.45 µM 이었다. 이러한 결과, 더덕 껍질 에탄올 추출물이 열수 추출물보다 항산화 효과 및 세포 보호 효과 그리고 항염증 효과가 더 우수하였으며, 천연 기능성 화장품 소재로서의 가능성이 있다고 판단된다.

Acknowledgements

본 연구는 2017년도 남부대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

References

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200, 1958.

Bu HJ, Lee S. Antioxidation and anti-inflammation activity of *Isodon inflexus* (Thunb.) Kudo extract and its isolated substance. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 42: 257-268, 2016.

Eun CS, Hwang EY, Lee SO, Yang SA, Yu MH. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Barley sprout extract. *Journal of Life Science*, 26: 537-544, 2016.

Folin O, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry*, 22: 305-308, 1915.

Jang JR, Hwang SY, Lim SY. Inhibitory effect of extracts of *Platycodon grandiflorum* (the Ballon flower) on oxidation and nitric oxide production. *Korean Journal of Food Preservation*, 18: 65-71, 2011.

Jin KS, Oh YN, Lee JY, Son BY, Choi WB, Lee EE, Kwon HJ, Kim BW. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of seven medicinal herbs including *Tetrapanax papyriferus*

and *Piper longum* Linne. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 41: 253-262, 2013.

Kang HW. Antioxidant and anti-inflammatory effect of extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41: 1072-1078, 2012.

Kim KS, Ryu MJ. Physiological activity of the *Glycyrrhiza uralensis* extracts as a cosmetic product. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 15: 11-22, 2017.

Kim SJ, Jang TW, Kim DW, Park JH. Study on antioxidant and anti-inflammatory activities of *Persicaria tinctoria*. *The Korea Journal of Herbology*, 30: 17-24, 2015a.

Kim SG, Byun HD, Kim SC, Yang KW, Kim JH, Han JH. Antioxidative and anti-inflammatory activities of Carrot flower. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 30: 77-81, 2015b.

Kim ES, Jeong NH. Anti-inflammatory effect of germinated mung bean and hairdye applications. *Journal of the Korean Oil Chemists' Society*, 31: 23-30, 2014.

Kim CH, Chung MH. Pharmacognostical studies on *Codonopsis lanceolata*. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 6: 43-47, 1975.

Kim NY, Chae HS, Lee IS, Kim DS, Seo KT, Park SJ. Analysis of chemical composition and antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* skin. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39: 1627-1633, 2010a.

Kim JS, Kim JW, Kwon HS, Lim HW, Lee HY. Screening of skin whitening activity of *Codonopsis lanceolata* extract by complex steaming process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 21: 54-60, 2013.

Kim BH, Lee YT, Kang KH. *Codonopsis lanceolata* inhibits inflammation through regulation of MAPK in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*, 24: 80-84, 2010b.

Jeong SH. Anti-oxidant activities of phytol on keratinocytes. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 15: 457-465, 2017.

Lee JY, Yoo DH, Jo DH, Kim SR, Jo HS, Joo SH, Chae JW. Anti-inflammatory effects of *Amelanchier asiatica* fruits ethanol extract. *Journal Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 43: 19-26, 2017.

Lee SY, Kim JM, Oh HC, Im SJ, Hwang CY, Mun YJ, Woo WH. The effect of *Codonopsis lanceolata* on the melanogenesis.

Physiological Activity of the *Codonopsis lanceolata* Skin Extracts

- The Journal of Herbal Formula Science*, 10: 199-211, 2002.
- Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 40: 1361-1370, 2011.
- Maeng YS, Park HK. Antioxidant activity of ethanol extract from Dödök (*Codonopsis lanceolata*). *Korean Journal of Food Science and Technology*, 23: 311-316, 1991.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47: 469-474, 1974.
- Park GH, Lee JY, Kim DH, Cho YJ, An BJ. Anti-oxidant and antiinflammatory effects of *Rosa multiflora* Root. *Journal of Life Science*, 21: 1120-1126, 2011.
- Park MJ, Kang YH. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of various organ extracts from *Trichosanthes kirilowii* Maxim. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 47: 327-332, 2016.
- Park SJ, Park DS, Lee SB, He X, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. Enhancement of antioxidant activities of *Codonopsis lanceolata* and fermented *Codonopsis lanceolata* by ultra high pressure extraction. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39: 1898-1902, 2010.
- Suh JS. Effect of *Codonopsis lanceolatae* Radix water extract on immunocytes. *The Korean Journal Food and Nutrition*, 9: 379-384, 1996.
- Shin SH, Kim DS, Kim MJ, Kim SH, Jo SK, Byun MW, Yee ST. Protective effects of a herbal composition (HemoHIM) against apoptosis induced by oxidative stress of hydrogen peroxide. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 35: 1127-1132, 2006.

국문초록

더덕 껍질 추출물의 항산화 및 항염증 효과

정윤희, 유민정*

남부대학교 향장미용학과, 광주, 한국

목적: 더덕 껍질 추출물의 생리활성 및 화장품 소재로서의 가능성과 산업적 활용가치를 확인하고자 하였다. **방법:** 더덕 껍질 열수 그리고 에탄올 추출물을 이용하여 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성 및 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량, superoxide dismutase (SOD) 유사활성을 조사하여 항산화 효과를 확인하고, HaCaT 세포에서 H₂O₂에 대한 세포 보호 효과를 측정하였다. LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포를 통해 nitric oxide (NO) 생성 억제 효과를 Griess의 방법으로 조사하였다. **결과:** 항산화 효과 측정 결과, DPPH 소거활성은 500 µg/mL에서 열수 추출물은 74.93%, 에탄올 추출물은 85.25% 소거능이 확인되었으며, 열수 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 각각 70.22, 75.27 µg/mL 이고, 총 플라보노이드 함량은 16.12, 22.65 µg/mL로 확인되었다. SOD 유사활성 측정 결과, 500 µg/mL에서 열수 추출물은 62.20%, 에탄올 추출물은 69.93%의 활성이 확인되었다. HaCaT 세포에서 H₂O₂에 대한 세포 보호 효과 측정결과, 100 µg/mL 농도에서 열수 및 에탄올 추출물은 각각 30, 36%의 보호 효과가 확인되었다. Lipopolysaccharides (LPS)로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 세포를 통해 NO 저해 효과 측정 결과, 100 µg/mL 농도에서 열수 및 에탄올 추출물의 NO 생성량은 각각 14.57 µM, 11.45 µM로 감소하였다. **결론:** 더덕 껍질 에탄올 추출물은 열수 추출물보다 항산화 효과 및 세포 보호 효과 그리고 항염증 효과가 더 우수하였으며, 천연 기능성 화장품 소재로서의 가능성이 있다고 판단된다.

핵심어: 항산화, 항염증, 더덕, 화장품, 과산화수소

본 연구는 2017년도 남부대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

참고문헌

- 강현우. 팽이버섯 추출물의 항산화 및 항염증 활성. *한국식품영양과학회지*, 41: 1072-1078, 2012.
- 김계순, 유민정. 화장품 소재로서 감초 추출물의 생리활성. *아시아뷰티화장품학술지*, 15: 11-22, 2017.
- 김범희, 이용태, 강경화. LPS로 유도된 RAW264.7 염증모델에서 MAPK 조절에 의한 羊乳의 항염증효과. *동의생리병리학회지*, 24: 80-84, 2010.
- 김나영, 채현석, 이인숙, 김동수, 서강태, 박성진. 더덕 껍질의 일반성분 분석과 항산화 활성. *한국식품영양과학회지*, 39: 1627-1633, 2010.
- 김종현, 정명현. 더덕(沙蔘)의 생약학적 연구. *생약학회지*, 6: 43-47, 1975.
- 김지선, 김지웅, 권희석, 임혜원, 이현용. 복합 고온 전처리 더덕 추출물의 미백 활성 탐색. *한국약용작물학회지*, 21: 54-60, 2013.
- 김수정, 장태원, 김도완, 박재호. 쪽의 항산화 및 항염증 활성에 대한 연구. *대한분초학회지*, 11: 17-24, 2015.
- 김은석, 정노희. 발아 녹두 추출물의 항염증 효능 및 염모제 응용. *한국유화학회지*, 31: 23-30, 2014.
- 맹영선, 박혜경. 더덕 에탄올추출물의 항산화효과. *한국식품과학회지*, 23: 311-316, 1991.
- 박근혜, 이진영, 김동희, 조영제, 안봉진. 짙레나무뿌리(*Rosa multiflora* root)의 항산화 및 항염증효과. *생명과학회지*, 21: 1120-1126, 2011.
- 박미진, 강영화. 하늘타리(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.)의 부위별 추출물의 항산화 및 항염증 활성. *생약학회지*, 47: 327-332, 2016.

- 박성진, 박동식, 이수복, 허신용, 안주희, 윤원병, 이현용. 초고압 추출 처리에 의한 더덕 및 발효더덕의 항산화 증진. *한국식품영양과학회지*, 39: 1898-1902, 2010.
- 부희정, 이선주. 산박하 추출물과 분리물질의 항산화 및 항염증 활성. *대한화장품학회지*, 42: 257-268, 2016.
- 서정숙. 더덕(*Codonopsis lanceolatae* Radix) 추출물이 면역세포에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, 9: 379-384, 1996.
- 신성해, 김도순, 김미정, 김성호, 조성기, 변명우, 이성태. 과산화수소의 산화적 스트레스로 유도된 Apoptosis에 대한 생약복합조성물(HemoHIM)의 방호효과 평가. *한국식품영양과학회지*, 35: 1127-1132, 2006.
- 이승연, 김진만, 오현철, 임숙정, 황충연, 문연자, 우원홍. 더덕추출물이 멜라닌생성에 미치는 영향. *대한한의약방제학회지*, 10: 199-211, 2002.
- 이진영, 유단희, 주다혜, 김소라, 조희선, 주성현, 채정우, 채진목. 에탄올 추출물의 항염증 효과 검증. *대한화장품학회지*, 43: 19-26, 2017.
- 임현희, 김은옥, 서미자, 최상원. 정향(*Eugenia caryophyllata* Thunb.) Eugenol 및 그 유도체의 항산화 및 항염증활성. *한국식품영양과학회지*, 40: 1361-1370, 2011.
- 은청수, 황은영, 이승욱, 양선아, 유미희. 보리싹 추출물의 항산화 및 항염증 활성. *생명과학회지*, 26: 537-544, 2016.
- 장주리, 황성연, 임선영. 도라지 부탄올 추출물의 항산화 및 nitric oxide 생성 저해 효과. *한국식품저장유통학회지*, 18: 65-71, 2011.
- 정선희. 인간각질형성세포에서 Phytol의 항산화 효능. *아시아뷰티화장품학술지*, 15: 457-465, 2017.
- 진경숙, 오유나, 이지영, 손병일, 최우봉, 이은우, 권현주, 김병우. 통초, 필발을 포함한 7종 한약재 추출물의 항산화 및 항염증 활성. *한국미생물·생명공학회지*, 41: 253-262, 2013.

中文摘要

沙参皮提取物的抗氧化和抗炎作用

鄭允熙, 柳敏貞*

南部大学香妆美容学科, 光州, 韩国

目的: 调查沙参皮提取物的生理活性, 作为化妆品原料的可行性以及产业应用价值。 **方法:** 利用沙参皮热水和乙醇提取物测定2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)自由基消除活性, 总多酚和类黄酮含量, 以及以调查superoxide dismutase (SOD)活性来确认抗氧化作用, 对HaCaT细胞的细胞保护作用。通过Griess方法检测由LPS诱导的RAW 264.7细胞对nitric oxide (NO)产生的抑制。 **结果:** 抗氧化测定结果, 在提取物浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 热水和乙醇提取物的DPPH清除活性分别为74.93%, 85.25%; 热水和乙醇提取物的总多酚含量分别为70.22和75.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 总类黄酮含量分别为16.12, 22.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。SOD样活性测量结果, 在浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 热水提取物和乙醇提取物的活性能分别检测到62.20%和69.93%。在提取物浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 热水和乙醇提取物对过氧化氢处理的HaCaT角质形成细胞的保护作用分别为30%和36%。通过lipopolysaccharides (LPS)诱导炎症反应的RAW 264.7 细胞, 测定NO抑制效果结果显示, 在浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 热水和乙醇提取物的NO生成量降低为14.57 μM , 11.45 μM 。 **结论:** 沙参皮乙醇提取物比热水提取物具有更高的抗氧化, 细胞保护和抗炎作用, 并且作为天然功能性化妆品原料充分具有可行性。

关键词: 抗氧化, 抗炎, 沙参, 化妆品, 过氧化氢

