

오렴매 뿌리 추출물의 항산화, 항염 및 수렴 효과

위장미¹, 이지안^{2*}

¹서경대학교 일반대학원 미용예술학과, ²서경대학교 미용예술대학 뷰티테라피&메이크업학과

Anti-oxidant, anti-inflammatory, and astringent effects from *Cayratia japonica* root extract

Guangui Wei¹, Ji-An Lee^{2*}

¹Division of Beauty Art, Graduate Seokyeong University

²Division of Beauty Therapy & Make-up, College of Beauty Art, Seokyeong University

요약 본 연구는 오렴매 뿌리를 대상으로 60°C 열수(CJW)와 80% 메탄올(CJM) 두 가지 용매를 이용하여 추출물을 획득하고, 각 추출물의 항산화, 항염 및 수렴 활성을 평가하여 천연식물 유래의 화장품 원료로서의 적용 가능성을 규명하고자 하였다. 두 추출물의 총폴리페놀 함량은 CJW 29.88±5.87 mgGAE/g, CJM 32.21±4.81 mgGAE/g으로 확인되었다. DPPH 전자공여능과 ABTS 라디칼 소거능 결과 모든 추출물은 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였다. 오렴매 메탄올 추출물은 RAW264.7 세포를 LPS로 처리하여 염증을 유도한 후 증가된 NO 생성을 억제시켰으며, 추출물 농도 0.2 mg/mL 이상에서 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았다. 또한 LPS로 처리된 RAW264.7 세포 배양액에서 TNF- α , IL-6 및 PGE₂와 같은 염증 매개물질의 분비와 iNOS 또는 COX-2와 같은 염증 유전자의 단백질 발현 수준은 추출물 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 게다가 오렴매 메탄올 추출물의 수렴 활성은 추출물 농도 1 mg/mL 조건에서 56.9%로 우수하였다. 따라서 80% 메탄올 용매 추출 조건에서 획득한 오렴매 뿌리 메탄올 추출물(CJM)의 항산화 활성, 항염 및 수렴활성이 열수 추출물보다 우수한 것으로 확인되어 천연 화장품 원료로 이용될 수 있다는 가능성을 제시한다.

Abstract This study investigated the anti-oxidant, anti-inflammatory, and astringent activities of *Cayratia japonica* root extracts produced using 60°C hot water (CJW) and 80% methanol (CJM) to evaluate its potential as a natural cosmetic ingredient. The total polyphenolic content of CJW and CJM was 29.88±5.87 mgGAE (gallic acid equivalents)/g, and 32.21±4.81 mgGAE/g, respectively. All extracts showed dose-dependent 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) electron-donating and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activities. The CJM displayed a strong inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells. Extracts of up to 0.2 mg/mL concentration did not reduce the viability of RAW264.7 cells. The expression levels of inflammatory mediators (tumor necrosis factor α [TNF- α], interleukin 6 [IL-6], and prostaglandin E₂ [PGE₂]) in cell culture medium were observed to decrease with an increase in the concentration of the extracts. Furthermore, the gene expression of inflammatory genes, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were reduced when observed using the western blot assay. In addition, the CJM showed 56.9% astringent activity at a 1 mg/mL concentration. The CJM showed the best anti-oxidant, anti-inflammatory, and astringent effects. The study shows that the CJM can be used as a good source of natural anti-oxidant, an alternative anti-inflammatory agent, and as a source for cosmetic facial pore contraction.

Keywords : *Cayratia japonica*, Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Astringent, Anti-aging

*Corresponding Author : Ji-An Lee(Seokyeong Univ.)

email: jianlee@skuniv.ac.kr

Received September 7, 2022

Accepted December 7, 2022

Revised November 10, 2022

Published December 31, 2022

1. 서론

활성산소(ROS: Reactive Oxygen Species, 이하 ROS)는 산화적 스트레스(oxidative stress)의 주된 원인 중 하나이며, 이는 세포 내 지방(lipid), 유전자(DNA), 단백질(protein)과 작용하여 피부 노화를 촉진시키는 주된 요인으로 작용한다. 항산화제는 스스로 혹은 다른 분자를 대신 해서 산화되는 물질로 생명유지에 필수적인 분자들이 산화되어 유해한 물질로 되는 것을 방지한다. 화장품뿐만 아니라 식품, 음료, 의약품과 사료 산업 등 다양한 분야에서 사용되는 항산화제는 크게 합성 항산화제와 천연 항산화제로 나뉜다. 그러나 butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) 등 과 같은 합성 산화제는 제조원가가 저렴하여 폭넓게 사용되는 반면, 과다 사용 시 부작용을 초래한다 [1]. 따라서 최근 무첨가 및 합성 원료보다 부작용이 적은 유기농과 천연 제품에 대한 소비자들의 구매 선호도가 꾸준히 증가하는 화장품 시장의 소비 경향은 비록 현재 여전히 화장품 시장에서 합성 항산화제 사용이 우위를 차지하고 있지만, 향후 천연 항산화제의 사용 비중이 더욱 높아질 것으로 전망된다. 최근 천연 항산화제는 피부 내 산화 스트레스를 줄이거나 산화적 분해(oxidative degradation)를 방지할 수 있는 다양한 천연원료인 곡물, 과일, 채소, 버섯, 꽃, 향신료, 허브식물 등과 같은 자연 식물로부터 유래한다[2-4].

오렴매(*Cayratia japonica*, 烏薺每)는 포도나무과 거지덩굴속의 여러해살이 덩굴식물로 일본, 중국 남부, 인도차이나 등 동남아시아가 원산지로, 다른 나무와 풀을 감으며 타고 올라가는 특성이 있어 주변식물의 빛을 차단시킴으로써 고사시킬 뿐만 아니라 뿌리를 통한 강한 번식력으로 빠르게 주변 식생을 파괴시키며 큰 면적을 차지한다. 또한 미국 남부 열대지역에서는 침입종(invasive species)으로 분류되어 산불 발생 시 오렴매의 줄기(canopy)가 “사다리” 역할을 하여 더 큰 피해로 숲을 죽인다는 부쉬킬러(bushkiller)로 환경을 파괴하는 문제 식물로 인식되고 있다.

그러나 오렴매의 지상부와 뿌리는 중국, 말레이시아, 태국을 포함한 동양 여러 나라의 민간 처방에서 붓기 제거, 해열, 이뇨 및 해독, 바이러스 감염, 암 등의 치료에 사용되어져 왔다[5-8]. 또한 진보라색의 숙성한 열매 껍질에는 Cayratinin과 같은 안토시아닌 성분이 함유되어 있으며[9], 지상부의 에센셜 오일은 항바이러스, 항박테리아, 천연 살충제, 항비만 등의 효능에 대한 연구가 보

고 되고 있다[10-14].

따라서 본 연구에서는 오렴매 뿌리를 대상으로 열수(60°C)와 80% 메탄올을 선택하여 용매별 추출물을 제조한 후, 각 추출물에 의한 항산화(DPPH 전자공여능, ABTS 라디칼 소거능, 총 폴리페놀 함량), 세포독성과 항염(NO 생성 저해 활성, 염증성 싸이토카인 분비) 및 수렴 효능을 조사하여 화장품 원료로서 가능성을 비교 평가하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 재료 및 추출물 제조

본 연구에 사용한 오렴매 뿌리는 2019년 8월 중국(사천성)에서 구매하여 사용하였다. 오렴매 뿌리 부분을 세척한 후 45°C에서 음건하였고, 분쇄기(KSP-25, KOREAMED Co., LTD)를 이용하여 추출용 시료로 준비하였다. 분쇄한 시료(163.5 g)에 각각 증류수(60°C)와 80% 메탄올을 가하여 15시간 총 3회 반복 추출하였다. 각 추출액은 filter paper (Whatman No. 1, Maidstone, England)로 여과한 후, 감압농축(EYELA evaporator)하고, 농축된 추출물은 동결건조(FD-8512, Ilshin Engineering Co., Korea)하여 일정량의 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

2.2 항산화 효능 측정

2.2.1 DPPH 전자공여능 측정

오렴매 뿌리 추출물의 DPPH 전자공여능은 Blois의 방법으로 측정하였다[15]. 안정한 라디칼 화합물인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, MO, USA)는 메탄올에 용해되었을 때, 517 nm에서 최대 흡광도를 나타내며 추출물의 환원력에 의해 DPPH 라디칼이 감소하는 정도를 흡광도로 측정하는 가장 보편적인 항산화 활성 시험법이다. DPPH (0.2 mM)와 농도별로 희석한 시료를 1:1 (v/v)로 혼합하여 30분 동안 상온에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.2 ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 소거 활성은 Re 등의 방법을 변형하여 실험하였다[16]. ABTS (7 mM)와 potassium persulfate (2.45 mM)를 증류수에 용해하여 12~16시간 동안

암소에서 방지하여 ABTS cation radical (ABTS⁺)을 형성시킨 후, 이 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.75 ± 0.002 가 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 ABTS⁺ 용액 180 μ l와 농도별로 희석한 시료 20 μ l를 혼합하여 30분 동안 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.3 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법으로 측정하였다 [17]. 농도별로 희석한 시료와 Folin-ciocalteu's phenol reagent를 1:1 (v/v)로 혼합한 후 실온에서 방지하였다. 5분 후 시료와 동일한 양의 10% Na₂CO₃를 첨가하여 암실에서 1시간 방치한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 총 폴리페놀화합물은 gallic acid (Sigma, MO, USA)를 표준물질로 이용하여 작성한 표준검량곡선으로부터 함량을 구하였다.

2.3 추출물의 세포 안전성 측정

2.3.1 세포주 및 배양

본 연구에서 세포를 이용한 실험은 사람의 피부 섬유아세포(NHDF: Normal Human Dermal Fibroblast, 이하 NHDF)와 쥐의 대식세포주(RAW264.7: Murine Macrophage Cell)를 대상으로 수행하였다.

모든 세포는 10% FBS (Fetal Bovine Serum)와 1% antibiotic-antimycotic (100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml amphotericin B)가 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)으로 37°C, 5% CO₂ 분압 하에서 배양하였다.

2.3.2 세포 생존율 측정

오렴매 뿌리 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. 세포(5×10^4 cells/well)를 96 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 새로운 배지로 교체하고 각 추출물을 농도별로 18시간 처리하였다. 0.5 mg/ml의 MTT 시약을 첨가하고, 4시간 동안 추가 배양한 세포의 배양액을 제거한 후 DMSO로 비수용성의 formazan을 녹여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[18].

2.4 항염 효능 측정

2.4.1 NO 생성 저해 활성 측정

오렴매 뿌리 추출물의 LPS (Lipopolysaccharide) 함

성에 의한 NO 생성량 저해 활성을 평가하기 위해 Griess assay를 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포 (1×10^5 cells/well)를 24 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 새로운 배지로 교체하고 각 추출물을 농도별로 18시간 처리하였다. 세포 배양액으로 분비된 NO 함량을 Griess 시약과 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 sodium nitrate를 표준물질로 사용하여 표준검량곡선을 작성한 후 정량하였다[19].

2.4.2 염증성 사이토카인 분비량 측정

오렴매 뿌리 추출물이 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포에서 분비되는 TNF- α 및 IL-6 생성량에 미치는 영향을 조사하기 위해 RAW264.7 세포(1×10^5 cells/well)를 24 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 새로운 배지로 교체하고 각 추출물을 농도별로 18시간 처리하였다. 세포 배양액을 희석하여 제조한 시료를 대상으로 ELISA kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다[20].

2.4.3 염증 조절 유전자 iNOS 및 COX-2의 단백질 수준 측정

각 추출물이 LPS 유도에 의한 세포 내 염증 조절 관련 유전자 iNOS와 COX-2 단백질 수준에 미치는 영향을 확인하고자 RAW264.7 세포(1×10^6 cells/dish)를 60 mm-dish 에 분주하여 24시간 배양한 후 새로운 배지로 교체하고 각 추출물을 농도별로 처리하였다. 24시간 후 세포를 차가운 PBS (Phosphate buffered saline)로 3회 세척하고 lysis buffer를 넣어 4°C에서 30분간 반응시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액 내 단백질을 Bradford protein assay로 정량하여 SDS-PAGE에 전기영동한 후, PVDF membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 5% BSA blocking buffer로 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 차단하고, 1차 항체(anti-iNOS, anti-COX-2, anti- β -actin)를 4°C에서 overnight 반응시켰다. 0.1% Tween20을 함유한 TBS washing buffer로 membrane을 30분간 세척한 다음, 2차 항체로 반응시켰다. ECL system을 이용하여 X-ray film 상에서 단백질을 확인하였다[21].

2.5 수렴 효능 측정

오렴매 두 가지 용매 추출물의 수렴 활성은 각 추출물

을 농도별로 희석하여 제조한 시료에 PBS로 녹인 혈액단백질(bovine blood hemoglobin)을 1:1 (v/v)로 혼합하여 5분간 진탕혼합한 후 2,500 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 이 후 상등액 200 μ l 를 취하여 470 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다[22].

2.6 통계처리

본 실험의 모든 결과는 3회 반복 수행하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 처리 농도간의 차이의 유무를 검증하기 위해 일원분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 추출 수율

오렴매 뿌리 건조 시료 (163.5 g)를 대상으로 60 $^{\circ}$ C 증류수(*C. japonica* water extract, CJW)와 80% 메탄올(*C. japonica* methanol extract, CJM) 두 가지용매로 추출한 후, 동결건조 후 획득된 최종 건조 중량은 각각 CJW 17.93 g, CJM 15.60 g으로 확인되었다. 이 때 각 시료의 추출 수율은 추출 전 시료의 중량에 대한 각 추출물의 동결건조 후 시료의 중량을 백분율(%)로 환산한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 CJW는 10.996%, CJM은 9.543%로 나타났다.

Table 1. The extraction yield and anti-oxidant properties of *C. japonica* root extracts.

Sample	Yield(%)	DPPH IC ₅₀ (μ g/ml)	ABTS IC ₅₀ (μ g/ml)
CJW	10.966	29.706 \pm 2.634	151.202 \pm 2.474
CJM	9.543	21.397 \pm 1.066	104.662 \pm 9.991

3.2 항산화 활성

3.2.1 DPPH 전자공여능

DPPH 라디칼 화합물 (DPPH)은 메탄올에 용해되어 안정한 분자로 진보라색을 띠며 517 nm 파장에서 최대 흡광도를 갖는다. 시료 내 항산화 물질로부터 공여 받은 전자나 수소 원자에 의해 환원되면 노란색으로 변색되는 원리로 항산화능 측정에 보편적으로 사용되는 분석법 중 하나이다[23]. 오렴매 뿌리 열수(CJW) 및 80% 메탄올 추출물(CJM)의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 1에서 보

는 바와 같이 CJW와 CJM의 농도 증가에 따른 전자공여능이 증가하였다. DPPH IC₅₀ 값이 ascorbic acid의 경우 8.053 \pm 0.375 μ g/ml일 때, CJW는 29.706 \pm 2.634 μ g/ml, CJM은 21.397 \pm 1.066 μ g/ml로 나타나 메탄올 추출물의 DPPH 전자공여능이 우수함을 확인하였다. 이는 오렴매의 과피[9], 잎[24], 전초(whole plants) 및 열매[28] 등을 소재로 각 추출물의 항산화 효능을 보고한 선행 연구들과 더불어 본 연구에서 사용된 오렴매 뿌리 추출물이 천연 항산화제로서 가능성이 있음을 시사한다.

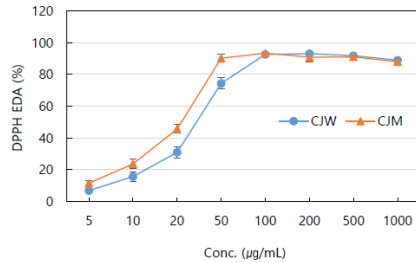


Fig. 1. Effects of *C. japonica* root extracts on DPPH electron donating ability.

3.2.2 ABTS 라디칼 소거능

ABTS는 강력한 산화제인 potassium persulfate와의 반응으로 생성된 ABTS 양이온 라디칼이 시료 내 항산화 물질에 의해 제거되면 특유의 청록색이 탈색되는 원리를 이용한 방법이다[25]. 오렴매 뿌리 추출물 CJW와 CJM의 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 모든 추출물 농도 의존적으로 라디칼 소거 활성이 증가하였다. 또한 CJW와 CJM의 ABTS IC₅₀ 값이 각각 151.202 \pm 2.474 μ g/ml, 104.662 \pm 9.991 μ g/ml로 나타났으며, 이는 표준물질 ascorbic acid (35.941 \pm 2.379 μ g/ml)와 비교했을 때 약 2.9배 차이로 항산화 활성이 매우 우수함을 확인하였다.

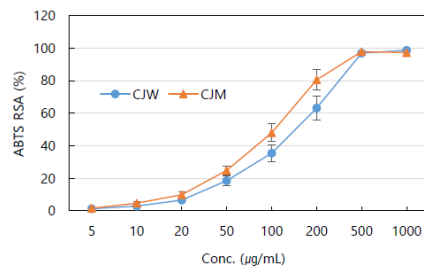


Fig. 2. Effects of *C. japonica* root extracts on ABTS radical scavenging ability.

3.2.3 총 폴리페놀 함량

폴리페놀의 주요 효능은 유전자를 손상시키는 활성산소를 제거하여 세포사와 암세포 발생을 억제하며 대표적으로 녹차에 함유되어 있는 카테킨류(catechins), 커피에 들어 있는 클로로젠산, 딸기나 가지, 포도, 검은 콩, 팥 따위 붉은 색이나 자색의 안토시아닌계 색소 등은 모두 폴리페놀 화합물이다[26,27]. 오렴매 뿌리 2종 추출물 시료 내 폴리페놀이 Foline-ciocalteu reagent를 환원시켜 청색으로 변색되는 정도를 표준물질인 gallic acid 양으로 산출한 결과, CJW는 29.88 ± 5.87 mgGAE/g, CJM은 32.21 ± 4.81 mgGAE/g으로 80% 메탄올 추출물 내 총 폴리페놀 함량이 더 높았다. 이는 사포닌과 같은 당 성분보다 메탄올과 같은 유기 용매에 의해 용해가 더 잘되는 활성성분이 오렴매 뿌리 crude extract 내에 존재함으로 나타나는 결과로 추후 뿌리 메탄올 추출물을 대상으로 성분분석을 통한 심층연구가 이루어져야 한다고 사료된다. 따라서 메탄올 용매를 이용한 추출물에서 7가지 플라보노이드 성분을 포함한 오렴매 열매뿐만 아니라[28], 오렴매 뿌리 부위도 천연 항산화제로서의 활용 가치가 있다고 판단된다.

3.3 항염 활성

3.3.1 오렴매 추출물의 세포 독성

오렴매 뿌리 2종 추출물이 사람의 피부 섬유아세포(NHDF)와 쥐 대식세포(RAW264.7)에 미치는 세포 독성을 평가하고자 MTT assay를 수행하였다. 먼저 화장품 원료로서 추출물의 피부에 대한 독성을 세포 수준에서 확인한 결과 Fig. 3a에서 보는 바와 같이 각 시료 농도(0.02 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.5 mg/ml)에 따른 세포독성은 CJW의 경우 98.8%, 96.1%, 95.1%, 92.9%, 90.1%로, CJM은 103.5%, 103.5%, 94.9%, 87.3%, 85.1%로 나타났으며 통계학적으로 유의하지 않았다.

또한 추출물의 항염 효능 평가를 위한 선행 단계로 쥐 대식세포에 각 추출물의 독성이 없는 시료 농도 조건을 조사한 결과 Fig. 3b에서 보는 바와 같이 시료 농도(0.02 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.5 mg/ml)에 따른 세포독성은 CJW의 경우 97.4%, 96.5%, 95.7%, 93.6%, 90.5%로 나타났으며, CJM은 111.9%, 110.7%, 102.8%, 102.7%, 100.0%로 확인되어 세포를 이용한 실험에서 추출물 처리는 0.02 mg/ml~0.2 mg/ml 조건으로 진행하였다.

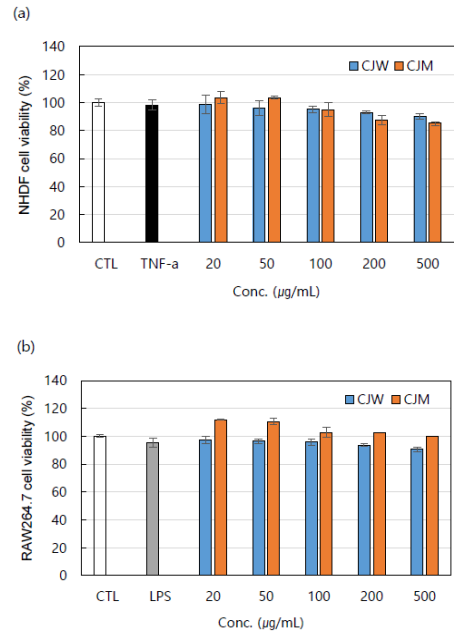


Fig. 3. Effects of *C. japonica* root extracts on NHDF (a) and RAW264.7 (b) cell viability. Cells were treated with indicated concentration of extracts for 18 h and the cell viability was analyzed by MTT assay.

3.3.2 NO와 pro-inflammatory cytokine 생성 및 iNOS 단백질 발현 저해

오렴매 뿌리 추출물 CJW와 CJM이 LPS로 처리한 RAW264.7 세포에서 증가된 NO를 저해시키는지 조사하고자 각 시료를 농도(0.02 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml)별로 처리한 후 Griess reagent assay를 수행하였다. 그 결과 Fig. 4a에서 보는 바와 같이 LPS에 의해 증가된 NO 생성량이 $41.7 \mu\text{M}$ 일 때, CJW와 CJM 모두 추출물 농도 의존적으로 감소되었으며 최고 농도 0.2 mg/ml에서 CJW는 $25.4 \mu\text{M}$, CJM은 $17.7 \mu\text{M}$ 로 확인되었다. 또한 RAW264.7 세포를 대상으로 LPS에 의해 유도된 염증 반응 시 증가된 pro-inflammatory cytokine 분비에 오렴매 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA analysis를 수행하였다. 그 결과 LPS 처리 후 TNF- α 의 생성량이 73.1 ng/ml 일 때 추출물 최고농도 0.2 mg/ml에서 CJW의 경우 131.51 ng/ml , CJM은 61.50 ng/ml 로 확인되었으며, 이와 마찬가지로 LPS 처리에 따른 IL-6 분비량(1.78 ng/ml)은 동일한 추출물 농도 조건하에서 CJW는 0.11 ng/ml , CJM은 0.01 ng/ml 로 현저하게 감소하였다.

NO는 중요한 세포 신호 분자로 eNOS (endothelial

NOS), nNOS (neuronal NOS), iNOS (inducible NOS) 3가지 형태의 효소에 의해 생성되며, 이 중 iNOS는 특히 면역반응에 관여한다. LPS로 유도된 염증 세포 모델에서 오름매 추출물에 의한 NO량 감소는 iNOS에 의한 결과임을 western blot analysis를 통해 확인하였다. 이러한 결과는 동일한 거지덩굴 속(Cayratia genus) *C. albifolia*의 뿌리를 열수로 추출한 후 항염 효능을 C57BL/6 마우스 모델에서 확인한 Luo 등의 선행연구에 대한 분자생물학적 근거로서 맥을 같이한다[29].

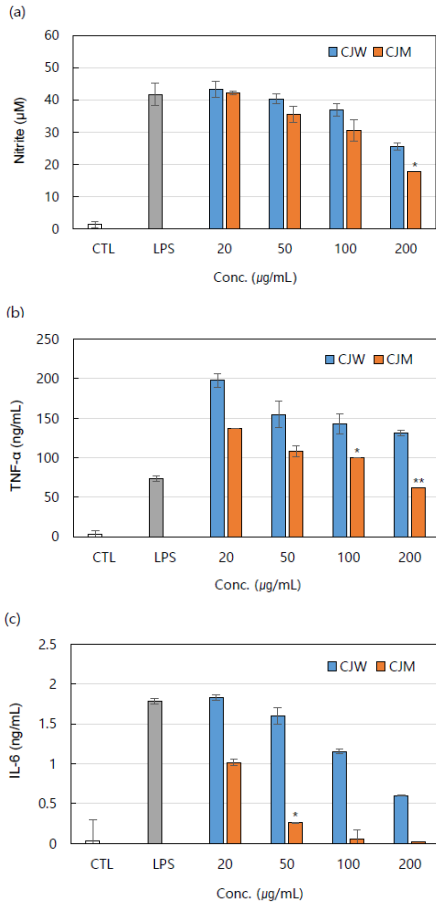


Fig. 4. Effects of *C. japonica* root extracts on production of NO and pro-inflammatory cytokines in LPS-treated RAW264.7 cells. (a) The NO production in supernatant was determined by the Griess reagent. (b and c) Cells were treated with the indicated concentration of extracts for 18 h and supernatants were collected for TNF- α and IL-6 assay. Statistical differences are presented * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.3.3 COX-2 발현 및 PGE₂ 생성 억제

염증 반응 물질 PGE₂ (prostaglandin E₂)는 여러 종류의 세포로부터 COX (cyclooxygenase)라는 효소에 의해 생성되며, COX는 두 가지 동질효소가 존재한다. COX-1은 대부분 정상 조직에서 발현되어 조직 보호 등과 같은 일상적인 역할을 하는 반면, COX-2는 LPS와 같은 자극에 의해 합성되어 다량의 PGE₂를 생성함으로써 염증관련 질병을 유발하는 것으로 밝혀져 있다 [30,31]. 오름매 뿌리 추출물이 COX-2 발현과 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 LPS에 의해 증가된 COX-2 단백질 발현 수준을 western blot 분석법으로 확인한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 오름매 뿌리 두 추출물 농도에 비례하여 감소하였으며, 특히 메탄올 추출물의 억제 효능이 높은 것으로 나타났다. 또한 ELISA 분석방법을 통해 LPS 처리 후 증가한 PGE₂ 분비량(8.81 pg/ml)이 각 추출물 농도 증가에 따라 열수추출물은 8.61 pg/ml, 6.11 pg/ml, 2.78 pg/ml, 1.12 pg/ml로, 메탄올추출물은 7.40 pg/ml, 3.24 pg/ml, 1.45 pg/ml, 0.6 pg/ml로 감소하였으며, 이는 western blot analysis 결과를 통해 COX-2 유전자의 단백질 발현 수준 억제에 의한 것임을 확인하였다.

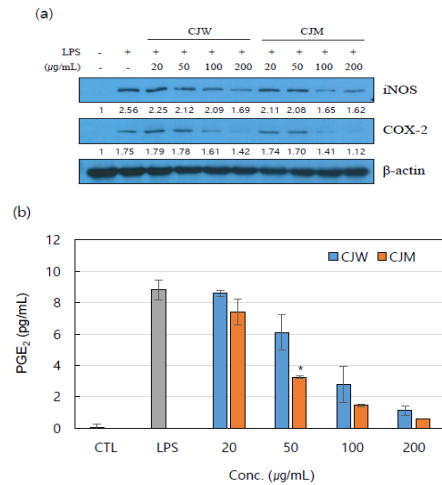


Fig. 5. Effects of *C. japonica* root extracts on expression and secretion of inflammatory mediators in LPS-treated RAW264.7 cells (a) Cells were cultured with indicated concentration of extracts for 18 h and level of iNOS or COX-2 was determined by Western blotting. The bands intensity was measured using Image J. (b) Cells were treated with the indicated concentration of extracts for 18 h and supernatants were collected for PGE₂ assay. Statistical differences are presented * $p < 0.05$.

3.4 수렴 활성

피부 미용에서 수렴 원리는 피부 단백질이 고분자 flavonoids와 결합하여 가교결합을 형성함으로써 피부가 수축되는 현상으로, 모공수축 및 피지 제거 기능을 통한 피부정화에 대한 효과를 나타낸다[32]. 오렴매 뿌리 2종 추출물의 수렴 활성은 혈액단백질(hemoglobin)과 결합하여 침강되는 정도를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 양성 대조군 TA (tannic acid, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 수렴활성이 92.46 \pm 2.09%일 때, CJW와 CJM은 각각 28.19 \pm 8.22%, 56.98 \pm 1.26%로 나타났다. 특히 표준물질로 사용된 TA가 단일물질임을 감안할 때 오렴매 메탄추출물은 수렴 기능 화장품으로서의 가능성이 기대된다.

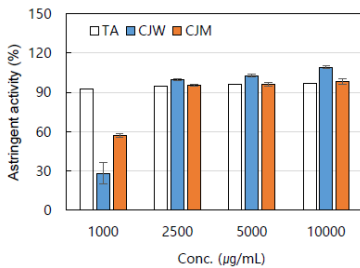


Fig. 6. Effects of *C. japonica* root extracts on astringent activity. *In vitro* astringency of the extract was evaluated using hemoglobin precipitation technique.

4. 결론

본 연구는 동남아시아에서 전통 약용식물로 사용되어 온 오렴매 뿌리를 소재로 추출물을 획득하고 이를 대상으로 항산화, 항염 및 수렴 효능을 비교 평가하여 화장품 원료로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 건조된 오렴매 뿌리를 대상으로 각각 60 $^{\circ}\text{C}$ 증류수와 80% 메탄을 두 가지 용매를 선택하여 추출한 결과 최종 추출 수율은 CJW의 경우 10.996%, CJM은 9.543%로 확인되었다.

두 추출물의 항산화 효능을 조사하기 위해 수행한 DPPH 전자공여능에서 모든 추출물의 농도에 비례하여 전자공여능이 증가하였으며 표준물질 ascorbic acid의 DPPH IC₅₀ 값이 8.053 \pm 0.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때, CJW가 29.706 \pm 2.634 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CJM이 21.397 \pm 1.066 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. ABTS 라디칼 소거능 결과 두 종류의 추출물 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가하였으며, 표준물

질 ascorbic acid의 ABTS IC₅₀ 값이 35.941 \pm 2.379 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때, CJW와 CJM은 각각 151.202 \pm 2.474 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 104.662 \pm 9.991 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타나 60 $^{\circ}\text{C}$ 열수추출물보다 80% 메탄을 추출물의 항산화능이 높음을 확인하였다. 또한 총 폴리페놀 함량 측정결과 CJW는 29.88 \pm 5.87 mgGAE/g, CJM은 32.21 \pm 4.81 mgGAE/g으로 나타나 DPPH 전자공여능 및 ABTS 라디칼 소거능 결과와 마찬가지로 80% 메탄을 용매 추출물의 총 폴리페놀 함량이 우수함을 확인하였다.

화장품 원료로서 피부 안전성을 세포 수준에서 평가하고자 이용한 사람의 피부세포(NHDF)와 항염 효능 평가를 위해 추출물 농도에 따른 독성을 쥐 대식세포주로 확인하여 세포 독성이 없는 추출물 농도(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 범위를 확인하고 추후 세포를 이용한 모든 실험에 사용하였다.

오렴매 뿌리의 열수 또는 메탄을 용매별 추출물에 따른 항염 효능은 쥐 대식세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도하여 수행하였으며, 그 결과 메탄을 추출물은 iNOS 단백질 발현 수준 저해를 통한 NO 생성을 감소시켰으며, TNF- α 및 IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine 분비는 0.2 mg/mL 농도에서 LPS 처리군과 비교하여 각각 1.18배, 16.18배로 억제되었다. 또한 COX-2 단백질 발현과 PGE₂ 분비를 줄여 LPS에 의한 염증 반응을 억제하였다.

마지막으로 수렴 효능을 확인한 결과 동일 농도 조건 하에서 CJM은 56.98 \pm 1.26%, CJW는 28.19 \pm 8.22%로 나타나 표준물질인 tannic acid (92.46 \pm 2.09%)와 비교하여 수렴 기능의 화장품 성분으로서 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다.

References

- [1] H. T. Hoang, J-Y Moon, Y-C Lee, Natural antioxidants from plant extracts in skin care cosmetics: recent applications, challenges and perspectives, *Cosmetics*, Vol.8, No.14, pp106-130, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040106>
- [2] S. C. Lourenço, M. Moldão-Martins, V. D. Alves, Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications, *Molecules*, Vol.249, No.22, pp.4132-4157, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>
- [3] Y. H. Ahn, M. J. Gwon, H. J. Lee, S. H. Choi, S. C. Kwon, Antibacterial and antioxidant activity of rose extract according to the extraction method, *Journal*

- of the Korean Academia-industrial cooperation Society, Vol.23, No.4, pp.440-449, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2022.23.4.440>
- [4] S. R. Lim, Ji An Lee, Antioxidant activity and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Allium schoenoprasum*, *Journal of Convergence for Information Technology*, Vol.10, No.7, pp232-239, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.22156/CS4SMB.2020.10.07.232>
- [5] Jiangsu New Medical College.(1977). Dictionary of Chinese Herbal Medicine, Shanghai Science & Technology Press, Shanghai China, pp.472-474.
- [6] J. Gong, J. Zhang, S. F. Ni, Y. F. Wu, R. F. Luo, Pharmaceutical research on *Cayratia Juss.* plants produced in China, *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, Vol.37, pp.3031-3032, 2009.
DOI: <https://www.oriprobe.com/journals/ahnykx.html>
- [7] E. R. Woo, H. J. Kim, J. H. Kwak, Y. K. Lim, H. Park, Anti-herpetic activity of various medicinal plant extracts, *Archives of Pharmacal Research*, Vol.20, No.1, pp.58-67, 1997.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02974043>
- [8] C. C. Lee, P. Houghton, Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer, *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.100, pp.237-243, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.064>
- [9] N. Ishirura, M. Shibata, Cayratinin, a new anthocyanin from the pericarp, *The Botanical Magazine, Tokyo*, Vol.83, No.984, pp.179-183, 1970.
DOI: <https://doi.org/10.15281/jplantres1887.83.179>
- [10] L. Ruo, S. X. Liao, H.Q. Liang, Constituents and anti-virus activity of essential oil from *Cayratia japonica*, *Academic Journal of Second Military Medical University*, Vol.13, pp169-173, 1992.
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/wpr-550781>
- [11] M. L. Zhao, The observation on bacteriostasis of *Cayratia japonica*, *Chinese Medical Journal of Metallurgical Industry*, Vol.12, pp.75-77, 1995.
<https://www.oriprobe.com/journals/zvjgyyzz.html>
- [12] J. R. Lin, M. Li, C. E. Deng, H. Lian, Experimental observation of the anti-bacteria effects of *Cayratia japonica* Gannep, *Lishizhen Medicine and Material Medica Research*, Vol.17, No.9, pp.1649-1650, 2006.
<http://caod.oriprobe.com/order.htm?id=11397079&ftex=base>
- [13] Z. L. Liu, K. Yang, F. Huang, Q. Z. Liu, S. S. Du, Chemical composition and toxicity of the essential oil of *Cayratia japonica* against two grain storage insects, *The Journal of Essential Oil Research*, Vol.24, No.3, pp. 237-240, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.676765>
- [14] L. Bao, X. Ma, X. Song, M. Wang, H. Lu, Two new resveratrol tetramers isolated from *Cayratia japonica*(THUNB.) GAGN. with strong inhibitory activity on fatty acid synthase and antioxidant activity, Vol.7, pp.2931-2940, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900394>
- [15] M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, Vol.181, pp.1199-1200, Apr. 1958.
DOI: <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- [16] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, C. R. Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.26, No.9-10, pp.1231-1237, 1999.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- [17] V. L. Singleton, J. A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic: phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol.16, pp.144-158, 1965.
<https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>
- [18] D. Y. Park, K. Y. Lee, Evaluation of the cosmeceutical activity of ethanol extracts from *Perilla frutescens* var. *acuta*, *Journal of the Korean Academia-industrial cooperation Society*, Vol.18, No.3, pp.513-517, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.3.513>
- [19] A. Murakami, M. Nakashima, T. Koshiha, T. Maoka, J. Ohigashi, Modifying effects of carotenoids on superoxide and nitric oxide generation from stimulated leukocytes, *Cancer Letters*, Vol.149, pp.115-123, 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(99\)00351-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(99)00351-1)
- [20] J. H. Rye, J. H. An, Y. K. Woo, H. J. Cho, The anti-inflammation effects of A.C.C. extracts on the LPS-induced Raw264.7 cell, *Journal of the Korean Academia-industrial cooperation Society*, Vol.18, No.12, pp.503-511, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2017.18.12.503>
- [21] Y. X. Yang, J. A. Lee, Anti-inflammatory, anti-wrinkle and astringent activities of the *Euphorbia thymifolia* extract: an in vitro study for anti-aging applications, *Journal of the Korean Society of cosmetology*, Vol.28, No.3, pp.525-530, 2022.
DOI: <https://doi.org/10.52660/JKSC.2022.28.3.525>
- [22] J. T. Lee, Y. S. Jeong, B. J. An, Physiological activity of *Salicornia herbacea* and its application for cosmetic materials, *The Korea Journal of Herbology*, Vol.17, No.2, pp.51-60, 2002.
<https://kiss.kstudy.com/thesis/thesis-view.asp?key=2013504>
- [23] L. R. Fukumoto, G. Mazza, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.48, pp.3597-3604, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- [24] H. J. Yang, E. H. Kim, S. N. Park, Antioxidative activity and component analysis of *Cayratia japonica* extract, *The Korean Society of Beauty and Art*, Vol.34, No.2, pp.117-127, 2008.
<https://koreascience.kr/article/JAKO20082764257826>

7.pdf

- [25] E. A. Shalaby, S. M. M. Shanab, Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*, *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, Vol.42, No.5, pp.556-564, 2012.
<http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/24794>
- [26] G. Briguglio, C. Costa, M. Pollicino, F. Giambò, C. Fenga, Polyphenols in cancer prevention: New insights(Review). *International Journal of Functional Nutrition*, sep. 2020.
 DOI: <https://doi.org/10.3892/ijfn.2020.9>
- [27] M. Singh, M. Arseneault, and J. T. Sanderson, Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's Disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), pp.4855-73, 2008.
 DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0735073>
- [28] X. H. Han, S. S. Hong, J. S. Hwang, M. K. Lee, J. S. Ro, Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives of Pharmacal Research*, Vol.30, No.1, pp.13-17, 2007.
 DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02977772>
- [29] L. Luo, W. Zhang, Z. Zhang, J. Zhu, H. Liang, The water extract of "Jiao Mei Gu" attenuates the lipopolysaccharide induced inflammatory response via inhibiting NF- κ B activity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.259, pp.112882-112892, 2020.
 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112882>
- [30] J. Hendel, O. H. Nielsen, Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease, *American Journal of Gastroenterology*. Vol.392, pp.1170-1173, 1997.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9219792/>
- [31] J. R. Vane, Y. S. Bakhle, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Vol.38, pp.97-120, 1998.
 DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97>
- [32] D. H. Son, M. H. Nam, C. O. Hong, H. M. Seol, K. W. Lee, 5- α reductase inhibitory effect and astringent activity of green apple rind extract on human keratinocytes and fibroblast cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol.77, No.4, pp.714-721, 2013.
 DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.120757>

위 장 미(Wei GuanGui)

[준회원]



- 2018년 12월 ~ 2021년 2월 : 일리비아 화장품 무역 대표
- 2019년 9월 ~ 현재 : 서경대학교 대학원 미용예술학석사

<관심분야>

피부미용, 기능성화장품, 천연소재

이 지 안(Ji-An Lee)

[정회원]



- 2007년 2월 : 서경대학교 대학원 미용예술학석사
- 2012년 2월 : 원광대학교 대학원 미용학박사
- 2013년 9월 ~ 현재 : 서경대학교 미용예술대학 뷰티테라피&메이크업학과 교수

<관심분야>

뷰티테라피, 화장품, K-Beauty, 미용교육