

호장근추출물이 피부질환 및 피부미용에 미치는 영향

정현아 · 노석선 · 오민석*

대전대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과교실, 대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실*

The Effects of *Polygonum Cuspidatum* on the Skin Functions

Hyun-A Jung, O.M.D., Seok-Seon Roh, O.M.D., Min-Suck Oh, O.M.D.*

Dept. of Oriental Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University
Dept. of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University*

Objectives :

This study was carried out to investigate the effects of *Polygonum cuspidatum* extract on several skin functions including inflammation and wrinkle formation.

Methods :

To investigate in vitro anti-oxidant activity assay, ethanol extracts of medicinal plants tested by DPPH method. In the next experiment, to investigate anti-inflammatory test, the RAW 264.7 macrophage cells was cultured using DMEM including the 10% FBS.

To study anti-allergic effect, we blended cultured Human Mast Cells(HMC-1), and then observe TNF- α , IL-8 by ELISA

Results :

Polygonum Cuspidatum extract has the effects of anti-inflammation and anti-allergy, which may be due to its inhibitory potential on the macrophage activation. Furthermore, *Polygonum Cuspidatum* extract has the anti-wrinkle effects through the inhibitory potential on the collagenase, elastase and gelatinase activities.

Conclusions :

The above results suggest that *Polygonum Cuspidatum* extract could be applicable for improvement of several skin functions.

Key words : *Polygonum cuspidatum*, Anti-oxidant, Anti-inflammation, Anti-allergy, Skin function

■ 접수 : 2008년 12월 11일, 수정 : 2008년 12월 29일, 채택 : 2009년 1월 19일
■ 교신저자 : 정현아, 대전광역시 중구 대흥동 22-5 대전대학교 대전한방병원 한방안이비인후과교실
Tel : (042) 229-6815, Fax : (042) 254-3403, E-mail : hyuna1122@empal.com

I. 서론

皮膚은 우리 몸의 가장 바깥에 있으면서 外部로 부터 모든 자극을 받아들이고 민감하게 반응하는 최초의 窓口¹⁾로, 병원성 미생물에 저항하는 강력한 방어체계를 갖는다. 이러한 방어체계의 중요한 요소로 작용하는 것은 정상피부의 pH, 수분량, 피부에서 배출되는 피지, 지방산, 요소와 같은 물질이다. 그러나 어떤 특정 원인에 의해 피부방어체계가 붕괴되면, 바이러스와 미생물에 의해 여러 피부질환이 유발되는 것으로 알려져 있다²⁾.

또한 사람의 피부는 나이가 들어감에 따라 자연스럽게 내적 요인 및 외적 요인에 의해 노화 과정을 거치면서 주름이 발생하게 된다. 그와는 반대로 사람들은 피부의 노화를 지연시키고 주름을 없애고자 많은 노력을 아끼지 않으며 그 일환으로 약물을 복용하거나, 피부에 바르거나, 수술적인 치료법도 고려하게 된다³⁾.

그러나 현재까지의 약물들은 여러 부작용과 항생제 내성균주의 출현, 치료 중단시 재발의 문제점이 보고되고 있으며, 외과적 수술이나 자외선 조사 같은 물리적 치료요법은 고비용을 부담하는 단점이 있다⁴⁾.

이에 최근에는 기존의 합성 항산화제보다 안전하고 독성이 적으며, 실용성이 큰 천연물의 개발로 전환되고 있으며⁵⁾, 이에 대한 실험적 연구로는 이⁶⁾의 피부 미백 효과에 관한 연구와 이⁷⁾의 주름 억제 효과에 관한 연구 등이 있었다.

호장근은 『名醫別錄』⁸⁾에 최초로 收錄되어 있으며, 마디풀과에 속한 다년생 초본인 호장 또는 왕호장의 근경과 근을 건조한 것으로 祛風利濕, 散瘀定痛, 및 清熱解毒의 효능이 있어 癰腫瘡毒 등에 活用되며⁹⁾, 약리 작용으로 항산화작용, 항균

작용, 항바이러스작용 등이 밝혀졌으며¹⁰⁾, 호장근의 화학성분에 대한 연구도 활발히 진행되어 emodin, physcion, chrysophanol, quercitrin, malic acid, citric acid, resveratrol, piceid 등이 보고되었다¹¹⁾.

호장근에 대한 현대 의학적인 연구도 최근 활발히 진행되어 호장근 추출물의 항산화효능¹²⁾, nitric oxide 생성억제 및 COX-2 활성억제¹³⁾, 간염바이러스에 대한 항바이러스 효능 및 streptococcus mutans 등에 대한 항균 효과¹⁴⁾, 관절염 억제효과¹⁵⁾ 등에 대한 보고가 있었으나 아직까지 호장근의 피부질환이나 피부 미용적 효능에 대한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

이에 저자는 피부질환과 주름 개선의 효과가 있는 물질들을 찾아보기 위하여 가자, 모과, 목별자, 호장근 추출물을 대상으로 세포 독성을 평가한 후, 항산화력, 항염증, 항알레르기 효과, 주름 개선 효과를 평가하였고, 그 결과 거의 모든 부분에서 우수한 효과를 나타낸 호장근 추출물을 대상으로 피부질환 및 피부미용 관련 기전에 대한 물질이 무엇인지를 규명하기 위해 유효성분 연구를 추가로 실시한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 내용 및 검액의 제조

본 실험에 사용된 한약재 4종은 동우물산(Korea)에서 구입하였다(Table I). 실험에 사용된 모든 약재는 600 g의 분량을 한약재 분쇄기를 이용해 100~200 메쉬 크기로 분쇄시킨 후 에탄올 약 3,000

ml(약 1:5 weight/volume)을 가하여 5일간 냉침하여 추출하였다. 추출한 약재는 Whatman filter paper No. 4를 사용해 고형분을 제거한 후, rotary evaporator를 이용해 감압 농축시키고, 70% 에탄올을 이용해 5% 용액으로 제조한 후 희석해 실험에 사용하였다.

Table 1. List of Medicinal Plants

No.	Herbal name	Pharmacognostic name
1	訶子	<i>Chebulae Fructus</i>
2	木瓜	<i>Chaenomelis Fructus</i>
3	木鱉子	<i>Momordica Cochinchinensis</i>
4	虎杖根	<i>Polygonum Cuspidatum</i>

2) 시약 및 기기

효소 억제력 실험을 위해서는 EnzCheck gelatinase/collagenase assay kit, EnzCheck elastase assay kit, DQ™ collagen(type 1 from bovine skin, flourescein conjugate), DQ™ elastin (from bovine neck ligament, flourescein conjugate), DQ™ gelatin(from pig skin, flourescein conjugate), 1,10-phenanthroline, monohydrate, 그리고 N-Methoxysuccinyl-Ala -Ala- Pto-Val-chloromethylketone(이상 Invitrogen, USA), mushroom tyrosinase, NaH₂PO₄, Na₂H₂PO₄(이상 Sigma, USA), L-DOPA(Acros organics, Belgium)를 사용하였다. 세포배양, 항염증, 항알레르기, 항산화 실험에는 Dulbecco's MEM, IMDM, FBS, antibiotic-antimycotic(penicillin G sodium, streptomycin sulfate, amphotericin B), trypsin-EDTA(이상 Gibco BRL, USA.), sodium bicarbonate, MTT, lipopolysaccharide, GRIESS reagent, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), dimethyl sulfoxide, chloroform, isopropanol(이상 Sigma, USA), M-mlV reverse transcriptase, recombinant RNasin ribonuclease inhibitor, deoxynucleotide triphosphates

(dNTPs), random hexamer(이상 Promega, USA), HiPi thermostable DNA polymerase, 100bp DNA ladder marker(이상 엘피스바이오텍, Korea), easy blue, proprep, westzol(이상 Intron, Korea), mouse TNF- α , human TNF- α , mouse IL-6, human IL-8 ELISA kit(이상 Biosource, USA) 등을 사용하였다. 실험 기기로는 rotary evaporator system (BCHI, Swetzerland), inverted microscope (nikon, Japan), clean bench, incubator(이상 비전과학, Korea), CO₂ incubator(Forma, USA), ELISA reader (Bio-TeK, USA), fluorescence microplate reader, luminoscence microplate reader(이상 ThermoScientific, USA), geneAmp PCR System, spectrophotometer (이상 Beckman, USA), pH meter(Istek, Korea), Refrigerated Microcentrifuge(한일과학, Korea), electrophoresis System(Hoefler, USA) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 피부미용과 관련된 생화학적 반응 효과

(1) Collagenase 활성 억제력 측정

Collagenase 활성 억제력은 EnzCheck Gelatinase /Collagenase assay kit (invitrogen E12055)를 사용하였으며, substrate로는 DQ™ collagen, type 1 from bovine skin, flourescein conjugate을 이용하여 측정하였으며, 양성대조군으로는 1,10-phenanthroline monohydrate을 사용하였다.

(2) Elastase 활성 억제력 측정

Elastase 활성 억제력은 EnzCheck Elastase assay kit(invitrogen E12056)를 사용하였으며, substrate로는 DQ™ elastin, from bovine neck ligament, flourescein conjugate을 이용해 평가하였으며, 양

성대조균으로는 N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pto-Val-chloromethylketone을 사용하였다.

(3) Gelatinase 활성 억제력 측정

Gelatinase 활성 억제력은 EnzCheck Gelatinase/Collagenase assay kit (Invitrogen E12055)를 사용하였으며, substrate로는 DQ™ gelatin from pig skin, fluorescein conjugate을 이용해 평가하였으며, 양성대조균으로는 1,10-phenanthroline monohydrate 5 µg/ml을 사용하였다.

(4) MMP-1, MMP-3 유전자 발현 측정

조직에서 초대 배양한 후 계대배양 횟수가 10이 넘지 않는 인체섬유아세포(human fibroblast cell)를 trypsin-EDTA를 처리 후, 1×10⁵ cells/ml의 농도로 희석시키고 60 mm dish에 넣어 90% 정도까지 성장할 때까지 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 세포배양액을 교체하고, 에탄올로 희석한 실험물질을 50ppm과 10ppm의 농도로 가하여 24시간동안 전 처리하였다. PBS로 2회 이상 세척하여 잔존하는 FBS를 완전히 제거하고, 세포가 마르지 않을 정도의 PBS를 가하여 UVB 20mj을 조사한 후 전처리와 마찬가지로 24시간동안 후처리를 시행하고 RT-PCR을 수행하였다(Table II).

Table II. Nucleotide Sequence of the Primers

	Primer	Sequence
MMP-1	Sense	5'-cga tct atg gat cca ggt ta-3'
	Anti-sense	5'-ctt ctt tgg act cac acc at-3'
MMP-3	Sense	5'-cag agg aaa tga ggt acg ag-3'
	Anti-sense	5'-ccc aaa ttc ttc aaa aac ag-3'

2) 항산화력 측정

무수에탄올로 50 µg/ml과 50 µg/ml로 희석한

실험물질 50 µl에 에탄올로 녹인 4×10⁴M 1,1-diphenyl-2-picrylhyrazyl(DPPH)¹⁶⁾ solution 450 µl를 가한 후, 518 nm에서 10분간 흡광도를 측정하였다.

3) 항염 효과 측정

(1) NO(Nitric oxide) 형성 억제력 측정

RAW 264.7 세포주(ATCC number: CRL-2278)를 이용한 GRIESS¹⁷⁾법으로 NO 형성억제력 실험을 실시하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW 264.7 cell을 96 well plate에 2×10⁴ cells/ml의 농도로 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 FBS free media로 12시간 starvation시킨 후, 배지에 희석한 실험물질을 50 µg/ml과 10 µg/ml의 농도로 가해 15분간 처리하였다. LPS(Lipopolysaccharide)를 0.5 µg/ml의 농도로 가하여 16시간 배양한 후, 상층액을 100 µl씩 취해 96 well plate에 옮기고, GRIESS reagent를 100 µl씩 가해 상온에서 15분간 반응시키고, ELISA reader로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

(2) IL-1β, TNF-α 유전자 발현 측정

Monolayer를 형성한 RAW 264.7 세포를 배양 용기에서 떼어내고, 1×10⁵ cells/ml의 농도로 희석시킨 후 6well dish에 넣어 90% 정도까지 성장할 때까지 배양하였다. 혈청이 첨가되지 않은 DMEM으로 세포배양액을 교체하고, 에탄올로 희석한 실험물질을 dish당 50ppm과 10ppm의 농도로 가하여 16시간동안 처리하였다¹⁸⁾. 이때 대조균으로는 에탄올을 사용하였으며, 본 실험에 사용된 primer들의 염기서열은 다음과 같다(Table III).

Table III. Nucleotide Sequence of the Primers

	Primer	Sequence
IL-1 β	Sense	5'-tct ttg aag ttg acg gac cc-3'
	Anti-sense	5'-agg cca cag gta ttt tgt cg-3'
COX-2	Sense	5'-tca tgg aag atg cat tgg aa-3'
	Anti-sense	5'-ctg ttg cgg aga aag gag tc-3'
GAPDH	Sense	5'-acc aca gtc cat gcc atc ac-3'
	Anti-sense	5'-tcc acc acc ctg ttg ctg ta-3'

(3) TNF- α , IL-6 분비량 억제 측정

10% FCS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW 264.7 cell을 24 well plate에 2×10^4 cells/ml의 농도로 24 well plate에 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 혈청이 배제된 DMEM를 가하여 12시간 starvation시킨 후, FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 실험물질을 10 μ g/ml의 농도로 가해 20분간 전처리하고, LPS를 0.5 μ g/ml의 농도로 가하여 16시간 배양한 후, 상층액을 취해 ELISA Kit(Biosource, USA)를 이용해 TNF- α 와 IL-6을 정량하였다.

4) 항알레르기 효과 측정

10% FBS가 첨가된 IMDM으로 전 배양하고 FBS가 첨가되지 않은 배지로 Human mast cell line인 HMC-1을 24well plate에 2×10^5 cells/ml의 농도로 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 16시간 배양, starvation을 주고 배지에 희석한 실험물질을 50 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도로 가해 15분간 전처리 하였다. PMA(50nm)와 A23187(250 nm)를 가하여 24시간 배양한 후, 상층액을 취해 ELISA Kit를 이용해 TNF- α 와 IL-8를 정량하였다.

5) 호장근의 유효성분 분리 및 효능 측정

호장근 300 g을 한약재 분쇄기를 이용해 100~200 메쉬 크기로 분쇄시킨 후 메탄올 약 3,000 ml (약 1:10 weight/volume)을 가하여 5일간 냉침하

여 추출하였다. 추출한 약재는 Whatman filter paper No. 4를 사용해 고형분을 제거한 후, rotary evaporator를 이용해 감압 농축시켰다.

농축시켜 얻은 에탄올 추출물(8.3 g)을 80% 메탄올(1,000 ml)로 용해시켜 n-hexane(1,000 ml)과 용매 분배하여 80% 메탄올 용매층과 hexane 용매층으로 분리하였다. Hexane 층은 다시 감압 농축하였으며 그 결과 농축액 3.63 g을 얻었다. Hexane 층 농축액은 다시 95% 메탄올 이동상으로 이용하여 역상 크로마토그래피(ODS open chromatography, 60 \times 6cm)를 통해 추가적인 분리가 이루어졌으며, 이에 따라 모두 6개의 분획으로 나누었다. 이 중 5번째 분획을 고성능 액체 크로마토그래피[High performance liquid chromatography: Grom-sil 120 ODS-3 CP, 10 μ m column(250 \times 4.6 mm) 0.8 ml/min, 85% 메탄올]를 이용하여 분리하였고, 그 결과 antraquinone류인 emodin(23.47 mg)을 얻었다. 세번째 분획은 크기 배제 크로마토그래피(sephadexTM LH-20, 100% 메탄올 용매계, 150 \times 1 cm)를 이용하여 분리하였으며, 그 결과 2-methoxystypantron(5.95 mg)과 emodin-6-O- β -D-glucoside (5.21 mg)를 얻었다. 다음으로 6번째 분획을 크기 배제 크로마토그래피(sephadexTM LH-20, 100% 메탄올 용매계)를 이용하여 추가 분리를 실시하였고, 고성능 액체 크로마토그래피[Fluofix column (250 \times 10 mm), 2 ml/min, 이동상; 70% \rightarrow 100% 메탄올, 30min, gradient]를 이용하여 순수하게 정제하여 단일 성분 physcion(10.34 mg)을 얻었다(Fig 1).

분리된 모든 화합물들의 구조결정은 Sigma사에서 구입한 표준시료와 TLC(thin layer chromatography)를 통한 Rf값의 비교 및 1H NMR 스펙트럼을 비교하여 확인하였다. Hexane 층과 함께 분획된 80% 메탄올 층은 농축 후 다시 30% 메탄올 용매와 chloroform 용매 각각 1,000 ml를 이용하여

용매 분배를 실시하여 나누었다. 상대적으로 극성이 강한 30% 메탄올 용매 층은 다시 농축 후 부탄올(BuOH)과 물 용매 각각 1,000 ml를 이용하여 나누었다. 그 결과 Scheme 1에서 보는 바와 같이 Sample 1~8을 제조하였다.

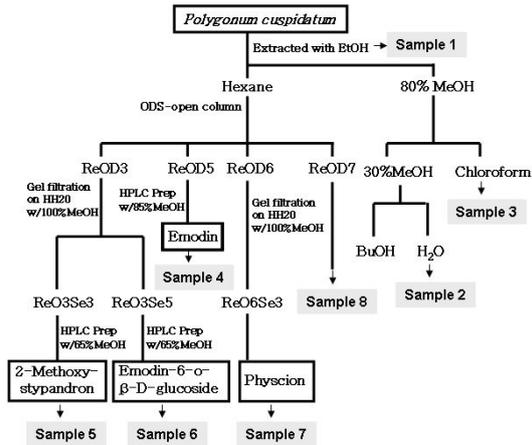


Fig. 1. Isolation of bioactive compounds from the *Polygonum Cuspidatum*.

6) 세포 독성 측정

RAW 264.7 세포주(ATCC number: CRL-2278)를 이용해 MTT법¹⁹⁾으로 세포독성을 평가하였다.

III. 결 과

1. 한약재 추출물 4종의 피부 생화학적 효과

1) 세포 독성

RAW 264.7 세포를 이용해 MTT법으로 세포독성을 평가한 결과 가자, 모과, 목별자 및 호장근 추출물은 50 μ g/ml에서 세포독성이 미미한 것으로 평가되었다(Fig. 2).

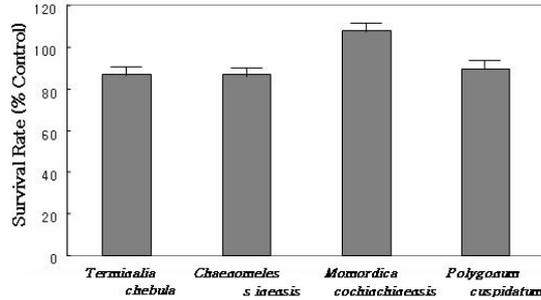


Fig. 2. Cytotoxicity of ethanol extracts of medicinal plants on RAW 264.6 cells at 50 μ g/ml determined by MTT assay.

2) 항산화력 효과

DPPH법으로 측정된 약재추출물 4종의 항산화력은 50 μ g/ml과 10 μ g/ml의 농도에서 가자 98.5%와 89.6%, 모과 21.2%와 6.1%, 목별자 9.0%와 4.0%, 그리고 호장근이 81.1%와 29.3%의 항산화력을 보여, 가자와 호장근 추출물이 우수한 것으로 평가되었다(Fig. 3).

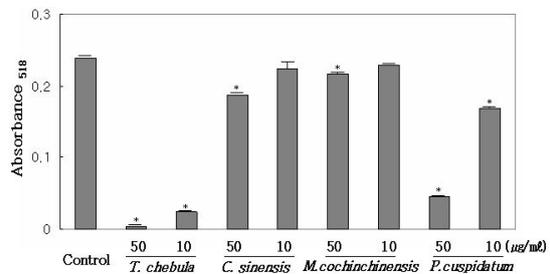


Fig. 3. Radical scavenging activities of ethanol extracts of medicinal plants determined by DPPH assay.

3) 항염증 효과

(1) NO 생성 억제

RAW 264.7 세포를 이용해 GRIESS법으로 4가지 약재추출물의 nitric oxide 생성억제력을 평가한 결과, 가자추출물이 50 μ g/ml과 10 μ g/ml에서 각각 37.3%와 24.2%, 모과추출물이 41.6%와 32.1%,

목별자추출물이 45.1%와 18.2%, 그리고 호장근 추출물이 각각 56.5%와 30.4% 억제시켰다(Fig. 4).

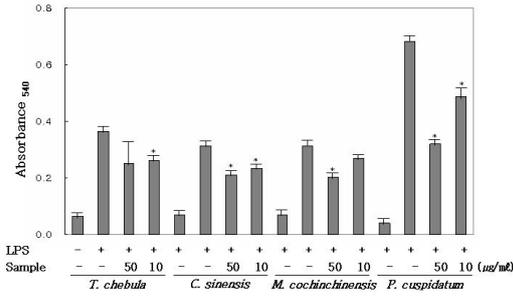


Fig. 4. Effects of ethanol extracts of medicinal plants on nitric oxide synthesis in RAW 264.7 cells.

(2) TNF-α, IL-1β, IL-6 및 COX-2 유전자 발현 억제력

호장근 추출물은 50 μg/ml에서 LPS의 자극을 받아 RAW 264.7 세포에서 발현이 증가되는 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 COX-2 유전자의 발현을 각각 33.6%, 60.0%, 92.3%, 75.3% 억제시켰으나, 다른 3종의 약재추출물은 이들 유전자의 발현에 별다른 영향을 주지 못했다(Fig. 5).

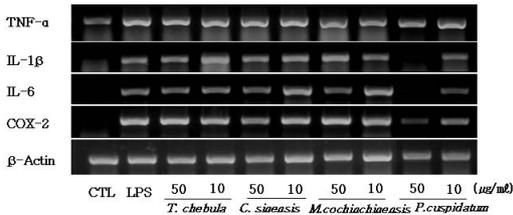


Fig. 5. Effects of ethanol extracts of medicinal plant on the mRNA levels of TNF-α, IL-1β, IL-6 and COX-2 in the cultured RAW 264.7 cells by RT-PCR.

(3) TNF-α 분비량 억제

LPS의 자극을 받아 RAW 264.7 세포에서 합성되는 TNF-α에 미치는 영향을 평가한 결과, 가자, 모과, 목별자 및 호장근 추출물은 50 μg/ml의 농

도에서 각각 7.4%, -15.3%, -15/1%, 31.4% 억제시켰다(Fig. 6).

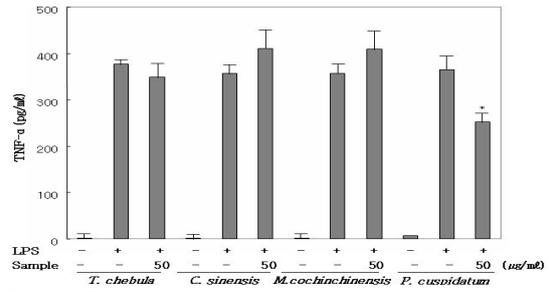


Fig. 6. Effects of ethanol extracts of medicinal plants on TNF-α production in RAW 264.7 cells determined by ELISA.

4) 항알레르기 효과

(1) IL-8 분비량 억제

호장근 추출물은 PMA와 A23187의 자극에 의해 HMC-1 세포에서 생성되는 IL-8을 50 μg/ml에서 87.5% 억제시켰다(Fig. 7).

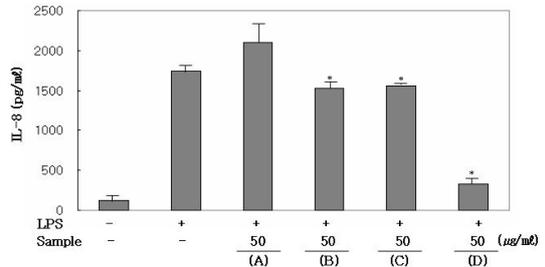


Fig. 7. Effects of ethanol extracts of medicinal plants on IL-8 production at 50 μg/ml in HMC-1 cells determined by ELISA.

(A) Terminalia Chebula (B) Chaenomeles Sinensis (C) Momordica Cochinchinensis (D) Polygonum Cuspidatum.

2) TNF-α 분비량 억제

호장근 추출물은 PMA와 A23187의 자극에 의해 HMC-1 세포에서 생성되는 TNF-α를 50 μg/ml에서 41.5% 억제시켰다(Fig. 8).

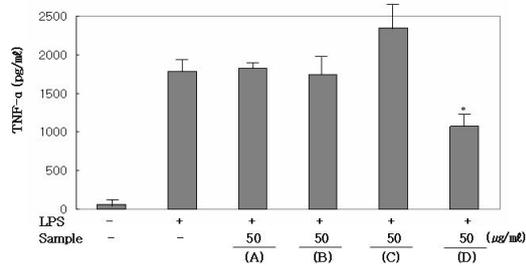


Fig. 8. Effects of ethanol extracts of medicinal plants on TNF- α production at 50 μ g/ml in HMC-1 cells determined by ELISA.

(A) *Terminalia Chebula* (B) *Chaenomeles Sinensis* (C) *Momordica Cochinchinensis* (D) *Polygonum Cuspidatum*.

5) 피부주름과 관련된 생화학적 효과

(1) Collagenase 활성 억제

가자, 모과, 목별자 및 호장근 추출물을 대상으로 collagenase 활성 억제력을 평가한 결과 4가지 한약재 추출물 모두 농도 의존성을 확인하였다 (Fig. 9).

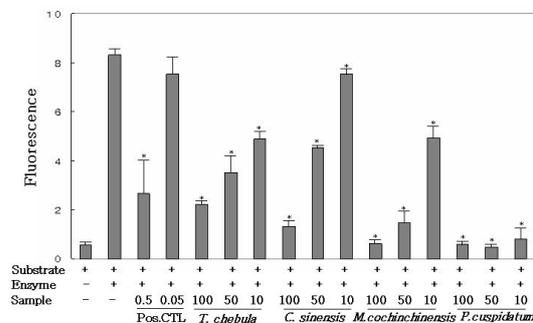


Fig. 9. Effects of ethanol extracts of medicinal plants on collagenase activities determined by ELISA assay.

(2) Elastase 활성 억제

호장근 추출물을 대상으로 elastase 활성 억제력을 평가한 결과 농도 의존성을 확인하였다(Fig. 10).

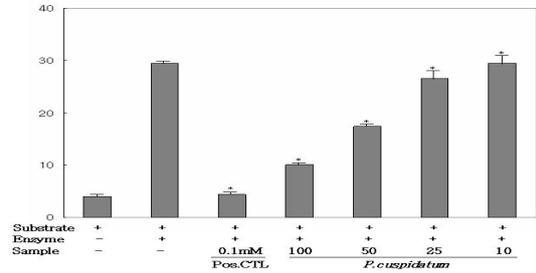


Fig. 10. Effects of ethanol extracts of *Polygonum Cuspidatum* on elastase activities determined by ELISA assay.

(3) Gelatinase 활성 억제

호장근 추출물을 대상으로 gelatinase 활성 억제력을 평가한 결과 농도 의존성을 확인하였다 (Fig. 11).

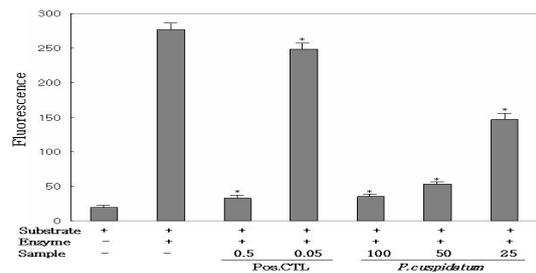


Fig. 11. Effects of ethanol extracts of *Polygonum Cuspidatum* on gelatinase activities determined by ELISA assay.

(4) MMP-1, MMP-3 유전자 발현 억제

RT-PCR 결과 호장근 추출물은 사람의 섬유아 세포(human fibroblast cell)가 자외선의 자극에 의해 증가되는 MMP-1과 MMP-3 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다(Fig. 12).

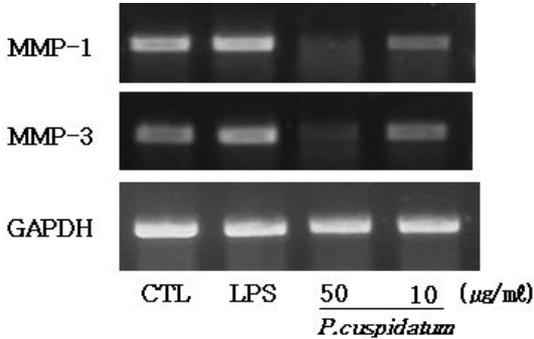


Fig. 12. Effects of ethanol extract of *Polygonum Cuspidatum* on the mRNA levels of MMP-1 and 3 in the cultured human fibroblast cells stimulated by ultraviolet.

6) 호장근의 유효성분 효과

(1) Collagenase 활성 억제

분획과정에서 8개 분획물(Sample 1~Sample 8)을 대상으로 한 실험에서 Sample 3(chloroform 추출물)이 호장근 추출물보다 강력한 효소 억제력을 보였으며, Sample 4(emodin)와 Sample 6(emodin-6-O-β-D-glucoside) 역시 호장근 추출물과 유사한 수준의 효소 활성 억제력을 보였다. 또한 이 분획물들은 모두 농도 의존적인 효소 활성 억제력을 보였다.

(2) Elastase 활성 억제

Sample 3 과 Sample 6 이 최초의 호장근 추출물보다 더욱 강력한 효소 억제력을 보였으며, Sample 4 역시 호장근 추출물과 유사한 수준의 효소 억제력을 보였다. 이들 분획물들은 모두 농도 의존성을 보였다.

(3) Gelatinase 활성 억제

Sample 3이 호장근 추출물보다 강력한 gelatinase 억제력을 보였으며, Sample 6도 호장근 추출물과 유사한 수준의 효소 활성 억제력을 보였다. 이들

분획물들은 모두 농도 의존성을 보였다.

IV. 고찰

피부는 몸속에 있는 여러 가지 臟器를 둘러싸고 있는 하나의 膜과 같은 것으로서 身體의 表面을 덮고 있으며, 각종 外界의 刺戟으로부터 保護作用을 하는 기관의 一種이다²⁰⁾.

피부는 해부학적으로 외부와의 경계부에 위치하여 介체 介에 손상을 줄 수 있는 미생물, 화학물질 뿐만 아니라 열, 한랭, 자외선 및 기계적 자극과 같은 물리적 인자들에 항상 노출되어 있는데, 介체를 방어 유지하는 임무의 대부분이 면역반응과 직접 또는 간접적으로 관련되어 있다. 염증반응의 유발 및 조절, 창상의 치유과정, 알레르기 반응에도 면역반응의 관련이 깊으며 따라서 피부는 다양한 형태의 면역반응이 흔히 노출되는 대표적인 장기이다²⁾.

피부질환의 주증상은 소양, 동통, 무감각증이며²⁾, 이는 한의학에서 瘡瘍의 범주에 살펴볼 수 있는데, 瘡瘍의 原因에 對하여 陳²¹⁾은 “外因은 六淫으로 經絡에서 나타나 臟腑로 전해지고, 內因은 七情鬱結과 臟腑가 손상되어 肢體로 나타나고, 不內外因은 飮食飢飽, 呼吸傷氣, 虎狼毒蟲, 金瘡 등에 나타나 三因이 형성된다” 하였으며, 王^{22,23)}은 “虛邪가 犯하거나 榮衛가 經絡에 停留되거나 喜怒가 不斂하거나 飮食不節, 五臟六腑不和, 九竅不通 등으로 발생된다”고 하였다.

皮膚美容은 우리의 日常生活과 깊은 關係를 갖고 있으며, 많은 사람들이 사용하는 普遍化된 分野라고 할 수 있다. 現代에 있어서의 皮膚美容의 目的이라고 한다면 身體를 清潔히 하는 것, 색조화장에 의해 缺點은 隱蔽시키고 長點을 부각시켜 身體를 아름답고 매력있게 표현하는 것, 紫

外線 등의 外部 環境으로부터 身體를 保護하는 目的으로 使用하고 있는데, 科學이 더욱 발전함에 의해 美白, 老化 等の 醫學的인 면이 皮膚美容의 目的에 더해지고 있다²⁴⁾.

호장근(*Polygonum Cuspidatum*)은 『名醫別錄』⁸⁾에 최초로 收錄되어 있으며, 《本草綱目》本部 中品에 “杖은 그 줄기를 뜻하며 虎는 그 斑點을 말한다”라고 기록되어 있는데²⁵⁾, 호장근의 藥理作用으로 항산화작용, 항균작용, 항바이러스작용, 활혈거어작용 등이 밝혀졌으며¹⁰⁾, emodin, physcion, chrysophanol, quercitrin, malic acid, citric acid, resveratrol, piceid 등의 화학성분이 있는 것으로 보고되었으¹¹⁾, 특히 호장근의 anthraquinone유도체의 하나인 emodin은 항산화 활성, 항염증작용, tyrosine kinase억제활성, 혈관신생 억제활성 등을 지니고 있는 것으로 알려져 있다²⁶⁾.

호장근에 대한 보고도 최근 활발히 진행되어 왔다. 호장근 추출물의 항산화 효능¹²⁾, NO 생성 억제 및 COX-2 활성 억제¹³⁾, 간염바이러스에 대한 항바이러스 효능 및 streptococcus mutans 등에 대한 항균 효과¹⁴⁾, 관절염 억제효과¹⁵⁾ 등에 대한 보고가 있었으나 아직까지 호장근의 피부질환이나 피부 미용적 효능에 대한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

이에 저자는 피부질환과 주름 개선의 효과가 있는 물질들을 찾아보기 위하여 여러 한약 추출물을 스크리닝한 후 효능이 확인된 가자, 모과, 목별자, 호장근 추출물을 대상으로 세포독성을 평가한 후, 항산화력, 항염증, 항알레르기 효과를 비롯하여 피부 주름 개선 효과 등을 평가하였고, 그 결과 거의 모든 부분에서 우수한 효과를 나타낸 호장근 추출물에 대하여 분획연구를 추가로 실시하였다.

우선 가자, 모과, 목별자 및 호장근 추출물을 대상으로 RAW 264.7 세포를 이용해 MTT법으로

세포 독성을 평가한 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 4종의 추출물 모두에서 세포독성이 미미한 것으로 평가되었다(Fig. 2).

수많은 원인에 의하여 일어나는 염증반응은 그 원인과 반응조직의 차이에 상관없이 거의 유사한 변화를 보인다. 이러한 현상은 조직 손상 후에 일어나는 변화로서 손상에 의하여 생체내 국소부위에 유리되는 공통적인 물질요인의 존재를 추정케 한다. 이러한 화학적 매개체로는 활성산소, NO(nitric oxide), PG(prostaglandin), 염증을 유발시키는 여러 cytokines 등이 있다²⁷⁾.

활성산소는 이온의 상태가 불안하여 다른 물질과 결합해 안정화되려는 성질, 즉 강한 반응성을 지니는 특성을 가진 산소를 말한다. 이러한 활성산소는 인체 내의 정상세포의 대사과정 중의 여러 산화반응의 부산물로 만들어지며, 식세포에 의해 만들어져 감염반응을 조절하는 긍정적인 역할을 하는 반면, 이산화 방사선, 자외선, 환경공해, 심한 운동을 할 경우에 만들어져, 생체조직을 공격해 각종 염증질환과 암, 간장장애, 동맥경화, 위염등 많은 질병을 일으키며, 궁극적으로는 노화의 한 원인이 되는 것으로 알려져 있다²⁸⁾.

이에 본 연구에서 염증반응과정에서 중요한 역할을 하고 있는 활성산소를 제거하는 radical scavenger로서의 작용을 하는지의 여부를 조사하기 위해 DPPH법을 이용하여 항산화력 실험을 실시한 결과, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 가자 98.5%와 89.6%, 모과 21.2%와 6.1%, 목별자 9.0%와 4.0%, 그리고 호장근이 81.1%와 29.3%의 항산화력을 보여, 가자와 호장근 추출물이 우수한 것으로 평가되었다(Fig. 3).

NO는 nitric oxide synthase(NOS)효소에 의해 만들어지며, 체내의 염증과정에서는 과량의 NO가 만들어져 관절염을 비롯한 각종 급성 혹은 만성 염증 질환에서 중요한 역할을 하는 것으로 알

려져 있다. NOS는 I형, II형, III형의 3종류가 있는데, 이중 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 I형이나 III형과 달리 II형은 iNOS (inducible NOS)로 cytokine이나 세균 등에서 분비되는 LPS나 calcium ionophore에 의해 일부 세포에서 생성되며, 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 각종 염증질환에 작용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 각종 염증의 발생억제와 치료를 위해서는 NO의 발생을 억제시켜 주는 것이 중요하다²⁹⁾.

이에 본 연구에서 LPS(Lipopolysaccharide)에 의해 유도되는 NO의 생성을 억제시키는 역할을 하는 지의 여부를 평가하기 위해 염증실험에 널리 활용되고 있는 macrophage 세포주인 RAW 264.7를 이용해 GRIESS법으로 NO 생성 억제력을 평가한 결과, 가자추출물이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 37.3%와 24.2%, 모과추출물 41.6%와 32.1%, 목별자추출물 45.1%와 18.2%, 그리고 호장근 추출물이 각각 56.5%와 30.4%의 억제효과를 보여(Fig. 4), 4종 약물 모두에서 NO 생성을 억제시키는 것으로 평가되었으며, 이를 통해 NO 형성억제를 통한 항염증 효능을 확인 할 수 있었다.

염증 반응에서의 유해자극은 직접 국소에 작용해 손상을 주기도 하지만, 대부분 내인성 화학 전달물질을 통해 간접적으로 국소의 혈관이나 세포에 전달된다. 염증 반응의 주요 화학전달 매개 물질로는 크게 즉시형 혈관투과성 항진에 관여하는 amine류(histamine, serotonin 등)와 kinin류(bradykinin 등), 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine류와 prostaglandin과 leukotriene류 등의 4군으로 분류된다. 지연형 반응에 주로 작용하는 cytokine은 30kD이하의 분자량을 가진 당단백으로 소량(10⁻¹⁰ - 10⁻¹⁵M)으로도 수용체와 결합해 강력하게 염증반응과 면역반응을 조절하는 기능을 가졌

다. 면역과 염증에 관련된 여러 cytokine 중 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 cytokine으로 보고되고 있다³⁰⁾. PG은 arachidonic acid에서 유래해 염증과 면역반응을 비롯해 smooth muscle tone, vascular permeability, cellular proliferation 등에 작용하는 intercellular, intracellular messenger이다. PG은 세균의 감염에서 유래한 LPS 혹은 외부 자극에 의해 세포막 지질 성분이 phospholipase A2에 의해 생성되는 arachidonic acid로부터 만들어진다. 즉 arachidonic acid는 COX(cyclooxygenase) 효소의 작용을 받아 PG를 합성하는데, PGE2와 PGI2는 혈관 투과성 항진에 작용을 하고, tromboxane은 백혈구 유주에 관여하는 등 PG는 염증과 가장 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. COX는 I형과 II형의 2가지 isoform이 존재한다. I형 효소인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절, 혈소판 응집 등 인체의 정상적인 기능을 유지하는데 중요한 작용을 하는 house keeping enzyme인 반면, 외부 자극에 의해 발현이 유도되는 II형인 COX-2는 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다³¹⁾. 따라서 항염증제의 개발을 위해 COX-2의 활성을 억제시키는 물질의 탐색에 많은 연구자들이 힘을 쏟고 있다³²⁾.

이에 본 연구에서 LPS의 자극을 받아 RAW 264.7 세포에서 발현되는 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 COX-2 유전자의 변화를 평가하기 위해 RT-PCR를 실시한 결과, 호장근 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유전자의 발현을 각각 33.6%, 60.0%, 92.3%, 75.3% 억제시켰으나, 다른 3종의 약재추출물은 이들 유전자의 발현에 별다른 영향을 주지 못했다(Fig. 5).

또한 여러 염증성 cytokine 중 특히 TNF- α 는 염증이 발생된 부위에는 높은 농도로 존재하며, 최근에는 TNF- α 를 차단하는 약물들이 염증의 치

료제로 연구되고 있어³³⁾, LPS의 자극을 받아 RAW 264.7 세포에서 합성되는 TNF- α 의 분비량을 평가한 결과, 호장근 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 31.4%를 억제시켰으나 다른 3종의 약재 추출물은 별다른 영향을 주지 못하여(Fig. 6), 4종 약물 중 호장근 추출물이 염증과 관련된 여러 cytokine의 억제를 통한 항염증 효능이 가장 우수함을 알 수 있었다.

알레르기 질환은 비교적 흔한 만성 질환임에도 불구하고 그 정확한 발병기전 및 원인이 밝혀져 있지 않고, 효과적인 진단과 치료에도 어려움이 많은 질환이다³⁴⁾. 개체의 면역계는 항체 혹은 특이 감각 림프구에 의한 작동기전에 의해 특이 항원에 대해 개체를 방어하는데, 알레르기 반응이란 이러한 항원에 대한 적응 면역반응이 부적절하거나 과잉될 때 조직손상을 일으켜 질병을 유발하는 과민반응을 말하며, 이러한 과민반응은 반응기전에 따라 5종류로 구분 할 수 있으며, 제 I, II, III, V형이 항체 중개성으로 체액성 면역반응이고, 제 IV형은 주로 T 림프구 및 대식세포에 의해 중개되는 세포매개성 면역반응으로 항체에 의해 매개되는 즉시형 과민반응과 달리 지연형 면역반응으로 특이항원을 인식하는 T 림프구에 의해 일어나며²⁾, 만약 이런 항원성 자극이 피부로 가해지면 각질형성세포, 랑게르한스세포같은 단핵-식세포 계열 세포 및 T림프구 상호간의 세포반응과 IL-1, TNF- α , IL-8, COX-2등을 비롯한 다양한 사이토카인의 협동 작용에 의해 항원 특이성 T림프구가 활성화되어 세포매개성 면역반응과 이로 인한 염증반응이 시작된다³⁵⁾.

이에 본 연구에서 PMA와 A23187의 자극에 의해 HMC-1 세포에서 생성되는 IL-8과 TNF- α 분비량 억제력을 측정 한 결과 호장근 추출물만이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 87.5%, 41.5% 억제시키는 것으로 나타나(Fig. 7, 8), 면역반응과 관련된 cytokine의

억제를 통한 항알러지 효능이 있음을 알 수 있었다.

피부는 또한美容의 核心으로 認識되고 있는데²⁾, 피부미용 중 가장 관심이 큰 것은 주름의 생성을 억제시키거나, 피부 미백 기능을 들 수 있다. 이에 본 연구에서는 가자, 모과, 목별자 및 호장근 추출물을 대상으로 피부 주름 개선 효능에 대한 실험과 피부 미백 효능을 평가하였다.

최근에 천연식물에 대한 관심과 더불어, 환경오염과 외부조건에 의한 피부의 손상을 억제하고자 하는 노력이 증가하고 있다. 이에 따라서 피부에서의 항산화 및 자외선 차단에 관한 관심이 증가하고 있다. 자외선에 과도하게 노출된 경우, 피부의 형태를 유지시켜주는 기질단백질인 콜라겐과 엘라스틴을 분해시켜주는 효소인 collagenase의 발현이 증가되어, 피부 단백질의 손상과 광에 의한 피부노화 및 피부 주름증이 유발된다³⁶⁾.

교원 섬유(collagen fiber)는 피부 건조 중량의 75%를 차지하여 피부에 장력과 탄력성을 제공한다. 노화가 진행되면 피부를 지지하고 있는 섬유가 늘어나서 피부가 늘어났다. 자외선에 과다 노출시 파괴되어 피부에 주름을 유발한다³⁷⁾.

Collagen은 현재까지 14종 이상의 형태가 밝혀졌는데 피부의 경우 5가지가 존재한다. 성인의 진피에 있는 collagen은 대부분 type I collagen으로 80~85%를 차지하며 20% 정도가 type III collagen이다. Type I collagen은 망상층에 있는 대부분의 굵은 교원섬유에서 발견되며, type III collagen은 주로 유두층과 피부 부속기 주변에 성글게 존재하며 섬유는 가늘다. Type IV, VII collagen은 기저막에, type VIII 형 collagen은 혈관내피세포에 분포한다³⁸⁾. 이런 collagen을 분해하여 주름이 발생되게 하는 것으로 collagenase와 gelatinase라는 효소가 알려져 있다. Gelatinase에는 MMP-2와 MMP-9가 있고, 이들은 type IV, V, VII collagen

과 gelatin에 대한 분해활성을 지니며, 대부분의 표피층에서 검출되며, 주름 형성과 밀접한 관련을 지닌 것으로 보고되고 있다³⁹⁾.

또한 탄력 섬유(elastic fiber)는 진피의 5% 정도를 차지하는 스프링 모양의 단백질 섬유로서 가해진 힘에 의해 변형된 피부가 원래의 모습으로 되돌아오도록 탄력성을 제공해주며, 노화됨에 따라 스프링 구조가 느슨해져서 쉽게 처지고 잔주름이 생기게 되고, 피부 속에 존재하는 elastase라는 효소에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다³⁷⁾.

따라서 주름의 발생과 피부탄력 등의 피부미용적인 측면에서 collagenase, elastase 그리고 gelatinase의 활성 억제에는 큰 의미를 지닌다 할 수 있다.

이에 본 연구에서도 가자, 모과, 목별자 및 호장근 추출물을 대상으로 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 다양한 농도에서 실험을 한 결과, 4가지 한약재추출물 모두 collagenase 활성을 억제력을 보였으며, 농도 의존적인 경향을 보였다(Fig. 9).

또한 호장근 추출물을 대상으로 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 다양한 농도에서 elastase와 gelatinase 활성 억제력 실험을 한 결과 각각에서 농도 의존적으로 elastase와 gelatinase 활성을 억제하였다(Fig. 10, 11).

이에 저자는 collagenase, elastase, gelatinase 모든 부분에서 우수한 활성 억제력을 보인 호장근 추출물이 collagen 분해를 억제시키는 보다 구체적인 원인을 규명하고자 MMP-1, MMP-3 유전자 발현에 미치는 영향을 추가로 조사하였다.

Matrix metalloproteinase(MMPs)는 세포외 기질(extracellular matrix)과 기저막(basement membrane)의 분해에 관여하는 여러 효소의 family로, 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type MMP

(MT-MMP) 등 네 개의 subfamily로 나누어진다⁴⁰⁾.

특히 피부의 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 AP-1(activator protein-1)의 활성도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다⁴¹⁾. 또한 MMP-3은 gelatin, proteoglycan, laminin, fibronectin과 type IV, IX collagen을 포함한 다양한 세포외기질이 분해를 담당하며⁴²⁾, 류마티스관절염과 골관절염을 포함한 다양한 염증성 질환과 관련된 결합조직의 파괴에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, MMP-1의 활성을 조절하여 병인 과정이 시작되는 결정적인 요소를 제공할 것이라고 보고되고 있다⁴³⁾.

이에 collagen 분해를 억제시키는 보다 구체적인 원인을 규명하고자 MMP-1, MMP-3 유전자의 변화를 평가하기 위해 RT-PCR를 실시한 결과 호장근 추출물은 사람의 섬유아세포(human fibroblast cell)가 자외선의 자극에 의해 증가되는 MMP-1과 MMP-3 발현을 농도 의존적으로 억제시켰다(Fig. 12). 따라서 호장근 추출물의 경우 매우 우수한 collagenase, elastase, gelatinase 활성 억제작용은 물론 MMP-1, MMP-3의 활성을 모두 억제하므로 피부재생, 피부노화 및 피부주름 개선에 활용 가능성이 많을 것으로 생각된다.

지금까지 실험에서 항산화력, 항염증, 항알레르기 효능을 비롯하여 피부 주름발생 억제 효능에서 우수한 효과를 나타낸 호장근 추출물을 대상으로 호장근 추출물을 구성하는 여러 유효 성분 중 피부질환 및 피부미용 관련 기전에 대한 약효물질이 무엇인지를 규명하기 위해, 호장근을 새롭게 구입하여 메탄올로 호장근 추출물을 제조한 후, 화학적 분리법을 활용해 유효성분을 분리

하고 이 물질들의 효소 활성 억제력을 평가하였다.

분획과정에서 8개 분획물(compound 1~compound 8)을 대상으로 collagenase 활성 억제력에 대한 실험에서 compound 3(chloroform추출물)이 호장근 추출물보다 강력한 효소 억제력을 보였으며, compound 4(emodin)와 compound 6(emodin-6-O-β-D-glucoside) 역시 호장근 추출물과 유사한 수준의 효소 활성 억제력을 보였고, 이들 분획물들은 모두 농도 의존적인 효소 활성 억제력을 보였다. Elastase 활성 억제력 실험에서는 compound 3과 compound 6이 최초로 추출한 호장근보다 더욱 강력한 효소 억제력을 보였으며, compound 4 역시 호장근 추출물과 유사한 수준의 효소억제력을 보였으며, 이들 분획물들은 모두 농도의존성을 보였다. 또한 gelatinase 활성 억제력 실험에서 compound 3이 호장근 추출물보다 강력한 glectinase 억제력을 보였으며, compound 6도 호장근 추출물과 유사한 수준의 효소 활성 억제력을 보였으며, 이들 또한 모두 농도 의존성을 보였다.

이상의 실험에서 compound 4, compound 6 그리고 성분이 확인되지 않은 compound 3이 collagenase, elastase 및 glectinase에 대한 효소 활성 억제력이 우수함을 확인하였다. 본 연구에서는 compound 3에 대한 추가적인 연구를 실시하여 compound 3이 10여종의 물질로 구성되어 있음을 확인하였으나 이들 물질에 대한 성분규명을 아직 하지 못한 아쉬움이 남는다. 이상의 결과를 통해 호장근 추출물은 진피를 구성하는 구성하고 있는 구조단백질인 collagen과 elastin을 분해하는 효소인 collagenase, elastase, glectinase의 활성을 억제하며, 이는 호장근 추출물속에 포함된 유효성분인 emodin과 emodin-6-O-D-glucoside 등에 의한 것임을 규명하였다. 비록 본 연구에서

collagenase, elastase 및 glectinase의 활성 억제력을 지닌 모든 물질의 규명에는 성공하지 못했지만, 호장근 추출물의 유효성분인 emodin이 피부 미용 효과를 위해 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 호장근 추출물은 우수한 항산화력을 보였으며, 양호한 NO 생성 억제 및 TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 유전자 발현 억제를 통한 항염증 효과, 항알레르기 효과인 IL-8, TNF-α 분비량 억제, 우수한 collagenase, elastase, gelatinase 활성 억제력과 MMP-1, MMP-3 유전자 발현 억제를 통한 피부주름 개선 효과 등을 보인 점을 고려할 때, 응용법의 개발 등 체계적인 연구가 이루어진다면, 피부 질환 및 피부 미용에 대한 활용가치가 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

가자, 모과, 목별자, 호장근 추출물을 대상으로 세포 독성을 평가한 후, 항산화력, 항염증, 항알레르기 효과, 주름 개선 효과 등을 평가하였다. 또한 거의 모든 부분에서 우수한 효과를 나타낸 호장근 추출물의 유효성분연구를 추가로 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가자, 모과, 목별자, 호장근 추출물을 대상으로 MTT법으로 세포 독성을 평가한 결과, 실험을 주로 실시한 농도인 50 μg/ml에서 4종의 추출물 모두에서 미미한 세포 독성을 나타내었다.
2. 항산화력은 50 μg/ml와 10 μg/ml의 농도에서 가자 98.5%와 89.6%, 모과 추출물 21.2%와 6.1%, 목별자 추출물 9.0%와 4.0%, 그리

고 호장근 추출물이 81.1%와 29.3%로 가자, 호장근 추출물이 우수한 억제 효과를 나타내었다.

3. NO 생성 억제력을 측정한 결과, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 가자 추출물 37.3%와 24.2%, 모과 추출물 41.6%와 32.1%, 목별자 추출물 45.1%와 18.2%, 그리고 호장근 추출물이 56.5%와 30.4%로 4종 약물 모두 우수한 억제 효과를 나타내었다.
4. TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 COX-2 유전자의 변화를 평가한 결과, 호장근 추출물만이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유전자의 발현을 각각 33.6%, 60.0%, 92.3%, 75.3% 억제시켰으며, TNF- α 의 분비량 측정에서도 호장근 추출물만이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 31.4% 억제 효과를 나타내었다.
5. HMC-1 세포에서 생성되는 IL-8, TNF- α 분비량 억제력을 측정한 결과 호장근 추출물만이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 87.5%, 41.5% 억제 효과를 나타내었다.
6. MMP-1, MMP-3 유전자 발현억제력이 호장근 추출물에서 농도 의존성 억제 효과를 나타내었다.
7. 호장근 추출물을 화학적 분리법을 활용하여 유효성분을 분리한 후 이들 물질들의 효소 활성 억제력을 평가한 결과, emodin과 emodin-6-O- β -D-glucoside 등이 우수한 억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과 호장근 추출물은 우수한 항산화

력, 양호한 NO 생성 억제, TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 유전자 발현 억제, 항알레르기 효과인 IL-8, TNF- α 분비량 억제, collagenase, elastase, gelatinase 활성 억제 및 MMP-1, MMP-3 유전자 발현 억제 효과가 있어 피부 질환 및 피부 미용에 대한 활용가치가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 송점식. 韓方皮膚美容. 서울:도서출판 효림. 1993:19-20.
2. 대한피부과학회 교과서편찬위원회 편저. 皮膚科學. 서울:麗文閣. 2000:45,72-83,694.
3. 이진아, 이원주. 마황근과 화피 추출물의 국소 도포에 따른 피부주름의 변화에 대한 연구. 대한피부과학회지. 2004;42(11):1396-405.
4. 손호용 외. 피부 여드름 치료제 개발을 위한 천연물의 항균활성 검색. 안동대학교식품영양학과. 한국. J. Microbiol. Biotechnol. 2006; 42(3):265-77.
5. 최옥희 외. 천연물 도포가 UVB 파로 손상된 C57BL/6 mouse 피부의 색소침착과 염증생성에 미치는 영향. 한국환경보건학회지. 2006; 32(5):492-8.
6. 이태헌. 보리, 현미, 울무의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원. 2003:1-26,126.
7. 이태완. 유백피 추출물을 함유한 하이드로겔 패치의 주름 억제 효과. 약제학회지. 2004; 34(3):193-9.
8. 辛民教. 臨床本草學. 서울:南山堂. 1986:476-7.
9. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울:永林社. 1994:420-1.
10. 한방약리학 교재편찬위원회. 한방약리학. 서울:신일출판사. 1992:469-71.

11. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis. potential role of reactive oxygen. J. Immunol. 2000; 164:6509-19.
12. Hsu CY, Chan YP, Chang J. Antioxidant activity of extract from *Polygonum Cuspidatum*. Biol Res. 2007;40:13-21.
13. Kim KW, Ha KT, Park CS, Jin UH, Chang HW, Lee IS, Kim CH. *Polygonum Cuspidatum*, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in RAW 264.7 macrophages. Vascul Pharmacol. 2007;47:99-107.
14. Chang JS, Liu HW, Wang KC, Chen MC, Chiang LC, Hua YC, Lin CC. Ethanol extract of *Polygonum Cuspidatum* inhibits hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line. Antiviral Res. 2005;66:29-34.
15. 김정연. 호장근에 의한 NO 형성억제가 Adjuvant로 유도된 관절염에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 1997;7(1):46-63.
16. 문숙임 외. 식용식물의 항산화효과 검색과 산초의 항산화성분. 한국영양식량학회지. 1994; 23:466-71.
17. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of Ginkgo biloba extract and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. Chem. Biol. Interact. 2001;137:43-58.
18. Nodengele MM, Bellone CJ, Lechner AJ and Matuschak GM. Brief hypoxia differentially regulates LPS-induced IL-1 β and TNF- α gene transcription in RAW 264.7 cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000; 278:1289-96.
19. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Immunol Methods. 1986;89:271-7.
20. 김봉인 외. 피부과학. 서울:형설출판사. 2001; 1, 71-5, 153-5.
21. 陳言. 三因方. 서울:翰成社. 1997:325.
22. 王燾. 外臺秘要. 北京:人民衛生出版社. 1982: 107, 625-31.
23. 薛己. 薛己醫案. 서울:成輔社. 1977:349-55.
24. LG생활과학연구소. ESTHETIC. 대전:LG생활건강. 2001:33-42, 105-61, 235-41.
25. 李時珍. 本草綱目. 上海:綿章圖書局. 1980:18.
26. 이태규. 호장근으로 분리된 emodin의 혈관신생 억제활성. 서울:우석대학교 생명공학부. 2003:53.
27. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1995:71-104, 175-91.
28. 박광균. 구강생화학. 서울:군자출판사. 1999: 318-25.
29. 김용규 외. 넵취 정유의 murine macrophage Raw 264.7 세포에서의 in vitro 항암효과. 약학회지. 2002:343-7.
30. Aeberli D, Oertle S, Mauron H, Reichenbach S, Jordi B and Villiger P. Inhibition of the TNF-pathway use of infliximab an etanercept as remission-inducing agents in case of therapy-resistant chronic inflammatory disorders. Swiss Med. Wkly. 2002;132:414-22.
31. 노민수 외. 리포폴리사카라이드에 의해 유도되는 대식세포의 프로스타글란딘 생합성을 저해하는 천연물의 탐색. 약학회지. 1998;42

- :558-66.
32. 문태철 외. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지. 1998;42:214-9.
 33. Feldman M, Taylor P, paleolog E, Brennan F.M, Maini R.N. Anti-TNF- α therapy is useful in rheumatoid arthritis and Crohn's disease, analysis of the mechanism of action predicts utility in other disease. Transplant Proc. 1998;30:4126-7.
 34. 康秉秀. 한방 임상알레르기. 서울:成輔社. 1998:22-3.
 35. 노석선. 原色 皮膚科學. 서울:(주)아이비씨기획. 2006:85-6, 122.
 36. 김경동. 한방 천연식물의 항산화 및 자외선 흡수에 관한 연구. 한국미용학회지. 2004; 10(2):145-53.
 37. 강원형. 피부질환 아틀라스. 서울:도서출판 한미의학. 2003;8, 137, 259-60, 289-93, 337-40, 369-71, 381-4.
 38. 김선미 외. 피부미용을 위한 피부과학. 서울:현문사. 2005:18.
 39. Inomata S, Matsunaga Y, Amano S, Takada K, Kobayashi K, Tsunenaga M, Nishiyama T, Kohno Y, Fukuda M. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse.1. J Invest Dermatol. 2003;120:128-4.
 40. 조영호 외. 에틸 아세테이트층의 항산화 활성과 Matrix Metalloproteinase-1 발현 저해효과. 대한화장품학회지. 2005;31(1):103-9.
 41. Chun J H, S W Kang, J Varani, J Lin, G J Fisher and J J Voorhees. Decreased extracellular signal regulated kinase and increased stress activated MAP kinase activities in aged human skin in vitro. J. Invest. Dermatol. 2000;115:177-82.
 42. MacNaul K L, Chartrain N, Lar M, Tocci M J and Hutchinson N I. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rheumatoid human synovial fibroblast. J. Biol. Chem. 1990;48: 17238-45.
 43. Suzuki K, England J J, Morodomi T and Salvasen G. The activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinases-3(stromelysin). J. Biol. Chem. 1990;29:10261-70.