Journal of Radiation Industry 10(4) : 231~242(2016)

옥수수수염, 들깻잎 및 포도줄기 복합추출물의 UVB 조사 피부 손상 및 Compound 48/80 유도 가려움증 개선 효과

조병옥[1,2,†] · 신재영[2,†] · 데니스[2] · 황영민[2] · 이현서[2]
유 철[3] · 최지원[4] · 장선일[1,2,5,*]

[1](주)아토큐앤에이, [2]전주대학교 보건관리학과, [3](주)향미원
[4]전주대학교 방사선학과, [5]전주대학교 농생명치유산업연구소

Improvement Effect of Corn Silk, Perilla Leaf and Grape Stem Extract Mixture against UVB-Induced Skin Damage and Compound 48/80-Induced Pruritus

Byoung Ok Cho[1,2,†], Jae Young Shin[2,†], Denis Nchang Che[2], Young Min Hwang[2], Hyun Seo Lee[2], Cheol Ryu[3], Jiwon Choi[4] and Seon Il Jang[1,2,5,*]

[1]*Ato Q&A Coperation, 303, Chenjam-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 55069, Republic of Korea*
[2]*Department of Healthcare & Science, Jeonju University, 303, Chenjam-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 55069, Republic of Korea*
[3]*Hyangmiwon Corporation, 65 Baekgu-myeon, Gonsul-gil, Gimje-si, Jeollabuk-do 54330, Republic of Korea*
[4]*Department of Radiological Sciences, Jeonju University, 303, Chenjam-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 55069, Republic of Korea*
[5]*Agri-Bio Healing Industry Institute, Jeonju University, 303, Chenjam-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 55069, Republic of Korea*

Abstract - This study was conducted to evaluate the synergistic protective effects of mixtures of corn silk, perilla leaf and grape stem extract (CPG mixture) against UVB-induced skin damage and compound 48/80-induced pruritus in mice. The results showed that treatment with CPG mixture exhibited much stronger suppressive effect on erythema and melanin index as well as melanin formation than treatment with ascorbic acid (AA) in UVB-irradiated mice. Moreover, the treatment with CPG mixture showed ameliorative effect on immune cell infiltration and collagen fiber destruction in UV-irradiated mice. The treatment with CPG mixture inhibited glutathione (GSH) depletion, lipid peroxidation and production of pro-inflammatory cytokines in UVB-irradiated mice. Furthermore, the treatment with CPG mixture inhibited compound 48/80-induced scratching behavior and histological changes in mice. Taken together, these results indicated that CPG mixture has potentials as functional and therapeutic materials against skin damage and itch-related skin diseases.

Key words : Corn silk, Perilla leaf, Grape stem, UVB-induced skin damage, Scratching

† These authors contributed equally to this work.
* Corresponding author: Seon Il Jang, Tel. +82-63-220-3124, Fax. +82-63-220-2054, E-mail. sonjjang@jj.ac.kr

서 론

피부는 포유동물의 가장 큰 기관으로 체내의 수분 손실을 예방하고 화상, 방사선, 알레르기 유발물질, 박테리아, 바이러스 등의 외부 환경 인자로부터 신체를 보호하는 기능을 한다(Darlenski *et al*. 2011). 피부는 조직학적으로 표피, 진피, 피하조직의 3층으로 구성되어 있으며 이 중 표피는 가장 외부에 존재함으로써 피부 노화의 측면에서 가장 중요한 역할을 하며 피부 미용 분야에서도 가장 집중적인 연구 대상이 되고 있다(Kwon *et al*. 2005).

자외선(ultraviolet, UV), 흡연, 대기오염, 환경 호르몬 등 피부에 영향을 미치는 대표적인 환경요인 중 UV는 비타민 D 합성, 살균작용, 혈액순환 촉진 등 이로운 점이 많지만, 지나친 UV에 노출되면 홍박, 색소침착, 피부암을 유발할 뿐만 아니라 피부가 거칠어지고 주름이 생겨 피부 노화를 촉진한다(Imokawa 2009; Yoon *et al*. 2013). UV에 노출되면 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성에 의한 산화스트레스가 발생하여 DNA, 단백질, 지질 같은 세포 구성 성분이 손상을 받아 결국 피부 주름이 증가하고 탄력이 감소하여 노화가 유발된다(Hwang *et al*. 2012; Yoon *et al*. 2013; Kong *et al*. 2015). 또한 UV는 중성구(neutrophils), 대식세포(macrophages), 비만세포(mast cells) 등의 염증세포 침윤과 더불어 다양한 전염증성 인자들을 생성하여 염증 반응을 가속화시키고 피부 손상을 악화시킨다(Chung *et al*. 2001; Clydesdale *et al*. 2001).

옥수수수염은 비만, 신장질환, 당뇨 등의 치료에 사용되어 왔으며(Cha *et al*. 2016), 옥수수수염 추출물은 maysin을 비롯한 isoquercitrin, allantoin, stigmasterol, hordenine, resin, cryptoxanthin, anticyanins 등의 다양한 기능 물질을 포함하고 있고(Maksimović *et al*. 2005; Kim *et al*. 2014), 주요 플라보노이드 성분인 maysin은 항산화와 신경보호 효능이 있다고 보고되었다(Byrne *et al*. 1996; Choi *et al*. 2014). 들깨의 기능성분으로는 주성분인 rosmarinic acid를 비롯해 luteolin, caffeic acid, apigenin 등이 알려져 있으며(Cho *et al*. 2011; Lee *et al*. 2014), 이 중 주성분인 rosmarinic acid는 항염증, 항산화 및 항알러지 효과가 보고된 바 있다(Huang *et al*. 2009; Zhu *et al*. 2014). 포도는 레스베라트롤, 안토시아닌, 탄닌, 퀘세틴 등 폴리페놀 성분이 풍부하고, 항암, 항산화, 항노화 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Yoon *et al*. 2014). 최근에 국내 재배 품종 중 캠벨어얼리 포도줄기에 resveratrol 함량이 가장 많이 포함되어 있다고 보고되었고(Chang *et al*. 2013), 레스베라트롤은 항노화 및 항암 효과가 뛰어나다고 알려져 있다(Baxter 2008; Bishayee 2009). 그러나 이들 물질을 복합적으로 추출한 추출물에 대하여 피부 손상 개선 및 가려움증 억제 효능에 대한 연구는 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 옥수수수염, 들깻잎 및 포도줄기 복합추출물의 자외선 B(UVB)로 조사된 마우스의 피부 손상에 대한 개선 효과 및 compound 48/80(C48/80)으로 유도한 가려움증 유도 마우스에서 가려움증 억제 효과를 통해 복합추출물의 피부면역기능 개선 효과에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 옥수수수염과 들깻잎은 전라북도 김제시 지역특산 농산품 매장에서 구입하였고, 포도줄기는 전라북도 김제시 백구면 포도농장에서 2015년 11월에 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 천연물의 추출

구입한 천연물은 즉시 수돗물로 잘 세척한 후 증류수로 침지하여 물기를 제거한 후 37~40°C가 유지되는 건조기에서 충분히 건조하였다. 잘 건조된 옥수수수염과 들깻잎은 분쇄하여 각각 100 g으로 정량한 후 증류수 2 *l*를 주입하고 1시간 끓인 후 얻어진 추출물을 0.45 μm 필터를 사용하여 여과하고 감압 농축한 후 동결건조기(Eyela FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 건조하였다. 또한, 포도줄기는 분쇄하여 100 g으로 정량한 후 80% 에탄올 용액 2 *l*를 주입하여 1시간 초음파 추출한 후 3일간 상온에서 방치하였다. 추출용액은 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 0.45 μm 필터를 사용하여 여과하고 감압 농축한 후 동결건조기에서 건조하여 실험에 사용하기 전까지 −20°C에서 보관하였다.

3. 세포배양 및 NO 분석

본 실험에 사용된 세포는 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포로 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS (fetal bovine serum, Life Technology, Carlsbad, CA, USA)와 100 units ml^{-1} 페니실린, 100 μg ml^{-1} 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Life Technology) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 최종농도가 2×10^5 cells ml^{-1}가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후 옥수수수염, 들깻잎, 포도줄기 각각의 추출물과 복합물을 100 μg ml^{-1}의 농도로 처리한 다음 1시간 후 lipopolysaccharide (LPS)를 1 μg ml^{-1}의 농도로 처리하여 16시간 배양하였다. 세포배양액 100 μl와 그리스시약(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μl를 혼합하여 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 microplate reader (Tecan Group Ltd.,

Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 질산나트륨(sodium nitrate)으로 표준곡선을 작성하여 NO 생성량을 산출하였다.

4. 실험동물

무균환경에서 사육된 6주령의 수컷 C57/BL과 ICR 마우스는 오리엔트바이오사(익산, 대한민국)에서 구입하였고, 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경은 낮과 밤의 주기를 12시간씩 하였고, 온도(20~22°C)와 습도(50~60%)는 일정하게 유지하였으며, 전주대학교 실험동물위원회의 규정에 준하여 실험하였다(승인번호 #JJU-IACUC-2016-07).

5. UVB 유도 피부 손상 모델유도 및 실험디자인

실험 디자인은 정상군(UVB를 조사하지 않은 대조군), UVB 조사군, UVB 조사+옥수수수염, 들깻잎, 포도줄기 복합추출물(CPG) 투여군(50 mg kg^{-1}), UVB 조사+옥수수수염, 들깻잎, 포도줄기 복합추출물(CPG) 투여군(100 mg kg^{-1}) 및 UVB 조사+Ascorbic acid (AA) 투여군(10 mg kg^{-1}) 등 5가지로 난괴법에 따라 실험군 당 5마리씩 배정하여 모두 전기면도기로 등쪽 부분을 면도한 후 제모제를 도포하고 물로 깨끗하게 털을 제거하였다. 대조군과 UVB 단독 조사군은 생리식염수를 14일 동안 경구투여하였다. UVB 조사+CPG 투여군과 UVB 조사+AA 투여군은 14일 동안 하루에 1회씩 경구투여하였다. 대조군을 제외한 실험군은 경구투여 후 7일, 10일, 13일 등 3일간 하루에 1회씩 GL20SE UVB 램프(emission peak 306 nm; Sankyo Denki Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 UVB (300 mJ cm^{-2})를 조사하였다. 그 후 24시간 후 표피 두께와 멜라닌 및 홍반지수를 측정하였다.

6. 멜라닌 및 홍반지수 측정

최종 실험일인 14일째 홍반 및 멜라닌 지수는 Multiprobe MPA5 (CK electronic GmbH, cologne, Germany)를 사용하여 측정하였다.

7. 조직학적 평가

실험 최종일인 14일째 마우스를 희생시키고 피부조직을 절취하여 10% 중성 포르말린(pH 7.4)으로 24시간 고정한 후 50~100% 에탄올을 사용하여 탈수하고 xylene으로 세척하는 등 일련의 과정을 거쳐 파라핀메몰 표본을 제작하였다. 제작된 각 실험군의 파라핀메몰 표본은 5 μm 두께로 절편한 후 silane-coated micro slides (Muto-glass, Tokyo, Japan)에 부착하여 hematoxylin & eosin (H&E)과 toluidine blue로 염색한 다음 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 100배 및 400배 시야에서 검경하였다. 또한, 피부 조직에서 호중구 유입 및 활성화는 naphthol AS-D chloroacetate esterase kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 호중구 특정 마커인 neutrophil elastase를 염색하여 확인하였고, collagen fiber (콜라겐 섬유)는 trichrome stain kit (Abcam, Cambridge, MA, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 염색하였으며 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 100배 및 400배 시야에서 검경하였고, 어도비 포토샵 CS6 Extended 프로그램을 사용하여 콜라겐 양을 계산하였고, 정상대조군과의 상대적인 비율로 나타내었다. 멜라닌 형성은 Fontana-Masson staining kit (Abcam, Cambridge, MA, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 염색하였고, 광학현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 400배 시야에서 검경하였다.

8. 피부 용해물(skin lysate) 준비

실험 최종일인 14일째 마우스를 희생시키고 피부조직을 절취하여 차가운 식염수로 씻은 후 액체 질소에서 빠르게 얼려서 분석 전까지 −80°C에 보관하였다. 피부조직은 10 ml의 차가운 용해 완충액(50 mM Tris, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4, 1% NP40, 0.02% NaN_3, 1 mM PMSF+protease inhibitor cocktails)으로 균질화시키고, 4°C에서 20분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 깨끗한 튜브에 옮긴 후 다음 실험에 사용하였다.

9. 지질과산화(lipid peroxidation) 분석 및 글루타치온(GSH) 함량 측정

지질과산화(lipid peroxidation) 분석과 글루타치온(GSH)은 각각 MDA ELISA kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)와 GSH assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 제조업자의 프로토콜에 따라 측정하였다.

10. TNF-α 및 IL-6 수준 분석

TNF-α와 IL-6 정량은 ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 제조업자의 프로토콜에 따라 사용하여 수행하였다.

11. 가려움 억제 효능 평가

실험 디자인은 순화된 ICR 마우스를 대상으로 난괴법에 따라 군당 5마리씩 정상군, C48/80 (Comound 48/80: Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA) 처리 대조군, C48/80+CPG (100 mg kg^{-1})처리군, C48/80+프레드니솔론(10 mg kg^{-1}) 처리군으로 4군을 설정하였다. 가려움증 유도 및 긁는 행동 측정은 스트레스가 해소된 ICR 마우스는 실험군당 5마리의 마

우스를 각각 투명 아크릴 케이지(20×26×13 cm)에 한 마리씩 넣고, 안정을 위해 30분 동안 동일한 실험환경에 방치한 후 대조군은 생리식염수를 경구투여하였다. 그 후 60분에 C48/80 (50 μg site^{-1})의 농도로 100 μl씩 마우스 등의 양쪽 어깨 사이 높이에 피하주사하여 가려움증 유발물질을 주사한 마우스는 곧바로 Mihara *et al*. (2004)의 방법을 따라 micro-camera (ONCCTV, 서울, 대한민국)를 사용하여 60분 동안 녹화하였으며, 뒷발로 가려움증 유발물질이 주입된 부위를 긁는 횟수를 이중맹검법으로 계수하여 평가하였다. 피부조직 염색은 H&E stain (Hematoxylin & Eosin)과 toluidine blue 염색으로 실시하였다. 피부조직 약 5×5 mm를 적출하여 4% paraformaldehyde (pH 7.4)로 고정하고 일련의 과정을 통하여 파라핀 블록을 제작한 후, 5 μm 두께로 절편하였고, 조직 절편은 탈파라핀과 함수 과정을 거친 후 H&E과 toluidine blue로 염색하여 현미경 (×100, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

12. 통계처리

모든 실험값은 평균 또는 평균±표준편차로 표시하였고, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 $p<0.05$로 정하였다.

결 과

1. 옥수수수염, 들깻잎 및 포도줄기 복합추출물의 UVB 유도 피부 손상 및 색소침착 개선 효과

이전 in vitro 실험에서 옥수수수염, 들깻잎, 포도줄기 각각의 추출물과 여러 비율(40 : 40 : 20, 45 : 45 : 10, 35 : 35 : 30)로 혼합한 복합추출물을 RAW 264.7 세포에 150 μg ml^{-1}까지 처리한 결과 세포독성이 나타나지 않았으며(data not shown), 100 μg ml^{-1}의 추출물을 처리하고 NO 생성 억제 효능을 조사한 결과, 위 세 가지 비율 중 40 : 40 : 20의 중량비로 혼합한 복합추출물에서 가장 우수한 NO 생성 억제 효능을 보였다(Fig. 1). 따라서, 단독처리에 비해 시너지 효과가 있다는 것을 확인하였고, 본 연구에서는 효과가 우수한 40 : 40 : 20의 중량비로 혼합한 옥수수수염, 들깻잎 및 포도줄기의 혼합 추출물(CPG 복합추출물)을 사용하여 UVB 유도 피부 손상 마우스에서 개선 효과를 확인하였다. 먼저 CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스 피부 손상에 대한 개선 효과를 알아보기 위하여 UVB 조사된 피부의 형태학적 변화를 확인하였다. 그 결과 Fig. 2A와 같이 정상대조군에 비해서 UVB로 조사된 대조군은 피부 각질화 현상 및 손상 정도가 현저히 증가하였다. 그러나 CPG 복합추출물로 처리된 실험군의 피부 각질화 및 피부 손상이 개선되는 효과가 있었다.

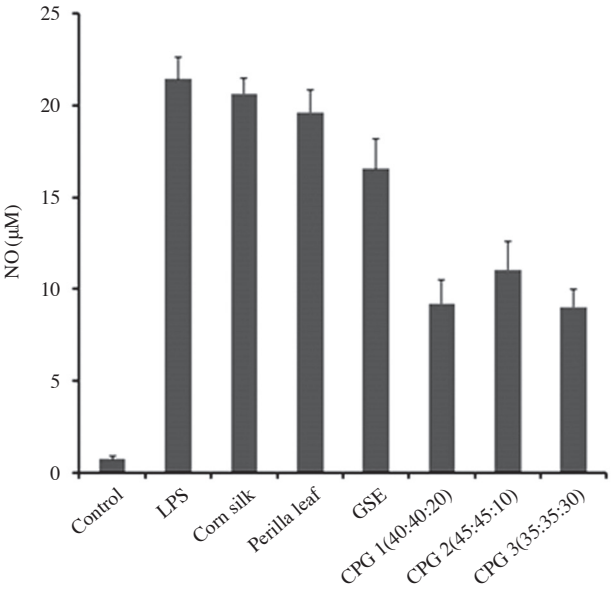

Fig. 1. Effects of each extract and CPG mixture on NO levels in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with 100 μg ml^{-1} of each extract and CPG mixture. for 1 h and then incubated for 16 h with LPS (1 μg ml^{-1}). The culture supernatant was subjected to NO assay.

이러한 효과는 참고 약물인 AA 처리군에 비해서 개선되는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스에서 미백 효능을 나타내는지 확인하기 위하여 피부색을 결정하는 주요 지표인 멜라닌 지수와 홍반도를 측정하였다. Fig. 2B와 2C에서 나타낸 바와 같이 UVB 조사군에서는 정상군에 비해 멜라닌 지수가 약 2.82배 증가하였고, 홍반도는 약 2.54배 증가하였다. 하지만 CPG 복합추출물 50 mg kg^{-1} 처리군, CPG 복합추출물 100 mg kg^{-1} 처리군과 참고 약물인 AA 처리군은 증가한 멜라닌 지수와 홍반도를 감소시키는 것을 확인하였으며, 특히 참고 약물인 AA 처리군에 비해 CPG 복합추출물이 더 뛰어난 억제 효과를 나타내었다. 또한 CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스의 멜라닌 형성을 억제하는지 확인하기 위해 피부 조직을 Fontana-Masson 염색을 실시하였다. 그 결과 UVB 조사군에서는 정상군에 비해 표피에 검은색으로 멜라닌 점들이 확연히 증가하였지만, CPG 복합추출물 처리군과 참고 약물인 AA 처리한 군은 이러한 멜라닌 형성을 뚜렷하게 완화하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

2. CPG 복합추출물의 UVB 유도 조직학적인 변화에 대한 개선 효과

다음으로 CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스 피부 손상에 대한 피부조직의 조직학적인 변화를 알아보기 위하여 hematoxylin과 eosin 및 toluidine blue로 염색하여 각 실험군별 피부조직의 형태 및 염증세포와 비만세포를 관찰하

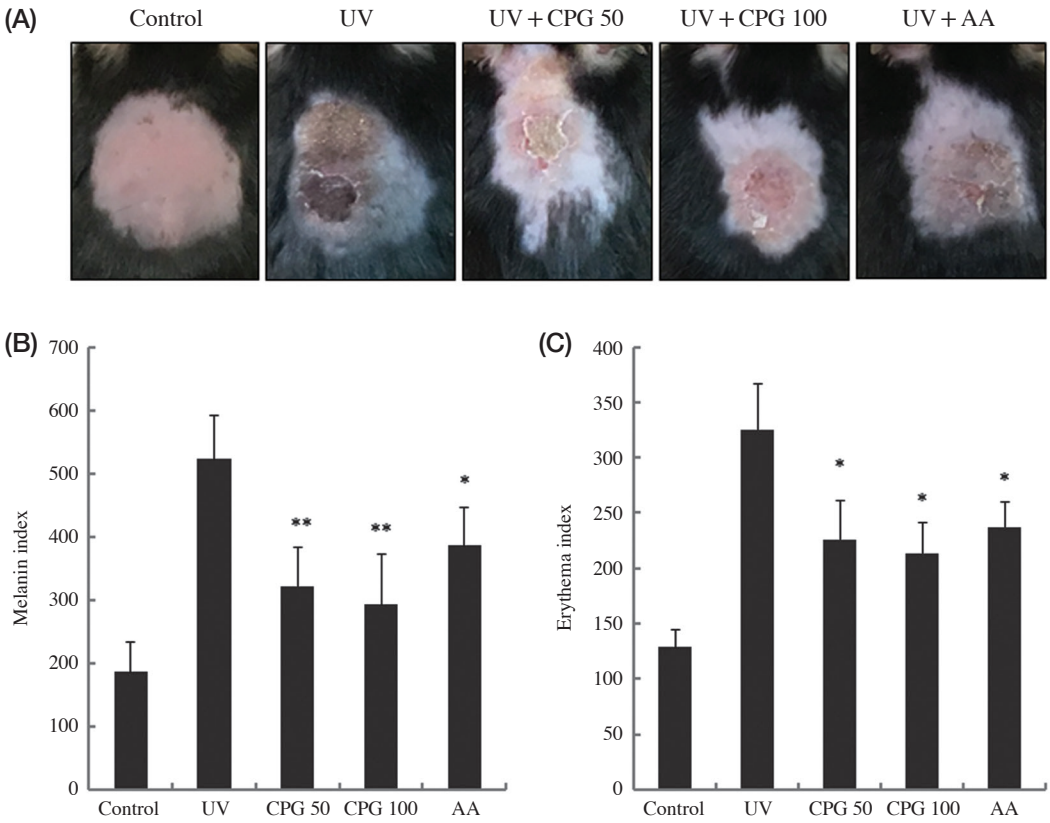

Fig. 2. Effects of CPG mixture on UVB-induced skin damage. (A) Morphological changes of mouse skin. Effects CPG mixture on UVB-induced skin melanin and erythema index. Skin melanin index (B) and erythema index (C) were measured using Multiprobe MPA5. Values are noted as the mean ± SD. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ vs. UVB irradiation alone.

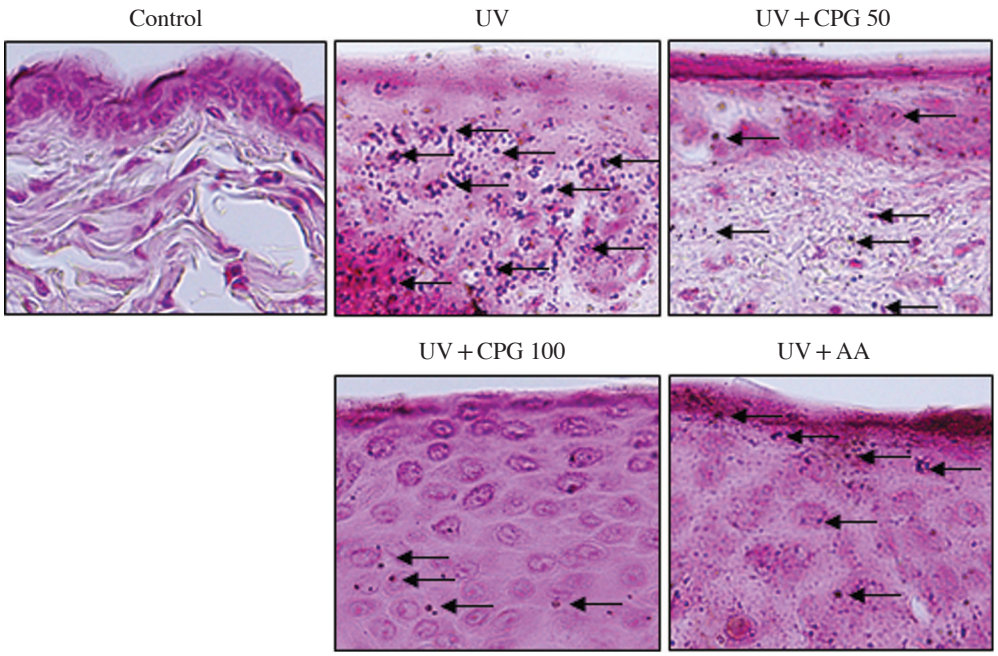

Fig. 3. Effects of CPG mixture on UVB-induced melanin formation. After CPG mixture administration followed by UVB exposure, skin samples were excised and Fontana-Masson staining was performed. Melanin spots were observed using microscope at a magnification of ×400. Arrows and black spots indicate melanin formation.

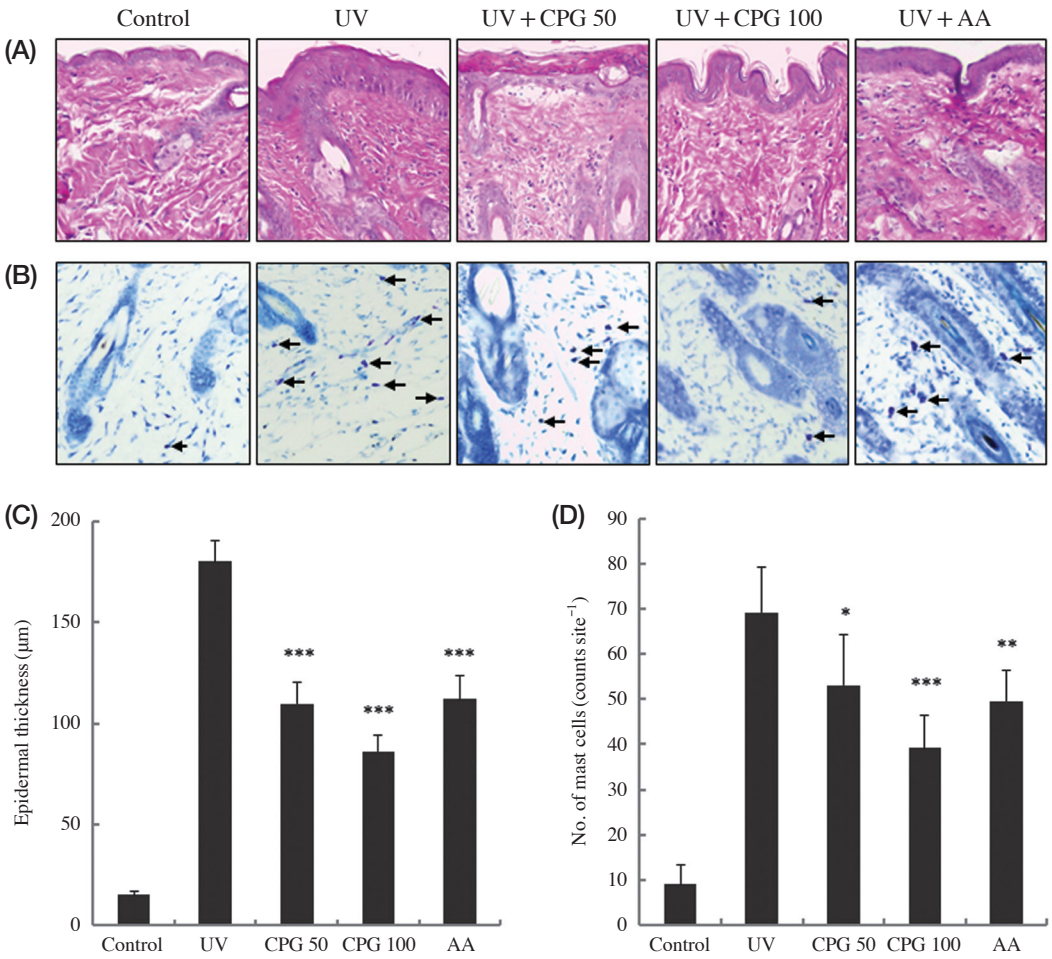

Fig. 4. Effects of CPG mixture on UVB-induced of histological changes. (A) The skin sections were stained with hematoxylin and eosin. (B) Mast cells were stained with toluidine blue. Sections were evaluated using microscope at a magnification of ×100. (C) Epidermal thickness were measured in the hematoxylin and eosin stained dorsal skin. (D) Number of mast cells were measured the cell stained with toluidine blue. Values are noted as the mean ± SD. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ vs. UVB irradiation alone.

였다. Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 UVB 조사군에서는 정상군에 비해 염증세포의 침윤과 표피 두께 및 비만세포의 탈과립 증가가 뚜렷하게 확인되었으나, CPG 복합추출물 처리군과 참고 약물인 AA 처리한 군은 염증세포의 침윤과 표피 두께 및 비만세포의 탈과립이 완화되는 것을 확인하였다. 특히, CPG 복합추출물 100 mg kg^{-1} 처리군이 참고 약물인 AA 처리군보다 더 뛰어난 효과를 나타내었다.

3. UVB 조사된 마우스에서 CPG 복합추출물의 neutrophil 활성 억제 효과

다음으로 CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스 피부 손상에서 neutrophil 유입 및 활성화에 대한 효과를 알아보기 위하여 피부 조직을 neutrophil elastase로 염색하여 관찰하였다. Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 UVB 조사군에서는 정상군에 비해 neutrophil 유입이 현저히 증가하였지만, CPG 복합추출물 처리군과 참고 약물인 AA를 처리한 군은 UVB 조사에 의해 증가한 neutrophil 유입을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

4. UVB 조사된 마우스에서 CPG 복합추출물의 collagen fiber destruction 억제 효과

다음으로 CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스 피부 손상에서 피부구조 및 콜라겐 섬유를 확인하여 피부조직의 조직학적인 변화를 알아보기 위하여 등 피부조직에 Masson's trichrome 염색을 실시하였다. Fig. 6에서 나타낸 바와 같이 UVB 조사군에서는 고밀도의 정상군에 비해 collagen fiber destruction 현상이 뚜렷하게 확인되었다. 그러나 CPG 복합추출물 처리군과 참고 약물인 AA를 처리한 군은 이러한 현상을 뚜렷하게 감소시켰다. 이러한 결과는 CPG 복합추출물에 의한 collagen fiber destruction 억제, 염증세포의 침윤과 비만세포의 탈과립 및 neutrophil 유입 감소를 통해 UVB에 의해 유발한 피부 손상을 개선시키는 것으로 사료된다.

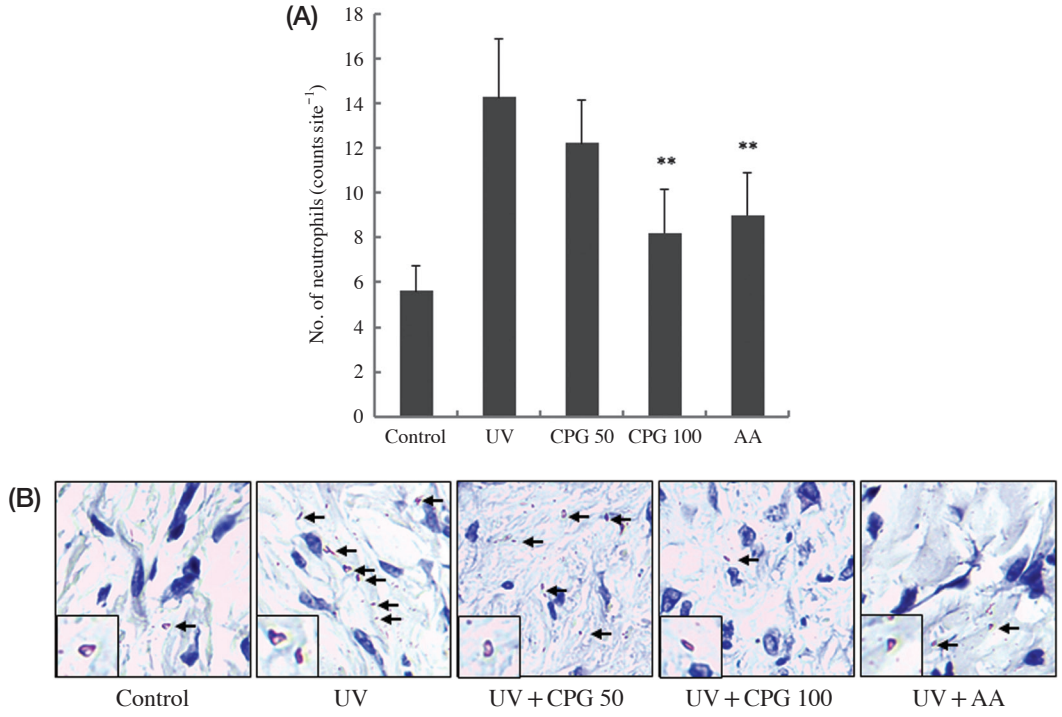

Fig. 5. Effects of CPG mixture on UVB-induced neutrophils infiltration in dorsal skin lesions. The skin sections were stained with naphthol AS-D chloroacetate esterase kit. Sections were evaluated using microscope at a magnification of ×400. Quantification of neutrophils was done by identifying positively staining cells. Arrows indicate neutrophils. Values are noted as the mean ± SD. $^{**}p < 0.01$ vs. UVB irradiation alone.

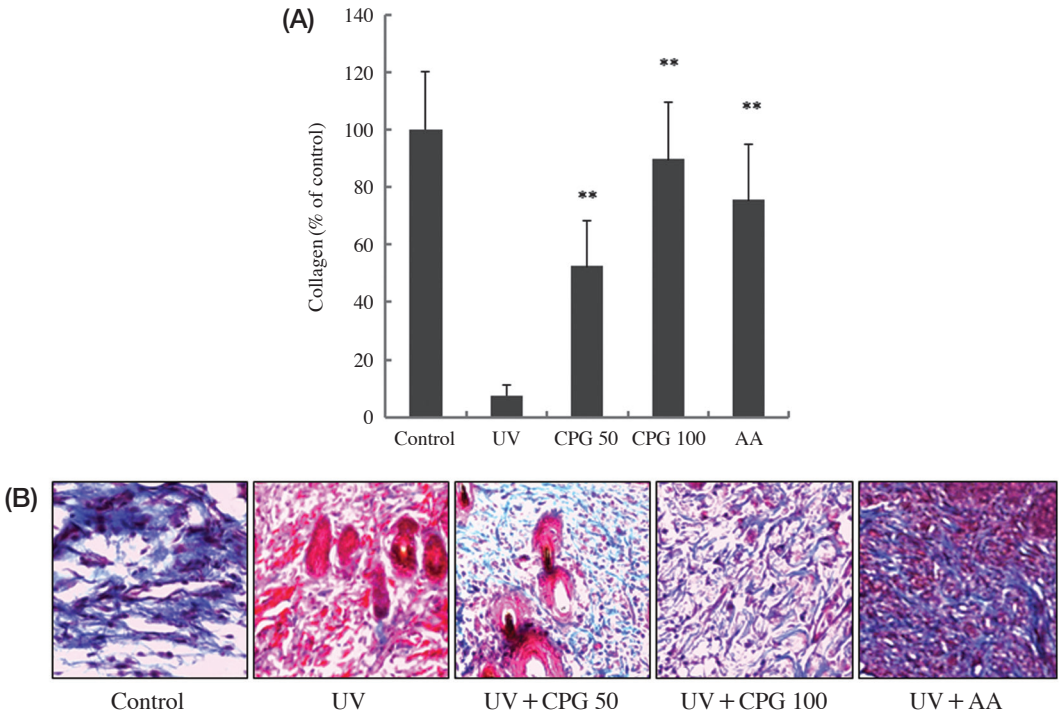

Fig. 6. Effects of CPG mixture on UVB-induced collagen fiber destruction in dorsal skin lesions. The skin sections were stained with trichrome stain kit. Sections were evaluated using microscope at a magnification of ×100. Quantification of collagen was done by identifying positively staining cells. Collagen staining appears blue. Collagen contents were calculated using Adobe photoshop CS6 Extended histogram based on microscopic analysis of the dorsal skin staining. Values are noted as the mean ± SD. $^{**}p < 0.01$ vs. UVB irradiation alone.

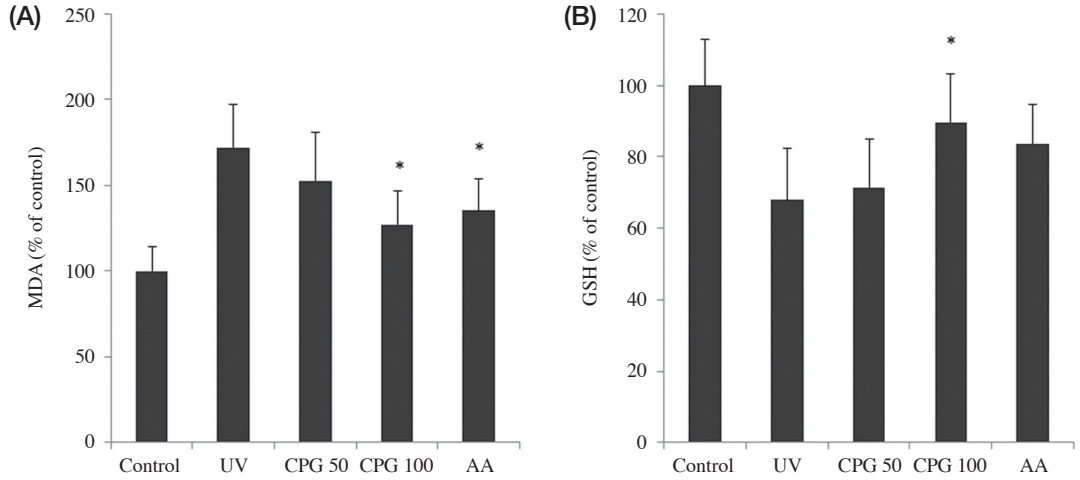

Fig. 7. Effects of CPG mixture on UVB-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in dorsal skin lesions. Tissue homogenates were prepared from mouse skin and tested for lipid peroxidation and glutathione depletion. Values are noted as the mean ± SD. *$p < 0.05$ vs. UVB irradiation alone.

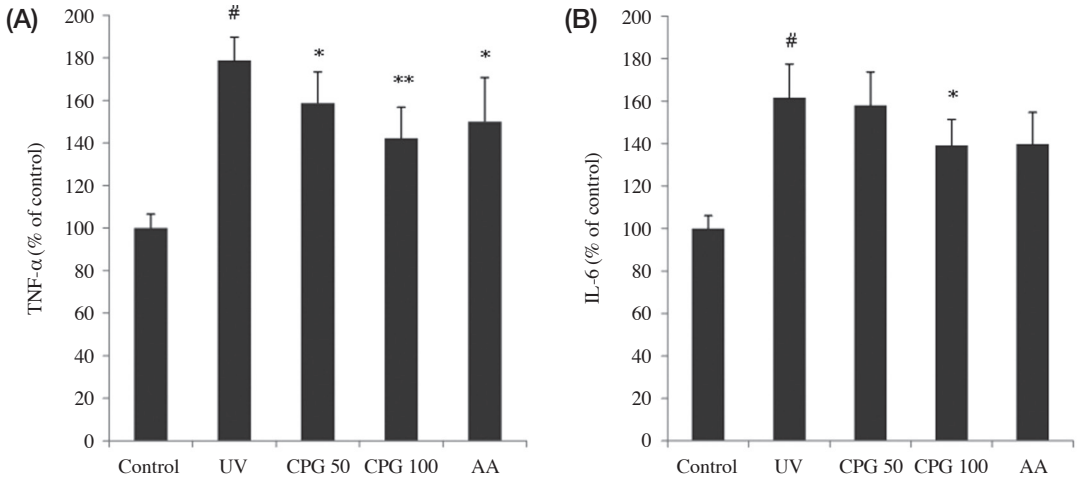

Fig. 8. Effects of CPG mixture on UVB-induced pro-inflammatory cytokinee in dorsal skin lesions. Tissue homogenates were prepared from mouse skin and tested for levels of TNF-α and IL-6 cytokine. Values are noted as the mean ± SD. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ vs. UVB irradiation alone.

5. UVB 조사된 마우스에서 CPG 복합추출물의 MDA 및 glutathione 변화에 대한 효과

CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스 피부 손상에서 지질과산화 반응에 대한 억제 효능을 나타내는지 알아보기 위하여 지질과산화 반응 중에 증가하는 malondialdehyde (MDA)를 측정하여 확인하였다. 그 결과 Fig. 7A와 같이 정상대조군에 비해서 UVB 조사군은 과산화지질 반응의 대사산물인 MDA 농도가 뚜렷하게 증가하였지만, CPG 복합추출물로 처리된 실험군의 MDA 농도는 감소하는 효과가 있었다. 또한, UVB로 조사된 마우스에서 항산화 효능을 확인하기 위하여 항산화제인 glutathione (GSH)의 변화를 확인하였다. 그 결과 Fig. 7B에 나타낸 바와 같이 정상대조군에 비해서 UVB 조사군은 GSH 양이 감소하였지만, CPG 복합추출물 처리군은 감소한 GSH를 증가시키는 효과를 보였다.

6. UVB 조사된 마우스에서 CPG 복합추출물의 염증성 사이토카인 변화에 대한 효과

다음은 CPG 복합추출물이 UVB 조사에 의해 유도된 마우스 피부 손상에서 염증 개선 효과를 알아보기 위하여 염증성 사이토카인인 TNF-α와 IL-6의 생성량을 측정하여 조사하였다. 그 결과 Fig. 8과 같이 정상대조군에 비해서 UVB로 조사군은 TNF-α와 IL-6의 생성량이 현저히 증가하였다. 그러나 CPG 복합추출물로 처리된 실험군은 UVB에 의해 증가한 TNF-α와 IL-6의 생성을 억제하는 효과가 있었다.

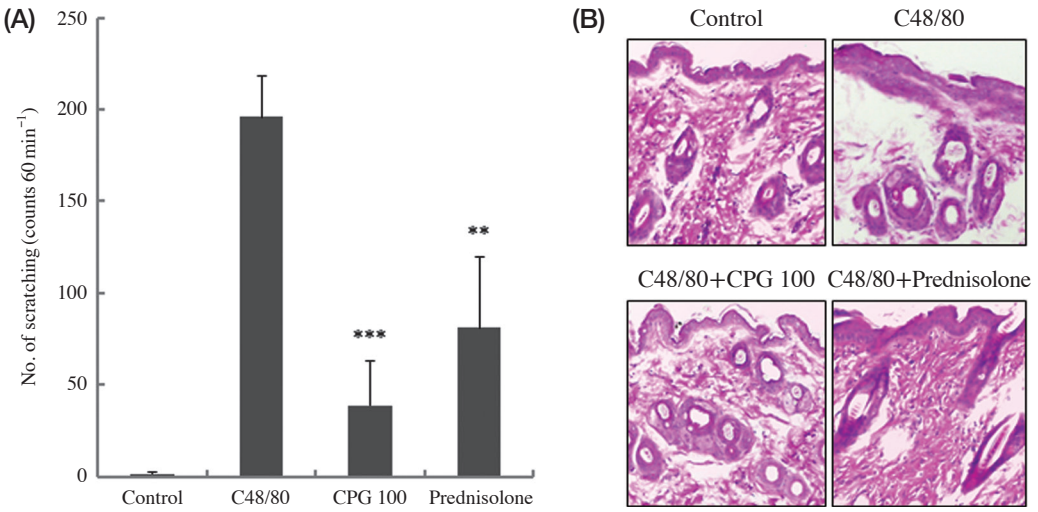

Fig. 9. Effects of CPG mixture on scratching behavior and histological changes in the ICR mice induced by C48/80. (A) Scratching behavior. Values are noted as the mean ± SD. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ vs. C48/80 alone. (B) Histological changes. The skin sections were stained with hematoxylin and eosin. Sections were evaluated using microscope at a magnification of × 100.

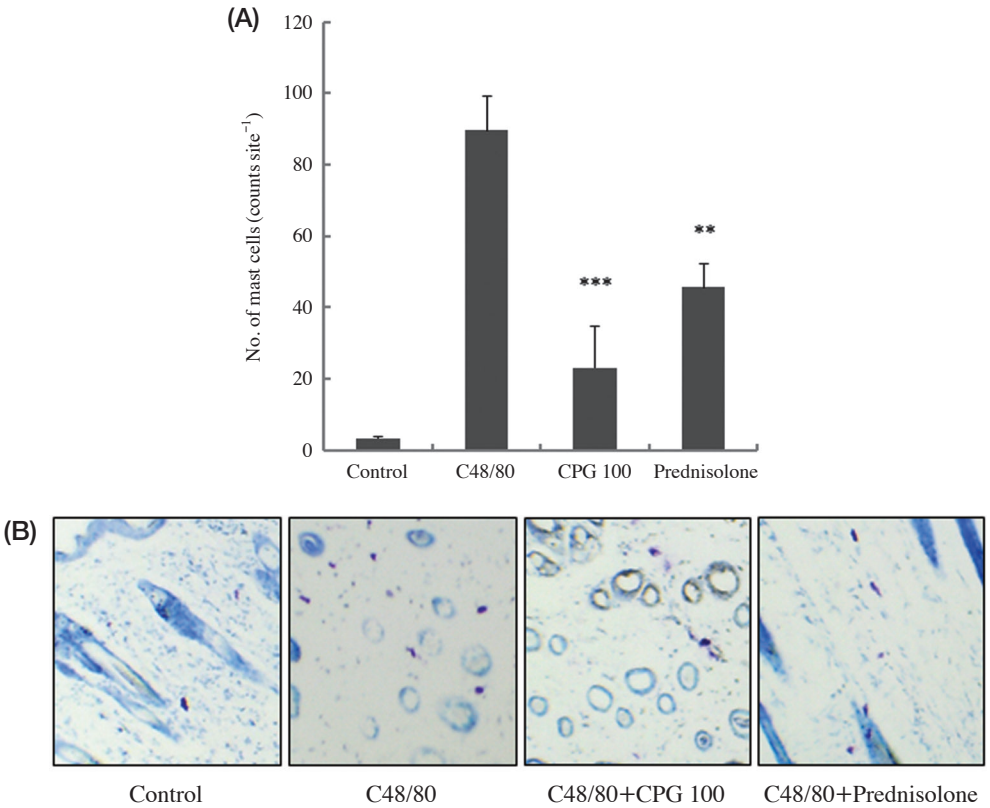

Fig. 10. Effects of CPG mixture on infiltration of mast cells in the ICR mice induced by C48/80. Mast cells were stained with toluidine blue. Sections were evaluated using microscope at a magnification of × 100. Number of mast cells were measured the cell stained with toluidine blue. Values are noted as the mean ± SD. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ vs. C48/80 alone.

7. 급성 가려움증 유발 마우스 모델에서 CPG 복합추출물의 가려움 억제 효과

CPG 복합추출물의 가려움증 억제 효능을 확인하기 위하여 ICR 마우스에 C48/80을 피하주사하여 급성 가려움을 유발하고 확인한 결과 C48/80 투여군은 정상 대조군에 비해서 긁는 횟수가 현저히 증가한 반면, CPG 복합추출물 처리군은 C48/80이 유도하는 가려움증을 억제하는 효능이 우수

하였으며, 조직학적인 피부병변 또한 개선 효능이 뚜렷하였다(Fig. 9). 또한, 가려움을 유발하는 비만세포를 확인한 결과 C48/80 처리에 의해 증가한 비만세포의 탈과립 현상이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10).

고 찰

본 연구에서는 옥수수수염, 들깻잎 및 포도줄기를 활용하여 제조한 복합추출물이 피부 손상 개선 및 가려움증 억제 효과를 상승시키는지 조사하였다. 피부가 UVB에 노출되면 피부 화상 및 홍반이 발생하고, 염증 발생과 함께 멜라닌 세포가 자극을 받아 피부 내에 색소침착이 나타난다(Xiang *et al*. 2015). UV에 노출된 피부는 홍반과 부종과 함께 염증 반응이 발생하는데 비만세포 및 대식세포의 침윤, 호중구의 유입뿐만 아니라 활성화된 염증세포에 의해 IL-1, TNF-α, IL-6 같은 전염증성 사이토카인의 방출을 통해 염증 반응을 가속화시킨다(El-Abaseri *et al*. 2013; Li *et al*. 2013). 더불어, 전사인자인 nuclear factor kappa B (NF-κB)에 의해 iNOS와 COX-2의 과발현을 통해 NO와 프로스타글란딘 E_2를 증가시킴으로써 염증 반응을 악화시켜 피부 손상을 야기한다(Kuo *et al*. 2016). 본 연구 결과 CPG 복합추출물의 처리는 UVB로부터 유발된 피부 손상 및 각질화 현상과 더불어 멜라닌과 홍반도 지수를 개선함으로써 미백활성을 나타내었다. 더불어 CPG 복합추출물이 UVB로부터 유발된 백혈구 침윤, 비만세포 침윤, 호중구의 유입과 같은 조직학적인 징후들을 개선하였고, 전염증성 사이토카인인 TNF-α와 IL-6의 증가를 억제하는 효과를 보였다. 이러한 결과는 CPG 복합추출물이 자외선 보호 효능이 우수하다는 것을 보여주는 것이라 사료된다.

피부에 UV가 조사되면 각질형성세포로부터 분비되는 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH)의 자극을 받은 멜라닌 형성세포는 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)라 불리는 전사인자에 의해 tyrosinase의 발현을 증가시켜 멜라닌이 생성된다. 화장품 원료로 사용되는 알부틴, 닥나무추출물, 감초추출물등이 이러한 tyrosinase의 활성을 억제하는 것을 주요 target으로 하고 있다(Yoon *et al*. 2013). 본 연구 결과 CPG 복합추출물이 UVB 조사에 의해 증가한 피부 멜라닌 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 오랫동안 UV에 노출되면 멜라닌 생성과 함께 세포의 기질 구조(extracellular matrix, ECM)를 파괴하는 collagenase 활성이 촉진되어 피부 조직 내 collagen이 파괴되어 탄력이 감소되고 주름이 형성된다(Kong *et al*. 2015). 최근 발표에 따르면 옥수수수염 추출물이 피부 색소침착을 억제한다고 보고되었고(Choi *et al*. 2014), 들깨의 플라보노이드 성분인 루테올린과 포도에 다량 함유되어 있으며 천연 항산화제로 알려져 있는 레스베라트롤이 UVB 유도 피부 손상 및 색소침착을 억제하는 효과가 우수하다고 보고되었다(Lim *et al*. 2013; Lee *et al*. 2016). 이전 연구에 따르면 들깨를 비롯한 식물추출물이 멜라닌 합성을 억제하는 효과를 나타내어 새로운 미백 소재로서 가능성을 제시해 주었다(Hwang and Lee 2007). 이러한 결과에 비추어 볼 때 옥수수수염, 들깻잎, 포도줄기 추출물을 함께 사용할 경우 각 추출물의 상승 작용을 통한 미백 활성이 우수함을 나타내는 것으로 사료되며, 기능성 화장품 원료로서 산업적으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단되어진다.

또한 UV에 의해 발생하는 과도한 ROS는 산화스트레스를 야기하여 멜라닌 형성 과정과 주름 형성에 관여하여 피부 손상 유발에 상승 작용을 나타내며 심할 경우 세포사멸이 발생한다(Kong *et al*. 2015; Lee *et al*. 2016). 이러한 과정에서 생성된 ROS는 염증반응과 관련된 NF-κB 신호 체계를 활성화하고, 특히 matrix metalloproteinases (MMPs)를 발현을 자극하여 콜란겐을 분해하여 피부 주름이 형성된다(Yoon *et al*. 2013; Lee *et al*. 2016). 본 연구 결과 CPG 복합추출물이 UVB 조사에 의해 감소한 피부 콜라겐 함량과 항산화제인 글루타치온 함량을 회복시켰으며, 지질과산화의 특징인 MDA 증가를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 CPG 복합추출물이 산화스트레스에 대한 효능이 우수함을 나타내며 기능성 화장품 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

가려움증 유발 물질인 compound 48/80은 마우스에서 급성 가려움증을 유발하여 천연 추출물과 유래 화합물들의 효능 시험에 널리 사용되어져 왔다(Hossen *et al*. 2006; Zhang *et al*. 2010). 비록 옥수수수염이 가려움증과 관련된 아토피나 알레르기에 대한 효능이 알려져 있지는 않지만, 옥수수 껍질은 항아토피 효능이 있다고 보고되었다(Ogawa *et al*. 2005). 들깻잎과 들깻잎의 활성성분인 로즈마릭산은 아토피 및 알레르기에 우수한 효능이 있다고 보고되었으며(Makino *et al*. 2001; Makino *et al*. 2003; Komatsu *et al*. 2016), 또한 포도의 주성분인 레스베라트롤은 항노화, 항염증 및 가려움증을 동반하는 아토피에 우수한 효능이 있다고 보고되었다(Karuppagounder *et al*. 2014). 본 실험 결과 CPG 복합추출물 투여는 compound 48/80이 유도하는 가려움증을 억제하는 효능이 우수하였으며, 또한 조직학적인 피부병변 개선 효능이 뚜렷하였다. 이러한 결과는 옥수수수염, 들깻잎, 포도줄기 추출물을 함께 사용할 경우 각 추출물의 상승 작용을 통하여 가려움증이 억제하는 효과가 있는 것으로 사료되며, 따라서 옥수수수염, 들깻잎, 포도줄기 복합추출물은 기능성 천연소재로서 식품 및 화장품 소재로 다양하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 옥수수수염, 들깻잎 및 포도줄기의 복합추출물을 자외선 B (UVB)로 조사된 마우스 피부 손상에 대한 개선 효과를 확인하고 동시에 가려움 유발물질인 Compound 48/80 (C48/80)으로 유도한 마우스 가려움 유발 행동에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스 피부 손상의 피부 각질화 현상이 줄어드는 결과를 보여 CPG 복합추출물의 처리는 UVB로부터 손상된 피부를 개선하는 데 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스에서 미백 효능을 나타내는지 확인하기 위하여 멜라닌과 홍반도를 측정한 결과 CPG 복합추출물 투여가 증가한 멜라닌 및 홍반도가 감소하여 미백 활성이 우수함을 알 수 있었다. CPG 복합추출물이 UVB로 조사된 마우스 피부 손상에 대한 피부 조직의 조직학적인 변화를 확인한 결과 염증세포의 침윤과 표피 두께, 비만세포의 침윤, neutrophil 유입 및 collagen fiber destruction가 완화되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 CPG 복합추출물 투여가 염증세포의 침윤과 비만세포의 침윤 및 neutrophil 유입 감소, collagen fiber destruction 억제를 통해 UVB에 의해 유발한 피부 손상을 효과적으로 개선시키는 것으로 사료된다. 또한 ICR 마우스에 C48/80을 주입하여 급성 가려움을 유발한 실험군은 정상 대조군에 비해서 긁는 횟수가 현저히 증가한 반면, CPG 복합추출물 처리군은 C48/80이 유도하는 가려움증을 억제하는 효능, 조직학적인 피부병변 및 비만세포의 침윤 현상을 개선하는 효과가 우수하였다. 이상의 결과를 종합해볼 때 CPG 복합추출물이 UVB가 유도하는 피부 손상을 개선하는 우수한 효과가 있어 기능성 식품 및 화장품 소재를 비롯한 다양한 산업적 활용을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 중소기업청의 산학연협력 기술개발사업의 일환으로 수행하였음[C0348845, 옥수수수염과 들깻잎 복합물의 기능 성분을 활용한 옥수수 라떼 개발].

참 고 문 헌

Baxter RA. 2008. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *J. Cosmet. Dermatol.* **7**:2-7.

Bishayee A. 2009. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev. Res. (Phila)* **2**:409-418.

Byrne PF, Darrah LL, Snook ME, Wiseman BR, Widstrom NW, Moellenbeck DJ and Barry BD 1996. Maize silk-browning, maysin content, and antibiosis to the corn earworm, *Helicoveroa zea* (Boddie). *Maydica*. **41**:13-18.

Cha JH, Kim SR, Kang HJ, Kim MH, Ha AW and Kim WK. 2016. Corn silk extract improves cholesterol metabolism in C57BL/6J mouse fed high-fat diets. *Nutr. Res. Pract.* **10**: 501-506.

Chang EH, Jeong SM, Park KS and Lim BS. 2013. Contents of Phenolic compounds and *trans*-resveratrol in different parts of Korean new grape cultivars. *Korean J. Food Sci. Technol.* **45**:708-713.

Cho BO, Park HY, Ryu HW, Jin CH, Choi DS, Kim DS, Lim ST, Seo KI, Byun MW and Jeong IY. 2011. Protective effect of *Perilla frutescens* cv. chookyoupjaso mutant water extract against oxidative injury in vitro and in vivo. *Food Sci. Biotechnol.* **20**:1705-1711.

Choi DJ, Kim SL, Choi JW and Park YI. 2014. Neuroprotective effects of corn silk maysin via inhibition of H_2O_2-induced apoptotic cell death in SK-N-MC cells. *Life Sci.* **109**:57-64.

Choi SY, Lee Y, Kim SS, Ju HM, Baek JH, Park CS and Lee DH. 2014. Inhibitory effect of corn silk on skin pigmentation. *Molecules*. **19**:2808-2818.

Clydesdale GJ, Dandie GW and Muller HK. 2001. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* **79**:547-568.

Chung JH, Seo JY, Lee MK, Eun HC, Lee JH, Kang S, Fisher GJ and Voorhees JJ. 2002. Ultravioletmodulation of human macrophage metalloelastase in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **119**:507-512.

Darlenski R, Kazandjieva J and Tsankov N. 2011. Skin Barrier Function: morphological basis and regulatory mechanisms. *J. Clin. Med.* **4**:36-45.

El-Abaseri TB, Hammiller B, Repertinger SK and Hansen LA. 2013. The epidermal growth factor receptor increases cytokine production and cutaneous inflammation in response to ultraviolet irradiation. *ISRN Dermatol.* **2013**:848705.

Hossen MA, Inoue T, Shinmei Y, Minami K, Fujii Y and Kamei C. 2006. Caffeic acid inhibits compound 48/80-induced allergic symptoms in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **29**:64-66.

Huang N, Hauck C, Yum MY, Rizshsky L, Widrlechner MP, McCoy JA, Murphy PA, Dixon PM, Nikolau BJ and Birt DF. 2009. Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* ethanol extract inhibits lipopolysaccharide-induced prostaglandin E_2 and nitric oxide in RAW 264.7 mouse macrophages. *J. Agric. Food Chem.* **57**:10579-10589.

Hwang IS, Kim JE, Choi SI, Lee HR, Lee YJ, Jang MJ, Son HJ, Lee HS, Oh CH, Kim BH, Lee SH and Hwang DY. 2012. UV radiation-induced skin aging in hairless mice is

effectively prevented by oral intake of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit blend for 6 weeks through MMP suppression and increase of SOD activity. *Int. J. Mol. Med*. **30**:392-400.

Hwang JH and Lee BM. 2007. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J. Toxicol. Environ. Health A*. **70**:393-407.

Imokawa G. 2009. Mechanism of UVB-induced wrinkling of the skin: paracrine cytokine linkage between keratinocytes and fibroblasts leading to the stimulation of elastase. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc*. **14**:36-43.

Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Sreedhar R, Afrin R, Harima M, Suzuki H, Nomoto M, Miyashita S, Suzuki K and Watanabe K. 2014. Resveratrol attenuates HMGB1 signaling and inflammation in house dust mite-induced atopic dermatitis in mice. *Int. Immunopharmacol*. **23**:617-623.

Kim SL, Kim MJ, Lee YY, Jung GH, Son BY, Lee JS, Kwon YU and Park YI. 2014. Isolation and identification of flavonoids from corn silk. *Korean J. Crop. Sci*. **59**:435-444.

Komatsu KI, Takanari J, Maeda T, Kitadate K, Sato T, Mihara Y, Uehara K and Wakame K. 2016. Perilla leaf extract prevents atopic dermatitis induced by an extract of *Dermatophagoides farinae* in NC/Nga mice. *Asian Pac. J. Allergy Immunol*. doi: 10.12932/AP0717 (in press).

Kong SZ, Chen HM, Yu XT, Zhang X, Feng XX, Kang XH, Li WJ, Huang N, Luo H and Su ZR. 2015. The protective effect of 18β-Glycyrrhetinic acid against UV irradiation induced photoaging in mice. *Exp Gerontol*. **61**:147-155.

Kuo YH, Lin TY, You YJ, Wen KC, Sung PJ and Chiang HM. 2016. Antiinflammatory and antiphotodamaging effects of ergostatrien-3β-ol, isolated from *Antrodia camphorata*, on hairless mouse skin. *Molecules*. **21**:1213. doi: 10.3390/molecules21091213.

Kwon MS, Choi TB and Kim GY. 2005. The Effect on the Skin Barrier Function of Ceramide. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*. **3**:131-137.

Lee B, Moon KM, Kim SJ, Kim SH, Kim DH, An HJ, Jeong JW, Kim YR, Son S, Kim MJ, Chung KW, Lee EK, Chun P, Ha YM, Kim MS, Mo SH, Moon HR and Chung HY. 2016. (Z)-5-(2,4-Dihydroxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione prevents UVB-induced melanogenesis and wrinkle formation through suppressing oxidative stress in HRM-2 hairless mice. *Oxid. Med Cell Longev*. **2016**:2761463.

Lee TH, Kang JH, Seo JO, Baek SH, Moh SH, Chae JK, Park YU, Ko YT and Kim SY. 2016. Anti-melanogenic potentials of nanoparticles from calli of resveratrol-enriched rice against UVB-induced hyperpigmentation in guinea pig skin. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **24**:85-93.

Lee Y, Song B and Ju J. 2014. Anti-inflammatory activity of *Perilla frutescens* Britton seed in RAW 264.7 macrophages and an ulcerative colitis mouse model. *Korean J. Food Sci. Technol*. **46**:61-67.

Li WH, Pappas A, Zhang L, Ruvolo E and Cavender D. 2013. IL-11, IL-1α, IL-6, and TNF-α are induced by solar radiation in vitro and may be involved in facial subcutaneous fat loss in vivo. *J. Dermatol. Sci*. **71**:58-66.

Lim SH, Jung SK, Byun S, Lee EJ, Hwang JA, Seo SG, Kim YA, Yu JG, Lee KW and Lee HJ. 2013. Luteolin suppresses UVB-induced photoageing by targeting JNK1 and p90 RSK2. *J. Cell. Mol. Med*. **17**:672-680.

Makino T, Furuta Y, Wakushima H, Fujii H, Saito K and Kano Y. 2003. Anti-allergic effect of *Perilla frutescens* and its active constituents. *Phytother. Res*. **17**:240-243.

Maksimović Z, Malencić D and Kovacević N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresour. Technol*. **96**:873-877.

Mihara K, Kuratani K, Matsui T, Nakamura M and Yokota K. 2004. Vital role of the itch-scratch response in development of spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Br. J. Dermatol*. **151**:335-345.

Ogawa K, Takeuchi M and Nakamura N. 2005. Immunological effects of partially hydrolyzed arabinoxylan from corn husk in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **69**:19-25.

Schaefer H and Redelmeier TE eds. Skin barrier: Principles of percutaneous absorption. Basel: Karger, 1-42 (1996).

Xiang F, Lucas R, de Gruijl F and Norval M. 2015. A systematic review of the influence of skin pigmentation on changes in the concentrations of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in plasma/serum following experimental UV irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci*. **14**:2138-2146.

Yoon CS, Kim DC, Ko WM, Kim KS, Lee DS, Kim DS, Cho HK, Seo J, Kim SY, Oh H and Kim YC. 2014. Anti-neuroinflammatory effects of quercetin-3-O-glucuronide isolated from the leaf of *Vitis labruscana* on LPS-induced neuroinflammation in BV2 cells. *Kor. J. Pharmacogn*. **45**:17-22.

Yoon YM, Bae SH, An SK, Choe YB, Ahn KJ and An IS. 2013. Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*. **11**:417-426.

Zhang Q, Andoh T, Konno M, Lee JB, Hattori M and Kuraishi Y. 2010. Inhibitory effect of methanol extract of *Ganoderma lucidum* on acute itch-associated responses in mice. *Biol. Pharm. Bull*. **33**:909-911.

Zhu F, Asada T, Sato A, Koi Y, Nishiwaki H and Tamura H. 2014. Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic, and α-glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from Perilla leaves. *J. Agric. Food Chem*. **62**:885-892.

Received: 4 October 2016
Revised: 29 November 2016
Revision accepted: 4 December 2016