한방약침소재로서 속수자 초임계추출물의 항산화 및 항노화에 대한 연구

곽병문¹ · 김태준² · 김이화¹

¹세명대학교 한의과대학 경락경혈학교실, ²세명대학교 한의과대학 한방안면비인후과학교실

Anti-Oxidant and Anti-Aging Effect of Supercritical Fluid Extraction of Seed of *Euphorbia lathyris* L. as a Pharmacopuncture Material

Byeong Mun Kwak¹, Tae-Jun Kim², Ee-Hwa Kim¹

¹Department of Meridian and Acupoint, College of Korean Medicine, Semyung University,

²Department of Korean Medicine, Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology,
College of Oriental Medicine, Semyung University

Objectives : The purpose of this study was to investigate the anti-oxidant and anti-aging effect of the seed of *Euphorbia lathyris* L. extracted by supercritical CO₂. **Methods :** Human dermal fibroblast cells dosed with the extract from *Euphorbia lathyris* L. were harvested and the intracellular proteome was analyzed to examine the expression of proteins related collagen synthesis pathway, metalloproteinases (MMPs), extracellular matrix (ECM)-cell interaction, cytokines, and antioxidant enzymes by 2-dimensional gel electrophoresis. **Results :** Fatty acid analysis of the extract from *Euphorbia lathyris* L. showed oleic acid was 84% and linoleic acid was 4.1%. Antioxidative effect was about 53% by beta carotene bleaching assay. In 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) analysis, fifteen protein changes in five mechanisms which were collagen synthesis pathway, MMPs, ECM-cell interaction, cytokines, and antioxidant enzymes were analyzed. **Conclusions :** This study suggests the supercritical extraction from the seed of *Euphorbia lathyris* L. could be used as anti-oxidant substances for pharmacopuncture.

Key words : *Euphorbia lathyris* L., supercritical fluid extraction, anti-oxidant

서 론

피부노화는 햇빛에 노출되어 나타나는 외부적인 노화와 사람이 나이가 들어감에 따라 생리적인 요인으로 나타나게 되는 내부적인 요인으로 구분되어진다. 햇빛에 의한 광노화는 색소침착이나 거친 주름등이 나타나게 되고 생리적으로 발생하는 노화는 표피가 점점 얇아지고 피부 내 수분 이동이 감소되는 것이 특징이다. 이 두 가지

모두 피부를 유연하게 해주는 피부 내의 콜라겐함량이 시간에 따라 줄어들거나 햇빛에 의해 파괴되어 나타나게 된다¹⁾.

속수자(續隨子, *Euphorbia Lathyridis* L. 이하 EUL)는 大戟科 (Euphorbiaceae)에 속한 2년생 본초인 속수자의 성숙한 종자로 햇볕에 말려 사용한다. 식용작물로 1 m 내외로 자라고 실험에 사용된 종자를 얻기 위한 열매는 둥글고 지름이 1 cm 정도이다. 續隨子는 성질이 따뜻하며, 매운 맛을 지닌 본초이다. 속수자의 따뜻한

Received April 8, 2020, Revised May 6, 2020, Accepted May 22, 2020

Corresponding author: Ee-Hwa Kim

Department of Meridian and Acupoint, College of Korean Medicine, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon 27136, Korea
Tel: +82-43-649-1348, Fax: +82-43-649-1702, E-mail: smctc@hanmail.net

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성질은 오장육부 중 간, 신, 대장에서 주로 작용을 한다. 속수자의 대표적인 효능은 3가지 있다. 첫째는 정체되어 있는 수분을 제거하여 부종을 제거하는 것이다. 둘째는 악성종양이 아닌, 근종, 양성종양(benign tumor)을 제거하는 효능이다. 셋째는 피부 등의 인체에 유해한 곤충을 제거하는 효능으로 옴과 같은 질환에 응용할 수 있다. 이와 같은 성질을 바탕으로 속수자는 수종창만(水腫脹滿), 담음(痰飲), 숙채(宿滯), 징하적취(癰瘡積聚), 이변불통(二便不通), 혈어경폐(血瘀經閉), 개선창독(疥癬瘡毒), 사교(蛇咬)에 주로 사용되었다¹⁾. 또, 기름을 짠 박을 이용하여 식중독, 이노제, 부종 등에 쓰인다²⁾.

이 속수자는 한방의약, 식품, 화장품의 원료로 사용가능한 천연 추출방법이라고 알려진 초임계 이산화탄소 추출방법을 이용하여 추출하였다. 이 초임계 이산화탄소 추출방법은 추출장비의 압력을 견디기 위하여 스테인레스를 사용하게 된다. 이 스테인레스는 다른 물질과 반응성이 없어 식품, 제약산업에서 사용하는 것으로 본 실험의 추출물에도 추출에 의한 물리적인 반응이 없는 장점이 있으며, 상온에서 기체상체인 이산화탄소를 사용함으로써 상온에서 모두 날아가기 때문에 잔존용매가 없다. 용매의 순수함, 저렴함, 무독성, 비인화성을 특징으로 하고 있으며 본래 친환경적인 물질을 사용함에 따라 현대의 소비자들의 믿음을 크게 반영할 수 있는 천연물 추출방법이다.

이에 속수자를 이용하여 초임계추출방법을 사용하여 항산화, 항염의 결과로 항노화 관련 약침의 소재로써의 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 속수자

실험에 사용된 속수자는 서울 제기동 경동시장에서 전남 장흥에서 생산된 국내산을 구매하여 수분 5%미만으로 건조하였다. 건조된 속수자는 추출에 사용하기 위하여 roll mill을 이용하여 800~1000 μm 의 사이즈로 파쇄하여 사용하였다.

2. Supercritical fluid extraction

초임계 추출 장비는 추출기 부피 기준 2 L 추출기를 사용하여 추출하였다(Fig. 1). 추출기에 추출할 속수자를 충전 하고 pre-heater를 통과하면서 추출 조건에 맞는 온도의 이산화탄소가 조건에 맞게 가열된 추출기 바닥 쪽으로 들어가게 된다. 추출기에 들어간 초임계상태가 된다. 이 초임계이산화탄소는 파쇄 되어 충전 되

어져 있는 속수자와 접촉하여 속수자 안의 초임계이산화탄소에 녹을 수 있는 물질을 추출하여 추출기 밖으로 나가게 된다. 초임계이산화탄소와 추출물의 혼합된 상태의 유체는 back pressure regulator (BPR)를 지나가게 되면서 감압이 되고 분리기로 들어가게 된다. 이 분리기에서는 초임계이산화탄소가 기체가 되는 조건으로 만들었고 그로 인해 분리기 안에서 추출물은 바닥으로 떨어진 속수자초임계추출물을 수거하였다. 기체가 된 이산화탄소는 냉각기를 지나가게 되면서 액화가 되어 저장소로 이동하여 액체 상태로 저장되어지며 이 액체 이산화탄소는 가압기를 통하여 재사용이 되는 시스템으로 사용하였다. 추출은 10분마다 한 번씩 진행하여 추출물을 얻었다.

3. Fatty acid analysis

Gas chromatography (GC)를 이용하여 속수자초임계추출물의 지방산을 분석하였다. 분석 장비로는 HP 5890 system (HP, 19251A, USA)를 사용하였고 flame ionization detector (FID)를 사용하였다. GC로 분석하기 위해 methylation을 하였다. Fatty acid Standard (C14, C16, C18, C18:1, C18:2, C18:3)는 BF₃ method를 사용하였고 추출물은 methylation으로 2N-KOH/MeOH를 사용하였다. 분석에 쓰인 column은 Supelco SP-2340 Fused Silica Capillary Column (30 m, 0.25 mm (I.D.), 0.20 μm (Film))을 사용하였다.

Fig. 1. The process flow diagram for the supercritical extraction from *Euphorbia lathyris* L.

The conditions used for the extraction from EUL were pressure of 350 bar, temperatures of 60°C, flow of 145 ml/min, particle size of 800~1000 μm .

4. Nitric oxide (NO) assay

RAW 264.7 cell을 이용하여 속수자초임계추출물의 nitric oxide 생성 억제 능력을 측정하였다. 분양받은 RAW 264.7 cell을 페니실린(10 U/ml), 10% Fetal bovine serum (FBS)가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소가 유지된 인큐베이터에서 배양하였다. RAW 264.7 cell을 5×10^4 cell/well 농도로 96 well plate에 분주한 후 24 시간 동안 배양 하여 1 mg/L 농도의 LPS를 처리하였다. 분석할 샘플을 phenol red가 포함되지 않은 DMEM에 PEG40 hydrogenated castor oil을 이용하여 emulsion을 만들고 DMEM을 사용하여 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 mg/L의 농도로 용해시킨 후 LPS 처리 된 RAW 264.7 cell에 2.5 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% 이산화탄소에서 배양하였다. 24시간 배양 후 상등액을 분리한 후 100 μ l의 상층액과 100 μ l의 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% phosphoric acid)을 혼합한 후 10분 동안 반응시켰다. Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 nitric oxide 생성량을 측정하였다.

5. Beta carotene bleaching assay

Beta carotene bleaching assay (BCB)는 beta carotene의 노란색이 산화되면서 노란색이 흐려지는 것을 흡광도를 이용하여 측정하는 방법으로 항산화제인 alpha-tocopherol과 함께 비교 분석하였다. Beta-carotene을 녹인 chloroform 용액 5 ml에 20 mg의 linoleic acid와 200 mg의 PEG-40 (가용화제)을 섞어 evaporator로 chloroform을 완전히 제거한다. 이후 oxygenated water와 함께 emulsion을 만들고 속수자초임계추출물과 50°C에서 3시간 반응하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 2D-PAGE

항노화 효능 평가를 위한 proteome을 분석하기 위하여 2D-PAGE를 실시하였다. 분석에 사용된 cell은 human dermal fibroblasts cell을 사용하였으며 antibiotics (10 U/ml), 10% FBS (Fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소가 유지된 인큐베이터에서 배양하였다. RAW 264.7을 5×10^6 cell/ml 농도로 petri dish 배양한 후 24시간동안 배양 후 2 μ l의 LPS (1 μ g/ml)를 처리하였다. 속수자초임계추출물을 DMSO (dimethylsulfoxide)에 100 mg/L의 농도로 용해시킨 후 LPS 처리된 RAW 264.7 cells에 2.5 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% 이산화탄소에서 배양하였다. 24

시간 배양 후 원심분리하여 RAW 264.7 cells pellet을 얻고 DPBS (Dulbecco's phosphate buffer saline)로 3회 washing 한다. Cell pellet에 200 μ l의 lysis buffer (urea, thiourea, CHAPS, DTT, DDW, bromophenol blue, 2% pharmalyte, 2% carrier ampholyte, 4% PIC)를 넣고 30°C에서 5시간 incubation 하여 단백질을 추출한다. 다시 원심 분리하여 상등액을 얻은 후 단백질을 정량한다. 일차 전기영동을 위해 immobilized pH gradient (IPG) strip에 500 μ l의 rehydration solution (urea, thiourea, CHAPS, DTT, Glycerol, DDW, bromophenol blue, 2% pharmalyte)을 첨가하여 빛이 차단된 조건에서 12시간동안 rehydration 시킨다. Ettan IPGphor3 (GE healthcare, USA)에 strip을 올려놓은 후 cup loading 방식으로 100 μ g 단백질, DNase, pI marker를 loading 한 후 미네랄 오일을 첨가한다. 1단계에서는 500 V로 750 Vhr, 2단계에서는 1,000 V로 800 Vhr, 3단계에서는 10,000 V로 18,000 Vhr, 4단계에서는 10,000 V로 110,000 Vhr 총 17시간 일차 전기영동한다. 이차 전기영동 (SDS-PAGE)을 위해 SDS gel을 제작한다. 고정된 유리판 사이에 질소를 퍼지한 후 12.5% gel solution (monomer stock (2% bisacrylamide, acrylamide solution), 4 $\times$ resolving buffer (Tris 1.5 M+pH 8.8 HCl 적정), DDW, 10% SDS, 10% APS, TEMED)을 넣어준 후 4시간 동안 굳혀서 사용한다. 일차 전기영동이 끝난 IPG strip을 strip tray에 올려 놓은 후 1% DTT가 포함된 equilibration solution (urea, thiourea, SDS, Tris-HCl, glycerol, bromophenol blue) 3 ml를 넣어주고 15분간 equilibration 한다. DTT 용액을 제거하고 2.5% iodoacetamide solution을 넣고 15분 기다린 후 iodoacetamide solution을 제거한다. Ettan DAIIXsix electrophoresis unit (GE healthcare, USA)에 5 L SDS buffer (Tris, Glycine, SDS, DDW)를 넣어주고 4°C를 유지하면서 순환시켜 준다. SDS gel 위에 IPG strip을 올려놓은 후 agarose solution (1 $\times$ SDS buffer, agarose, bromophenol blue)을 넣어 SDS gel과 IPG strip을 고정시켜준 후 전압을 걸어 전기영동을 시작한다. 1단계에서는 10 mA로 1시간동안 단백질을 정렬시키며, 2단계에서는 40 mA 4시간동안 단백질을 분리한다. 2D-PAGE가 끝난 gel은 silver nitrate staining을 통해 염색하여 분석한다.

결 과

1. 초임계 추출 수율

속수자초임계추출물의 350 bar 60°C 추출 결과에서 운동성 그

래프 상 180분에 65%의 수율을 얻을 수 있었다. 하지만 이 추출물은 수분도 많이 함유하고 있어 5000 rpm, 20분, 5°C 원심분리하여 물과 왁스를 분리하고 남은 상층의 추출물만 사용하였다. 이때의 수율은 약 35%였다(Fig. 2).

2. 지방산 조성 기기분석

1) **Fatty acid component:** 속수자초임계추출물들은 gas chromatography를 통하여 myristic acid (C14), palmitic acid (C16), stearic acid (C18), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), linolenic acid (C18:3)를 분석하였다. 지방산 조성은 oleic acid (C18:1)가 84%가량의 가장 많은 조성을 보였다. Oleic

Fig. 2. The kinetic graph of extraction rate from *Euphorbia lathyrus* L. Supercritical CO₂ flow was 145 ml/min, extraction time was 180 min, temperature was at 60°C, pressure was 350 bar.

acid가 많이 들어있는 천연오일이 항산화 효과가 있다는 사실은 이미 많이 보고되어지고 있다^{15,16}. 지방산 분석의 chromatogram은 Fig. 3에, 조성은 아래의 Table 1에 나타내었다.

3. 속수자 초임계 추출물이 nitric oxide (NO) 발현에 미치는 영향

EUL 추출물의 NO depression 결과를 확인해본 결과를 아래 Fig. 4에 나타내었다. NO발생량을 농도 의존적으로 줄어드는 것을 볼 수 있었다. MTT assay를 통하여 세포독성이 나타나지 않는 최고농도인 500 ppm에서 control 대비 약 20% 가량 NO발생량을 저해하는 것을 확인하였다. MTT 세포독성 결과도 Fig. 4에 함께 나타내었다.

4. 속수자 초임계 추출물이 항산화효과에 미치는 영향

속수자초임계추출물 같이 비극성 추출물의 항산화 능력을 볼 수 있는 beta carotene bleaching (BCB) assay (Fig. 5)에서는 alpha-tocopherol 0.1% 대비 추출물을 단독으로 사용하였을 때

Table 1. Fatty acid composition of each part of extracts from *Euphorbia lathyrus* L.

NO.	Fatty acid	component of fatty acid of extracts from EUL
1	myristic acid	-
2	Palmitic acid	6.8
3	Stearic acid	1.9
4	Oleic acid	83.6
5	Linoleic acid	4.1
6	Linolenic acid	2.2
7	Others	1.4

Fig. 3. Gas chromatography of fatty acid standard and extracts from *Euphorbia lathyrus* L. Chromatogram of extract from EUL. GC conditions: 170°C to 220°C at 2°C/min., FID: 230°C, Split ratio: 20:1. (A) Fatty acid standard, (B) Fatty acid from EUL extract.

Fig. 4. Inhibition of nitric oxide production on RAW 264.7 cells by extracts from *Euphorbia lathyris* L.

NO production was LPS activated RAW 264.7 cell. The concentrations of sample were 1, 5, 10, 100, 200, 500 mg/L. Incubated time of RAW 264.7 cell was 24hrs. The data was obtained from 3 independent experiments. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs control.

Fig. 5. Effect of antioxidant activity by extracts from *Euphorbia lathyris* L.

The concentrations of sample were 1, 10 and 100% of EUL. Alpha-tocopherol (0.1%) was used as a control. The data was obtained from 3 independent experiments.

Fig. 6. 2D-PAGE gel.

Control (A), EUL extract1 (B) and EUL extract2 (C). Gel image of proteins extracted from NF cell treated with 500 ppm of EUL extract.

약 110%의 능력을 보여주는 것을 확인하였다. 10% 추출물 농도에서는 control의 50% 정도의 항산화 능력을 확인할 수 있는 것으로 보아 저농도에서도 확실한 항산화 능력을 볼 수 있을 것으로 생각되어졌다.

항산화 반응의 관련한 메커니즘은 매우 다양하게 있으며 원인에 따른 메커니즘 자체도 매우 다르다. 또 다양한 항염 물질들이 다양한 염증반응 메커니즘 중 어떠한 부분에 작용을 하여 항염반응을 나타내는지 확인 하는 것도 어려운 일이기 때문에 이런 한계를 극복하고자 전체 proteome을 분석하여 만들어진 속수자초임계추출물이 어떤 메커니즘에서 작용하여 항염 효능을 나타내는지 human dermal fibroblasts (NF cell)에 속수자초임계추출물을 적용하고 단백질을 추출해 알아보았다. Control과 sample의 단백질 spot의 모습은 Fig. 6에 나타내었다.

5. 속수자 초임계 추출물의 2D gel 분석

Control에서는 884개의 단백질 spot이 검출되었으며 속수자초임계추출물을 처리한 cell에서는 706개, 895개의 단백질 spot이 검출되었다. Control과 매치된 단백질은 모두 425, 430개를 검출하였으며 5가지의 메커니즘 별로 나누어 결과를 도출해 내었다. 각 메커니즘 별 단백질의 변화를 Fig. 7~11에 나타내었다. 5가지 메커니즘 상의 단백질이 모두 변화된 것을 확인하였다.

콜라겐 합성경로에 있는 6가지 단백질의 spot을 확인 할 수 있었다. Prolyl 3-hydroxylase1 (P3H1), Prolyl 3-hydroxylase2 (P3H2), Prolyl 3-hydroxylase3 (P3H3)들은 콜라겐을 형성할 때

Fig. 7. Effects of Soksuja oil to expression of enzymes of collagen synthesis pathway.

The expression of protein from the human dermal fibroblasts cells, which was treated with EUL, was compared with control. The data was obtained from 2 independent experiments.

mRNA가 폴리펩타이드로 번역된 후 하이드록실화를 촉매하는 역할로 증가됨에 따라 콜라겐 합성에 도움이 된다³⁾. Iso 형인 P4HA1, P4HA2, P4HA3들이 만들어 내는 효소인 P4H1, P4H2, P4H3과 enhancer protein인 LH1도 증가할수록 콜라겐 합성에 도움을 준다. Fig. 7의 결과로 위에서 언급한 6가지 단백질 중 P3H 제외하 나머지 3가지 단백질이 모두 50%에서 90% 가량 증가됨을 확인할 수 있었다^{4,5)}.

세포 내 matrix metalloproteinases (MMP)의 주요 역할은 세포의 매트릭스 단백질을 뿐만 아니라 다수의 세포 활성 분자를 분해하는 것이다⁶⁾. MMP-1, MMP-3, MMP-13은 콜라겐합성과정에서 세포외기질의 분해에 관여하여 control 대비 모두 감소했을 때 콜라겐 합성에 효과가 있다고 볼 수 있다. 실험결과에서는 세가지 단백질 모두 감소한 것을 확인할 수 있었고 특히 MMP-3에서는 80%이상 매우 크게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

Integrin beta-1는 세포의 매트릭스 및 생체 역학적 리모델링에 중요한 역할을 한다. 실험에서 이 수용체 단백질 또한 control대비 약 40% 증가됨을 보고 콜라겐 합성에 도움을 주는 것을 확인하였다.

TNF-alpha와 interleukin-1 (IL-1) 는 type I, III의 pro-collagen mRNA의 정상 상태 수준을 감소시키고 면역이나 조직 리모델링, 재생 과정, 염증반응 등 필수적인 생물학적 과정에 관여 되고 있으며 본 실험에서 control대비 두 단백질 모두 감소 됨을 확인할 수 있었다⁷⁾.

Antioxidant enzymes은 체내에서 만들어지는 항산화 물질로 활성산소가 생성되는 과정에서 활성산소를 제거해주는 효소단백

Fig. 8. Effects of Soksuja oil to expression of MMPs.

The expression of protein from the human dermal fibroblasts cells, which was treated with EUL, was compared with control.

Fig. 9. Effect of Soksuja oil to expression of proteins related ECM-cell interaction.

The expression of protein from the human dermal fibroblasts cells, which was treated with EUL, was compared with control. The data was obtained from 2 independent experiments.

Fig. 10. Effect of Soksuja oil to expression of Cytokines.

The expression of protein from the human dermal fibroblasts cells, which was treated with EUL, was compared with control. The data was obtained from 2 independent experiments.

질이다. 활성산소는 이미 노화의 주범으로 알려져 있으며 glutathione (GHS), catalase 은 superoxide dismutase에 의해 분해된 과산화수소를 산소와 물로 분해시키는 역할을 하며 glutathione peroxidase1 (GPX-1)은 PSH의 활동을 촉진하는 역할을 한다. 모두 증가됨에 따라 콜라겐 합성을 촉진하는 것으로 GPX-1를 제외한 두 단백질은 모두 증가됨을 확인하였다. catalase는 control 대비 약 두 배 정도의 큰 증가폭을 보였다.

Fig. 11. Effect of Soksuja oil to expression of antioxidant enzymes.

The expression of protein from the human dermal fibroblasts cells, which was treated with EUL, was compared with control. The data was obtained from 2 independent experiments.

고 찰

속수자(*Euphorbia lathyroides* L., 續隨子)는 대극과(*Euphorbiaceae*)의 식물로 다른 대극과 식물인 대극(*Euphorbia pekinensis* R.), 감수(*Euphorbia kansui* T.N. Liu et T.P. Wang), 파두(*Crotonis Semen*)와 같이 본초학에서 대변을 통리시켜 위장의 적체를 배제하는 설사약으로 분류되는 본초이다⁸⁾. 속수자는 동의보감¹⁷⁾에서도 “下水最速, 然有毒損人, 不可過多, 利大小腸, 下惡滯物, 破積聚.”으로 경구로 복용을 할 시 소화기계 문제를 해결하는 약으로 보고 있으며, 대다수의 한의학에서는 속수자를 이와 같은 목적으로 사용하였다.

하지만 본초강목⁹⁾에는 “續隨子莖汁洗黥黯, 剝人皮. 續隨子汁 灰 糞灰並剝白癩風. 黑子疣贅: 續隨子熟時塗之, 自落.”으로 외용을 할 경우 다른 대극과식물과 달리 간증(黥黯), 백전풍(白癩風), 흑자우체(黑子疣贅)에도 속수자를 사용할 수 있다고 제시 되어 있다.

간증(黥黯)은 한방 피부과 질환으로 이흑반(鰐黑斑)이라고 하며, 현대의 기미와 동일한 질환이다¹⁰⁾. 기미는 조직 검사상 병변 부위에 멜라닌세포의 숫자가 정상 피부에 비해 증가된 질환으로, 멜라닌세포에서 멜라닌 색소를 만드는 과정에 관여하는 효소의 활성도가 증가되어 있다. 멜라닌 생성은 활성 산소에 의한 피부 광손상의 한 요소로 피부노화의 한 과정이다^{15,16)}. 이와 같은 특징을 지닌 기미의 치료에 사용하는 속수자는 항노화 효과가 있을 것으로 생각되었다. 백전풍(白癩風)은 현대의 백반증과 동질한 질환이다¹⁰⁾. 백반증은 멜라닌세포의 소실에 의해 다양한 크기와 형태의 백색

반이 피부에 발생한 질환이다. 이 질환은 monoamine oxidase의 증가로 멜라닌세포의 손상으로 초래되며, 부산물로 H_2O_2 가 생성된다. H_2O_2 는 활성산소 중 하나로 단백질, DNA, 효소 및 T 세포와 같은 면역계통 인자를 손상시켜 질환을 일으키며, 체내 과산화지질을 축적하므로 인해 생체기능 저하 및 노화를 유발한다^{12,15}. 이와 같은 특징을 지닌 백반증의 치료에 사용하는 속수자는 항산화 효과가 있을 것으로 생각되었다. 흑자우첸(黑子疣贅)은 한방 피부과 질환으로 우목(疣目) 중 회갈색의 색상 변화가 보이는 심상우(尋常疣)라고 하며 현대의 심상성 사마귀와 동일한 질환이다¹⁰. 심상성 사마귀의 경우 현대의학에서는 Diphenylcyclopropenone (DPCP)를 도포하여, DPCP의 사이토키인 억제제를 이용하여 치료한다^{18,19}. 심상성 사마귀의 도포 치료제인 DPCP와 속수자는 비슷한 기전으로 항염 효과가 있을 것으로 생각되었다. 이를 통해 속수자의 항산화, 항염 효과에 대한 효능이 있을 것으로 생각되어 항노화의 소재로서의 가능성을 예상하였다. 피부노화의 한 과정인 광 손상에 의한 과도한 멜라닌 생성에 기인한 기미(黧黯)^{15,16}, monoamine oxidase의 증가로 멜라닌세포의 손상과 활성산소 중 하나인 H_2O_2 가 발생하는 질환인 백반증(白癬風)^{12,15}, papilloma 바이러스에 의해 검어지면서 과각화성의 구진이 발생하는 질환인 심상성 사마귀(黑子疣贅)¹⁵와 같은 질환의 치료에 적용할 수 있는 본초로서 항노화, 항산화, 항염의 효과가 있을 것으로 생각되나 이런 효과에 대한 연구가 많지 않았다. 이와 같은 약침 요법의 소재로서 속수자를 활용할 경우, 속수자의 강렬한 성미로 인하여 내복약이 갖는 소화 흡수과정에서 발생하는 유효성분의 소실과 복용의 불편성을 극복하여, 경혈, 경락 및 경맥, 병소를 직접적으로 자극하여 최소량의 약물로 최대의 효과를 기대할 수 있다^{20,21}.

결론

본 연구에서는 속수자 초임계추출물이 어떤 성분을 가지고 항산화와 항노화에 어느 정도의 효과를 갖는지를 기기분석과 세포수준 평가, 세포 내에서 기작에 관여하는 단백질의 변화량을 확인하여 약침으로써의 가능성을 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 초임계 이산화탄소를 이용하여 속수자를 추출하였을 때 350 bar 60°C 조건에서 약 35%의 초임계추출물을 얻을 수 있었고, 지방산 분석결과 올레익산이 83.6%로 가장 높은 조성을 보였으며 그 다음 조성인 팔미탄산, 리놀렌산 등은 7% 아래에 머무르는 조성으로 올레익산 하나의 조성이 월등히 높은 것을 확인하였다.

2. NO활성과 베타카로틴을 이용한 항염, 항산화 평가에서 모두

농도 의존적으로 효과가 있는 경향을 보였다. NO억제율은 약 20%를 보였고 항산화제인 0.1% alpha-tocopherol 만큼 효과를 보이는 것을 볼 수 있었다.

3. Human dermal fibroblasts에 속수자초임계추출물을 처리해 단백질의 변화량을 확인한 결과 처리하지 않은 세포 단백질과 비교했을 때 콜라겐 합성에 필요한 단백질은 대부분 상승하는 경향을 볼 수 있었고, 콜라겐 합성 억제에 작용하는 효소 단백질은 대부분 감소되는 경향을 확인하였다.

Acknowledgement

None.

Funding

None.

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

1. Oh JH, Kim YK, Jung JY, Shin JE. Intrinsic aging- and photo-aging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *J Dermatol Sci*. 2011; 62(3): 192-201. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.02.007>
2. Zhao Z, Xiao P. Encyclopedia of medicinal plants. China, Shanghai world publishing Corporation : 2009
3. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of

- proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Database issue):D343-50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr987>
4. Fernandes RJ, Farnand AW, Traeger GR, Weis MA, Eyre DR. A Role for Prolyl 3-Hydroxylase 2 in Post-translational Modification of Fibril-forming Collagens. *J Biol Chem.* 2011; 286(35) : 30662-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.267906>
5. Gilkes DM, Chaturvedi P, Bajpai S, Wong CC, Wei H, et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013; 73(11) : 3285-96. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06893-9>
6. Chiusaroli R, Maier A, Knight MC, Byrne M, Calvi LM, Baron R, et al. Collagenase cleavage of type I collagen is essential for both basal and parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor-induced osteoclast activation and has differential effects on discrete bone compartments. *Endocrinology.* 2003; 144 : 4106-16. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0254>
7. Mauviel A, Heino J, Kähäri VM, Hartmann DJ, Loyau G, Pujol JP, et al. Comparative Effects of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- α on Collagen Production and Corresponding Procollagen mRNA Levels in Human Dermal Fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1991; 96(2) : 243-9. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12462185>
8. KH Textbook Editing Board. *Herbology* 3rd edition. Seoul : Young Rim Sa. 2008 : 282-301.
9. Lee SJ. *Dohae Bonchogangmok*. Seoul : Komoonsa. 1975 : 300-5.
10. Ko WS, Kim KJ, Kim NK, Kim YB, Kim JH, Kim HT, et al. *Text of Traditional Korean Dermatology & Surgery*. Busan : Seonu. 2007 : 432-60.
11. Lee JH, Jung SJ, Park YK. Effects of *Euphorbia lathyris* Semen on cell apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Kor. J. Herbology.* 2007; 22(2) : 65-72.
12. Lee HC, Hwang SG, Kim DG, Ju SM, You HK, Kim WS, et al. Screening on Monoamine Oxidase B Inhibitor and Antioxidant Activity from the water Extracts of Medicinal Plants. *Kor J Ori Med Physiol Pathol.* 2002; 16(3) : 458-63.
13. Kim TE, Yoon YM, Park YI, Kim YS, Leon BH, Kim MD. Screening of the Biological Activity from Water Extracts of the Medicinal Plants and the Protective Effect of *R. palmatum* on MTPT-induced Neurotoxicity. *Kor J Ori Med Physiol Pathol.* 2004; 18(6) : 1666-85.
14. Seo BI, Kwon DK. A philological study on poisoning of *Euphorbia lathyris* Semen. *The Journal of East-West Medicine.* 2008; 33(4) : 1-12.
15. Ahn SK, Jang KH, Jung J, Kim TH, Kang YC, Cheon SH, et al. *Common Skin Disease*. Seoul:JN Medbook. 2015 : 311-521.
16. Kim JY, Park SN. Anti-oxidative Activities of *Castanea crenata* Leaf Extract/Fractions and Application on Cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* 2008; 34(4) : 259-68.
17. Heo J. *Donguibogam*. Hadong : Donguibogam Publisher. 2006 : 1408-2205.
18. Moon YK, Jeong WY, Shin JH, Kim YB, Nam HJ, Kim KS. Three Cases of *Verruca Vulgaris* Treated Mainly with *Gwakhyangjeong-gisangamibang* and Moxibustion. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2015; 28(2) : 93-101.
19. Lee SG, Shin JH, Choi GS. Therapeutic Effect of Topical Diphenylcyclopropenone (DPCP) for the Treatment of Extensive Alopecia areata. *Korean J Dermatol.* 2004; 42(9) : 1130-7.
20. Roh JD, Kim LH, Song BY, Yook TH. The effects of distilled Wild Ginseng Herbal Acupuncture on the Heart Rate Variability (HRV). *J Pharmacopuncture.* 2008; 11(1) : 55-69. <https://doi.org/10.3831/kpi.2008.11.1.055>
21. *Pharmacopuncture Textbook Editing Board*. *Pharmacopunctureology*. Seoul : ELSEVIER Korea. 2011 : 3-92.