



Validation of pharmacological activity and anti-pollution effect of ethanol extract of *Azadirachta indica* leaf

Jin A Hyun¹, Ji Hye Lee^{1,3}, Eun Bin Kang², Hyun Jeong Kim^{1,2}, Dong In Kim^{1,3},
Ga Eun Park¹, Ki Sung Kwak², Bong Jeon An^{1*}

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsan 38610, Korea

²R&D Center, HONEST Co., Ltd., Daegu 42151, Korea

³R&D Team, Cosfactory Co., Ltd., Pyeongtaek 17745, Korea

넝트리(*Azadirachta indica*)잎 에탄올추출물의 약리활성 및 안티폴루션 효능 검증

현진아¹ · 이지혜^{1,3} · 강은빈² · 김현정^{1,2} · 김동인^{1,3} · 박가은¹ · 곽기성² · 안봉진^{1*}

¹대구한인대학교 화장품약리학과, ²(주)허니스트 기업부설연구소, ³(주)코스팩토리

Abstract

In this study, we investigated the anti-oxidant, anti-inflammatory, whitening, anti-wrinkle, and anti-pollution effects of Neem tree (i.e., *Azadirachta indica* leaf) 70% ethanol extract. More specifically, the polyphenol content was 51.37 mg/g, and the DPPH and ABTS radical scavenging activities were 34.09 and 72.18%, respectively, at a final concentration of 1,000 µg/mL. SOD experiments showed an effect of 24.13% at a final concentration of 1,000 µg/mL. In addition, to investigate the whitening effect, the tyrosinase inhibition effect was measured, giving a value of 47.21% at a final concentration of 1,000 µg/mL. Furthermore, MTT assay experiments were carried out on macrophages (RAW 264.7) to determine the cytotoxicity using the neem tree leaf extract, it was confirmed that the cell viability was unaffected up to a concentration of 100 µg/mL. Moreover, anti-inflammatory (NO) analysis of the cells using macrophages stimulated with LPS induced an inflammatory response of 68.86%, in addition to an anti-inflammatory activity of 66.45% at a final concentration of 100 µg/mL. The iNOS protein showed an inhibition rate of 97.49% at a concentration of 100 µg/mL, and in the cytotoxicity assay (MTT assay) using keratinocytes (HaCaT), the cell viability was similar to that of the untreated control at 10 µg/mL. Western blotting analysis confirmed the inhibition rate of MMP-1. Additionally, HaCaT and CCD-986sk human skin cells were stimulated with benzo[e]pyrene, which contains fine dust and heavy metals, and then treated with neem tree extract to measure the effect of the extract on the cell viability. Indeed, the anti-pollution efficacy of the extract was confirmed. Overall, the benzo[e]pyrene-stimulated cells presented improvements of >92 and 81% for the HaCaT and CCD cells at a concentration of 25 µg/mL, while improvements were observed at a concentration of 100 µg/mL HaCaT for fine dust-stimulated cells. Moreover, HaCaT cell and CCD cells showed improvements of more than 85 and 76%, respectively. The obtained results therefore indicate that Neem tree 70% ethanol extract is expected to have value for application in cosmetics due to its pharmacological activity and its fine dust-blocking properties.

Key words : *Azadirachta indica*, anti-pollution, fine dust, benzo[e]pyrene, validation of pharmacological activity

*Corresponding author. E-mail : anbj@dhu.ac.kr, Phone : +82-53-819-1435, Fax : +82-53-819-1435

Received 16 January 2020; Revised 12 March 2020; Accepted 24 March 2020.

Copyright © The Korean Society of Food Preservation.

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.

서 론

체내의 산소에는 약 95%의 좋은 산소와 약 5% 정도의 나쁜 산소가 있다. 좋은 산소가 어떠한 환경적 요인과 대사 현상으로 인해 전자를 받아 변화되어 생체에 유해한 나쁜 산소인 활성산소[oxygen radical, oxygen free radical, reactive oxygen species(ROS)]가 된다(Choi, 1998). 이 활성산소는 세포를 파괴하고 효소 활성을 저해하여 산화적 손상(oxidative damages)을 유발하여 다양한 질병을 일으키는 원인이며, 노화를 촉진시킨다. 생명체의 대사과정 중 필연적으로 생성되는 활성산소 종은 free radical로 인한 높은 반응성으로 염증 유발 및 세포 노화로 다양한 질병을 야기한다(Beckman 등, 1998; Haddad, 2002). 이러한 활성산소를 제거하는 주요 효능성분으로는 L-ascorbic acid (vitamin C), epigallocatechin gallate(EGCG), butylated hydroxy anisol(BHA) 등이 있으며, 이것들은 free radical을 제거하는 -OH group을 통해 활성산소를 소거하는 환원성을 가지며, 보통 동·식물성 유래 천연 항산화제로 알려져 있다(Ding 등, 2009). 그중에 EGCG는 비타민 E보다 25배, 비타민 C보다 100배 정도의 항산화 효과를 가지고 있다(Bagchi, 1999). 최근 현대 사회에 미세먼지가 큰 문제가 되고 있다. 공기 중 돌아다니는 미세먼지와 초미세먼지는 PM_{2.5}로 입자가 매우 작으며 세계보건기구(WHO)에서 1급 발암물질로 인체에 매우 치명적이다(Kim 등, 2018). 경제가 발전하면서 발생하는 인위적인 발생원에 의해 배출되는 경우 직경이 대부분 작는데, 이 입자를 구성하는 화학물질로 중금속(Cd, Cr, As, Pb 등)이나 방향족 탄화수소(benzo pyrene 등) 같은 유해한 성분이 다량 포함되어 있으며(Lee, 2003), 다른 환경오염 물질과 흡착해서 피부에 침투된다. 이로 인해 피부 장벽이 약해지고, 각질층이 제대로 역할을 못한다. 피부 속에 침투한 미세먼지는 미토콘드리아를 손상시켜 콜라겐 합성을 방해하고 분해를 증가시키며, 멜라닌 색소를 자극해 여러 가지 피부 질환을 일으킬 수 있다. 또한, 미세먼지에 포함된 중금속이 피부에 흡착되면 재생력이 떨어져 피부 결이 거칠어지고 탄력도 감소하게 되면서 피부 노화가 시작되어 주름이나 검버섯 등이 나타날 수 있다. 이는 가려움과 피부건조 등을 동반하며 만성적으로 재발하는 아토피는 정확한 원인이 규명되지 않았지만, 미세먼지의 중금속이나 공해물질이 알레르기 면역 반응을 유발해 증상이 악화될 수 있다(Seo 등, 2016). 이러한 이유로 소비자들은 미세먼지로 인해 발생하는 다양한 질병의 예방 및 치료에 관심이 높아지고 있으며, 이에 따라 피부로부터 미세먼지를 막아주거나 잘 씻겨나가게 해주는 화장품의 수요도 증가하고 있다.

넝트리(*Azadirachta indica*)는 neem 또는, nim tree라고 불리며, 멸구슬나무과와 비슷한 종이다. 인도와 네팔, 파키

스탄, 방글라데시, 스리랑카, 몰디브와 같은 열대 및 아열대 지역에서 서식하고 높이가 15 - 20 m로 급성장하는 특징을 가지고 있다. 인도 대륙에서 해충 방지제, 치과위생, 사막화방지 및 전통의학으로 사용되었으며, phytochemical을 함유하고 있어서 발열, 말라리아, 기생충 감염, 켈양 및 염증 및 피부와 같은 산화적 장애 관련 질병(Clayton 등, 1996), 류마티스성 관절염 질환 발열과 당뇨병 치료(Van der Nat 등, 1991)로 사용되고 있다. 하지만 넝트리의 효능을 평가하기 위해 수행된 연구는 neem tree oil의 효능 정도뿐 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 넝트리잎을 70% ethanol로 추출하여 생리활성 실험과 LPS로 유도된 대식세포를 이용하여 염증성 cytokine과 iNOS, COX-2 단백질의 발현 정도를 연구하고, 각질세포와 섬유아세포를 가지고 중금속 항공해(anti-pollution) 효과, 미세먼지로부터의 피부효과, 항균실험 등을 통해 효능 검증을 진행하고, anti-pollution 화장품 소재로서의 활용 여부를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에 사용한 넝트리(*Azadirachta indica*)는 TNVHH SBJ Viet Nam Co.에서 구입하여 이용하였다. 70% ethanol 추출물은 넝트리잎을 건조한 뒤 건조된 시료 중량의 10배의 용매로 상온에서 24시간 침지하여 추출하는 것을 3회 반복하여 추출액을 여과지(No.20 filter paper, Hyundai Micro Co., Ltd., Seoul, Korea)로 여과, 농축, 동결건조하여 분말화하였다. 수율은 29.32%였다. 추출물은 4°C 냉장실에 보관하고, 본 실험의 시료로 사용하였다(Fig. 1).

측정 시약

실험에 사용된 시약은 다음과 같다. 2,2-Disphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt, potassium peroxodisulfate, butylated hydroxy anisole, L-ascorbic acid, tannic acid, xanthine, xanthine oxidase, nitro blue tetrazolium(NBT) 등은 Sigma-Aldrich Co., Ltd.(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. Folin-Ciocateu phenol reagent는 Junsei Chemical Co., Ltd.(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic 등은 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd.(Ansan, Korea)의 제품을 사용하였으며, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, Tyrosinase from mushroom 등은 Sigma-Aldrich Co., Ltd.의 제품을 사용하였다. Sodium phosphate monobasic dihydrate, sodium phosphate dibasic anhydrous 등은 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd.의 제품을 사용하였다. MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2. 2차

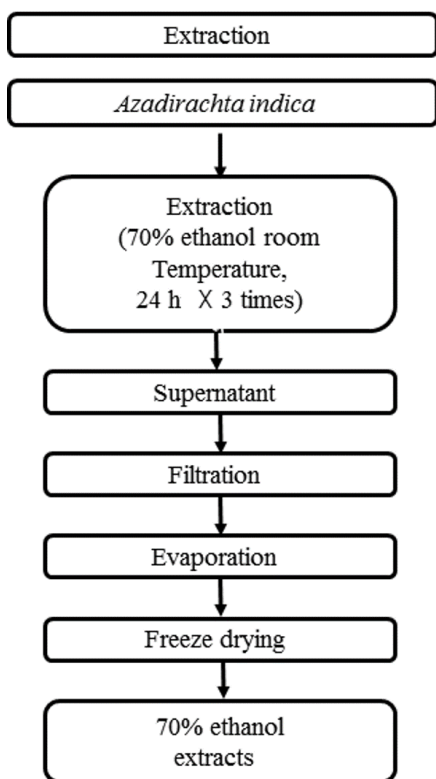


Fig. 1. The procedure for extraction from *Azadirachta indica*.

antibodies는 Biotech(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide, Elastase from porcine pancreas 등은 Sigma-Aldrich Co., Ltd.의 제품을 사용하였다. MMP-1, Filaggrin 2차 antibodies는 Biotech에서 구입하였고, 균주로는 *Escherichia coli* KCTC 2441, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Staphylococcus epidermidis* KCTC 1917, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750, *Enterobacter cloacae* KCTC 2361, *Propionibacterium acnes* KCTC 3065, *Candida albicans* KCTC 7965 등이 사용되었다. 배지로는 Gifu anaerobic medium(GAM)는 Nissui Co.(Japan)에서 Nutrient agar(NA), Tryptic soy agar(TSA), Yeast Mold agar(YMA), Yeast Mold broth(YMB), Nutrient broth(NB)와 Tryptic soy broth(TSB)는 Difco Lab.(sparks, NV, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포주 Murine macrophage cell(RAW 264.7)은 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구하였으며, Keratinocyte cell(HaCaT)은 한약진흥재단(GyungSan, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포 배양을 위한 fetal bovine serum(FBS), dulbecco's modified eagle medium(DMEM)은 GE HLS(Logan, UT, USA)에서 구입하여 사용했으며, trypan blue stain, trypsin-EDTA은 Gibco Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, MTT 시약은 Sigma-Aldrich Co., Ltd.에서 구입하여 사용하였다. Griess

reagent, Lipopolysaccharide 등은 Sigma-Aldrich Co., Ltd.에서 구입하여 사용하였으며, Benzo[e]pyrene은 Sigma-Aldrich Co., Ltd.에서 구입하였다. 또한, Fine Dust(PM10-like)는 Sigma-Aldrich Co., Ltd.에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기

본 실험에 사용된 기기는 ELISA reader(Spectra max 190, Molecular devices, Sunnyvale, USA), freeze drier(Ilshin, Korea), autoclave(Hanbaek Scientific Co., Korea), Microscope (Olympus Co., Ltd., Japan), Rotary vacuum evaporator (Rikakikai Co., Ltd., Japan), Digital reciprocating shaker (Daihan Scientific Co., Ltd., Korea), Western imaging system (CAS-400SM, Davinch-K Co., Ltd., Korea), TP professional basic thermocycler(Thistle Scientific Co., Ltd., UK), Step one real-time pcr system(Thermo Fisher Scientific Co., Ltd., USA), BOD incubator(Hanbaek Scientific Co., Korea), CO₂ incubator(VS-9160GC, Hanbaek Scientific Co., Deajeon, Korea)를 사용하였다.

ABTS⁺ radical 소거 효과 측정

ABTS⁺ cation decolorization assay 방법(Rice-Evans 등, 1974)에 따라 ABTS radical을 이용한 항산화력을 측정하였다. 7 mM 2,2-azino-bis와 2.4 mM potassium persulfate를 같은 비율로 섞고, 차광하여 12 - 24시간 동안 방치하여 반응을 시킨 후 실험을 진행하였다. 시료의 농도는 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL 농도로 희석하여 준비하였고, 양성 대조군으로는 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하였다. 이후 96-well plate에 용액 100 µL와 각 추출물 100 µL를 가하여 25°C에서 7분간 반응시킨 뒤 파장 734 nm에서 흡광도를 측정하고 저해율(%)로 나타내었다.

DPPH radical 소거능 효과 측정

DPPH radical 소거능의 효과 측정은 Blois(Blois, 1958)의 방법으로 측정하였다. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)를 0.45 mM 농도가 되도록 99% ethanol로 녹여 준비하고, 시료의 농도는 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL 농도로 희석하여 준비하였다. 양성 대조군으로는 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하였다. 이후 96-well plate에 각 추출물 120 µL와 DPPH 60 µL를 첨가하고, 실온에서 차광하여 15분 동안 반응시키며, 517 nm에서 ELISA reader를 사용하여 소거활성을 측정하였다.

총폴리페놀 화합물 함량 측정

총폴리페놀 화합물은 Folin-Denis 방법(Folin과 Denis, 1912)으로 측정하였다. 시료는 증류수에 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL 농도로 희석하여 준비한다. 0.2 mL Folin

Cioaltea reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분 동안 실온에 방치하였다. 3분 후 0.7 M Na_2CO_3 포화용액 0.5 mL를 가하여 섞은 후 각 추출물 0.5 mL씩 농도별로 넣은 후 1시간 반응시킨 뒤, 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid를 사용한 표준곡선을 이용하여 양을 환산 후 총폴리페놀 함량을 표기하였다.

Superoxide dismutase 유사활성 효과 측정

Marklund(Marklund와 Marklund, 1974)의 방법에 따라 superoxide dismutase(SOD) 유사활성을 측정하였다. 시료의 농도는 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 로 준비하였고, 양성 대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다. 96-Well plate에 시료용액 20 μL 에 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.5) 130 μL , 증류수에 녹인 7.2 mM pyrogallol 20 μL 를 넣고 20분 동안 실온에서 차광하여 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 pyrogallol의 양을 측정하였다.

Superoxide anion radical 소거 효과 측정

Nitroblue tetrazolium(NBT) 환원방법(Fridovich, 1970)에 따라 superoxide anion radical 소거능을 측정하였다. 시료를 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 각 시료 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.4 mL에 NBT(0.24 mM)와 xanthine(0.4 mM)을 녹인 substrate 2 mL를 첨가하고 xanthine oxidase(0.2 U/mL) 2 mL를 첨가하여 20분 동안 37°C에서 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 첨가하여 흡광도 560 nm에서 측정하였다. 양성 대조군으로는 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하였다.

균배양

항균력 측정 실험을 위해서 전처리 배양 및 본 실험의 배양을 위해 *E. coli*, *S. epidermis*, *P. aeruginosa* 및 *E. cloacae*의 액체배지로는 Nutrient broth(NB)를 *S. aureus*의 액체배지로 Tryptic soy broth(TSB)를 사용하였으며, *P. acnes*의 액체배지로 Gifu anaerobic medium(GAM)을 사용하였으며, *C. albicans*균의 액체배지로 yeast mold broth(YMB)를 사용하였다. 고체 배지는 nutrient agar(NA), Tryptic soy agar(TSA), Yeast Mold agar(YMA)와 Gifu anaerobic medium(GAM)을 사용하였으며, 실험에 있어서 본 배지에 agar powder를 첨가하여 실험에 사용하였다.

생육 저해환(Clear zone) 측정

Paper disc(Conner과 Beuchat, 1984)를 이용하여 생육 저해력을 측정하였다. 즉, 액체 배지 15 mL에 평판 배지에서 배양된 각 균주를 1 백금이 취해서 18 - 24시간 배양하여 활성화시킨 뒤 다음 액체 배지 15 mL에 균액을 0.1 mL 접종하여 4 - 8시간 본 배양한 다음 평판배지 1개당 균수

가 약 1×10^6 cells가 되게 접종하여 멸균된 명봉을 사용하여 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc(8 mm, Tokyo, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓고 시료를 농도별로 0.05 mL/disc가 되도록 흡수시켜 세균은 37°C 인큐베이터에, 진균은 25°C 인큐베이터에 12 - 48시간 배양하여 disc 주위의 Clear zone(mm)의 직경을 측정하여 저해활성을 확인하였다.

Mushroom 유래 tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성을 Yagi 등의 방법(1986)에 따라 측정하였다. 시료는 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 준비하였고, 양성 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 67 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8) 80 μL 에 10 mM L-DOPA를 녹인 substrate 40 μL 와 시료 40 μL 를 섞은 혼합액에 mushroom tyrosinase(125 unit/mL) 40 μL 를 첨가하여 10분간 37°C에서 반응시킨 후 흡광도를 492 nm에서 측정하였다.

Elastase 저해 효과 측정

Elastase 저해활성은 Cannell 등(1988)의 방법을 참고하여 실험을 진행하였다. N-succinyl-(L-Ala)-p-nitroanilide를 사용하여 36°C에서 25분간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성되는 양을 405 nm에서 ELISA로 측정하였다. 그 후, 시료는 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 시료액을 40 μL 로 취하고 50 mM 농도의 Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 Porcine pancreas elastase (0.5 unit/mL) 용액 40 μL 를 가한 후 기질로 50 mM 농도의 tris buffer(pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide를 첨가하여 20분 동안 반응시킨 후 결과를 측정하였다. 양성 대조군으로는 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하였다.

세포 배양

본 실험에서 이용한 RAW 264.7 macrophage cell, CCD-986sk cell, HaCaT keratinocyte cell은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin(100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO_2 incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. RAW 264.7은 cell scraper를 이용해서, HaCaT cell과 CCD-986sk cell의 경우 phosphate buffer saline(PBS)로 세척 후 trypsin-EDTA를 사용해서 세포를 수확한 후 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 독성 확인

세포 독성 측정은 Carmichael(Carmichael 등, 1987)의 방법에 따라 측정하였다. 96-well plate에 RAW 264.7, HaCaT cell은 5×10^3 cells/well이 되게 분주하고, CCD-986sk cell은 1×10^4 cells/well이 되게 분주한 뒤, RAW 264.7, HaCaT cell,

CCD-986sk cell 모두 시료를 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도 별로 제조하여 0.02 mL 첨가 후 RAW 264.7 cell, HaCaT cell은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였고, CCD-986sk cell은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 그 후 2.5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액을 0.02 mL 첨가하여 4시간 동안 배양시켰다. 그 후 배양액을 최대한 제거하고 각 well 당 DMSO(dimethyl sulfoxide, DUSAN)를 0.1 mL를 가하여 실온에서 30분간 충분히 반응시켜 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide 생성 저해 효과 측정

Nitric oxide(NO) 측정은 세포의 상등액의 NO의 양을 nitrite and nitrate로 측정하였다(Green 등, 1982). 96-well plate에 세포주 RAW 264.7을 1×10^4 cells/well이 되도록 분주하고, incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양시켰다. 그 뒤에 배양액을 혈청 무첨가 DMEM 배지로 교환하고, lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 염증 반응을 유도하였다. 따라서 LPS 1 ppm/well이 되도록 처리하고, 각각의 시료용액을 농도별로 처리한 후 incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양시켰다. 그 뒤에 새로운 96well plate에 세포 배양액을 100 μL 옮기고 Griess reagent를 100 μL 첨가하여 상온에서 5분 동안 반응시킨 뒤에 540 nm에서 흡광도를 측정하여 결과를 계산하였다.

Western blot을 통한 단백질 발현량 측정

iNOS, COX-2 그리고 MMP-1, Fillagrin, procollagen 단백질 발현량을 측정하기 위해 6-well plate에 세포주 RAW 264.7, HaCaT cell을 5×10^5 cells/well이 되도록 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양시켰다. 그 뒤에 배양액을 혈청 무첨가 DMEM 배지로 교환한 후 RAW 264.7은 lipopolysaccharide(LPS)로 처리하고, 각 시료용액을 농도별로 처리 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켰다.

HaCaT cell에서 MMP-1, AHR, Filagrin, Procollagen 단백질 발현량 측정을 위해 HaCaT cell에 각 시료용액을 농도별로 처리 후 UV-B 또는 benzo[e]pyrene(BP)로 자극하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양시켜 세포 보호 및 중금속 독성완화를 측정하였다.

그 뒤 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척 후 모든 세포는 RIPA buffer로 처리하여 세포를 용해시키고 원심분리기를 이용하여 4°C, 16,000 $\times g$ 에서 15분 동안 원심분리시킨 뒤 얻은 상등액을 새 튜브에 옮긴다. Membrane은 digital reciprocating shaker 기기를 이용하여 5% skim milk로 2시간 blocking한 다음 primary antibody로 3시간 반응시켜준 후 TBST solution으로 10분씩 3번 세척을 반복하였다. 그

다음에 특정 단백질에 primary antibody가 붙은 membrane을 각 항체의 숙주에 해당하는 Secondary antibody를 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 TBST solution으로 10분씩 3번 세척을 반복한 뒤 Davinch Western imaging system을 이용하여 단백질 발현량을 측정하였다.

중금속 항공해(Anti-pollution) 효과 측정

중금속 항공해 효과 측정을 확인하기 위해 96-well plate에 세포주 HaCaT cell을 5×10^3 cells/well이 되도록 분주하고, CCD-986sk cell은 1×10^4 cells/well 분주 후 incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양시켰다. 그 뒤에 배양액을 혈청 무첨가 DMEM 배지로 교환하고, benzo[e]-pyrene(BP)을 처리하여 자극하였다. 따라서 BP 150 ppm/well이 되도록 처리하고, 각각의 시료용액을 농도별로 처리한 후 HaCaT cell은 incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양시키고, CCD-986sk cell은 incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 48시간 동안 배양시켰다. 그 뒤에 2.5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액을 20 $\mu\text{L/well}$ 로 첨가하여 3 - 4시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 100 $\mu\text{L/well}$ 으로 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 통해 결과를 도출하였다.

미세먼지로부터 피부세포 보호 효과 측정

미세먼지로부터의 피부세포 보호 효과를 확인하기 위해 96-well plate에 세포주 HaCaT cell을 5×10^3 cells/well이 되도록 분주하고, CCD-986sk cell은 1×10^4 cells/well 분주 후 incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양시켰다. 그 뒤에 배양액을 혈청 무첨가 DMEM 배지로 교환하고, Benzo[e]pyrene(BP)을 처리하여 자극한다. 따라서 BP 150 ppm/well이 되도록 처리하고, 각각의 시료용액을 농도별로 처리한 후 HaCaT cell은 incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양시키고, CCD-986sk cell은 incubator에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 48시간 동안 배양시켰다. 그 뒤에 2.5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액을 20 $\mu\text{L/well}$ 로 첨가하여 3 - 4시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고, dimethyl sulfoxide(DMSO)를 100 $\mu\text{L/well}$ 으로 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 통해 결과를 도출하였다.

결과 및 고찰

ABTS⁺ radical 소거 활성

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid(ABTS)가 potassium persulfate와 반응하여 ABTS⁺ radical이 생성되어 특유의 색인 청록색을 나타내는데, 시

료를 첨가하게 되면 연한 녹색으로 변하며 hydrogen donating antioxidant와 chain breaking antioxidant 모두를 측정할 수 있는 특징을 갖는다. 항산화 물질과 반응함에 따라 흡광도의 변화가 생기므로 DPPH 소거능 실험법과 함께 많은 연구에서 이용되고 있다. 님트리일 추출물의 항산화 능력을 알아보기 위해 대조군 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하여 ABTS⁺ 라디칼 소거활성을 측정하였다. 최고 농도인 1,000 µg/mL에서 69.60%의 활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 대조군인 EGCG보다는 효과가 낮지만 항산화 기능성 소재로서 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다(Fig. 2).

DPPH radical 소거능 효과

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 전자공여능 측정에 사용되며, 물질 스스로가 매우 안정한 free radical을 가지고 517 nm에서 다른 파장과 구별되는 광흡수를 나타내 보라색을 띠는 분획물이다. DPPH는 유기용매인 알코올 등에 안정하며, 항산화 활성을 눈으로 쉽게 파악할 수 있는 장점이 있다(Molyneux, 2004). 님트리일 추출물의 항산화 능력을 알아보기 위해 대조군 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다. 님트리일 추출물의 항산화 효능의 측정 결과, 농도의존적인 항산화 효과가 나타났으며, 1,000 µg/mL의 농도에서 34.09%의 효과를 나타냈다(Fig. 3).

총폴리페놀 화합물 함량 확인

페놀성 분획물은 천연물 속에 많이 함유되어 있으며, 자유 라디칼을 소거하는 것이 이들의 주요 역할이라는 연구가 많이 보고되어 있으며, 또한 이러한 플라보노이드나 페놀산 및 안토시아닌 등의 페놀성 분획물이 DPPH

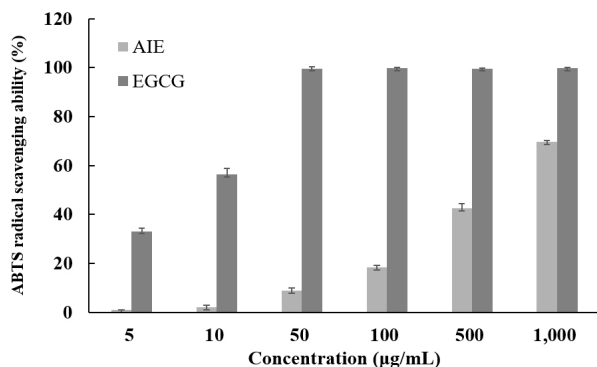


Fig. 2. ABTS⁺ action radical scavenging ability of solvent fractions from *Azadirachta indica* 70% ethanol extract.

AIE, *Azadirachta indica* ethanol extract; EGCG, epigallocatechin gallate.

Data are pressed as mean±SD of one separate experiments.

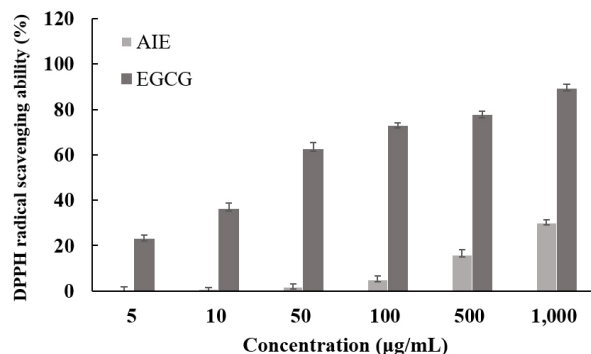


Fig. 3. Electron donating ability of solvent fractions from *Azadirachta indica* 70% ethanol extract.

AIE, *Azadirachta indica* ethanol extract; EGCG, epigallocatechin gallate.

Data are presented as mean±SD of one separate experiments.

라디칼 소거활성과 같은 항산화 활성에 매우 중요한 인자로 작용한다(Moon 등, 2004). 본 실험에서는 기본 물질로 tannic acid를 이용해 표준곡선을 사용하여 님트리 추출물의 폴리페놀 함량을 측정하고, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 그 결과, 51.37 mg/g의 함량을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다. 약용식물 추출물의 폴리페놀 함량 분석(38)에서 나온 갈화(6.46 mg/g), 갈근(5.50 mg/g) 및 감국(2.48 mg/g) 등과 비교했을 때 님트리일 70% ethanol 추출물의 폴리페놀 함량이 높은 것을 확인하였다. 이렇게 다른 약용식물들보다 높은 폴리페놀 함량을 가지므로 항산화 기능성 소재 및 천연소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다(Table 1).

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성능

Superoxide dismutase(SOD)는 생체에서 유해한 superoxide anion radical($\cdot O_2^-$)과 반응하여 과산화수소(H_2O_2)를 생성하는 효소로, 산소를 사용하는 모든 생물에 존재하며 생체에서 활성산소에 대한 장애의 방어 작용을 하는 대표적인 활성산소 저해제이다(Jain, 2003; Choi, 1999). 또한, 산소분자가 환원되어 생기는 superoxide anion radical($\cdot O_2^-$)을 제거하는 방어 메커니즘에 관여하는 효소($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2^-$)로, 독성이 매우

Table 1. The contents of total polyphenols of *Azadirachta indica* 70% ethanol extract

Sample	Polyphenol contents (mg/g) ¹⁾
AIE ²⁾	51.37±0.60 ³⁾

¹⁾TAE standards for tannic acid equivalents.

²⁾AIE, *Azadirachta indica* ethanol extract.

³⁾All value are expressed as mean±SD of triplicate determinations.

강한 hydroxy radical이 생성되는 것을 예방하는 작용을 하는 항염증 소재나 피부 노화방지를 위한 미용적인 소재로 화장품 등과 같은 첨가제로 사용이 되고 있다(Grasbon, 1999; Mckersie, 2000). SOD 유사활성 효과를 측정하여 님트리잎 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과, 최고 농도인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 24.13%의 유사활성을 보였다 (Fig. 4).

Superoxide anion radical 소거 효과

Superoxide anion radical(NBT)은 호기성 세포의 효소 또는 비효소적인 단계에서 매우 강한 독성이 생성되는 radical로서 노화와 관련하여 산화반응의 개시단계에 관여한다. 또한, 과산화수소, 하이드록시 라디칼, 일중항산소 등과 같은 활성산소종의 생성에 관여하여 지질, DNA, 단백질 등에 산화적 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Ghosh, 1998; Feng, 1999). 이러한 과정에서 항산화 물질이 superoxide anion radical과 반응하여 소거되면 보라빛으로 발색되는 현상이 줄어들게 되고, 이 흡광도의 변화를 이용하여 항산화 효과를 측정하는 방법이다. Superoxide anion radical 소거능을 측정하여 님트리잎 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과, 최고 농도인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 96.04%로 나타났다. 대조군과 비슷한 활성을 갖는 것으로 보아 항산화 기능성 소재로 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다 (Fig. 5).

생육 저해환(Clear zone) 확인

한천 내 확산법(paper disc agar diffusion assay)을 통한 님트리잎 추출물의 항균 효과를 알아보았으며, 그 결과를 생육 저해환(Clear zone)으로써 측정하여 Fig. 6과 Table 2에 나타내었다. 그 결과 님트리잎 추출물은 *E. coli*, *S. epidermis*,

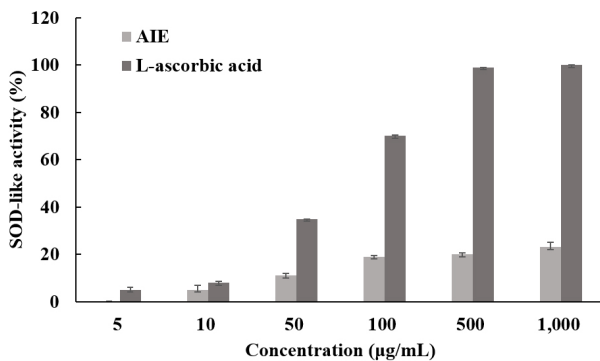


Fig. 4. Superoxide dismutase scavenging ability of solvent fractions from *Azadirachta indica* 70% ethanol extract.

AIE, *Azadirachta indica* ethanol extract; EGCG, epigallocatechin gallate. Data are presented as mean \pm SD of one separate experiments.

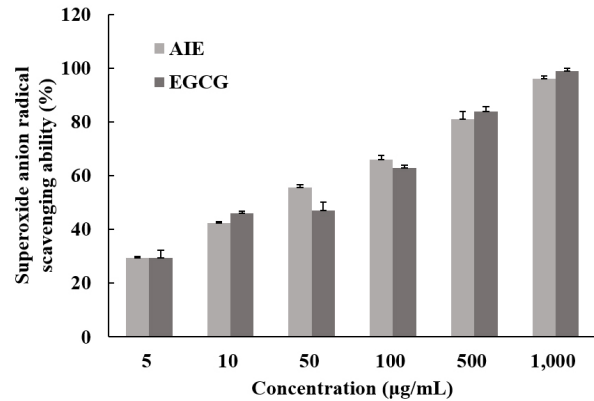


Fig. 5. Superoxide anion radical scavenging ability of solvent fractions from *Azadirachta indica* 70% ethanol extract.

AIE, *Azadirachta indica* ethanol extract; EGCG, epigallocatechin gallate. Data are presented as mean \pm SD of one separate experiments.

P. aeruginosa, *E. cloacae*, *C. albicans*군에 대하여 항균 효과를 가지지 못한 것으로 나타났으며, *S. aureus*군에서 2 mg/disc에서부터 1.0 \pm 0 cm 이상의 Clear zone이 나타났고, *P. acnes*군에 대해서는 5 mg/disc에서부터 1.1 \pm 0 cm 이상의 Clear zone이 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이 결과, 여드름균인 *P. acnes*군에서 저해효과를 보이므로 여드름 기능성 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Mushroom 유래 tyrosinase 저해 활성

Melanocyte는 표피 기저층의 색소세포 내의 melanosome에서 생합성 되는데, 여기서 melanin은 피부의 색조를 결정하는 중요한 인자로 작용한다. 아미노산의 일종인 tyrosinase에 의해 L-3,4-dihydroxyl phenylslnine(DOPA)과 DOPA quinone으로 산화된다. 그 후 다시 DOPA quinone이 5,6-dihydroxyindole, DOPA chrome, indole-5,6-quinone이 되고, indole-5,6-quinone 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 2007). 이렇게 피부 속에서의 melanin의 중합체 생합성을 저해할 수 있는 tyrosinase의 저해활성을 측정하기 위해서 mushroom 유래의 tyrosinase 저해활성을 측정하였고, 그 결과 최고 농도인 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 47.21%의 저해율이 나타났으며, 양성 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid보다는 낮은 효과가 나타났지만 님트리잎 추출물은 천연물로서 상당한 효과가 확인되어 미백 작용에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다(Fig. 7).

Elastase 저해 효과

Elastin은 진피 내에서 피부 탄력을 유지하는데 매우 중요한 단백질이며, 피부의 결합조직에 존재하여 조직의 신축성과 유연성에 관여하고 있다. Elastase는 이러한 elastin

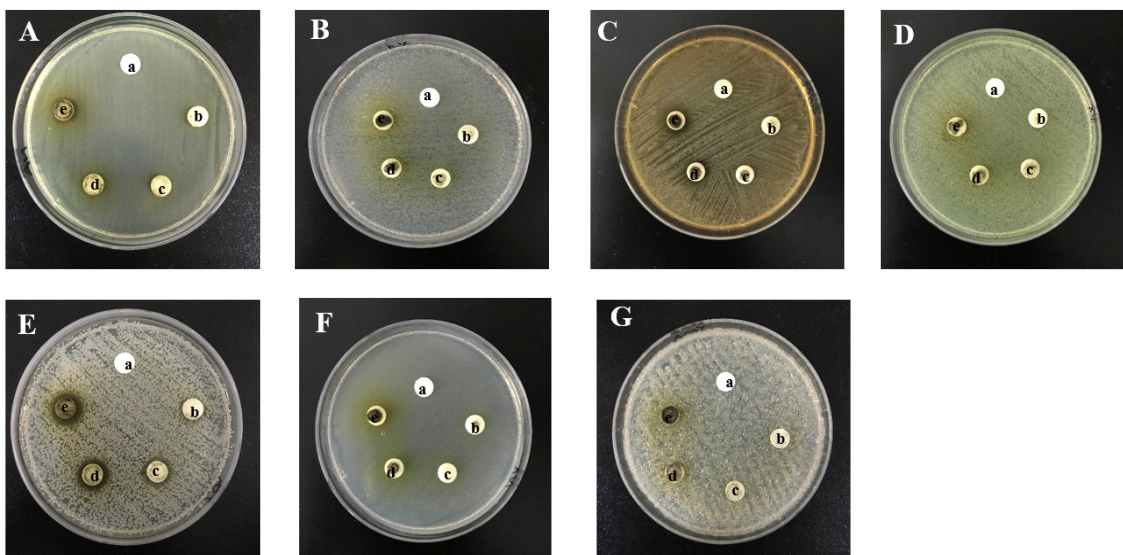


Fig. 6. Antimicrobial activity of *Azadirachta indica* 70% ethanol extract.

a, control; b, 1%; c, 2%; d, 5%; e, 10%.

A, *Escherichia coli*; B, *Enterobacter cloace*; C, *Propionibacterium acnes*; D, *Pseudomonas aruginosa*; E, *Staphylococcus aureus*; F, *Staphylococcus epidermidis*; G, *Candida albicans*.

Table 2. Antimicrobial activity of *Azadirachta indica* extracts

Bacteria	AIE clear zone	Diameter (mm)
<i>Enterobacter cloace</i>	control	-
	1%	-
	2%	-
	5%	-
	10%	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	control	-
	1%	-
	2%	10
	5%	13
	10%	16
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	control	-
	1%	-
	2%	-
	5%	-
	10%	-
<i>Pseudomonas auruginosa</i>	control	-
	1%	-
	2%	-
	5%	-

Table 2. Antimicrobial activity of *Azadirachta indica* extracts (continued)

Bacteria	AIE clear zone	Diameter (mm)
<i>Pseudomonas auruginosa</i>	10%	-
	control	-
<i>Escherichia coli</i>	1%	-
	2%	-
	5%	-
	10%	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	control	-
	1%	-
	2%	-
	5%	13
<i>Candida albicans</i>	10%	15
	control	-
	1%	-
<i>Candida albicans</i>	2%	-
	5%	-
	10%	-

¹)Dismeter (Disc 8mm).

²)No inhibitory zone was formed. Values are mean±SD of triplicate determination.

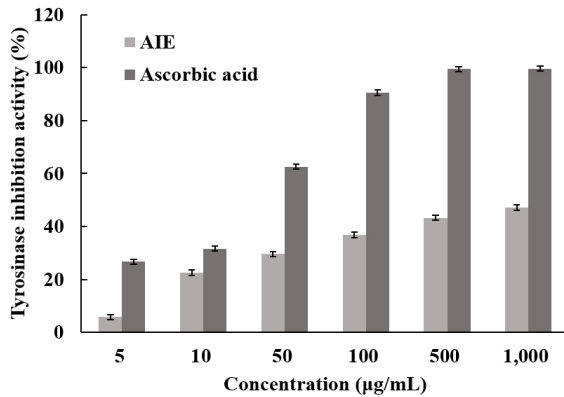


Fig. 7. Tyrosinase inhibition ability of solvent fractions from *Azadirachta indica* 70% ethanol extract.

AIE, *Azadirachta indica* ethanol extract; EGCG, epigallocatechin gallate. Data are presented as mean±SD of one separate experiments.

을 분해하는 효소이며, 주름과 피부 처짐 등의 피부노화를 발생시키는 원인 중 하나이다(An 등, 2009). 따라서 elastase 저해제는 피부 주름개선을 통한 노화를 방지하는 작용을 하게 되는데, 님트리잎 추출물의 elastase 저해 활성 효과를 측정 한 결과는 최고 농도인 1,000 µg/mL에서 저해활성이 24.24%로 나타났다(Fig. 8).

Macrophage cell(RAW 264.7)의 세포독성 확인

님트리에 의한 macrophage cell의 세포 생존율을 MTT assay를 통해 확인하였으며, 생존율이 80% 이상 나타내는 농도구간을 설정하여 100 ppm 이하로 실험을 진행하였다(Fig. 9).

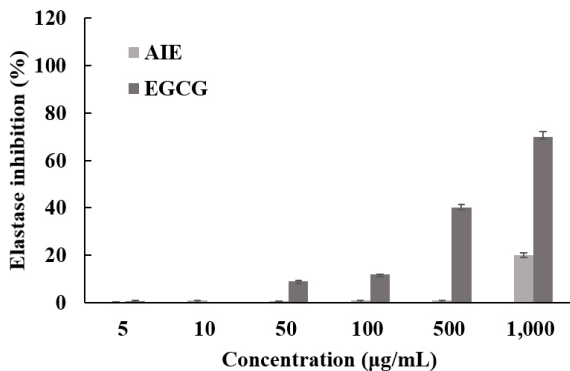


Fig. 8. Elastase inhibition ability of solvent fractions from *Azadirachta indica* 70% ethanol extract.

AIE, *Azadirachta indica* ethanol extract; EGCG, epigallocatechin gallate. Data are presented as mean±SD of one separate experiments.

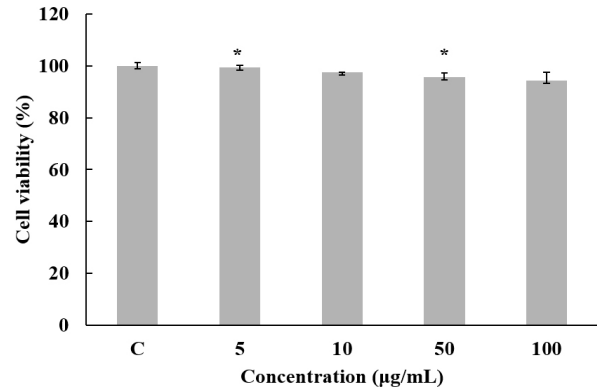


Fig. 9. Cell viability of *Azadirachta indica* 70% ethanol extract in RAW 264.7 cells.

C, LPS-not treated.

The data represent the mean±SD of one separate experiment (significant as compared to control. *p<0.05, **p<0.01).

Human keratinocyte cell(HaCaT)의 세포독성 확인

님트리에 의한 Human keratinocyte cell의 세포 생존율을 MTT assay를 통해 확인한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 측정 한 결과, 농도 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL에서 농도 10 µg/mL까지 80% 이상의 생존율을 보였고, western blot 실험을 진행하였다.

섬유아세포(CCD-986sk cell)을 이용한 세포 생존율

님트리에 의한 CCD-986sk fibroblast cell의 세포 생존율을 MTT assay를 통해 확인하였으며, 농도별로 측정 한 결과, 농도 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL에서 90% 이상의 생존율을 보였다(Fig. 11).

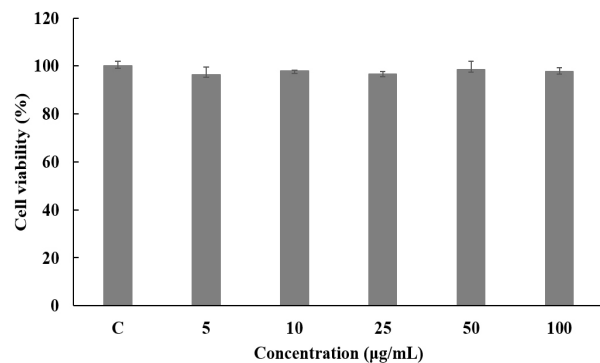


Fig. 10. Cell viability of *Azadirachta indica* extracts on human keratinocyte cells (HaCaT).

C, UV-B not treated.

The data represent the mean±SD of one separate experiments (significant as compared to control. *p<0.05, **p<0.01).

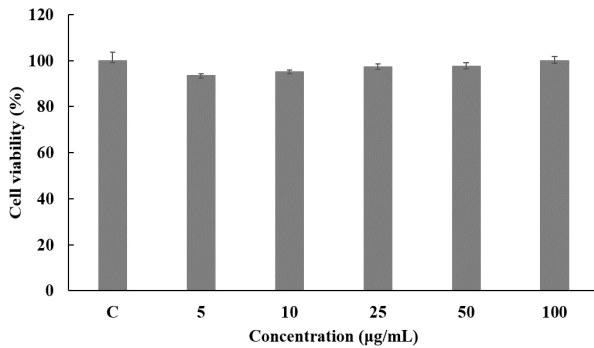


Fig. 11. Cell viability of *Azadirachta indica* 70% ethanol extract on CCD-986sk (fibroblast cell).

C, untreated group other than DMEM.

The data represent the mean±SD of one separate experiment (significant as compared to control. *p<0.05, **p<0.01).

Nitric oxide(NO) 저해 활성

넙트리의 macrophage cell인 Raw 264.7에서 chitosan-gluconate의 NO의 억제 정도를 측정하기 위해 농도별로 샘플을 처리하여 NO양을 측정된 결과를 Fig. 12와 같이 나타내었다. 최고농도인 100 µg/mL에서 68.86%의 저해효과를 보였다. 이 결과, 항염효과를 갖는 화장품 소재로 이용할 수 있을 것이라고 판단된다.

Western blot을 통한 INOS, COX-2 발현 확인

넙트리가 iNOS, COX-2에 미치는 영향을 보기 위해 LPS로 유도된 mouse macrophages cell(RAW 264.7)에 70% Ethanol 추출물을 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리한 후 24 h 뒤에 회수하여 western blot을 통해 발현을 확인하였다. 대조군으로는 ammonium pyrrolidinedithio-carbamate

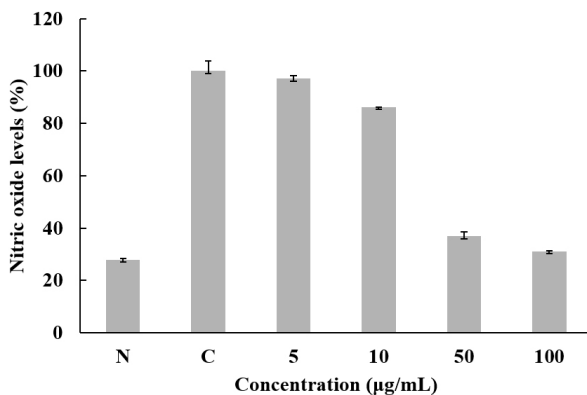


Fig. 12. Inhibition rate of *Azadirachta indica* 70% ethanol extract on nitric oxide.

N, LPS-not treated; C, LPS-not treated.

The data represent the mean±SD of one separate experiments (significant as compared to control. *p<0.05, **p<0.01).

(PDTC)를 사용하였다. House keeping gene으로는 β -actin을 사용하였다. Fig. 13에 나타난 결과, iNOS 단백질에서 최고농도 100 µg/mL에서 97.49%의 억제율이 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 보아 iNOS 단백질에 의한 NO 생성을 억제하는 것으로 판단된다.

Western blot을 통한 MMP-1, Filaggrin 발현 확인

MMPs는 피부의 섬유아세포, 각질형성세포를 비롯하여 많은 세포들로부터 분비되며, 현재까지 약 20여 종의 종류가 있다고 알려져 있다. MMP-1은 Collagenase 1로 알려져 있으며, 콜라겐 type- I과 III을 기질로 한다(Wang 등, 1999). Profilaggrin이라고 불리는 전구체는 이물질 및 수분침투에 의한 방어막 역할을 하며 피부 내부로부터 수분 증발을 저지하여 케라토히알린과립(keratohyalin granules)이 존재하는데 천연보습인자 생성에 관여하며 filaggrin 등의 단백질을 포함한다(Dale 등, 2001). 본 실험에서는 MMP-1과 filaggrin 단백질 발현 확인을 하여 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 그래프에서 확인할 수 있듯이 최고농도인 10 µg/mL에서 MMP-1은 9.93%의 억제율을 보였으며, Filaggrin에서는 32.52%의 보습효과를 가진 것을 확인할 수 있었다.

각질 형성 세포(HaCaT cell)와 섬유아세포(CCD-986sk cell)를 이용한 중금속 항공해(anti-pollution) 효과

HaCaT 세포주에 benzo[e]pyrene만 처리했을 때 30% 정도의 사멸을 보였고, CCD 세포주는 benzo[e]pyrene만 처리했을 때 31% 정도의 사멸을 보였다. Benzo[e]pyrene을 처리한 세포에 넙트리 70% ethanol 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL로 처리했을 때 HaCaT 세포주는 benzo[e]pyrene만 처리한 세포에 대비해 25 µg/mL에서 90% 이상의 개선효과를 보였으며, CCD 세포주는 benzo[e]pyrene만 처리한 세포에 대비해 25 µg/mL에서 80% 이상의 개선효과를 보였다. 이 결과, 중금속으로부터 피부보호 소재로서의 활용이 가능할 것으로 사료된다(Fig. 15).

각질 형성 세포(HaCaT cell)와 섬유아세포(CCD-986sk cell)를 이용한 미세먼지로부터 피부세포 보호 효과

HaCaT 세포주에 미세먼지만 처리했을 때 23% 정도의 사멸을 보였고, CCD 세포주에 미세먼지만 처리했을 때 23% 정도의 사멸을 보였다. 미세먼지를 처리한 세포에 넙트리 70% ethanol 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL로 처리했을 때 HaCaT 세포주는 미세먼지만 처리한 세포에 대비해 100 µg/mL에서 76% 이상의 개선효과를 보였으며, CCD 세포주는 미세먼지만 처리한 세포에 대비해 100 µg/mL에서 85% 이상의 개선효과를 보였다. 이것으로 보아 미세먼지로부터 피부보호 소재로 활용이 가능할 것으로

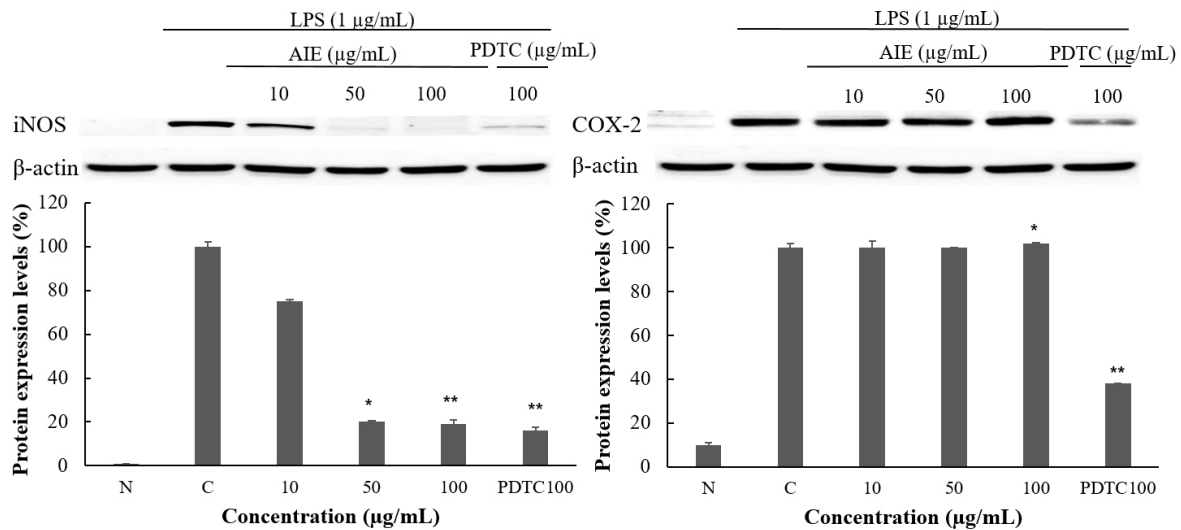


Fig. 13. Inhibitory effects of *Azadirachta indica* ethanol extract on the protein levels of iNOS and COX-2 RAW 264.7 cells. N, LPS-not treated; C, LPS-treated. The data represent the mean±SD of one separate experiments (significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

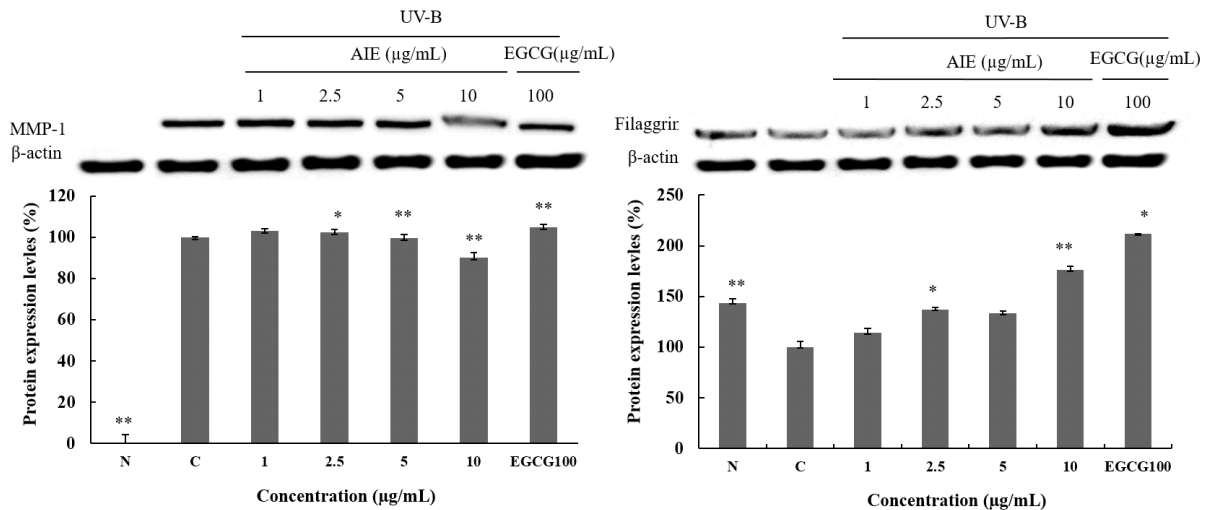


Fig. 14. Inhibitory effects of *Azadirachta indica* ethanol extract on the protein levels of MMP-1 and Filaggrin Human keratinocyte cells. N, UV-B not treated; C, UV-B treated. The data represent the mean±SD of one separate experiments (significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

로 사료된다(Fig. 16).

요 약

본 연구에서는 님트리 70% 에탄올 추출물을 이용하여 항산화, 항염, 미백, 주름 및 미세먼지와 중금속으로부터 세포보호 효과를 연구하여 기능성 화장품 소재로서 가능성을 확인하였다. 폴리페놀 함량은 51.37 mg/g을 함유하고

있으며, DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능은 최종 농도인 1,000 μg/mL에서 각 34.09%, 72.18%의 활성을 나타내었다. SOD 실험에서는 최종 농도인 1,000 μg/mL에서 24.13%의 효과를 보였다. 미백 효과를 확인하기 위해, 최종 농도 1,000 μg/mL에서 티로시나아제 억제효과는 47.21%였다. 또한, 님트리일 추출물을 이용해 세포 독성을 확인하기 위해 대식세포(RAW 264.7)에 MTT assay 실험을 한 결과, 100 μg/mL의 이하 농도까지 세포 생존율에

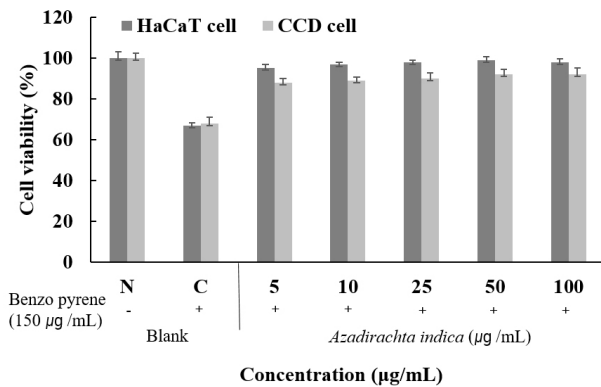


Fig. 15. Cell viability on benzo[a]pyrene of HaCaT cell (keratinocyte) and CCD-986sk (fibroblast cell) treated with *Azadirachta Indica* 70% ethanol extract.

N, benzo[a]pyrene-not treated; C, benzo[a]pyrene-treated. The data represent the mean±SD of one separate experiments (significant as compared to control. *p<0.05, **p<0.01).

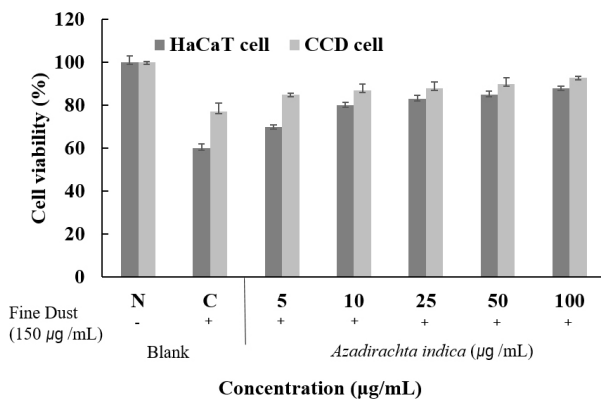


Fig 16. Cell viability on fine dust of HaCaT cell (keratinocyte) and CCD-986sk (fibroblast cell) treated with *Azadirachta Indica* 70% ethanol extract.

N, fine dust-not treated; C, fine dust-treated. The data represent the mean±SD of one separate experiment (significant as compared to control. *p<0.05, **p<0.01).

영향을 미치지 않음을 확인하였다. LPS로 자극해 염증반응을 유도시킨 대식 세포를 이용한 세포의 소염(NO) 분석에서는 최종농도인 1,000 µg/mL에서 68.86% 및 66.45%의 소염 활성을 나타냈다. 또한, iNOS 단백질은 100 µg/mL 농도에서 97.49%의 억제율이 나타났다. 각질세포(HaCaT)를 사용한 세포 독성 분석(MTT assay)에서, 세포 생존율은 10 µg/mL에서 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율과 유사하였다. 또한, western blotting으로 MMP-1의 억제율을 확인하였다. 추가적으로 사람 피부 세포인 HaCaT cell과 CCD-986sk cell를 미세먼지와 중금속 성분인 benzo[e]pyrene (BP)으로 자극시킨 뒤 님트리 추출물을 처리해 자극된 세

포들이 추출물에 의한 개선효과와 세포생존율을 측정해 anti-pollution 효능을 확인했다. Benzo[e]pyrene으로 자극한 세포는 25 µg/mL의 농도에서 HaCaT cell과 CCD cell 각각 92%, 81% 이상의 개선 효과를 보였고, 미세먼지로 자극한 세포는 25 µg/mL의 농도에서 HaCaT cell과 CCD cell 각 85%, 76% 이상의 개선 효과를 보였다. 따라서 님트리 70% 에탄올 추출물은 미세먼지 차단 화장품 소재로서의 화장품 및 기능성 활용가치가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부의 창업성장 기술개발사업 (과제번호: S2746447)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Jin A Hyun <https://orcid.org/0000-0001-5500-2044>
Bong Jeon An <https://orcid.org/0000-0001-6655-7707>

References

- An BJ, Lee JT, Lee CE. Novel Cosmetic Material. Gwangmungak, Paju, Korea, p 82 (2009)
- Bagchi D. Green Tea. Antioxidant Power to Fight Disease. Keats Publishing, New Canaan, CT, USA, p 48 (1999)
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Pysiol Rev, 78:547-581 (1993)
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev, 78, 547-581 (1998)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200 (1958)
- Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. Ann N Y Acad Sci, 973, 31-43 (2002)
- Brieskorn CH, Fuchs A, Bredenberg JB, McChesney Jd, Wenkert E. The structure of carnosol. J Org Chem, 29, 2293-2298 (1964)
- Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. J Pharm Pharmacol,

- 46, 982-985 (1994)
- Cannell RJ, Kellam SJ, Owsianka AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med*, 54, 10-14 (1988)
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47, 936-942 (1987)
- Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher AM, Gaetano C. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int J Mol Sci*, 14, 17643-17663 (2013)
- Cho YJ, An BJ. Anti-inflammatory effect of extracts from Cheongmokbanosang (*Morus alba* L.) in lipopolysaccharide-stimulated RAW cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 51, 44-48 (2008)
- Choi JH. The Role of Oxygen Radicals in Aging Process. October 1, Bugyong University, Korea, p 2 (1998)
- Choi SM, Kim CD, Lee MH, Choi YH, Rang MJ, Ahn HJ, Yun YP. Screening of 5 α -reductase inhibition and comedolytic effects from natural products. *Yakhak Hoeji*, 43, 342-350 (1999)
- Clayton T, Soralump P, Chaukul W, Tamsiririrkkul R. Medicinal Plants in Thailand, Volume 1. Amarint Printing and Publishing PuKlic, Bangkok, p 44 (1996)
- Conner DE, Beuchat LR. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl Environ Microbiol*, 47, 229-233 (1984)
- Dale BA, Fleckman P, Kuechle MK, Lewis S, Presland RB. Regulated expression of human filaggrin in keratinocytes results in cytoskeletal disruption, loss of cell-cell adhesion, and cell cycle arrest. *Exp Cell Res*, 270, 199-213 (2001)
- Ding C, Cicuttini F, Li J, Jones G. Targeting IL-6 in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. *Expert Opin Invest Drugs*, 18, 1457-1466 (2009)
- Emerit I. Free Radicals and Aging of the Skin. In: Free Radicals and Aging, Emerit I, Chance B (Editors), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, p 328-341 (1992)
- Farhang B, Kakuda Y, Corredig M. Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Dairy Sci Technol*, 92, 353-366 (2012)
- Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol*, 163, 6403-6412 (1999)
- Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Lin P, McPhillips F, Wang Z, Li X, Wan Y, Kang S, Voorhees JJ. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*. *J Clin Invest*, 15, 1432-1440 (1998)
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem*, 12, 239-249 (1912)
- Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Bio Chem*, 245, 4053-4057 (1970)
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16, 225-260 (1998)
- Grasbon T, Grasbon-Frodl EM, Juliusson B, Epstein C, Brundin P, Kampik A, Ehinger B. CuZn superoxide dismutase transgenic retinal transplants. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 237, 336-341 (1999)
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 126, 131-138 (1982)
- Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signalling*, 13, 85-94 (2001)
- Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signalling*, 14, 879-897 (2002)
- Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (y)-sensitive transcription factors. *Cell Signalling*, 14, 879-897 (2002)
- Im S, Moro O, Peng F, Medrano EE, Cornelius J, Babcock G, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA. Activation of the cyclic AMP pathway by α -melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res*, 58, 47-54 (1998)
- Jain A, Basal E. Inhibition of *Propionibacterium acnes*-induced mediators of inflammation by indian herbs. *Phytomedicine*, 10, 34-38 (2003)
- Kameyama K, Sakai C, Kuge S, Nishiyama S, Tomita Y, Ito S, Wakamatsu K, Hearing VJ. The expression of tyrosinase, tyrosinase-related proteins 1 and 2 (TRP1 and

- TRP2), the silver protein, and a melanogenic inhibitor in human melanoma cells of differing melanogenic activities. *Pigment Cell Res*, 8, 97-104 (1995)
- Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain*, 5, 14 (2012)
- Kang SO, Lee KK, Choi JD. Free radical scavenging activity and characterization of the extracts from *Alpinia katsumadai* and *Areca catechu*. *J Korean Cosmet Scientists Korea*, 27, 133-150 (2001)
- Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutat Res*, 659, 15-30 (2008)
- Lee JY, Park WS, Son ED, Ahn SM, Hwang JS. *In vitro* evaluation methods for development of cosmeceutical ingredients. *J Altern Anim Exp*, 1, 33-40 (2007)
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 47, 469-474 (1974)
- Marmol V, Beermann F, Veronique M, Friedrich B. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FFBS Lett*, 381, 165-168 (1996)
- Mckersie BD, Murnaghan J, Jones KS, Bowley SR. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol*, 122, 1427-1437 (2000)
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-435 (2008)
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J Sci Technol*, 26, 211-219 (2004)
- Moon JS, Kim SJ, Par YM, Hwang IS, Kim EH, Park JW, Park IB, Kim SW, Kang SG, Park YK, Jung ST. Antimicrobial effect of methanol extracts from some medicinal herbs and the content of phenolic compounds. *Korean J Food Preserv*, 11, 207-213 (2004)
- Park SH, Cho CH, Ahn BY. A study on the application of *Gastrodiae rhizoma* for food stuffs - Effects of *Gastrodiae rhizoma* on the regional cerebral blood flow and blood pressure. *J East Asian Soc Dietary Life*, 17, 554-562 (2007)
- Petersen MJ, Hansen C, Craig S. Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 99, 440-444 (1992)
- Posadas I, Terencio MC, Guillen I, Ferrandiz ML, Coloma J, Paya M, Alcaraz MJ. Co-regulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch of Pharmacol*, 361, 98-106 (2000)
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res*, 22, 375-383 (1995)
- Shin JH, Kang JR, Kang MJ, Shin JH. Physiological activity of five kinds of medicinal plant extracts with various solvents and their composites. *J Life Sci*, 28, 320-330 (2018)
- Shin JY. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J Food Nutr*, 14, 568-572 (2001)
- Smith LT, Holbrook KA, Madri JA. Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *Am J Anat*, 175, 507-521 (1986)
- Steskova A, Morochovicova M, Leskova E. Vitamin C degradation during storage of fortified foods. *J Food Nutr Res*, 45, 55-61 (2006)
- van der Nat JM, van der Sluis WG, Silva KTD, Labadie RP. Ethnopharmacognostical survey of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). *J Ethnopharmacol*, 35, 1-24 (1991)
- Wang Y, Johnson AR, Ye QZ, Dyer RD. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J Biol Chem*, 274, 33043-33049 (1999)
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med*, 52, 517-519 (1986)