



< 연구논문 >

한국미용학회지, 제30권 제5호 (2024), pp. 1078-1088
http://e-jkc.org

pISSN 1229-4349, eISSN 2765-5881

J. Kor. Soc. Cosmetol.

Vol. 30, No. 5, pp. 1078-1088(2024)

https://doi.org/10.52660/JKSC.2024.30.5.1078

강황 추출물 및 분획물의 항산화 및 피부염증 억제 효과

이교영¹ · 서승희^{2,*}

¹동신대학교 사회개발대학원 뷰티미용학과, 대학원생

²동신대학교 뷰티미용학과, 교수

Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Curcuma Longa* Extracts and Fractions on Skin Inflammation

Gyo-Young Lee¹ and Seung-Hee Seo^{2,*}

¹Graduate Student, Department of Cosmetology, DongShin University

²Professor, Department of Cosmetology, DongShin University

Addresses the impact of modern society's rapid industrialization and environmental pollution, leading to increased oxidative stress and immune system disorders. Skin barrier issues have resulted in a rise in inflammatory skin conditions, sparking heightened interest in functional cosmetics to address these concerns and combat aging. The research focused on exploring natural ingredients, particularly specific fractions of *Curcuma Longa* extracts, known for their antioxidant properties. The results of this study are summarized as follows. In the first stage experiment, DPPH radical scavenging activity and ABTS radical scavenging activity were investigated, and fractions exhibiting higher scavenging activity than extracts were sought. In the 2nd-step experiment, the cell survival rate was examined to determine the concentration that would not affect cytotoxicity. To demonstrate significant anti-inflammatory effects on RAW 264.7 cells, inflammation reactions were induced by LPS and the production of Nitric Oxide (NO) was controlled. As a result, *Curcuma Longa* extracts and fractions all proved excellent control effects on NO production. In HaCaT cells, skin inflammation was induced with TNF- α /IFN- γ and the control of interleukin (IL)-6 production was measured. As a result, *Curcuma Longa* extracts and fractions proved to facilitate the immune reaction and control the reaction that would lead to inflammation. In the following 3rd-step experiment, the control of Chemokine's major factors IL-8, RANTES, and TARC was measured. As a result, it was verified that certain fractions of *Curcuma Longa* of extract showed excellent Chemokine production control effects and thus that these specific fractions are effective on various inflammatory skin diseases. ICAM-1 expressions were observed to control the initial stage of inflammation in a way of cellular adhesion regulation, and the MAPK path which is important to regulate inflammatory reactions in the signaling system was measured. As a result, the inhibition of phosphorylation, which is important for initial inflammation inhibition and inflammatory reaction control, was verified. Based on the above-stated findings, active ingredients containing certain fractions were analyzed, and color reactions in specific fractions were induced from active ingredient spots of extract. In consideration of future material development and production, the quantitative and qualitative characteristics of active ingredients of certain fractions were examined with the HPLC, and it was verified that certain fractions contained more active ingredients than extracts. In conclusion, certain fractions of natural elements proved the great potentials as a cosmetics ingredient. Therefore, these fractions proved excellent anti-oxidative and anti-inflammatory effects in certain fractions, and the efficiency is quite high with only a small quantity of them. It is expected that these fractions are widely utilized as a cosmetic element, and the future study will examine natural cosmetic elements from these fractions with the aim to contribute to the functional cosmetics industry and anti-aging product market.

Keyword: Anti oxidant effect, Anti-inflammatory effect, *Curcuma Longa* extracts, *Curcuma Longa* fractions, Skin inflammation

본 논문은 저자의 학위논문 일부를 발췌하여 재구성하였음

*Corresponding author: Seung-Hee Seo

Tel : +82-61-330-3297

E-mail : ssh@dsu.ac.kr

접수일(2024년 8월 23일)/수정일(2024년 9월 30일)/채택일(2024년 10월 7일)

I. 서 론

1. 연구의 필요성 및 목적

최근 급격한 산업화에 따른 환경 및 대기 오염으로 인하여 현대인들에게 산화적스트레스 증가 및 면역 체계 이상 등으로 인한 질병이 증가하고 있으며(Yu, 2018), 외부 자극에 노출된 피부 장벽에는 다양한 염증성 피부질환이 발생하고 있다(Kim, 2016). 이러한 사회적 분위기로 인해 다양한 피부염증 질환 및 노화 개선에 관한 현대인들의 관심이 높아지면서 기능성 화장품 시장이 확대되었으며, 더불어 항노화 시장도 고령사회 진전에 발맞춰 높은 성장세를 보이고 있다. 이에 따라 다양한 소재를 활용한 기능성 성분 탐색 관련 연구가 활발히 진행되고 있으나, 기능성 화장품에 주원료로 사용되는 일부 성분이 발암물질로 지정되면서 끊임없이 발견되는 부작용 및 높은 가격, 합성 염증 억제제의 확실하지 않은 효능 등이 심각한 문제로 대두되고 있다(Kim et al., 2017). 이러한 점을 보완하기 위해 부작용이 적은 천연 유래 소재에서 활성 성분을 찾고자 하는 연구가 활발히 수행되면서(Park et al., 2019), 유효성분이 다량 함유된 특정 분획물을 탐색하는 연구도 활발히 진행되고 있다. 이에 본 연구는 선행연구 조사를 통하여 천연 항산화 및 항염증, 항암효과 등이 우수하다고 알려진 강황 추출물을 연구 소재로 선정하였으며, 강황 추출물을 활용하여 추출물보다 유효성분이 다량 함유되어 있는 특정 분획물을 찾아 항산화 효과와 피부염증 억제 효과를 탐색하고자 하였다.

강황(*Curcuma longa* Linne)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 초본 식물로 열대 아시아 원산으로도 인도, 중국, 동남아시아 등지에서 주로 재배되고 있다(Yun et al., 2022). 본초학에서는 강황이 따뜻한 성질을 가진 생약으로 분류되며, 혈액순환 촉진과 통증 완화에 탁월하다고 하였다. 강황에는 curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin과 같은 생리활성 물질이 함유되어 있으며 담도염, 간염, 담석증, 소화기 및 심혈관계 질환의 예방과 치료를 위한 의약품 소재로 주목받고 있다. 선행연구로는 만성 및 급성 염증 모델에서 강황 추출물의 효과(Senthilkumar et al., 2014), 강황 추출물과 커큐민의 사염화탄소로 유도된 간 손상에서의 항산화 효능 연구(Choi, 2017), 일반 강황과 발효 강황의 항산화 및 항균 활성 특성(Ra et al, 2016)에 관한 연구 등 강황 추출물에 관한 연구는 매우 다양하지만, 분획물을 활용한 피부염증과 관련된 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 강황을 활용하여 항산화 효과 및 항염증 효과와 관련된 기전을 확인하고, 독성이 없는 강황 추출물(*Curcuma Longa* Extract, CL Ex.) 및 강황 분획물(*Curcuma Longa* Fraction, CL Fr.)의 효능을 탐색하여 화장품 소재로서의 이용 가능성을 분석해 보고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물 분획 방법

본 연구는 강황(*Curcuma longa*) 뿌리줄기에서 추출한 물질을 사용하여 실험을 진행하였다. 강황 뿌리줄기는 분쇄 후, 30% 에탄올(EtOH)을 용매로 하여 추출을 진행하였다. 추출은 용매 5배량을 사용하여 24시간 동안 상온에서 교반 추출을 시행하였으며, 이후 여과 과정을 거쳐 불순물을 제거하였다. 여과된 추출액은 감압 농축기를 사용하여 감압 상태에서 에탄올을 제거하였고, 이를 동결건조하여 총 500 g의 강황 추출물(CL Ex.)을 수득하였다. 수득된 강황 추출물(CL Ex.)은 YMC사의 C-18 담체를 사용하여 분획하였다. 분획은 메탄올(MeOH) 농도 기울기를 적용하여 순차적으로 진행하였다. 먼저 20% MeOH 용액 500 mL를 컬럼에 통과시켜 첫 번째 분획물(CL Fr. 1)을 수득하였고, 이후 40% MeOH(CL Fr. 2), 60% MeOH(CL Fr. 3), 80% MeOH(CL Fr. 4), 100% MeOH(CL Fr. 5) 용액을 각각 500 mL씩 동일한 방식으로 흘려보내어 총 5개의 분획물(CL Fr. 1-5)을 획득하였다.

2. 세포 배양

본 실험에 사용된 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 Fetal Bovin Serum(FBS) 10%와 penicillin/streptomycin 1%가 함유된 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지를 이용하였다. 사람각질형성세포주인 HaCaT(Human Keratinocyte) 세포는 조선대학교 약학대학(Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. HaCaT 세포는 10%의 Fetal Bovine Serum(FBS)과 1%의 penicillin/streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂를 유지하는 인큐베이터를 통해 세포를 배양하여 실험에 사용하였다.

3. 강황 추출물 및 분획물의 세포 및 생리활성 효과 측정

1) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH 용액은 Methanol을 사용하여 0.3 mM의 농도로 제조하였으며, radical 생성을 위해 30분간 반응시켰다. 이후 강황 추출물과 분획물 용액을 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도로 제조하였다. 양성 대조군은 radical 소거 활성 억제에 효과적이라고 알려진 Ascorbic Acid와 비교하였다. DPPH 용액과 제조된 시료를 1:9 비율로 혼합한 후 암실에서 30분간 반응시킨 후 micro plate에 150 µL씩 분주하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정해 DPPH 소거율을 계산하였다.

2) ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS 7.4 mM 용액과 Potassium persulfate 2.6 mM 용액을 혼합 후 16-24시간 반응시켜 radical을 생성시켰다. 강황 추출물 및 분획물 용액을 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL 농도로 제조하였으며, 추출물과 분획물을 ABTS 용액과 49:1 비율로 혼합 후 암실에서 30분간 반응시켰다. 이후 micro plate에 150 μ L씩 분주하여 734 nm의 파장에서 흡광도를 측정해 ABTS 소거율을 계산하였다.

3) 세포독성 측정

세포독성은 강황 추출물 및 분획물을 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 사람각질형성세포주인 HaCaT 세포를 통해 확인하였다. 세포를 12시간 배양한 후 강황 추출물 및 분획물을 독성에 미치지 않는 농도로 희석하고 48시간 배양한 후, 5 mg/mL의 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide(MTT) 용액을 20 μ L씩 분사하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거해 Reductase에 의해 환원되어 보라색을 띠는 formazan을 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해한 후 VersaMax™ Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) RAW 264.7에서 Nitric Oxide 생성억제 측정

대식세포주인 RAW 264.7 세포를 5×10^4 cell/mL 수준으로 48well plate에 12시간 동안 배양하였다. 이후 강황 추출물 및 분획물을 농도별 처리하여 3시간 배양 후 염증 유도물질인 Lipopolysaccharide(LPS)를 0.5 mg/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 배양을 마치고 난 후 세포에서 상등액으로 분비된 Nitric oxide(NO)를 측정하기 위해 Griess 시약 [0.1% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) phosphoric acid]을 사용해 반응시킨 후, VersaMax™ Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, USA)로 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5) Cytokine, Chemokine 생성억제 측정

사람각질형성세포주인 HaCaT세포를 5×10^4 cell/mL 수준으로 48 well plate에 12시간 동안 배양하였다. 그 후 강황 추출물 및 분획물을 각각 독성이 없다고 판단된 농도별로 처리하여 3시간뒤 TNF- α 와 IFN- γ 를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 Cytokine 및 Chemokine ELISA 키트를 준비하여 세포 상등액을 96 well plate에 정량적으로 추가해 ELISA 플레이트를 제조사의 권장 조건에 따라 처리하여 Cytokine 및 Chemokine 생성 억제도의 차이를 VersaMax™ Tunable Microplate Reader(Molecular Devices, USA) 기기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Western Blotting Analysis

HaCaT 세포를 5×10^4 cell/well의 수준으로 24시간 배양 후 각각의 시료를 농도별로 처리하고 TNF- α 와 IFN- γ 로 자극하였다. ICAM-1(24 h), p-p38(2 h), p-ERK(15 min), 이후 Cell scraper를 이용하여 단백질을 회수하였다. ICAM-1은 RIPA lysis buffer를 첨가하였으며 p38, ERK는 RIPA lysis buffer(1 mL RIPA buffer + 10 μ L phosphatase inhibitor)를 첨가하여 4°C, 16,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 새로운 tube에 옮겨 담았다. 단백질 정량은 BSA(bovine serum albumin)를 이용하여 Microplate Reader를 통해 정량하였으며, 각각의 시료를 10% SDS-polyacrylamide gel에서 영동하고 45V로 1시간 30분동안 Transfer를 진행하였다. 그 후 skim milk를 5% 희석하여 blocking 한 후 1 \times TBST(Tris-Buffered Saline, 0.1% Triton x-100)로 3회 세척 후 ICAM-1 antibody를 (1:1000), p-p38(1:1000), p-ERK(1:1000) 조건으로 하룻밤 반응한 다음, second antibody (1:5000)를 1시간동안 반응시켜 1 \times TBST로 10분간 4회 세척하였다. 이후 Detection reagent인 ECL solution을 처리하였다. Band intensities는 ImageJ software(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 결과를 확인하였다.

7) 추출물 및 분획물의 함유성분 TLC 분석 방법

Thin layer chromatography(TLC)를 이용하여 함유 성분의 패턴을 분석하였다. TLC plate(silica gel 60 F254, silica gel 60 F C18 F254)은 merck사에서 구매하여 사용하였다. TLC plate에 이동상 용매를 전개시킨 후 UV 조사기 및 10% H₂SO₄를 이용하여 함유성분의 패턴을 발색시킨 후 R_f치를 비교하였다.

8) HPLC를 이용한 추출물 유효성분 정성 및 정량 분석 방법

HPLC를 이용하여 항산화 성분을 분석하기 위해 함유 성분의 패턴을 분석하였다. HPLC 장치는 SHIMADZU(Younglin, Korea)사용하였으며, 컬럼은 YMC(Younglin, Korea)의 YMC-Triart C-18 ExRS(4.6 \times 150 mm, 5 μ m)을 사용하였다. 시료는 강황 추출물 및 특정 분획물과 강황의 유효성분 demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin의 단일화합물 무게를 정확하게 측정 한 후, MeOH에 녹여 0.45 μ m PVDF membrane filter로 여과하여 사용하였다. 강황추출물 및 특정분획물의 분석 조건으로 컬럼 온도는 30°C, 주입량은 20 μ L로 진행하였다. 이동상은 H₂O(0.1% Formic acid(a)와 Acetonitrile(b)을 gradient 조건을 사용하였다. 0-11 min 동안 (b)를 50-80%로, 30-40 min 동안 (b)를 80-90%로 진행하였고, 40-45 min 동안 (b)를 90-100%로 진행하였으며 42-50 min 동안 (b)를100%로 유지하다가, 50-65 min에 (b)를 100-50%까지 진행하였다. 유속은

1.0 mL/min으로 254 nm에서 검출하였다.

4. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 평균값±표준편차(mean±S.D.)로 나타내었으며, 통계 분석은 GraphPad Prism V5.01을 활용하였다. 각 처리군 간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 수행하였고, Tukey's multiple comparison tests를 사용하여 p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 차이로 간주하였다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

III. 결과 및 고찰

1. DPPH radical 소거 활성 측정

강황 추출물 및 분획물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 강황 추출물(CL Ex.) 및 분획물(CL Fr.)을 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 최고농도인 1 mg/mL 농도에서 26.96±1.41%의 강황 추출물의 소거 활성을 확인하였으며, 분획물 1번부터 5번(CL Fr. 1-5)까지 1 mg/mL 농도에서 9.57±0.56, 33.47±1.11, 47.75±0.71, 55.36±1.58, 37.69±3.15%의 소거 활성을 보였다. Jung et al.(2014)의 연구에 따르면 DPPH radical 소거 활성의 연구 결과에서 강황 추출물 안에 항산화 작용의 활성력을 가진 curcumin의 함량이 높을수록 DPPH의 radical 소거 활성이 높게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 강황 분획물 4번에 높은 소거 활성으로 보이는 강황의 유효성분 물질이 함유되어 있을 것으로 예측해 볼 수 있다(Fig. 1).

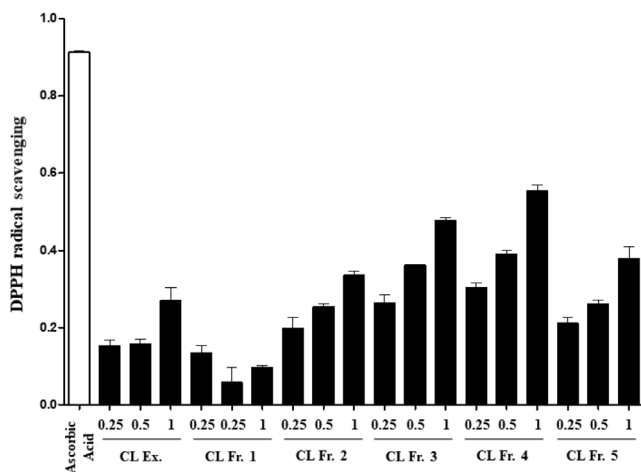


Fig. 1. The DPPH radical scavenging activity of *Curcuma Longa* extract and its fractions was evaluated, with the data presented as the mean ± S.D. from three independent experiments.

2. ABTS radical 소거 활성 측정

강황 추출물 및 분획물의 항산화 효과를 알아보기 위해 ABTS radical 소거 활성을 측정하였다. 강황 추출물 및 분획물을 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL의 농도로 처리 시 최고농도인 1 mg/mL의 농도에서 24.42±1.41%의 강황 추출물의 소거 활성을 확인하였으며, 분획물 1번부터 5번까지 16.16±1.41, 45.37±2.00, 60.95±2.71, 74.94±1.64, 48.87±3.21%의 소거 활성을 보였다. 이상의 결과들을 종합해 보았을 때 강황 분획물 4번에서 강황 추출물의 3배 높은 소거 활성 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 2).

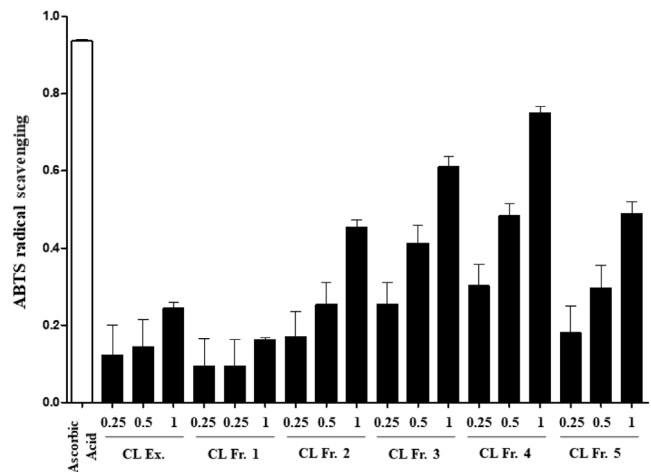


Fig. 2. The ABTS radical scavenging activity of *Curcuma Longa* extract and its fractions was assessed, with the results expressed as the mean ± S.D. from three separate experiments.

3. 세포독성 측정 결과

대식세포주인 RAW 264.7 세포와 사람각질형성세포주인 HaCaT 세포를 이용하여 세포독성 실험을 진행하였다. RAW 264.7 세포에서 강황 추출물 및 분획물의 세포독성을 측정한 결과 강황 추출물 및 분획물은 대부분 독성이 관찰되지 않았으나, 분획물 4번에서 10 µg/mL 농도부터 독성이 관찰되었다. 이러한 결과를 통하여 분획물 4번에는 세포독성이 없는 10 µg/mL 이하 농도로 설정하여 염증 억제 효능을 분석하였다(Fig. 3). HaCaT 세포에서 강황 추출물 및 분획물을 각 농도 별로 처리하였을 때 강황분획물 4번이 10 µg/mL에서 독성이 발견되어 최고농도를 5 µg/mL로 설정하였으며, 이 농도로 처리하였을 때 강황 추출물 및 분획물 모두 독성이 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 HaCaT 세포에서는 최종적으로 강황분획물 4번의 세포독성이 없는 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL 농도를 설정하여 염증 억제 효능을 살펴보았다(Fig. 4).

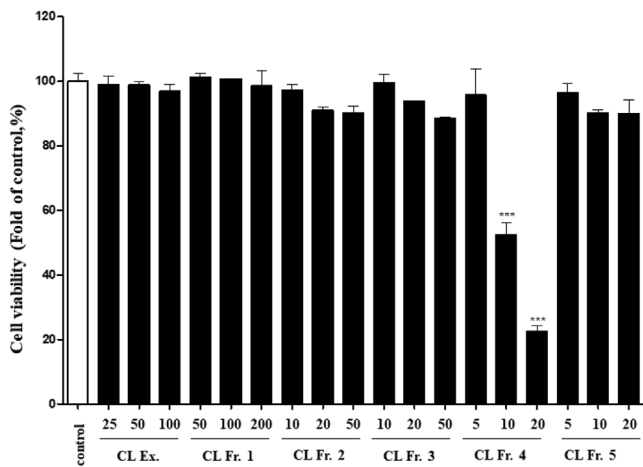


Fig. 3. Cell viability of RAW 264.7 cells treated with *Curcuma longa* extracts and Fractions 1-5 was evaluated. The cells were exposed to varying concentrations of *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 for 24 hours, and cell viability was determined using the MTT assay. Data are expressed as the mean ± S.D. from two independent experiments. *** $p < 0.001$ compared to the control group.

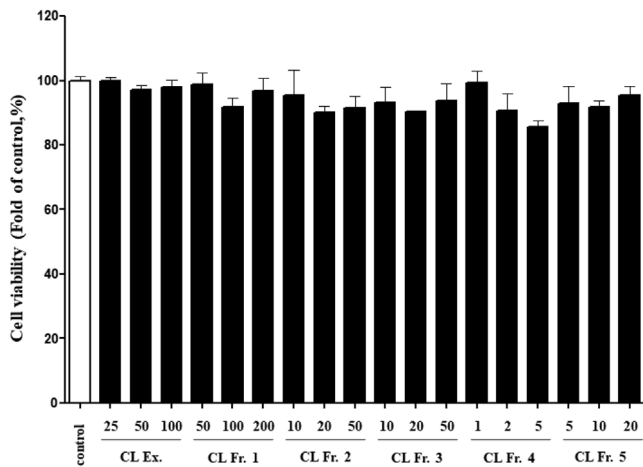


Fig. 4. The cell viability of HaCaT cells treated with *Curcuma longa* extracts and Fractions 1-5 was assessed. The cells were incubated with the specified concentrations of *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 for 24 hours, and cell viability was measured using the MTT assay. The results are presented as the mean ± S.D. from two independent experiments.

4. RAW 264.7 세포에서 Nitric Oxide 생성억제 효과

LPS로 자극받아 염증에 노출된 RAW 264.7 세포에서 면역 방어기전의 다양한 과정을 매개하는 Nitric Oxide(NO) 생성억제를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 강황 추출물 및 분획

물을 양성대조군인 Sulfuretin 20 µM 농도와 비교한 결과, 강황 추출물의 100 µg/mL 농도에서 NO 생성억제 결과를 확인하였다. 분획물에서는 강황 분획물 4번의 2 µg/mL와 5 µg/mL에서 높은 NO 생성억제 효과를 확인하였으며, 강황 분획물 5번 20 µg/mL 농도에서는 두 번째로 높은 NO 생성억제 효과를 확인하였다(Fig. 5).

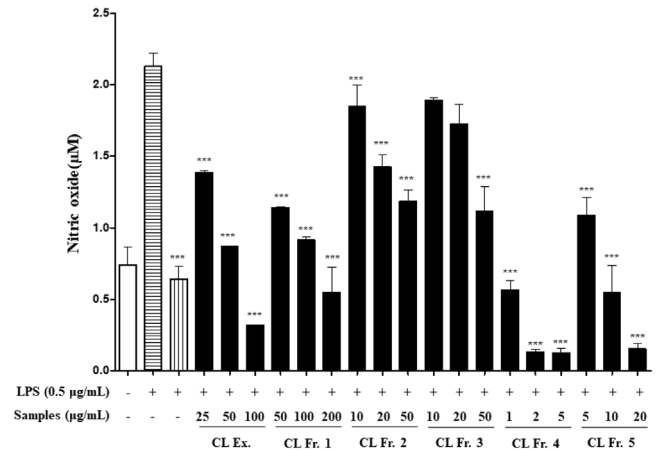


Fig. 5. Effect of *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 on Nitric Oxide production in RAW 264.7 cells. Cells were pre-treated with *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 at the specified concentrations for 3 hours, followed by stimulation with LPS (0.5 µg/mL) for 24 hours. Data are expressed as mean ± S.D. from two independent experiments. Sulfuretin served as the positive control. *** $p < 0.001$ compared to the LPS-only group.

5. HaCaT 세포에서 Cytokine 생성억제 효과

1) 강황 추출물 및 분획물의 IL-6 생성억제 효과

HaCaT 세포에서 TNF-α와 IFN-γ로 유도된 피부 염증 반응에 관련된 염증성 사이토카인 IL-6 생성억제 결과는 Fig. 6과 같다. 본 강황 추출물에서는 IL-6 생성을 억제하는 경향을 보였으나 유의적으로 억제하지 못하였다. 분획물에서는 강황 분획물 4번에서 2, 5 µg/mL 농도에서 염증성 사이토카인의 IL-6 생성량을 유의적으로 억제하였다. Zhao et al.(2020) 연구에 따르면 HaCaT 세포에서 강황의 지표 물질인 curcumin 성분으로 인해 IL-6 생성이 억제된다고 보고되어 있다. 이러한 결과를 바탕으로 강황 분획물 4번에 염증성 사이토카인 IL-6 생성의 억제가 우수한 결과로 보아 강황 분획물 4번에는 IL-6 생성을 억제하는 강황의 유효성분이 다량 함유되어 있을 것으로 예측해 볼 수 있으며, 염증 유발의 초기 작용기전을 억제함으로써 피부 자극의 완화효과를 줄 수 있을 것으로 사료된다.

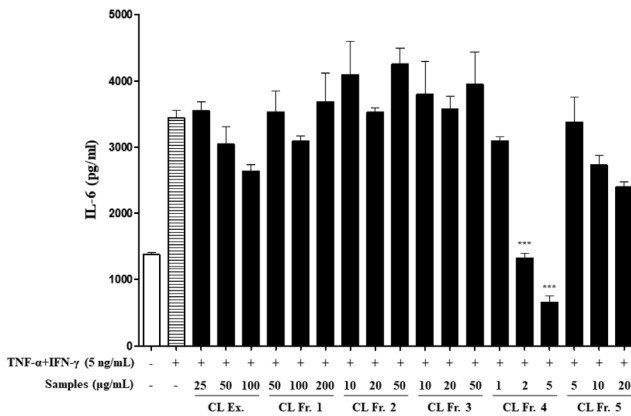


Fig. 6. Effects of *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 on IL-6 secretion in HaCaT cells stimulated with TNF- α /IFN- γ . IL-6 levels in the culture supernatant were measured after treating HaCaT cells with *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 at the specified concentrations for 3 hours, followed by stimulation with TNF- α /IFN- γ (5 ng/mL) for 24 hours. Data are expressed as mean \pm SD from two independent experiments. *** p <0.001 compared to the TNF- α /IFN- γ -only group.

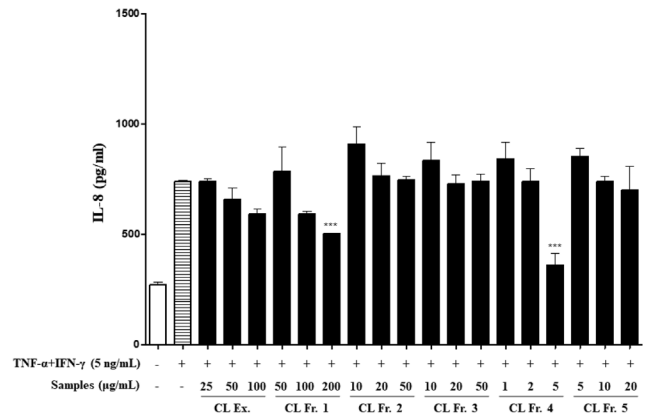


Fig. 7. Effects of *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 on IL-8 secretion in HaCaT cells stimulated with TNF- α /IFN- γ . IL-8 levels in the culture supernatant were determined after pretreating HaCaT cells with *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 at specified concentrations for 3 hours, followed by stimulation with TNF- α /IFN- γ (5 ng/mL) for 24 hours. Data are presented as mean \pm SD from two independent experiments. *** p <0.001 compared to the TNF- α /IFN- γ -only group.

6. HaCaT 세포에서 Chemokine 생성억제 효과

1) 강황 추출물 및 분획물의 IL-8 생성억제 효과

HaCaT 세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 반응에 관련된 케모카인 IL-8 생성억제를 확인한 결과 Fig. 7과 같다. 본 강황 추출물에서는 IL-8 생성억제가 확인되지 않았으며, 강황 분획물 4번의 5 μ g/mL 농도에서 IL-8 생성이 유의적으로 억제되는 것을 확인하였다. Hidaka et al.(2002) 연구에 따르면 강황 추출물의 주성분인 curcumin에 의해 IL-8 생성이 억제된다고 보고되어 있다. 이는 본 연구 결과와 관련이 깊으며, 이를 바탕으로 강황 분획물 4번이 히스타민의 분비를 조절하여 염증 반응 억제에 효과적인 분획물이라 예측해 볼 수 있다.

2) 강황 추출물 및 분획물의 RANTES 생성억제 효과

HaCaT 세포에 TNF- α 와 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 반응에 관련된 케모카인 RANTES 생성억제를 확인한 결과는 Fig. 8과 같다. 본 강황 추출물의 100 μ g/mL 농도에서 RANTES의 생성억제를 확인하였다. 분획물에서는 강황 분획물 4번의 2, 5 μ g/mL 농도에서 RANTES 생성억제에 가장 우수한 효과를 확인하였다. Bulboacă et al.(2019) 연구에 의하면 강황의 주성분인 curcumin이 RANTES의 생성을 억제하는데 효율적인 것으로 보고되어 있다. 또한 Wang et al.(2022) 연구에 의하면 HaCaT 세포에 TNF- α 및 IFN- γ 를 처리하여 염증을 유도한 실험 결과 강황의 유효성분인 Bisdemetoxycurcumin(BDMC) 성분이 케모카인 RANTES 생성을 유의적으로 억제하였다고 보

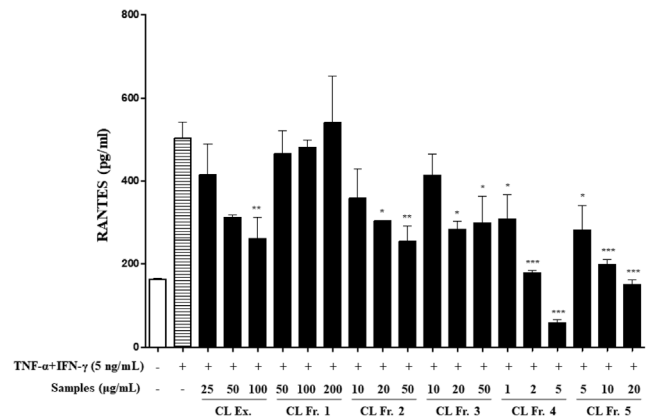


Fig. 8. Effects of *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 on RANTES secretion in TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells. RANTES levels in the culture supernatant were assessed following treatment of HaCaT cells with *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 at the specified concentrations for 3 hours, followed by stimulation with TNF- α /IFN- γ (5 ng/mL) for 24 hours. Data are presented as mean \pm SD from two independent experiments. * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 compared to the TNF- α /IFN- γ -only group.

고되어 있다. 이는 본 연구 결과와 관련이 깊으며, 이를 바탕으로 강황 분획물 4번은 피부염증 개선에 가장 효과적인 분획물이라 예측해 볼 수 있다.

3) 강황 추출물 및 분획물의 TARC 생성억제 효과

HaCaT 세포에 TNF- α 와 IFN- γ 로 유도된 피부 염증 반

응에 관련 케모카인 중 중요한 표적 분자인 TARC 생성억제 효과 결과는 Fig. 9와 같다. 본 강황 추출물의 모든 농도에서 TARC의 유의미한 생성억제를 확인하였으며, 강황 분획물 4번의 2 µg/mL, 5 µg/mL 농도에서 염증성 케모카인 TARC 생성억제에 가장 우수한 효과를 확인하였다. Wang et al.(2022) 연구에 의하면 HaCaT 세포에 TNF-α와 IFN-γ를 처리하여 실험한 결과, 강황의 유효성분인 Bisdemetoxycurcumin(BDMC) 성분이 케모카인 발현의 TARC 생성을 유의적으로 억제하였다고 보고되어 있다. 이러한 결과를 바탕으로 강황 분획물 4번에는 TARC 생성을 억제시키는 강황의 유효성분이 함유되어 있을 것으로 예측해 볼 수 있다. 즉 강황 분획물 4번은 피부염증과 같은 민감한 피부질환에 우수한 작용을 할 것으로 사료된다.

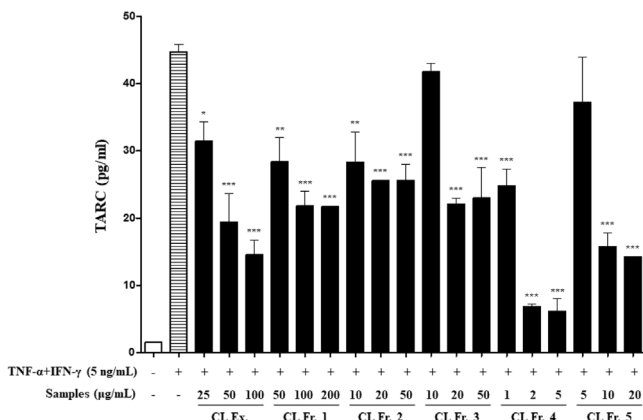


Fig. 9. Effects of *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 on TARC secretion in TNF-α/IFN-γ-stimulated HaCaT cells. TARC levels in the culture supernatant were determined after pretreating HaCaT cells with the specified concentrations of *Curcuma longa* extract and Fractions 1-5 for 3 hours, followed by stimulation with TNF-α/IFN-γ (5 ng/mL) for 24 hours. Data are expressed as mean ± SD from two independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001 compared to the TNF-α/IFN-γ-only group.

7. Western Blotting Analysis

1) 강황 추출물 및 분획물의 ICAM-1 발현 확인

HaCaT 세포에서 Western Blotting Analysis 통한 ICAM-1 발현을 확인한 결과 Fig. 10과 같다. 정상군과 비교하여 TNF-α 및 IFN-γ 처리에 따른 염증 유발군에서 ICAM-1 발현이 활성화되었으며, 강황 추출물에서 ICAM-1 발현 감소가 보이지 않았지만, 강황 분획물 4번에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. Jin et al.(2020), Yodkeeree et al.(2009) 연구에서는 강황의 유효성분인 bisdemetoxycurcumin, demetoxycurcumin 성분에 의해 ICAM-1 발현이 현저하게

감소되었다고 보고되어 있다. 이러한 결과를 바탕으로 강황의 대표적인 3가지 유효성분인 curcuminoid의 성분 모두 ICAM-1의 발현 감소에 유의미한 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 즉 강황 분획물 4번에 ICAM-1의 발현을 감소시키는 강황의 유효성분이 다량 함유되어 있을 것으로 예측해 볼 수 있으며, 이는 접촉성피부염, 아토피 피부염, 건선과 같은 만성 피부질환에 효과적인 성분으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

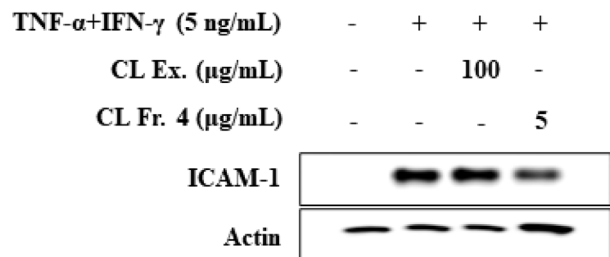


Fig. 10. Effects of *Curcuma longa* extract and *Curcuma longa* Fraction 4 on ICAM-1 expression in TNF-α/IFN-γ-stimulated HaCaT cells. ICAM-1 expression was assessed by western blot analysis using cell lysates. The cells were pretreated with the specified concentrations of *Curcuma longa* extract and Fraction 4 for 3 hours, followed by stimulation with TNF-α/IFN-γ (5 ng/mL) for 24 hours.

2) 강황 추출물 및 분획물의 MAPK 신호 전달 경로 확인

HaCaT 세포에서 TNF-α 및 IFN-γ 자극으로 염증이 유발되는 기전 경로로 Mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 인산화가 관여한다고 알려져 있다(Katiyar et al., 2001). 이에 강황 추출물 및 분획물의 대표적 신호 기전인 MAPK 경로의 염증 기전 경로 확인 결과는 Fig. 11과 같다. 정상군과 비교하여 TNF-α 및 IFN-γ를 처리에 따른 염증 유발군에서는 MAPK 신호 전달 기전 경로가 모두 활성화되었으며 p38, ERK의 염증 기전 경로를 확인했다. p38 신호 전달 기전에서 강황 추출물은 인산화 억제제가 나타나지 않았지만, 강황 분획물 4번에서 인산화가 유의적으로 감소하였다. ERK 신호 전달 기전에서 강황 추출물은 인산화 억제제가 나타나지 않았지만, 강황 분획물 4번에서 유의적으로 염증 기전 경로를 억제하였다. 이러한 결과를 바탕으로 TNF-α와 IFN-γ 자극에 의한 p38, ERK 인자에서 강황 분획물 4번이 모두 인산화를 억제함으로써 염증 기전 경로 억제를 확인하였다. Wang et al.(2012) 연구에 의하면 강황 추출물이 p38, ERK 염증 기전 경로의 활성화를 억제한 것으로 보고되어 있다. 이는 강황 분획물 4번의 p38, ERK 염증 기전 경로가 억제됨으로써 염증 유발을 차단한 것으로 본 연구 결과와 일치한다.

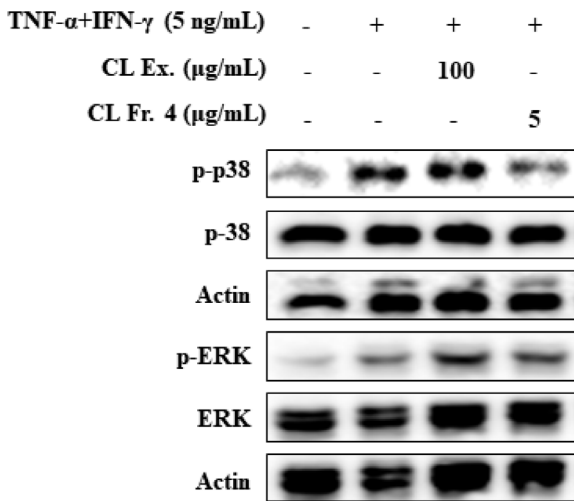


Fig. 11. Effects of *Curcuma longa* extract and Fraction 4 on MAPK expression in TNF- α /IFN- γ -stimulated HaCaT cells. MAPK expression was evaluated through western blot analysis using cell lysates. Cells were pretreated with the specified concentrations of *Curcuma longa* extract and Fraction 4 for 3 hours, followed by stimulation with TNF- α /IFN- γ (5 ng/mL) for 2 hours.

8. 강황 추출물 및 분획물의 TLC 패턴 분석 결과

강황의 주성분은 Curcumin, Demetoxycurcumin, Bisdemetoxycurcumin으로 알려져있다. Huang et al.(2020)의 연구에 따르면 Curcumin(CUR), Demetoxycurcumin(DMC), Bisdemetoxycurcumin(BDMC)중 DMC와 BDMC는 CUR보다 훨씬 우수한 화학적 안정성을 보였으며 이들 화합물은 최근 항염증 및 항암 특성을 나타내는 것으로 보고되었다(Enomoto et al., 2017; Chainani, 2003). 또한 현재까지 염증 및 암 예방에

서 DMC와 BDMC의 자세한 메커니즘은 대부분 알려지지 않았으며, 이 두 화합물에 대한 메커니즘은 계속 조사되어야 한다고 보고되어 있다(Huang et al., 2020). 이러한 선행 문헌으로 항염증 및 항암 특성을 나타내는 강황의 주성분인 CUR, DMC, BDMC을 이용하여 분획물과 주성분의 항염증 효과에 대한 상관관계를 확인하기 위해 TLC 크로마토그래피를 이용하여 함유 분획물의 성분을 분석하고자 하였다. 강황 추출물과 분획물 1-5번과 강황의 주성분인 CUR, DMC, BDMC을 자외선 및 황산 발색하여 함유 화합물의 spot을 비교 분석한 결과는 Fig. 1와 같다. CUR spot은 강황 분획물 5번에 함유된 것으로 확인되었으며, DMC과 BDMC spot은 강황 분획물 4번에 함유한 것으로 확인되었다. 또한, 각 분획물의 spot은 강황 추출물의 spot보다 선명하게 발색 되었다. 강황 분획물 1-5 번의 NO, IL-6, IL-8, RANTES, TARC 생성억제 효과를 비교한 Fig. 5, 6, 7, 8 및 Fig. 9와 TLC 크로마토그램의 주성분 비교분석 결과를 종합하였을 때, 분획물 4번이 DMC, BDMC으로 인해 분획물 중 가장 우수한 항염증 효과가 나타나는 것으로 예측되며, 분획물 5번은 CUR으로 인해 두 번째로 우수한 항염증 효과가 나타나는 것으로 예측된다.

9. HPLC를 이용한 추출물 유효성분 정성 및 정량 분석 결과

HPLC를 이용해 강황 추출물의 유효성분 정성 및 정량 분석을 살펴본 결과는 Table 1, Fig. 13과 같다. 강황의 주성분인 Demethoxycurcumin(DMC), Bisdemethoxycurcumin(BDMC)을 동일한 이동상과 파장으로 분석함으로써 주요 화합물의 함량에 대해 비교분석 및 정량평가 하였다. 정량 분석은 표준물질인 DMC와 BDMC의 면적 값을 활용하여 추세선 그래프를 작성한 후, 강황 추출물 및 강황 분획물 4번에 포함된 DMC와 BDMC의 HPLC 피크 면적을 추세선에 대입하여 함량을

※ 분석조건 (Normal phase): n-Hexane:Acetone=2:1

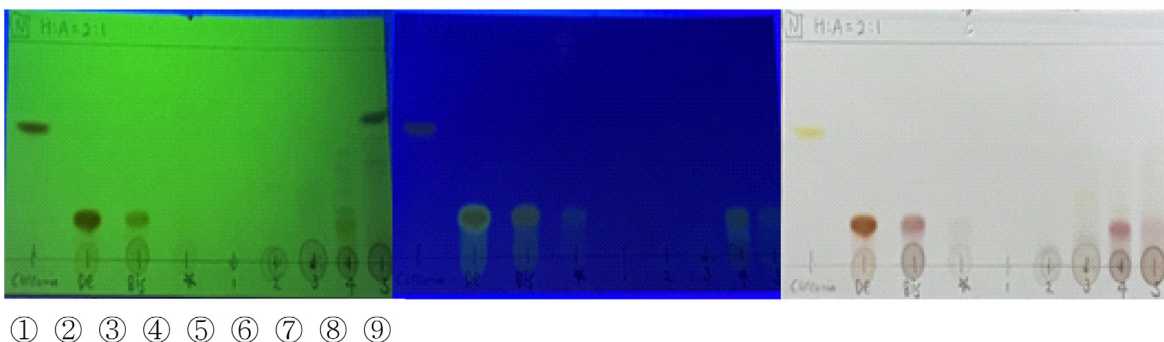


Fig. 12. TLC analysis of components of *Curcuma longa* extract and fractions ① Curcumin, ② Demetoxycurcumin, ③ Bisdemetoxycurcumin, ④ *Curcuma longa* extract, ⑤ *Curcuma longa* fraction 1, ⑥ *Curcuma longa* fraction 2, ⑦ *Curcuma longa* fraction 3, ⑧ *Curcuma longa* fraction 4, ⑨ *Curcuma longa* fraction 5. two compounds ② Demetoxycurcumin and ③ Bisdemetoxycurcumin, were colored in *Curcuma longa* fraction 4.

Table 1. The content of *Curcuma longa* Extract and Fraction 4

Parameter	Demethoxycurcumin	Bisdemethoxycurcumin
Linearity range (µg/mL)	6.25-800	6.25-800
Linearity equation	$y = 77563x - 298877$	$y = 16197x - 27914$
Correlation coefficient of (R)	0.9986	0.9992
Limit of Detection (µg/mL)	8.21	6.89
Limit of Quantification (µg/mL)	29	20.88
The content of <i>Curcuma longa</i> extract (mg/mg)	19.74	6.81
The content of <i>Curcuma longa</i> fraction 4 (mg/mg)	35.23	89.17

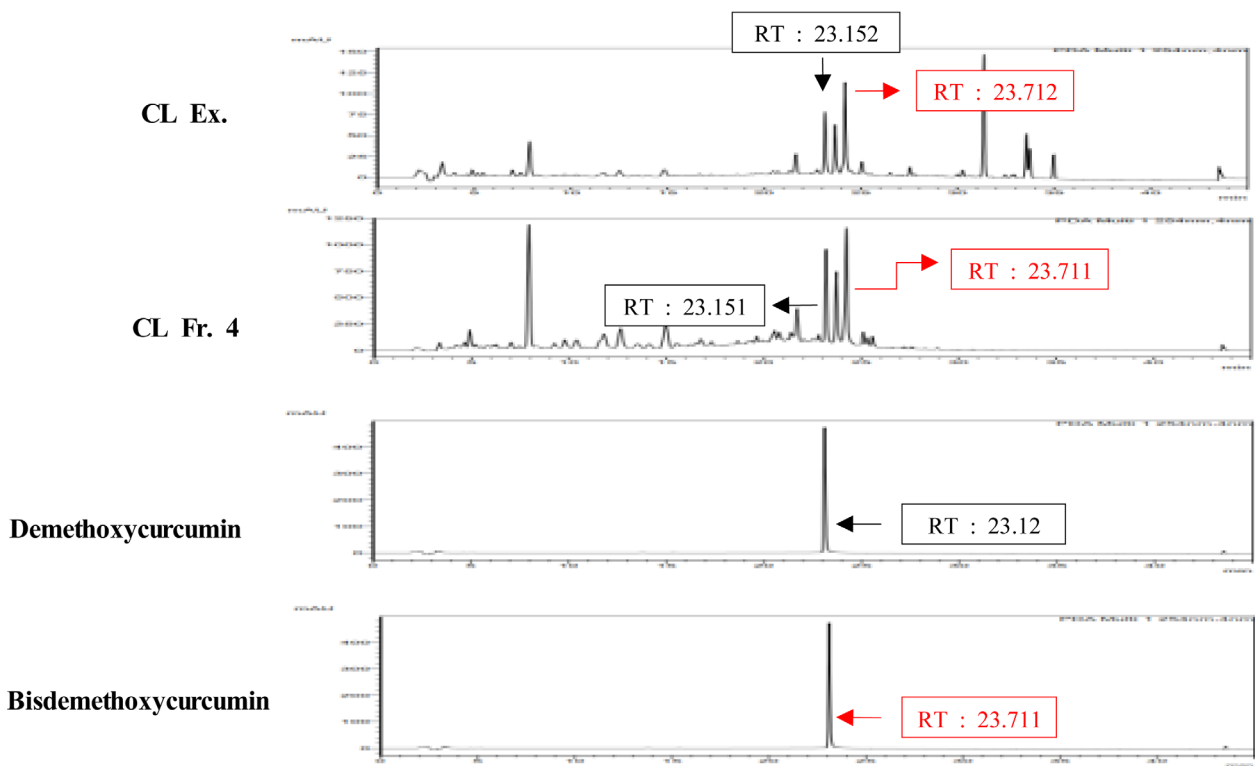


Fig. 13. HPLC analysis of *Curcuma longa* extract and fraction 4
 HPLC chromatogram of *Curcuma longa* extract and fraction 4. The wavelengths used in the analysis were detected at 254 nm

산출하였다. DMC로 작성한 추세선 그래프는 $y = 77563x - 298877$ 로 나타났으며, 상관계수(R²)는 0.9986, LOD 및 LOQ는 8.21, 29 µg/mL로 확인되었다. BDMC로 작성한 추세선 그래프는 $y = 16197x - 27914$ 로 나타났으며, 상관계수(R²)는 0.9992, LOD 및 LOQ는 6.89, 20.88 µg/mL로 확인되었다. 그 결과 DMC 함량은 강황 추출물에서 19.74 mg/g, 강황 분획물 4번에서 35.23 mg/g으로 나타났으며, BDMC 함량은 강황 추출물에서 6.81 mg/g, 강황 분획물 4번에서 89.17 mg/g으로 나타났다.

IV. 결 론

본 연구는 강황 추출물 및 분획물의 항산화, 세포독성, 항염증 등 다양한 피부 생리활성을 평가하여 화장품 소재로서의 활용 가능성을 알아보려고 하였으며, 결론은 다음과 같다. 첫째, DPPH & ABTS radical 소거 활성 측정 결과 강황 분획물 4번의 특정 분획물에서 우수한 소거활성을 확인하였다. 둘째, RAW 264.7 세포와 HaCaT 세포에서 독성을 평가한 결과, RAW 264.7 세포에서는 독성이 나타나는 농도가 확인

되어 이를 희석한 후 실험을 진행하였다. 반면, HaCaT 세포에서는 세포 생존율이 90% 이상으로 매우 안정적인 상태를 유지하였다.

셋째, RAW 264.7 세포에서 Nitric oxide 생성억제 측정 결과 강황 추출물 및 분획물 모두 NO 생성이 억제되는 것을 확인하였다.

넷째, HaCaT에서 Cytokine 종류인 IL-6 생성억제 측정 결과 강황 분획물 4번에서 2, 5 µg/mL 농도에서 염증성 사이토카인의 IL-6 생성량을 유의적으로 억제하였다.

다섯째, HaCaT에서 chemokine 종류인 IL-8, RANTES, TARC 생성억제 측정 결과 강황 분획물 4번에서 chemokine을 현저하게 억제하였다.

여섯째, HaCaT 세포에서 ICAM-1 발현 측정 결과 강황추출물을 분획물 4번과 비교하였을 때 강황 분획물 4번에서 ICAM-1의 발현을 현저하게 감소시켰다.

일곱째, HaCaT 세포에서 MAPK 신호전달경로 확인 결과 p38, ERK 경로가 강황 분획물 4번에 의하여 인산화를 억제함으로써 염증 기전 경로 억제를 확인하였다.

여덟째, 강황 추출물 및 분획물의 TLC 분석 결과 강황 추출물 및 분획물 4번에서 강황의 유효성분인 demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin 성분을 확인하였다.

아홉째, HPLC를 이용한 추출물 유효성분 정성 및 정량 분석 결과, 강황 분획물 4번에서 demethoxycurcumin 함량이 강황 추출물보다 1.7배, bisdemethoxycurcumin 함량은 강황 추출물보다 13배 함유 되어있는 것을 확인하였다.

위의 결과를 종합하여 볼 때 강황 추출물 및 분획물에서 항산화 효과와 피부염증 억제 탐색 연구 결과를 객관적으로 증명하였다. 본 연구는 강황 분획물 4번에서 항산화 작용과 항염증 작용에 우수한 특정 분획물을 확인하여 유효성분을 규명하였다는 것에 의의가 있다. 또한 특정 분획물에 유효성분이 다량 함유 되어있는 것을 확인하였는데, 이는 특정 분획물만을 추출 분획하여 약효의 상승과 저하에 관계없이 유효한 성분만을 대량으로 생산할 수 있으며, 또한 소량으로 인체에 효과적인 우수한 제품들을 개발할 수 있다는 것을 시사한다. 즉, 강황 분획물을 활용하여 식품과 화장품 소재로써 활용이 우수하다는 것을 알 수 있다. 그러나 향후 후속 연구를 통해 우수한 효능을 확인한 특정 분획물의 세부적인 기전 연구 및 실증적인 임상 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이와 같은 연구 결과를 바탕으로 천연 유래 화장품 소재 개발을 위한 기초 자료를 제공하고 기능성 화장품 산업 및 항노화 시장의 활성화에 도움이 되길 바란다.

References

Bulboacă, A. E., Boarescu, P. M., Bolboacă, S. D., Blidaru, M., Feștilă, D., Dogaru, G., & Nicula, C. A. (2019). Comparative

Effect of Curcumin Versus Liposomal Curcumin on Systemic Pro-Inflammatory Cytokines Profile, MCP-1 and RANTES in Experimental Diabetes Mellitus. *Comparative Study*, 18(4), 8961-8972. doi: 10.2147/IJN.S226790

Chainani-Wu N. (2003). Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J. Altern. Complement Med.*, 9(1), 161-168. doi: 10.1089/10755303321223035

Choi, M. K. (2017). The study of *Curcuma longa* L. extract and curcumin protect against chronic CCL4-induced liver damage by enhancing anti-oxidation. Chonbuk National University.

Enomoto, A., Yamada, J., Morita, A., & Miyagawa, K. (2017). Bisdemethoxycurcumin enhances X-ray-induced apoptosis possibly through p53/Bcl-2 pathway. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 815, 1-5. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.12.005

Hidaka, H., Ishiko, T., Furuhashi, T., Kamohara, H., Suzuki, S., Miyazaki, M., Ikeda, O., Mita, S., Setoguchi, T., & Ogawa, M. (2002). Curcumin inhibits interleukin 8 production and enhances interleukin 8 receptor expression on the cell surface: impact on human pancreatic carcinoma cell growth by autocrine regulation. *Cancer*, 95(6), 1206-1214. doi: 10.1002/cncr.10812

Huang, C., Lu, H. F., Chen, Y. H., Chen, J. C., Chou, W. H., & Huang, H. C. (2020). Curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin induced caspase-dependent and -independent apoptosis via Smad or Akt signaling pathways in HOS cells. *BMC Complement. Med. Ther.*, 20(1), 68.

Jin, F., Chen, X., Yan, H., Xu, Z., Yang, B., Luo, P., & He, Q. (2020). Bisdemethoxycurcumin attenuates cisplatin-induced renal injury through anti-apoptosis, anti-oxidant and anti-inflammatory. *Eur. J. Pharmacol.*, 874(5). doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173026. Epub 2020 Feb 20

Jung, E. J., & Choe, T. B. (2014). Study on the Bioactive Characteristics of *Curcuma longa* extract and Curcumin as a Cosmetic Raw Material. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, 12(3), 425-433.

Katiyar, S. K., Afaq, F., Azizuddin, K., & Mukhtar, H. (2001). Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 176(2), 110-117. doi: 10.1006/taap.2001.9276

Kim, S. Y. (2016). The Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of Acai Berry Ethol Extracts using RAW 264.7 Cells and TPA-induced Mouse Edema Model. Keimyung University Graduate School Master's thesis, Daegu.

Kim, S. Y., Park, K. H., Moon, H. D., Jung, S. H., Lee, S. E., & Kim, B. H. (2017). Anti-Inflammatory Effects of Acai Berry Ethanol Extracts. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*, 23(4), 669-676.

Park, C. H., Park, J. H., Min, S. Y., Kim, K. M., Kim, S. Y., & Park, Y. J. (2019). Studies on Antioxidant, Anti-inflammation and Whitening Activities of *Hordeum vulgare* L. Extracts and Their Fractions. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 45(3), 287-297. doi: 15230/SCSK.2019.45.3.287

Ra, H. N., Kim, H. Y. (2016). Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Curcuma aromatica* Salisb. with and without

- Fermentation. *Korean Journal of Food & Cookery Science*, 32(3), 299-306. doi: 10.9724/kfcs.2016.32.3.299
- Senthilkumar, A., Joshua, A. J., Bharathi, B., Amit, A., & Jung, E., B. (2014). Anti-inflammatory Effects of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extract on Acute and Chronic Inflammation Models. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 43(4), 612-617. doi: 10.3746/jkfn.2014.43.4.612
- Wang, J., & Dong, S. J. (2012). ICAM-1 and IL-8 are expressed by DEHP and suppressed by curcumin through ERK and p38 MAPK in human umbilical vein endothelial cells. *Inflammation*, 35(3), 859-870. doi: 10.1007/s10753-011-9387-4
- Wang, Y., Zhang, P., Zhang, J., & Hong, T., (2022). Inhibitory Effect of Bisdemethoxycurcumin on DNCB-Induced Atopic Dermatitis in Mice. *Molecules*, 28(1), 293. doi: 10.3390/molecules28010293
- Yodkeeree S, Chaiwangyen W, Garbisa S., & Limtrakul P. (2009). Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. *J. Nutr. Biochem.*, 20(2), 87-95. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.12.003. Epub 2008 May 20
- Yu, J. M., Moon, H. I. (2018). Antioxidants and acetyl-cholinesterase inhibitory activity of solvent fractions extracts from *Dendropanax morbiferus*. *Korean J. Plant Res.*, 31(1), 10-15. doi: 10.7732/kjpr.2018.31.1.010
- Yun, J. J., & Park, S. K. (2022). In vitro Activities of *Curcuma longa* Linne Extracts according to Extraction Solvents. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 51(10), 1103-1108. doi: 10.3746/jkfn.2022.51.10.1103
- Zhao, J., Wang, Z., Yuan, Z., Lv, S., & Su, Q. (2020). Baicalin ameliorates atherosclerosis by inhibiting NLRP3 inflammasome in apolipoprotein E-deficient mice. *Diab. Vasc. Dis. Res.*, 17(6). doi: 10.1177/1479164120977441