

한 영 숙 교수지도
박사학위 청구논문

연잎 추출물의 항산화, 항염증 및
피부상재균에 대한 항균활성 연구

2012

성신여자대학교 대학원
식품영양학과
이 선 숙

연잎 추출물의 항산화, 항염증 및
피부상재균에 대한 항균활성 연구

A Study on Lotus Leaf Extracts' Antioxidation,
Anti-Inflammation and Antimicrobial
Activity Against Resident Skin Flora

한 영 숙 교수지도

이 논문을 박사학위논문으로 제출함

2012년 8월

성신여자대학교 대학원

식품영양학과

이 선 숙

인 준 서

이선숙의 박사학위 논문으로 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

성신여자대학교 대학원

논문개요

본 연구는 여드름 피부에 안전하고 부작용이 없는 화장품 소재로서 연잎 추출물의 사용 가능성을 제시하기 위한 목적으로 시행하였다. 연을 4부위로 나눠 연꽃, 연잎, 연씨, 연방을 70% ethanol로 추출하여 피부상재균 3종 (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*)에 대한 항균활성을 paper disc법으로 측정하였으며, 열과 pH 안정성을 고려하여 항균활성과 안정성이 가장 뛰어난 부위를 시료로 선정하여 추출용매의 농도를 정하였고 항산화, 항염 활성을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 연의 부위별 추출물을 Paper disc diffusion 법을 이용하여 항균성을 측정한 결과 4가지 시료 모두에서 피부상재균 3종에 대한 항균성을 나타냈으며 연꽃, 연잎, 연씨, 연방 순으로 항균활성이 높았다.
2. 연의 부위별 추출물의 농도를 1mg/disc로 하여 40, 80, 100, 120℃에서 1시간 동안 열처리 한 후 추출물의 열 안정성을 측정한 결과 연꽃, 연잎, 연씨, 연방 모두 열에 안정한 항균활성을 보였다. 또한 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조절하고 37℃에서 1시간 동안 방치하고 pH 7로 중화시킨 후, 안정성을 측정한 결과 연잎 추출물에서만 모든 pH에서 안정적인 항균성을 보였다. 따라서 4가지 시료 중 항균성과 안정성이 가장 뛰어난 연잎 추출물을 다음 실험에 이용하였다.
3. 가장 뛰어난 항균력을 보이는 추출용매 농도를 알기 위해 에탄올을 50, 70, 95%로 조정하고 연잎 추출물을 만들어 항균성을 측정한 결과 50% ethanol 추출물에서 가장 높은 항균활성을 보였다. MIC 측정 결과 S.

*aureus*에 대한 항균활성이 50% ethanol 추출물에서 250 μ g/ml로 가장 높게 나타났다. 따라서 이하의 실험에서는 50% ethanol 추출물을 시료로 사용하였다.

4. 연잎의 총 페놀 화합물의 함량은 연잎 추출물의 농도가 높아질수록 증가하였으며, 1 μ g/ml 당 약 0.3 μ g/ml의 페놀을 함유하고 있었다.

5. 연잎 추출물의 DPPH radical scavenging activity는 시료의 농도에 비례하여 증가하였으며, 250 μ g/ml의 농도에서 79.76%로 가장 높았다

연잎 추출물의 Ferric reducing antioxidant power는 0.05~0.59mM /mL으로 추출물의 농도에 비례하여 항산화능이 증가하였다.

ABTS scavenging activity 또한 시료의 농도에 비례하여 활성이 증가하였으며, 연잎 추출물 250 μ g/ml 농도에서 46.31%로 가장 높았다.

β -carotene bleaching assay는 연잎 추출물 10, 50, 100 μ g/mL 농도에서는 항산화능을 보이지 않았으나 250 μ g/mL의 농도에서는 활성이 나타나 항산화 기전 중 lipid peroxy radical의 억제능이 있음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 연잎은 항산화력이 뛰어난 물질임을 알 수 있었으며 이 기전은 lipid peroxy radical을 억제하는 것으로 생각되었다.

6. 연잎 추출물의 RAW 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay로 평가한 결과 7.81~500 μ g/ml의 농도에서 95.9% 이상의 세포생존율을 보여 세포독성이 없음을 확인하였다.

7. 연잎 추출물의 Nitric oxide(NO) 생성 억제 효과를 RAW 264.7 cell을 이용하여 측정한 결과 시료에 lipopolysaccharide(LPS) 처리 시 NO 생성량이 약 6.5배 증가하였다. NO 억제 억제율은 연잎 추출물 10, 25,

50 μ g/mL의 농도에서 51.6%, 64%, 65%로 우수한 억제효능을 보였으나 나타나 농도의존성은 관찰되지 않았다.

염증을 유발하는 Prostaglandin E₂(PGE₂) 억제에 관여하는 효소인 Cyclooxygenase(COX)-2의 활성을 평가한 결과 연잎 추출물은 25 μ g/mL의 농도에서 62.7%, 50 μ g/mL의 농도에서 68.0%의 PGE₂ 생성 억제 효과를 보였다. 따라서 연잎 추출물은 항염증성이 우수한 것으로 확인되었다.

8. IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현 평가를 위한 PCR 실험 결과 연잎 추출물은 IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현에 영향을 주지 못하는 것으로 평가되었다.

위와 같이 연잎 추출물은 피부상재균에 대한 항균작용 및 항산화, 항염 활성을 보였다. 또한 세포독성이 없어 안전하기 때문에 피부에 부작용을 최소화 할 수 있는 여드름 관리를 위한 새로운 기능성 소재의 개발에 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

목 차

논문개요

I. 서론	1
II. 이론적 배경	4
III. 재료 및 방법	20
1. 실험재료	20
1) 시료	20
2) 시약 및 기구	20
3) 사용균주 및 배지	21
2. 실험방법	23
(1) 연의 부위에 따른 항균작용 검색	23
1) 연꽃, 연잎, 연씨, 연방의 부위별 추출	23
2) 시료 부위별 추출물의 항균력	23
3) 시료 부위별 추출물의 안정성	24
가) 열 안정성	24
나) PH 안정성	24

(2) 연잎의 생리활성 탐색	24
1) 추출방법	24
2) 추출 용매별 항균활성	25
가) 추출 용매별 항균력	25
나) 추출 용매별 MIC	25
3) 항산화 활성	26
가) Total phenol content	26
나) DPPH radical scavenging activity	26
다) Ferric reducing antioxidant power	27
라) ABTS cation radical scavenging activity	27
마) β -carotene bleaching	27
4) 세포독성 측정	28
5) 항염 활성	29
가) Nitric oxide 형성 저해능	29
나) Cyclooxygenase(COX)-2 저해능	29
다) IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현 평가	30
6) 통계분석	32
IV. 결과 및 고찰	33

1. 연의 부위에 따른 항균작용 검색	33
(1) 연꽃, 연잎, 연씨, 연방 추출물의 항균성	33
(2) 시료 부위별 추출물의 안정성	36
1) 열 안정성	36
2) PH 안정성	41
2. 연잎의 생리활성 탐색	46
(1) 추출용매의 농도별 항균 활성	46
1) 추출용매의 농도별 항균력	46
2) 추출용매의 농도별 MIC	48
(2) 항산화 활성	50
1) Total phenol content	50
2) DPPH radical scavenging activity	52
3) Ferric reducing antioxidant power	53
4) ABTS cation radical scavenging activity	55
5) β -carotene bleaching	56
(3) 세포독성	58
(4) 항염 활성	59
1) Nitric oxide 저해능	59

2) Cyclooxygenase(COX)-2 저해능	61
3) IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현 평가	63
V. 결론	64
Reference	67
Abstract	84

List of Tables

Table 1. List of microorganisms and media used for antibacterial activity test	24
Table 2. Nucleotide sequence of the primers and expected size of PCR products	36
Table 3. Antimicrobial activity from different parts (flowers, leaves, seeds and pods) of lotus	39
Table 4. Effect of temperature treatment on antimicrobial activity of lotus flowers	41
Table 5. Effect of temperature treatment on antimicrobial activity of lotus leaves	42
Table 6. Effect of temperature treatment on antimicrobial activity of lotus seeds	43
Table 7. Effect of temperature treatment on antimicrobial activity of lotus pods	44
Table 8. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of lotus flowers	46
Table 9. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of lotus	

leaves	47
Table 10. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of lotus seeds	48
Table 11. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of lotus pods	49
Table 12. Comparison of the antimicrobial activity of lotus leaves extracted with different concentration of ethanol	51
Table 13. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the extract of lotus leaves against several microorganisms	53
Table 14. The total phenol content depending on concentration of lotus leaves	55
Table 15. DPPH radical scavenging activity of lotus leaves	57
Table 16. Ferric reducing antioxidant power of lotus leaves	58
Table 17. ABTS scavenging activity of lotus leaves	60
Table 18. Effect of ethanol extract lotus leaves on the cell viability of RAW 264.7 cells.	62
Table 19. Effect of ethanol extract of lotus leaves on NO production	64
Table 20. Effects of ethanol extract of lotus leaves on COX-2 activity in RAW 264.7 cells	66

List of Figures

Figure 1. β -Carotene bleaching of lotus leaves	61
Figure 2. Effects of ethanol extract of lotus leaves on mRNA expression of IL-1 β and TNF- α	67

I. 서론

산업화와 국민소득의 상승으로 생활수준이 향상되고, 의학기술의 발달로 평균수명이 증가함에 따라 건강에 대한 관심 증가와 함께 육체적, 정신적 건강의 조화를 통한 아름답고 건강한 외모에 대한 관심이 증가하고 있으며, 특히 주름, 미백, 아토피, 여드름 등 피부미용에 대한 관심도 증가하고 있다. 이중 피부상재균 또는 호르몬의 영향 등 다양한 원인에 의해 발생하는 여드름을 치료하기 위해 전신적 치료와 외과적 치료 등 다양한 방법들을 활용하고 있으나 현재 효과적인 단일 치료법은 없으며, 또한 부적절한 치료에 의한 부작용도 나타나고 있다. 따라서 안전하고 인체에 부작용을 최소화 할 수 있는 항염, 항균작용을 가진 생리활성을 조절할 수 있는 천연물 탐색을 위한 연구에 대한 요구가 증가되고 있다.

식물에는 인체 내 물질의 결핍이나 과도한 분비로 인한 비정상적인 병태가 나타날 때 생리적 기능을 조절하며 물질의 특성에 따라 항산화, 해독, 면역기능 증강, 호르몬 조절, 항균, 항염 등의 작용을 하는 생리활성을 조절하는 물질이 들어있으며 이를 파이토케미컬(phytochemical)이라 한다.

연(*Nelumbo nucifera*)은 수생식물 중 부엽식물에 속하는 쌍떡잎 식물로서 아시아 남부, 북 호주가 원산지이다. 인도와 중국을 중심으로 열대, 온대의 동부아시아를 비롯한 한국, 중국, 일본 등에 널리 분포하고 있으며(Borsch, 1983 ; Dahlgren, 1983), 우리나라에서도 전국의 습지나 연못에 자생하거나 논밭에서 재배되기도 한다. 고생대의 식물로 불교에서 신성한 식물로 여기며, 7~8 월에 붉은색 혹은 흰색의 꽃을 피우며 9~10 월에는 열매인 연밥이 열린다. 꽃은 관상용과 차의 재료로 이용하여 왔으며(Yun, 2007), 잎과 뿌리는 식용해 왔다. 한의학적으로 연잎은 맛이 쓰고 성질은 유하며 여름철에 지친 심신을 안정시켜 식욕을 돋게 한다고

알려져 있다. 예로부터 출혈성 위궤양이나 위염, 치질, 수렴 및 지혈, 설사, 두통과 빈혈, 토혈, 산후 어혈치료, 야뇨증, 해독작용 등에 민간요법으로 사용되어 왔다(Kim, 1981).

연잎의 성분은 진통 작용, 진정 작용이 있는 roemerine, nuciferin, arnepavine, n-nornuciferine, pronuciferine, liriodenine, d-n-methylcoclaurine 등과 주석산, 구연산, 호박산, 탄닌 등이 함유되어 있다(Yuk CS 1990). 그 외에 칼슘과 칼륨함량이 비교적 높고 β -carotene, 비타민 C, E와 같은 항산화 비타민이 free radical을 제거함으로써 관상동맥질환, 암, 백내장 예방 및 노화방지에도 효과적이라고 알려져 있다. 특히 녹색 잎에 많이 함유된 flavonoids는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxide, catalase와 peroxy nitrate의 scavenging, Fe와 Cu의 chelating 효과 뿐만 아니라 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 지질 과산화와 low density lipoprotein (LDL)의 산화를 방지하며(이경석 등, 2006 ; 임진아 등, 2008), anti-obesity(Onoa, 2006 ; Xie, et al, 2011), 인슐린 분비촉진 효과와 연잎의 상용 섭취에 의한 혈청 콜레스테롤 및 중성지질 함량 조절 및 지질대사를 촉진하는 생리활성 효과에 관한 보고가 있다(Shin et al, 2006). 또한 연잎에 함유된 폴리페놀 성분에 의한 항산화(김금숙 등, 2008 ; 박찬흠 등, 2007 ; 이경석 등, 2006 ; 임진아 등, 2008) 항균(박윤점 등, 2008) 등의 생리활성에 관한 연구가 있다. 연의 피부미용에 관련된 연구로는 연잎 에탄올 추출물이 피부 주름에 미치는 영향(양웅모 등, 2006), 연잎, 연꽃 및 연꽃 수술 추출물의 Tyrosinase 활성억제 및 Melanin 생성억제에 의한 미백 효과(장문석 등, 2007), 연잎, 연꽃, 연수 추출물이 UVB자외선 조사에 의한 각질형성 세포의 보호 및 피부 노화방지에 미치는 영향(장문석 등, 2011), 연잎 추출물을 함유한 화장품의 안정성 평가 등이 있다(최선주 등, 2011). 하지만 현재까지 연과 여드름 피부에 대한 연구는 전무한 실정이다.

최근 이와 같이 연의 우수한 영양성분과 함께 함유된 생리활성물질의 효능이 알려지기 시작하면서, 연근의 소비량이 급속도로 증가하고 있으며, 수생 및 습지조경용 식물로서도 이용성이 증대되고 있다. 또한 수질정화 능력도 우수하여 현재까지 수질정화능력이 가장 뛰어나다고 알려진 부레옥잠에 약 4배, 물상추 및 마름에 2배 이상의 질소 제거능력을 갖고 있으며, 인에 대해서도 부레옥잠에 비해 1.5배 정도의 제거능력을 보유하고 있다. 연은 이처럼 식용, 환경정화능력, 관상성 또한 뛰어나 다수의 지역에서 연 관련 축제를 개최하기도 하고, 벼 대체 작물로서 전망이 좋아 연의 수요량이 크게 증가하고 있다. 우리나라의 연 재배 면적은 1996년 91ha에서 2009년에는 721.1ha로 증가하였고, 연근 생산량도 1996년 2097톤에서 2008년에는 12,563톤으로 연평균 16.1%의 증가율을 보이고 있다. 한편 정부의 신활력 사업 수행의 일환으로 무안군 일로면 회산 방죽에 자생하는 백련을 농가에 보급하여 소득자원으로 이용하고 있으며, 무안군 이외의 다른 지자체에서도 연을 산업화 하려는 시도가 진행되고 있다(임명희, 2011). 이에 따라 연잎의 소비량과 부가가치 증대를 위한 다양한 가공 제품의 상품화가 필요한 시점이다.

최근 천연 소재에 대한 관심 증가로 천연 생리활성 물질에 대한 탐색이 이루어지고 있으며 이를 식품, 의약품, 화장품 등의 산업에 널리 이용하고자 하고 있다. 연잎 추출물의 항산화, 항염, 항균 활성에 관한 연구는 연잎 소비량에 대한 부가가치 창출과 더불어 새로운 기능성 소재로서의 개발에 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 이에 연잎추출물이 여드름 피부의 관리를 목적으로 하는 기능성 천연 소재로서 사용 가능성을 제시하고자 본 연구를 시행하였다.

II. 이론적 배경

1. 여드름

여드름의 정확한 원인은 밝혀져 있지 않으며 여러 인자의 상호작용에 의해 유발된다. 특히 사춘기에 호발하며 면포, 구진, 농포, 결절 등의 병변을 특징으로 하는 모피지성 질환(pilosebaceous disease)으로 최근 성인에게 여드름 발생이 증가한다는 보고가 늘고 있다. 여드름의 병인은 남성호르몬에 의한 피지 분비의 증가, 과각화된 모낭벽의 증가, *Propionibacterium acnes*균의 증식에 의한 염증유발, 피부장벽이상, 유전, 환경적 요인, 모낭의 반응성 등의 다양한 인자가 제시되고 있다.

여드름 피부는 정상 피부보다 피지 분비량이 많고, 병변의 중증도와 피지 분비량과는 밀접한 관련이 있으며, 이러한 피지분비의 증가는 안드로겐과 밀접한 관련이 있다. 안드로겐은 피지선의 피지 세포내에 존재하는 안드로겐 수용체와 결합함으로써 활성화된 형태로 바뀐다. 피지선을 자극하여 피지세포의 세포분열을 촉진시켜 피지분비를 증가시키고, 모공입구의 각질형성세포를 자극하여 모공 폐쇄를 유도한다. 즉 피지분비의 증가와 함께 모공입구 각질형성세포의 각화현상에 의해 모공이 막히면 피지는 축적되고, 피지분비의 증가로 변화된 피지성분에 의해 모공의 폐쇄가 더욱 심화된다. 정상적인 피지의 지질은 cholesterol, cholesterol ester, linoleic acid, free fatty acid, wax ester, triglyceride 등으로 구성된다. cholesterol, cholesterol ester, linoleic acid는 피지세포의 세포막을 구성하는 지질이며 wax ester, triglyceride는 피지세포 내에서 새롭게 형성되는 지질이다. 피지선의 피지분비는 피지를 함유한 피지세포 자체가 피지선으로부터 탈락되는 전분비(holocrine) 방식으로 여드름 피부의 피지분비가 증가하면 피지 성분 중 linoleic acid와 cholesterol의 함량이 감소하고 squalene과

triglyceride 그리고 triglyceride의 분해 산물인 free fatty acid의 함량은 증가한다(Smolinsk, 2004). 이러한 지방 조성의 변화로 모낭내의 cholesterol과 cholesterol sulfate간의 불균형을 초래한다. 이는 모낭 내 각질형성세포 사이의 결합을 증진시켜 모낭 정체와 과각화증을 유발한다. linoleic acid는 필수 지방산으로서 결핍이 되면 동물에서 전신적 인설을 형성하며, 특히 피지선 내에서 linoleic acid의 상대적인 농도의 감소는 모낭내의 인설, 즉 과각화증을 일으켜 면포 형성을 촉진한다 (Rosenfield, 1999). 이외에도 면포내의 linoleic acid 농도의 감소는 호중구의 포식 작용 및 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 형성 억제를 방해하여 염증을 악화시킨다(Akamatsu, 1998). 또한 필수지방산(linoleic acid)의 결핍으로 각질 세포간 지질의 다중층상 구조의 부분적 결손이나 구조적 이상 등과 같은 피부 장벽 기능의 이상을 초래한다. 피부장벽 기능의 이상은 표피의 장벽 기능의 유지와 회복에 중요한 역할을 담당하는 칼슘 기울기(calcium gradient)를 변화시킨다. 이는 피부장벽을 회복시키는 항상성 반응을 시작하는 신호로 작용하여, 각질세포간 지질의 전구체를 함유한 층판소체(lamella body)를 분비시키고, 새로운 층판소체를 생성한다. 이와 같은 기전에 의해 손상된 각질세포간 지질막을 재형성하게 된다(Holleran, 1991). 이때 표피의 각질형성세포에서는 사이토카인을 분비하여 각질형성세포의 증식을 직접 자극함으로써 진피내의 염증세포를 자극한다. 염증세포에서 분비된 사이토카인에 의하여 각질형성세포의 DNA 합성을 증가시키고 증식을 간접적으로 자극하여 표피의 증식을 초래한다. 이와 같은 장벽구조는 모낭 누두부에도 존재하며 동일한 피부장벽을 형성하고 있다. 모낭 누두부의 피부 장벽이 손상되면 모공 사이의 표피에 존재하는 피부장벽이 손상될 때 관찰되는 변화인 각질형성세포의 DNA 합성 증가에 의한 표피 증식이 동일하게 나타남으로써 모낭의 과각화를 일으켜 면포형성 및 여드름 병인에 중요한 원인으로 작용한다(Choi, 1997).

여드름의 초발 연령은 보통 남자보다 여자가 상대적으로 빠르며, 이는 여성에서 사춘기가 더 일찍 시작되는 것과 관련이 있다. androgen은 피지세포의 증식과 지질형성에 중요한 역할을 하며, 여드름은 dihydro-epiandrosterone(DHEA)의 대사와 주로 관련되는데, DHEA는 부신 남성호르몬으로서 sulfotransferase에 의해 혈장에서 순환하는 DHEA-sulfate (DHEA-S)로 변환이 가능하다. DHEA는 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17β -hydroxysteroid dihydrogenase, 5α -reductase 등에 의해 대사되며 androstenedione, testosterone, 5α -dihydrotestosterone(Dihydrotestosterone, 5α -DHT, DHT)으로 변환된다(Lobo, 1991). 인체에서는 주로 type I 5α -reductase가 활성을 보이며, 특히 표피와 피지선에서 관찰되고 testosterone을 더욱 강력한 남성호르몬인 DHT로 전환시킨다(Thiboutot, 1995). 피지선 활성도의 증가는 사춘기 이전에 혈청 DHEA-S의 증가와 함께 일어나는 것으로 밝혀졌으며, Lucky 등은 사춘기 이전의 어린이에서 혈청 DHEA-S가 상승하면 피지의 과다생성과 여드름 발생 빈도가 비례하여 증가한다고 보고하였다(Lucky et al, 1994). 이는 부신 기원의 남성호르몬이 사춘기 이전의 피지선 활성도를 결정하는 중요한 요소라는 것을 의미한다. Thiboutot(1997) 등은 여드름 호발 피부의 피지선에서 정상 피부에 비하여 type I 5α -reductase의 활성이 높아졌다는 보고를 하였으며 이러한 연구 결과는 국소적인 DHT 생성의 차이가 여드름 발생에 관여한다는 것을 의미한다. 또한 동일 그룹에서 지엽적인 DHT 생성 차이와 모낭의 과각화에 따른 면포 형성의 관련성에 대한 연구 결과도 보고하였다. 모낭의 누두 하부와 표피의 각질형성세포에서 남성호르몬의 대사를 비교하면 모낭 누두 하부의 각질형성세포에서 표피 각질형성세포보다 type I 5α -reductase의 활성도가 더 높게 나타났다. 피지선 세포에서도 type I 5α -reductase가 우위적으로 존재하며, type I 5α -reductase는 국소적으로 testosterone을 DHT로

전환시켜 피지선 세포에 활성이 증가되는 형태로 변환시킨다(Fritsch, 2001). Testosterone에서 변환된 DHT는 핵막 수용체인 androgen receptor에 우위적으로 결합함으로써 androgen 관련 유전자의 전사가 일어나며, 피지선 세포의 증식과 피지 생성과 관련된 단백질 및 효소의 합성이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Rosignoli, 2003). In vivo 상에서는 피지선 세포의 증식과 피지 생성 증가에 모두 영향을 미친다. 그러나 in vitro 실험에서는 androgen이 피지선 세포의 증식을 촉진시키지만 피지선 세포의 분화를 유도하지는 않는다. 이는 androgen 이외의 피지선 세포의 분화와 관련된 인자에 의한 영향으로 보고되었다. Bull(2002) 등의 연구에 의하면 CCAAT enhancer binding protein(C/EBP)family, peroxisome proliferator activated receptor(PPAR)family와 같은 전사 인자가 피지선 세포의 최종 분화 단계인 지질 생성에 영향을 미친다. PPARs(Peroxisome proliferator-activated receptors)는 피지선 세포의 분화와 지질생성에 관여하는 3개의 아형($\alpha, \beta/\delta, \gamma$)을 가지는 비스테로이드성 핵내 호르몬 수용체(nuclear hormone receptor)이다. 이 수용체는 RXR(retinoid x receptor)와 이질이량체(heterodimer)를 이루어 다양한 유전자의 전사를 조절하는 것으로 알려졌다(Kuenzli et al, 2003). 특히 지방 세포의 분화에 있어서 매우 중요한 역할을 하는데 최근 연구 결과에 의하면 피지선 세포에서도 PPARs가 발견되며 특히 PPAR $\beta/\delta, \gamma$ 가 피지 생성과 분화를 증가시켜 여드름 발생에 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다. PPARs 에서 fibrate, linoleic acid, thiazolidinedione 등이 각각의 아형에 ligand로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 피지선 세포의 활성과 분화에 영향을 준다. 특히 DHT와 PPAR γ 리간드와 함께 처리하였을 때 단독으로 PPAR γ 를 처리한 것보다 피지 생성이 크게 증가하였으며, androgen과 PPAR은 독립적이지만 상호 관련을 가지고 있다(Rosenfield et al, 1998). 모낭 누두 하부에서 더 많은 DHT가 생성되면

피지선 세포의 DNA와 결합하여 피지 세포의 분열이 증가하고 지질 생합성 효소를 활성화시켜 피지 분비가 증가된다(Zouboulis et al, 2004 ; Smolinski et al, 2004). 또한 증판소체의 생성과 분비를 감소시켜 각질 세포간 지질막 형성을 억제하여 피부장벽을 손상시킨다(Fimmel et al, 2005). 또한 각질형성세포의 DNA 합성을 증가시켜 표피증식으로 인한 과각화증을 유발함과 동시에 모낭의 과각화로 피지가 조직 외부로 유출되는 것을 막아 면포를 형성하여 미생물의 혐기적 생활 환경을 조성한다.

여드름에 관여하는 세균에는 그람 양성의 호기성 구균인 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*, 그람 양성의 비운동성 간균 *Propionibacterium acnes*가 있다. 이중 임상학적인 연구를 통해 알려진 가장 핵심적인 역할을 하는 균주는 *P. acnes* 이다(Holland, 1981). *P. acnes*는 피부상재균으로 혐기성이며 일부는 micro aerobic 상태에서 성장하기도 하며 모낭의 안에서 성장한다(Kearney, 1984). ribosome rich cytoplasm과 비교적 두꺼운 세포벽을 가지고 있으며 pH 5.0~6.5, 30~37°C, 산소 분압이 낮을수록 증식이 활발하고, 크기는 0.3~1.3 μm x 1~10 μm 이며 팽대된 균체와 뾰족한 균단의 형태로 pro-inflammatory cytokines(IL-1 α , IL- β , IL-8, TNF- α)의 생성을 촉진하여 염증유발, 개방성 면포와 구진, 농포, 결절, 낭종 등을 형성한다(Vowels et al, 1995 ; Basal et al, 2004). *P. acnes*의 증식과 집락화(colonization)는 체액성 또는 세포매개성 면역반응을 유도하여 pro-inflammatory mediator를 분비한다(Knor, 2005). *P. acnes*는 세포벽탄수화물 (polysaccharides)로 구성된 항원성 부분에서 보체를 활성화시켜 다형핵백혈구(polymorphonuclear leukocytes, PMNs)를 모이도록 하는 저분자의 chemotatic 물질들을 분비하고, 다형핵백혈구는 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-8, GM-CSF 등의 생성을 활성화시킨다(Graham, 2004 ; Grange, 2009). *P. acnes*가 식균작용에 의해 포식되면 호중구(neutrophil)가

lysosomal enzyme과 ROS를 생성하고, follicular epithelium을 자극 및 손상시켜 염증을 촉진시킨다. *P. acnes*가 관여하는 비면역학적인 기전은 자유지방산에 의한 염증유발로 *P. acnes*는 모낭에 존재하는 지방분해효소 (lipase)의 대부분을 형성하며 이외에도 protease, hyaluronidase 등을 분비하여 염증반응을 일으킨다. *P. acnes*의 면역학적인 기전을 알아보기 위한 연구에서 여드름 병변 유무에 관계없이 *P. acnes*에 대한 항체가 모두 존재하였으나 중증의 여드름 피부는 보체 고정능을 가진 *P. acnes*에 대한 항체가 경증의 여드름 피부나 정상 피부보다 더 높게 나타났으며 항체의 역할은 여드름의 중증도와 비례하였다. Kersey(1980) 등의 연구에서 *P. acnes*에 대한 지연성 피부반응의 강도가 여드름의 중증도와 비례함을 보고하였다. 또한 여드름 병변 주변에 CD4+T세포 (helper T cell)와 연관되는 HLA-DR의 발현이 증가되고, 표피 기저 세포에서 HLA-DR의 발현이 증가하는 것은 항원 특이 면역반응이 여드름과 관련된다는 증거로 제시되고 있다. 그 외 heat shock protein과 같은 면역학적 인자가 염증을 촉진시킨다고 알려졌고, Toll-like receptor(TLR)의 활성화로 여드름 병변에서 염증성 사이토카인의 생성이 증가된다. 이러한 TLR이 병변의 모피지선 주변의 대식세포에서 증가되었으며 TLR2는 *P. acnes*에 의해 NF- κ b 활성화와 IL-6의 생성을 증가시켰다. 또 다른 연구에서는 *P. acnes*에 대해 TLR2는 IL-12 p40 promoter를 항진하며, anti - TLR2 blocking 항체에 의해 IL-12, IL-8의 생성이 억제된다고 보고하였다. 또 다른 기전으로 *P. acnes*가 분비하는 glyocalyx polymer는 biofilm을 형성하여 세포외 골격과 물리적인 장벽으로 작용하여 항생제 내성을 일으키거나 여드름 치료의 효과를 저하시킨다(Burkhart et al, 2003 ; Burkhart et al, 2005 ; Mah et al, 2001).

포도상구균인 *S. aureus*와 *S. epidermidis*는 원발성 피부질환 및 여드름을 악화시키는 속발성 원인균이다. *S. aureus*는 자연계에 널리 분포하고 있

으며 인간의 피부에 집락을 형성하는 화농균으로 노란 색소를 형성하며 외모낭 또는 모낭의 중간에서 성장하며, 종기 여드름과 같은 피부병, 중이염, 방광염, 폐렴, 골수염, 뇌막염, 패혈증 및 식중독 등 각종 감염을 유발하는 주된 병원균 중의 하나로 알려져 있다(Lowy et al, 2000). 무증상으로 존재하는 균으로 건강한 사람의 40% 정도는 코, 피부, 액와부위, 회음부에 존재하고 변종에 의한 장독소(enterotoxin)를 생성하는 식중독의 원인균이며, 가장 침투성이 강한 종으로 속(genus)에서 유일하게 병원성을 띤다. 섬유소원이 섬유소로 전환되는 촉매반응의 응고효소를 생산하여 생명체가 장애물로부터 보호 받도록 돕는 역할을 하고, fibronectin과 같은 부착 단백질을 가지고 있어 숙주세포의 표면 단백질에 부착할 수 있으며, 숙주세포의 조직을 파괴하고 침입을 돕는 세포의 용균 효소(lipase)도 생산한다(김현숙, 2011). 또한 지방 친화성이 있고, 점액(slime)을 생성하여 항생제로부터 균체를 보호하고, 혈구의 응집력과 식균 작용을 억제하여 숙주의 면역계를 손상시킨다(Scholzen, 1998).

*S. epidermidis*는 외모낭이나 모낭의 중간에서 성장하며 비병원성으로 동물(사람의 피부), 우유, cheese, 기타 양조물 등에서 분리된다. *S. aureus*와 같은 점액(slime)생성능이 항생제로부터 균체를 보호하고 숙주의 면역 반응인 식균 작용을 막으며 혈구 응집능을 억제하고 숙주의 면역계를 손상시킨다. 건강한 피부에서는 알맞은 pH를 유지하여 밖으로부터 들어오는 세균을 방어하는 역할을 한다 (Feibleman et al, 1980; Soh et al, 2006 ; Peter et al, 1977 ; Melich et al, 1982). 그러나 모낭 내에 피지의 정체에 의한 공기의 차단은 *P. acnes*와 포도상구균의 좋은 생육환경을 제공하여 염증을 악화시킨다. *P. acnes*는 염증 유발과 면역반응을 유도하고 keratinocyte를 자극하여 다량의 superoxide anion(O_2^-)를 생성한다. 이렇게 생성된 O_2^- 는 *P. acnes*의 성장을 저해하지만, Nitric oxide (NO^-)와 함께 peroxynitrites 형태로 keratinocyte의 용해에 관여한다(Bowe

et al, 2008). 면포가 형성된 피부에서는 정상피부보다 linoleic acid가 현저하게 감소하고 palmitic acid는 증가한다. Linoleic acid는 ROS($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $H_2O_2^{\cdot-}$)의 생성을 억제하는 작용이 있고, palmitic acid는 단지 $H_2O_2^{\cdot-}$ 의 생성만을 감소시킨다(Akamatsu et. al, 2003). 면포부위에서 ROS의 과도한 생성은 *P. acnes* 증식 저해 물질의 결핍을 초래하고, palmitic acid는 여드름의 염증에 관여한다. 또한 피지중의 squalen은 triterpenoid로 지질과산화 과정에서 생성되는 superoxide의 소거능이 있어 피부를 보호하지만, squalen peroxide가 생성되면 면포형성과 inflammatory mediator를 생성하고, 세균의 집락화에 관여한다(Akamatsu et. al, 1998 ; Ottaviani et al, 2006). 활성산소종 중 1O_2 (singlet oxygen) 및 $\cdot OH$ (hydroxyl radical)은 피부의 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질 및 DNA 산화, 결합조직의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성과정 등에 참여하여 피부노화를 가속화시킨다. 활성산소종은 이러한 생체 구성 성분의 산화적 손상뿐만 아니라 UVA 의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 큰 역할을 한다. collagen은 피부 진피를 이루는 가장 많은 구성 성분으로 collagen의 생합성과 분해의 조절은 피부노화와 재생 과정의 핵심이다. 진피의 섬유아세포에서 1O_2 을 비롯한 ROS가 MMPS(matrix metallo proteinases)의 발현을 유발시키며, 1O_2 은 UVA로 유도된 MMP-1(collagenase)의 합성을 매개한다(Vile, 1995). 따라서 항산화제의 사용은 피부노화 방지와 함께 여드름 피부의 염증 관리나 상처 부위의 재생 과정에서 중요한 역할을 한다.

염증은 생체 조직의 손상 또는 외상이나 외부의 자극 등 다양한 감염원에 대한 생체 내 방어 반응의 하나로 국소혈관과 다양한 면역세포가 유기적인 상호작용을 하여 발적(redness), 발열(heat), 종창(swelling), 동통(pain) 등의 증상이 나타난다. 여러 가지 요인이 있으나 주로 섭취나 접촉에 의한 감염에 의해 유발되고, 여기에는 각종 cytokines과 protein의 관여는 물론

prostaglandin E₂, lysosomal enzyme, free radical 등 다양한 면역계 세포와 매개물질들이 관여하므로, 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이라고도 할 수 있다. 즉 면역세포가 세균·바이러스 등을 인식하면 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서 염증반응의 원인이 되는 다양한 인자들을 분비하여 염증반응을 유발시킨다.

cytokine은 interferon, interleukin, TNF(tumor necrosis factor)등 50여 종류가 발견되었으며 생체 내 활성물질 중 하나로 대식세포와 림프구 사이 또는 림프구와 림프구 사이의 정보를 전달하는 고분자 물질인 당단백질로서 미량으로 효과를 발휘하며, 세포의 receptor에 결합하여 그 결합에 의한 세포내 활성화로 효과를 발휘한다. cytokine은 표적 세포 특이성을 나타내며 생성세포로부터의 방출은 호르몬과 유사한 특성이 있으나, 혈액이 아닌 국소에서 주로 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한 각 cytokine의 작용은 독립된 작용과 동시에 서로 관련을 갖는 연쇄반응을 한다. 즉, cytokine은 일반적으로 다수의 작용을 하며, 다른 cytokine이 같은 활성을 나타내기도 한다(Abul et al, 2003). 대식세포는 몸에 항원이 되는 이물질이 침입하여 염증이 발생하면 그 이물질의 성질을 구분하고 다른 종류의 사이토카인을 배출하여 림프구나 과립구를 활성화시키며, 림프구는 대식세포의 신호가 없으면 작용하지 않는다(이지영 등, 2010) 과립구의 염증은 화농성으로 조직을 파괴하는 염증이고 급성 췌장염, 맹장염 등이 속하며, 림프구의 염증은 맑은 장액이 나오는 카타르성(catarrh) 염증이나 붉게 부어 오르는 플레그모네성 염증, 알레르기성 염증 등으로 아토피성 피부염, 기관지 천식, 알레르기성 비염, 화분증 등을 들 수 있다. 즉 인체방어에 필요한 염증반응도 과잉되거나 조절되지 못하면 다양한 질환으로 발전될 수 있다.

염증반응 시 대식세포와 같은 염증세포들이 활성화 되면 nitric oxide (NO)와 prostaglandin(PG), IL-1 β , TNF- α 등 다량의 염증 매개 인자

를 분비한다(전명순 등, 2009 ; Higuchi, 1990). 또한 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성균의 세포막에 존재하며, monocyte 또는 macrophage에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 와 같은 proinflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Axtelle et al, 2001 ; Lazarov et al, 2000 ; Lee et al, 2004 ; Scott et al, 2000). 분자생물학적으로 볼 때 체내 염증의 진행과정의 원인으로 산화적 스트레스가 알려져 있는데 이와 관련된 활성산소종과 염증성 cytokine은 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 병리학적 측면의 매개체로써 중요한 역할을 한다. 내독소 자극은 대식세포와 반응하여 내독소를 제거하는데 기여하나 대식세포가 과도하게 자극되면 염증성 cytokine인 TNF- α 와 같은 내독소의 매개체와 단백질분해효소 및 활성산소종 생성을 통해 염증반응과 산화적 스트레스를 증가시키게 된다. LPS에 의한 염증 매개체와 cytokine들의 생성은 NF- κ B와 같은 전사인자의 활성화에 의한 cyclooxygenase-2(COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 발현에 의존한다.

최근 세포 사이의 작용을 매개하는 메신저 물질로 중요한 연구 대상이 되고 있는 NO는 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의하여 arginine으로부터 합성되며, NOS는 nNOS, eNOS, iNOS로 구성되어 있다(Moncada et al, 1993). 혈관 내피로부터 유래된 NO는 강력한 혈관 확장제로 작용함으로써 혈관항상성을 유지시키는 반면, 염증상태에서의 과도한 NO의 생성은 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 급성과 만성염증에 대한 반응으로 조직의 손상 및 유전자 변이 등을 일으킬 수 있다(Mu et al, 2001 ; Ryu et al, 2003 ; Stokes et al, 2002). NO 생성의 증가는 PG 생성을 증가시키며, 반대로 NO 생성의 억제제는 COX와 PG 생성을 억제한다(Szczeklik et al, 2005). 염증 유도 사이토카인(pro-inflammatory cytokines), NO와 PGE₂는 iNOS와 COX-2에 의해 다량 생성된다(Posadas, 2000). iNOS

는 세포내 Ca^{2+} 의 농도에 비의존성이며 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포 간세포와 심근세포 등 여러 세포에서 LPS, $INF-\gamma$, IL-1과 $TNF-\alpha$ 등의 자극에 의해 활성화되어 장시간 동안 다량의 NO를 생성한다(Knowles et al, 1992). NO는 중추신경계통, 말초신경계통, 심장혈관계통에서 작용을 나타냄이 보고되어 왔는데, 혈소판 내에서 혈소판의 응집을 억제하며, 대식세포에서 세포독성을 매개하는 작용을 하고, 일부 인체조직에서는 혈관확장을 매개하는 물질로도 알려져 있다 (Feldman et al, 1993). NO가 적게 만들어지면 고혈압, 성교 불능, 동맥경화 등의 증상을 나타내고 세균에 감염되기 쉽다. 반면 NO가 필요 이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, mutagenesis, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다(Knowles et al, 1992). COX는 염증과 알레르기 증상 유발 물질인 arachidonic acid로부터 eicosanoids의 일종인 prostaglandine과 leukotrienes의 생합성을 매개하는 효소로서 염증반응에 주도적 역할을 한다. COX-1은 대표적인 생리작용인 위장세포 보호 및 신장의 정상기능 유지, 그리고 혈소판 응집과 같은 생리 기능 유지와 관련 있는 효소임에 반해(Warner et al, 1999), COX-2는 여러 종류의 자극에 의해 유도되는 효소이며 염증과 통증을 야기하는 PG를 생산함으로써 염증성 질환 및 종양의 생성에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Moon et al, 1998).

염증의 억제는 크게 phospholipase 저해제, lipoxygenase 저해제 및 cyclooxygenase 저해제로 나눌 수 있다. 이 eicosanoids의 생합성 과정에서 염증 반응은 COX에 의해 진행되며 두 종류의 이성효소 중 염증성과 유도성 효과들은 COX-2에 의한 것이다. COX-2에 의해 생성되는 PGE_2 합성은 비스테로이드성 항염증약에 의해 억제되거나 소화성 궤양이나 신장 기능 이상 등의 부작용으로 사용이 제한되어, 독성이 낮고 부작용이 없는 새로운 약물이 요구되고 있다. 이런 이유로 대표적인 COX 억제제인 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)를 장기간

복용하거나 위장이 약한 사람이 복용 시, COX-1의 활성 억제로 프로스타글란딘류 생합성이 억제되면서 위궤양 또는 장 궤양이 유발되며 과다출혈로 인한 이차적인 빈혈을 일으킬 수도 있다. 따라서 COX-2를 선택적으로 억제한다면 정상적인 생리기능은 그대로 유지하면서 부작용이 없거나 감소된 상태로 염증치료가 가능할 것이라 사료된다(김경범 등, 2007).

최근의 여드름 치료는 모낭세포의 비정상적인 각화완화, 피지분비 정상화, *P. acnes*의 과잉증식 억제 및 염증반응의 감소를 목적으로 한다. 여드름 치료제로 사용중인 내복약으로는 tetracycline, minocyclin, doxycyclin, erythromycin, roxithromycin 등이 사용되고 있다. 또한 호르몬요법인 경구피임약과 spironolactone 등이 사용되고 있다. 국부용 여드름 치료제로는 benzoyl peroxide(BP), retinoic acid, salyclic acid(BHA), adapalene, azelaic acid, clindamycin, triclosan 등이 사용되고 있다. 그러나 항생제 과다 사용 시 진피 건조증, 피부의 자극, 접촉성 피부염, 과민반응 등이 나타날 수 있고 장기간 복용으로 간 조직 등의 손상뿐만 아니라 항생제 내성에 대한 문제와 임신예정 및 임신 중의 사용은 최기형성을 일으키므로 금지하고 있다. 따라서 일본에서는 한국에서 시판되고 있는 일부 항생제의 사용을 금지하고 있으며, 2001년 영국에서는 *P. acnes*에 대한 내성이 67% 발생한다고 보고하였다.

메디컬 스킨케어에서는 needle이나 탄산가스레이저를 이용한 여드름 압출법, 박피, 레이저치료, 빛에 민감하게 반응하는 물질인 광과민제(5-ALA, 스피루리나 등)와 함께 사용하는 광역동요법(photodynamic therapy, PDT)등의 외과적 시술방법과 국소치료법으로 연고제(약물)와 화장품 등을 사용하여 스킨케어를 동시에 진행하고 있다(안성구 등, 2009). 한방에서는 한의학 원리에 의해 체질에 맞는 한약, 뜸, 부항, 좌훈요법 등의 치료와 한약재를 이용한 약침요법, 여드름 압출, 한방팩 등으로 관리하고 있다. 또한 에스테틱 업계에서의 여드름 피부관리는 여드름 피부 전용 세정과 각질제거

해초필링, 약초필링, α -hydroxy acid(AHA), β -hydroxy acid(BHA), BP 등과 항염 및 항균작용, 피지를 조절하는 작용이 있는 성분을 함유한 화장품을 이용한 관리, 면포제거, 피부진정 및 재생관리 등으로 여드름 피부를 관리하고 있다.

이와 같이 현재 다양한 여드름 치료나 개선 방법들이 이용되고 있으나 아직 효과적인 단일 치료방법을 찾기에 어려움이 있다. 따라서 안전하면서도 부작용을 최소화 할 수 있는 항염작용과 항균작용이 뛰어난 생리활성물질을 찾는 연구가 필요하며, 본 연구에서 연잎의 에탄올 추출물을 이용한 항산화, 항균, 항염작용에 관한 평가로 여드름 개선효과에 대한 유효성을 검색하고자 하였다.

2. 연

우리나라 연의 기원은 불교분화와 함께 고려시대 710년경 중국으로부터 전파된 것으로 추정하고 있으며, 불교문화 도입과 함께 재배가 늘어났다 국내에 자생하는 수련과(*Nymphaeaceae*)의 다년생 수생 초본으로는 순채(*Brasenia schreberi*), 개연꽃(*Nuphar japonicum*), 왜개연꽃 (*Nuphar pumilum*), 가지연꽃(*Euryale ferox*), 수련(*Nymphaea tetragona var. angusta*) 및 연(*Nelumbo nucifera*) 등이 있다(이창복, 1993). 이 중 연은 연과에 속하는 다년생 줄기 채소로 근경은 짧고 수염뿌리를 많이 내며 잎은 뿌리에서 나와 수면에 뜨며, 난상 심형이고 꽃은 6~7월에 피는데, 백색, 남색, 붉은색, 자주색 등 갖가지 색채로 핀다(김창민, 1998). 백련의(*Nelumbo nucifera* Gaertn) 뿌리와 잎은 민간요법에서 당뇨병(고병섭 등 2006), 고지혈증과 고혈압 등 대사성 질환에 효과적인 것으로 알려져 있다(김성빈 등, 2005; Brindha et al, 2010; Shin et al, 2006).

연은 뿌리줄기가 굵어진 연근, 연잎, 연꽃 및 연밥으로 구분되는데, 연의 과실 또는 종자(種子)를 연자(蓮子), 연 종자의 녹색의 배아(胚芽)를 연자심(蓮子心), 연의 수술을 연수(蓮鬚), 잎을 하엽(荷葉), 근경(뿌리줄기)을 우(藕), 근경(뿌리줄기)의 마디를 우절(藕節)이라고 한다(Jung et al, 1998; Kim et al, 1999).

꽃은 관상용과 차제로 이용하여 왔으며, 잎과 뿌리는 약용과 식용으로 사용되어 왔다. 한방에서 잎은 하엽(河葉)이라 하며, 설사, 두통과 어지러움, 산후 어혈치료, 야뇨증, 해독 작용에 쓰이고, 더위를 식히고 습(濕)을 제거하는 청서이습(淸暑利濕), 맑은 양기를 위로 오르게(升發)하고 지혈하는 효능이 있어 습(濕)에 의한 설사, 현기증, 수기(水氣)에 의한 부종(浮腫), 토혈(吐血), 코피, 혈변 등의 치료에 각각 사용하였다. 동의보감(東醫寶鑑)에서는 연잎이 ‘갈증을 멎게 하고 태반을 나오게 하며 버섯으로 인한 심독(毒)을

풀어 주고 혈창(血脹)으로 배가 아픈 것을 치료한다' 고 기록되어 있으며, 백련잎의 꼭지를 따서 섭취하면 잇몸질환을 억제하여 충치, 구취 예방에 효과가 있다고 하였다(조현영, 2005). 또한 체내의 삼투압의 조절, 항체 형성능력, 간 해독작용 등을 높이는 철분이 많아 유아, 사춘기소녀, 임산부 빈혈예방에 좋고 또한 비타민 E가 많아 천연 항산화제로 유용하며, 피를 맑게 하는 자정능력과 심장, 신장, 위장의 근육을 보호하는 기능이 있다. 그 밖에도 연잎은 입 냄새 제거, 니코틴 제거, 암 발생억제, 하혈을 멈추게 하고, 기침 가래 해소, 천식, 진통, 진정작용, 신경통, 관절염, 감기예방, 콜레스테롤 수치 감소 작용, 지방 분해 작용, 피부병 및 피부를 부드럽게 해주는 작용이 있어 연잎을 달여 목욕을 하면 건조한 피부나 아토피성 피부개선에 도움을 준다고 보고되고 있다(Jung et al, 1998 ; Kim et al, 2000). <중약대사전>에서는 면역성을 증가시켜 늙지 않게 하고 아름다운 머리결을 유지시켜 주며, 말초 혈관의 혈액 순환을 촉진하여 피부의 신진대사를 활발하게 함으로서 여드름이나 기미에 효과가 있고 신경과민이나 스트레스 등으로 인한 불면증이나 우울증을 진정시키는 효과가 있다고 전한다. 이처럼 잘 알려진 신경안정 작용은 스트레스로 인한 피지분비 증가에 의한 여드름의 발생요인과 악화요인에 긍정적인 요인으로 작용할 것으로 생각되며 연잎에 함유된 탄닌 성분은 피부에 수렴작용을 위한 화장품 성분으로서 사용되고 있다. 수렴작용의 원리는 피부 단백질의 고분자와 flavonoids가 가교결합을 형성하여 피부가 수축되는 현상으로 수렴제는 피부와 점막 혈관 등을 수축시키는 작용을 하며, 세포 간극 및 림프간극을 가로막아 점액의 분비를 억제시켜 과도한 피지분비의 조절 및 과도한 피지 분비로 인해 모공이 확장된 피부에 수렴작용에 의한 모공수축 효과를 기대할 수 있다.

연잎의 일반 성분은 건중량100g 당 수분 0.013 g, 탄수화물 63.84g, 단백질 16.9g, 지방 9.99 g, 회분 9.26g 이며, 무기질 함량은 칼륨 1,545.2mg, 칼슘 2,208.1mg 인 400.5mg, 나트륨 56.4 mg, 철

10.5mg이고, 비타민A 16.9 mg, 비타민C 0 mg, 비타민 B1 0 mg, 비타민B2 7.6 mg, Niacin 8.0 mg으로 나타났다(이경석, 2009). 최혜연(2009)의 연구에 의하면 수분 1.65g, 탄수화물 10.23g, 조단백질 14.47g, 조지방 2.29g, 조회분 9.36g이고 무기질 함량은 칼륨 1345.25 mg, 칼슘 1069.51 mg, 인 293.27 mg, 마그네슘 261.48 mg, 나트륨 12.41 mg, 철 4.32mg, 아연 1.76mg, 구리 0.27mg, 비타민A 714.61mg, 비타민C 679.58mg, 비타민 B1 4.10mg, 비타민B2 3.67mg, Sucrose 1,645.56 mg, Fructose 210.70 mg, Glucose 110.14 mg이라 하여 두 실험의 성분이 약간의 차이를 보였으나 이는 연의 생육조건과 재배 조건의 영향에 의한 차이로 판단된다.

연잎에서 분리된 생리활성 성분으로는 nelumboside, nuciferine, coclaurine 등의 alkaloid류, gallic acid와 methyl gallate 등의 aromatic acid류 및 quercetin, isoquercitrin, hyperoside, rutin, kaempferol 등의 flavonoid 류가 있다(Furukawa, 1966 ; Cho et al, 2003 ; Kashiwada et al, 2005 ; 최선주 등, 2011). 또한 aporphine alkaloids를 다량 함유하여 고지혈증의 발생빈도를 낮추고 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추며(김성빈 등, 2005), 항균활성이 있는 것으로 알려졌다.

이에 본 연구에서는 연잎 추출물을 이용한 피부상재균에 대한 항균작용과 항산화, 항염 활성을 평가하여 인체에 안전하면서도 부작용을 최소화할 수 있는 새로운 기능성 소재로서의 개발에 대한 기초자료의 제공과 더불어 연잎의 새로운 부가가치 창출에 목적을 두고 연구를 시행하였다.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료

본 연구에서 연의 부위별 항균 활성을 평가하기 위한 시료로 사용한 연잎과 연꽃은 2010년 6월 충청북도 (보은연꽃농장)에서 구입하여 수세한 후 동결 건조하여 사용하였으며 연씨, 연방은 2009년에 채취하여 건조한 상태로 부여의 백제 연꽃마을 영농조합에서 구입하여 시료로 이용하였다. 연잎의 생리활성 평가로 항균, 항산화, 항염 실험에 사용된 연잎은 2011년 6월에 충청북도(보은연꽃농장)에서 채취하여 수세한 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

2) 시약 및 기구

시료추출에 사용한 용매는 50% ethanol(DAEJUNG, KOREA)을 사용하였으며, 항산화 실험에 사용한 시약은 Na_2CO_3 (Samchun Chemicals, Korea), Folin-Ciocalteu(Sigma-Aldrich, USA), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(Aldrich Chemisty, Germany), 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid ; ABTS⁺), Trolox(Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA), β -Carotene(Sigma-Aldrich, Co. ST. Louis, Mo, USA), linoleic acid(Sigma-Aldrich, Co., St.

Louis, Mo, USA), tween 40(Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Mo, USA)을 사용하였다. 그 외의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

항균성 측정을 위한 기구로 paper disc는 (AKJTO49005020, Advantec, Japan) 6.0mm, digimatic caliper(Absolute Digimatic, Mitutoyo Corp., Japan)를 이용하였다.

실험에는 사용된 기기는 rotary vaccum evaporator(Series CCCA-1110, EYELA, Japan), deep freezer (Chayon Laboratories Inc., Korea), shaking incubator(HB-201UT, Hanbaek, Korea), centrifugal separator(1236MG, Gyrozen, Korea), incubator(MIR253, Sanyo Electric co. Ltd, Japan), 96-well plate (Falcon, USA), microplate reader(Biolog Inc., USA), UV/VIS spectro photmeter (UV-9100, Human co., Korea) 등이 사용되었다.

3) 사용균주 및 배지

항균 실험을 위한 균주는 총 3종으로 생명자원센터(KCTC)에서 분양 받아 사용하였다. 균주는 *Propionibacterium acnes* 3314, *Staphylococcus aureus* 1621, *Staphylococcus epidermidis* 1917를 사용하였으며 배지는 Reinforced-clostridial broth(Becton, Dickinson and company, USA), nutrient agar(Becton, Dickinson and company, USA)를 사용하였다. 균주는 배지를 이용하여 37℃ incubator (MIR-253, Sanyo Electric co. Ltd. Japan)에서 24시간 배양한 후 3회 계대 배양하여 활성이 회복된 균주를 사용하였으며 incubator의 습도는 95%를 유지하였다 (Table 1).

Table 1. List of microorganisms and media used for antibacterial activity test

	Microorganism		Gram	Media	Temp. (°C)
skin	<i>Propionibacterium acnes</i>	KCTC ¹⁾ 3314	+	RCB	37
flor	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC ¹⁾ 1621	+	NA	37
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC ¹⁾ 1917	+	NA	37

¹⁾Korean Collection for Type Culture

2. 실험방법

(1) 연의 부위에 따른 항균작용 검색

1) 연꽃, 연잎, 연씨, 연방의 부위별 추출

연꽃, 연잎, 연씨, 연방 25g을 70% ethanol 1L를 가하여 shaking incubator(HB-201UT, Hanbaek, Korea)에서 24시간 동안 2회 추출하였다. 추출액을 4000×g, 10℃에서 10분간 원심분리하고 여과하여 (Whatman NO.5) rotary vacuum evaporator(N-N Series CCA-1110, EYELA, Japan)로 35℃ 농축하고 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

2) 시료 부위별 추출물의 항균력

연꽃, 연잎, 연씨, 연방의 항균력을 측정하기 위하여 Zaika(1998)의 방법에 따라 paper disc methods를 이용하였다. 3종의 균주를 각각 1백금이씩 취하여 10ml의 broth에 접종하고, 37℃에서 24시간 동안 배양하여 활성화시키고, 3회 계대 배양하였다. 이 균주를 100 μ l씩 각각 RCB, NA 배지에 도말하고 멸균한 paper disc(AKJ-TO49005020, Advantec, Japan)에 1.0mg/ disc의 농도로 연꽃, 연잎, 연씨, 연방 시료를 흡수시킨 후 균주를 도말한 RCB, NA 배지의 표면 위에 놓았다. 이 petri dish를 뒤집어서 37℃로 유지되는 Incubator(MIR-253, Sanyo Electric co. Ltd, Japan)에서 24시간 동안 배양한 후 disc 주위의 inhibition zone의 직경(mm)을 digimatic caliper(Absolute Digimatic, Mitutiyo Corp., Japan)로 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복 실험하여 평균값을 사용하였다.

3) 시료 부위별 추출물의 열 및 pH 안정성

추출물의 열 안정성을 측정하기 위해 40, 80, 100, 120℃에서 1 시간 동안 열처리한 후 처리 온도별로 추출물의 농도가 1mg/disc가 되도록 paper disc method로 항균력 측정방법과 동일하게 측정하였다. pH 안정성 측정은 용매를 pH 2, 5, 7, 9, 11로 조정한 후 시료를 가하고 37℃에서 1시간 동안 방치한 다음 pH 7로 중화시켜 paper disc method로 측정하여 비교하였다.

(2) 연잎의 생리활성 탐색

1) 추출 용매 선정을 위한 추출방법

연잎으로부터 생리활성물질을 추출하기 위한 최적 추출용매를 선정하기 위한 실험으로 연잎 25g에 각각 1L의 50%, 70%, 95%의 ethanol을 가하여 shaking incubator(HB-201UT, Hanbaek, Korea)에서 24시간 동안 2회 추출하였다. 추출액 4000×g을 10℃에서 10분간 원심분리 한 후 여과하여(Whatman NO.5) rotary vaccum evaporator(N-N Series CCCA-1110, EYELA, Japan)로 35℃ 농축하고 동결건조하여 시료로 사용하였다.

2) 추출용매별 항균활성

가. 추출용매별 항균력

연잎 시료의 추출용매별 항균력을 측정하기 위하여 Zaika(1998)의 방법에 따라 paper disc methods를 이용하였다. 3종의 균주를 각각 1백금이 씩 취하여 10ml의 broth에 접종하고, 37℃에서 24시간 동안 배양하여 활성 시키고, 3회 계대 배양하였다. 이 균주를 100 μ l씩 RCB, NA 배지에 도말하고 멸균한 paper disc(AKJ-TO49005020, Advantec, Japan)에 1.0mg/disc의 농도로 50%, 70%, 95% ethanol로 추출한 연잎 시료를 각각 흡수시킨 후 균주를 도말한 RCB, NA배지의 표면 위에 놓았다. 이 petri dish를 뒤집어서 37℃로 유지되는 incubator(MIR-253, Sanyo Electric co. Ltd, Japan)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 disc 주위의 inhibition zone의 직경(mm)을 digimatic caliper (Absolute Digimatic, Mitutiyo Corp., Japan)로 측정하였다.

나. 추출 용매의 농도별 Minimum inhibitory concentration

추출 용매별 연잎 시료의 최소저해농도(MIC)는 broth microdilution method를 이용하였다. 96 - well plate(Falcon, USA)에 RCB, NA 배지를 각각 100 μ l씩 분주하고 50%, 70%, 95% ethanol로 추출한 연잎 시료를 100 μ l를 1000, 500, 250, 50, 0 μ g/ml 로 희석하여 농도를 조절 한 후 균의 농도를 $2 \times 10^4 \sim 10^5$ CFU/ml이 되도록 희석시켜 100 μ l씩 첨가하여 총 200 μ l를 첨가하였다. 그 후 37℃에서 24시간 배양한 뒤, 650nm에서 microplate reader(Biolog Inc., USA)로 흡광도를 측정 하였다. 흡광도가 0.00을 나타내는 시료 최대 농도를 MIC 값으로 정하였다.

3) 항산화 활성

가) Total phenol contents

연잎 시료의 총 페놀 화합물 함량은 Folin-Denis 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 0.2 mL에 증류수 5 mL과 Foin-Ciocalteau 시약 0.5 mL을 첨가한 후, 2% Na₂CO₃ 1 mL을 넣고 혼합하여 37°C 항온수조에서 20분간 반응시켰다. 반응 후에는 분광광도계를 이용하여 740 nm에서 흡광도를 측정하였으며 gallic acid를 표준물질로 작성한 표준검량식에 적용하여 총 페놀 화합물 함량을 산출하였다.

나) DPPH radical scavenging activity

연잎 시료의 DPPH radical 소거능은 Blois(1958)의 방법을 이용하여 측정하였다. 에탄올 100 mL에 DPPH(2,2-diphenylpicrylhydrazyl) 16 mg을 용해한 후, 여과지로 여과하여 DPPH 라디칼 용액을 제조하였다. 제조한 DPPH 라디칼 용액 0.8 mL에 에탄올 적당량(3~4 mL)을 가하여 spectrophotometer의 흡광도 값이 0.95~0.99가 되도록 조정하였다. 에탄올에 용해된 시료 0.2 mL에 DPPH 라디칼 용액 0.8 mL을 가하고 37°C 항온수조에 10분간 방치한 후 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 용액과 동일한 양의 에탄올을 사용하였으며, 다음의 식을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능을 산출하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) \times 100$$

다) Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

연잎 시료의 FRAP assay는 Benzie and Strain (1996)의 방법을 이용하여 측정하였다. FRAP reagent(WFR)는 300 mM acetate buffer 25 mL, TPTZ 2.5 mL와 20mM FeCl₃ · H₂O₂ 2.5mL를 10:1:1의 비율로 혼합하여 제조하였으며 37°C에서 3 mL WFR을 취하여 593 nm에서 blank 값을 측정한 후 WFR 용액과 100uL 시료, 300uL 증류수를 혼합하고 4분간 반응시켰다. 반응 종료 후에는 593 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준 물질로는 FeSO₄ · 7H₂O(100~1000 uM)를 사용하였다.

라) ABTS radical scavenging activity

연잎 시료의 ABTS(2,2 - azino - bis(3 - ethylbenzthiazoline - 6 - sulfonic acid diammonium salt) 라디칼 소거능은 Kim et al(2002)의 방법을 사용하였다. 1.0 M AAPH(2,2' - azobis(2 - amidinopropane) HCl)와 2.5 mM ABTS를 phosphate buffered saline (PBS) buffer에 용해하고 암소에서 24시간 방치하여 ABTS 라디칼 형성하였다. 제조한 ABTS 라디칼 용액 980uL에 시료 20uL을 넣고 37°C 항온수조에 10분간 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 용액과 동일한 양의 PBS buffer를 사용하였으며, 다음의 식을 이용하여 ABTS 라디칼 소거능을 계산하였다.

$$\text{ABTS radical 소거능(\%)} = (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{대조군 흡광도}) \times 100$$

마) β -Carotene bleaching

β -carotene linoleate system을 이용한 항산화 효과의 측정은 Mattaus(2002)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. β -carotene 용액

(1mg/mL in chloroform) 1 mL, 40 uL의 linoleic acid와 tween20 400uL를 플라스크에 넣고 40℃에서 질소가스로 클로로포름을 휘발시켰다. 증류수를 천천히 첨가하며(100 mL)를 교반하여 제조한 에멀전 용액 0.3 mL에 시료 120uL를 넣은 후 분광광도계로 470nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료로부터 최초흡광도를 측정한 후 50℃ 항온수조에 유지시키며 20분 간격으로 최대 120분까지 흡광도의 변화를 측정하였다.

4) 세포 독성 측정

가) 세포배양과 시료처리

RAW 264.7 (ATCC, Manassas, VA, USA) 세포는 100unit/mL의 penicillin이 포함된 10% FBS DMEM (WelGENE Inc., Daegu, Korea)으로 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 모든 실험에서는 80%의 confluency와 20세대를 넘기지 않은 세포를 사용하였다. Nitric oxide 농도를 측정하기 위하여 phenol red가 포함되어 있지 않은 10% FBS DMEM으로 5×10^4 cells/well 로 하여 96 well plate에 분주 후, 24시간 동안 부착시킨 다음 LPS 1 μ g/well 이 되도록 가하였다. 시료는 최종농도 1% DMSO가 되도록 한 후 0~500 μ g/ml 의 농도로 배양액에 가한 다음 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다.

나) MTT assay

24시간 배양된 세포의 배양액을 제거하고 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)의 농도가 0.5 mg/ml이

되도록 phenol red가 포함되어 있지 않은 10% FBS DMEM에 녹여 100 μ l를 가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양 하였다. 4시간 후 배양액을 제거하고 formazan crystal를 용해시키기 위하여 DMSO 200 μ l를 가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 산출하였다.

5) 항염증 활성

가) Nitric oxide 형성 저해능

cytokine에 의하여 RAW 264.7 세포가 발생하는 nitrite를 측정하기 위하여 griess 반응을 이용하였다. 12시간 배양된 세포의 상장액 100 μ l를 취하여 96 well plate에 취한 후 Griess reagent 인 2% sulfanilamide가 포함된 4% phosphoric acid 50 μ l 와 0.2% naphthylethylenediamine dichloride 50 μ l를 넣어, 상온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA microplate reader (Biochrom Ltd., Biochrom Asys UVM 340, UK)로 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite(NaNO₂)를 사용하여 얻은 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

나) Cyclooxygenase(COX)-2 억제능

10% FBS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW 264.7 세포를 24 well tissue culture plate에 10^5 cells/well의 농도로 가한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 16시간 배양하였다. 배지를 제거하고, FBS를 가하지 않은 DMEM을 가하여 8시간 starvation 시키고, 연잎 추출물을 농도별로 15분간 전 처리 하였다. Lipopolysaccharide(LPS, Sigma, USA)을 가하여 24시간 배양 한 후, 세포 상층액을 취해 ELISA Kit (Amersham, USA)를 이용해 prostaglandin E2를 정량하였다.

다) IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현 평가 (RT-PCR)

COX-II 활성억제력을 보인 연잎 추출물이 염증성 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위해 interleukin-1 β (IL-1 β)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)을 대상으로 RT-PCR를 수행 하였다. 10% FBS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW264.7 세포를 10^5 cells/ml의 농도로 12 well tissue culture plate에 넣어 80-90% 배양하였다. FBS가 첨가되지 않은 DMEM으로 세포배양액을 교체하고, 연잎 추출물을 10~50 ug/mL의 농도로 가한 후 24시간 추가 배양하고 다음의 실험을 실시하였다.

ㄱ) Total RNA 분리

RAW264.7 세포로부터 total RNA 분리를 위해 시료를 처리한 배지를 제거한 후 Easy blue(Intron, KOREA) 1ml을 가하여 녹여 eppendorf tube로 옮겼다. Chloroform을 200 μ l 가하여 1분간 세차게 흔든 후 4°C에서 15분간 방치하고 원심분리(14,000rpm, 4°C, 15분)하여 상층액

400ul를 취했다. Isopropanol을 동량을 가하여 -20℃에서 1시간 방치시킨 후 원심분리(14,000rpm, 4℃, 15분)하여 상층액을 제거하고 침전물을 DEPC처리된 이온교환수 30 μ l을 가하여 녹였다. 이중 일부를 취하여 spectrophotometer(Beckman, USA)로 260과 280nm에서 흡광도를 측정해 total RNA를 정량하였다.

ㄴ) RT-PCR

분리한 total RNA 4 μ g를 eppendorf tube에 넣고 random hexamer (10pmol/20 μ l)를 첨가하여 65℃에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 넣었다. 여기에 반응액 (1x buffer, 100uM dNTPs, 200unit RTase)을 가하여 37℃에서 1시간 반응시키고, 65℃에서 10분간 처리하여 reverse transcription (RT) 반응을 종료시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 상기한 RT 반응액을 PCR tube에 가하여 PCR machine (Perkin-Elmer, USA)에서 IL-1 β 와 TNF- α 는 94℃/30초, 58℃/40초, 72℃/1분의 조건으로 각각 27회 증폭하였다. 본 실험에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 5와 같다. RT-PCR 결과는 1% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색한 후, UV illuminator 위에서 polaroid camera를 이용해 사진 촬영하였다.

Table 2. Nucleotide sequence of the primers and expected size of PCR products

Primer		Sequence	Size
IL-1 β	Sense	5'-AAGCTCTCACCTCAATGGA-3'	301
	Anti-sense	5'-TGCTTGAGAGGTGCTGATGT-3'	
TNF- α	Sense	5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'	324
	Anti-sense	5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3'	
Cyclophilin	Sense	5'-CTCCTTTGAGCTGTTTGCAG-3'	325
	Anti-sense	5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3'	

6) 통계분석

실험결과는 SAS 9.2의 일반화 선형모형을 이용하여 시료간의 유의적인 차이를 검정하였으며 대조군과 비교하여 P값이 5% 미만일 때 통계학적 유의성이 있다고 판정하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. 연의 부위에 따른 항균작용 검색

(1) 연꽃, 연잎, 연씨, 연방의 추출물의 항균력

본 연구에서는 여드름 발생원인 중 가장 중요한 원인균 *P. acnes*와 염증을 악화시키는 작용을 하는 *S. aureus*와 *S. epidermidis*의 연의 부위별 추출물을 이용한 항균활성을 측정하였다. 많은 피부질환이 피부상재균에 의해 발생되며 이 중 *P. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*는 여드름 및 아토피 등 대표적인 피부질환과 관련된 균주이다. 피부상재균 이외에도 화장품을 변질시키는 세균이 피부에 악영향을 주고 있으며, 이를 사멸하기 위해 다양한 종류의 항균제나 방부제를 필수적으로 사용하고 있는데 기존에 사용되고 있는 합성물질들은 피부에 알레르기를 유발하기도 하며, 최근에는 방부제로 거의 모든 화장품에서 사용되고 있는 파라벤류의 유해성이 밝혀지고 있다. 따라서 피부에 안전하면서도 항균성, 방부력을 가진 천연 소재에 관한 연구가 필요한 시점이다.

연꽃, 연잎, 연씨, 연방 추출물의 항균 활성을 측정하기 위해 3종의 피부상재균으로 Paper disc methods를 실행하였다. Paper disc 주변에 inhibition zone이 생기면 항균활성이 있는 것으로 판단하고 inhibition zone의 직경이 클수록 항균 활성이 높다고 평가하였다(Kim, 2010).

연꽃, 연잎, 연씨, 연방 추출물의 항균활성을 검색한 결과는 Table 3과 같다. 3종의 균주 모두 연꽃, 연잎, 연씨, 연방에 고른 활성을 나타내었다.

*P. acnes*는 연꽃, 연잎, 연방, 연씨 모두 높은 항균 활성을 보여주었는데 그 중에서도 연꽃이 16.56 mm로 가장 큰 inhibition zone을 나타내었고, 연씨는 14.02로 가장 작은 inhibition zone을 보였다.

*S. aureus*는 연꽃, 연잎에서 좋은 항균 활성을 나타내었으며 연꽃이 16.48mm로 가장 좋았고, 연방이 8.37mm로 가장 낮은 inhibition zone을 보였다.

*S. epidermidis*는 연꽃과 연방에서 14.73mm, 14.23 mm로 모두 높은 항균 활성을 보여주었다.

종합해보면 연꽃과 연잎 시료가 대체로 모든 균주에서 높은 항균활성을 보였으며 *S. epidermidis* 는 연꽃, 연잎, 연씨, 연방의 모든 시료에서 높은 항균활성을 보였다. 3균주 모두 연꽃에서 높은 억제력을 보였다. 즉 연의 부위별 시료들이 피부상재균에 모두 뛰어난 항균 활성을 나타내어 여드름 피부의 항균작용을 돕는 화장품 소재로서의 가능성을 보였다

Table 3. Antimicrobial activity from different parts(flowers, leaves, seeds and pods) of lotus

Part	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)		
	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Flowers	16.56	16.48	14.73
Leaves	14.31	14.98	14.23
Seeds	14.02	12.19	13.55
Pods	15.35	8.37	11.90

(2) 시료 부위별 추출물의 안정성

1) 열 안정성

연의 부위별 추출물의 농도를 1mg/disc 로 하여 40, 80, 100, 120℃에서 각각 1 시간 동안 열처리 한 결과는 Table 4 ~Table 7 과 같이 나타났다.

연꽃, 연잎, 연씨, 연방 모두 3개의 균주 모두 온도의 변화에 따른 항균활성에 큰 변화를 보이지 않아 대체로 열에 안정한 것으로 나타났다.

*P. acnes*는 연의 부위별 시료들 중 연잎과 연씨에서 유의적인 차이를 보였으며 *S. epidermidis*는 연방에서 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$).

이와 같은 결과로 보아 연의 부위별 추출물을 화장품의 성분으로 활용함에 있어 화장품 제조 시 가열에 의한 항균 활성의 변화를 보이지 않아 추후 활용가능성이 충분하다고 사료된다.

Table 4. Effect of temperature treatment on antimicrobial activity of lotus flowers

strains	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)				P- value
	40 °C	80 °C	100 °C	120 °C	
<i>P. acnes</i>	12.19±0.33	11.46±0.41	11.44±0.41	11.98±0.68	0.4062
<i>S. aureus</i>	11.33±0.69	10.79±0.06	11.65±0.32	12.08±1.56	0.5636
<i>S. epidermidis</i>	11.96±0.73	11.27±0.24	11.49±0.09	12.43±0.70	0.2653

Table 5. Effect of temperature treatment on antimicrobial activity of lotus leaves

strains	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)				P- value
	40 °C	80 °C	100 °C	120 °C	
<i>P. acnes</i>	10.82±0.04	12.88±0.23 ^a	11.99±0.83	10.84±0.04 ^a	0.0228
<i>S. aureus</i>	11.18±1.68	12.02±0.11	12.42±1.91	10.85±1.41	0.6996
<i>S. epidermidis</i>	10.65±0.11	12.04±1.30	11.32±0.40	10.88±0.21	0.3278

a : 80 °C to 120 °C (Scheffe)

Table 6. Effect of temperature treatment on antimicrobial activity of lotus seeds

strains	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)				P- value
	40 °C	80 °C	100 °C	120 °C	
<i>P. acnes</i>	10.77±0.10 ^a	10.67±0.08 ^b	9.70±0.08 ^{ab}	11.08±0.18	0.0014
<i>S. aureus</i>	10.40±0.96	10.15±0.62	9.57±0.07	10.97±0.18	0.2584
<i>S. epidermidis</i>	11.22±0.57	9.59±2.45	9.89±0.54	11.08±1.18	0.6083

a : 40 °C to 100 °C (Scheffe)

b : 80 °C to 100 °C (Scheffe)

Table 7. Effect of temperature treatment on antimicrobial activity of lotus pods

strains	Inhibition zone diameter (mm)				P- value
	40 °C	80 °C	100 °C	120 °C	
<i>P. acnes</i>	8.96 ± 0.19	9.23 ± 0.26	9.53 ± 0.36	9.40 ± 0.18	0.2890
<i>S. aureus</i>	8.34 ± 0.69	9.05 ± 0.25	9.53 ± 0.04	9.00 ± 0.04	0.1259
<i>S. epidermidis</i>	8.53 ± 0.05	8.43 ± 0.10	9.99 ± 0.01	8.90 ± 0.70	0.0365

2) pH 안정성

연의 부위별 추출물의 pH 변화에 대한 항균 활성을 조사하기 위하여 각 시료의 농도를 1mg/disc로 하여 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조절하고 37°C에서 1시간 동안 방치한 다음 pH 7로 중화시켜 paper disc method로 측정된 결과는 table 8~table 11과 같다.

연꽃 추출물에서는 모든 균주가 pH 5와 7에서는 대조군과 마찬가지로 항균활성이 뚜렷이 나타나 차이가 거의 없는데 반하여, pH 2와 9, 11과 같은 강산과 강알칼리에서는 항균활성을 보이지 않았다($p < 0.05$). 화장품의 pH는 피부와 같이 약산성 pH 4.5~6.5로 제조하기 때문에 연꽃 추출물의 pH에 따른 항균활성은 화장품 소재로서의 사용 가능성을 보인다.

연잎에서는 모든 균주가 각 pH 조건에 대하여 대조군과 비교 시 큰 변화를 보이지 않고 유사한 항균활성을 보였다($p < 0.05$). 연씨 추출물에서는 모든 균주에서 각각의 pH 변화에 대하여 항균성을 나타내지 않았다.

이와 같은 결과는 pH에 변화를 주지 않았던 항균활성과 상이한 결과로서 실험상에 문제가 있거나 보관 시 활성성분의 파괴 등의 문제를 유추해 볼 수 있다. 결과 값은 3회 반복실험을 한 데이터의 평균값으로서 3회 동안 모두 항균성을 보이지 않아 후자의 원인에 의한 결과라고 판단된다.

연방에서는 모든 균주에서 pH 6, 7에서의 항균성이 미약하게 나타나는 경향을 보였으나 pH 2, 5, 9, 11과 같은 강산과 강알칼리에서는 항균활성을 나타내지 않았다($p < 0.05$).

이와 같이 연의 부위별 항균활성을 검색한 결과 연잎추출물이 모든 균주에서 항균성이 우수하였으며, 온도나 pH 안정성 또한 다른 시료들보다 우수하여 위의 4 가지 시료 중 연잎의 생리활성을 검증하기로 결정하였다.

Table 8. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of lotus flowers

strains	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)					P value
	pH 2	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11	
<i>P. acnes</i>	- ²⁾	7.33±0.32 ^a	7.84±0.08 ^a	-	-	0.0001
<i>S. aureus</i>	-	7.08±0.11 ^a	7.02±0.35 ^a	-	-	0.0017
<i>S. epidermidis</i>	-	8.02±0.30 ^a	7.90±0.08 ^a	-	-	<.0001

¹⁾Not active

a : pH 2, pH 9, pH 11 to pH 5, pH 7 (Scheffe)

Table 9. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of lotus leaves

strains	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)					P value
	pH 2	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11	
<i>P. acnes</i>	8.66±0.24	10.90±0.48 ^{ab}	10.20±0.47 ^b	9.75±0.28	8.35±0.25	0.0039
<i>S. aureus</i>	8.65±0.08	9.84±0.45 ^b	10.77±0.11 ^{bc}	9.18±0.08 ^b	8.22±0.54	0.0031
<i>S. epidermidis</i>	8.40±1.10	10.24±1.17	10.40±1.11	10.02±0.14	7.76±1.20	0.0914

a : pH 2 to pH 5 (Scheffe)

b : pH 11 to pH 5, pH 7 (Scheffe)

c : pH7 to pH9 (Scheffe)

Table 10. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of lotus seeds

strains	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)					P value
	pH 2	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11	
<i>P. acnes</i>	- ²⁾	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-

¹⁾Not active

Table 11. Effect of pH treatment on antimicrobial activity of lotus pods

strains	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)					P value
	pH 2	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11	
<i>P. acnes</i>	- ²⁾	-	7.58±0.32 ^a	-	-	0.0004
<i>S. aureus</i>	-	6.53±0.75	7.04±0.42	-	-	0.1346
<i>S. epidermidis</i>	-	6.43±0.60	7.58±0.24 ^b	-	-	0.0104

¹⁾Not active

a : pH 2, pH 5, pH 9, pH 11 to pH 7 (Scheffe)

b : pH 2, pH 9, pH 11 to pH 7 (Scheffe)

2. 연잎의 생리활성 탐색

(1) 추출용매의 농도별 항균활성

1) 추출 용매의 농도별 항균력

연잎에 50%, 75%, 95% ethanol을 농도별로 추출하여 항균활성을 측정하는 결과는 Table 12와 같이 나타났다. 3종의 모든 균주에서 50% ethanol 추출물의 항균성이 가장 높게 나타났고, 70%, 95%의 농도 순으로 항균활성이 나타났다.

이은수(2011)의 연구에서도 연잎, 연꽃, 연씨, 연방을 50%, 75%, 95%, 99.9%의 methanol 농도별로 추출하여 항균활성을 측정하는 결과 메탄올 농도가 높아질수록 항균활성이 낮아지는 경향을 보여 본 실험과 유사한 결과를 보였다. 식물추출물의 성분은 동일한 성분일지라도 식물종은 물론, 한 식물에서도 부위별로 약리활성이 조금씩 다르게 나타날 뿐만 아니라 추출용매에 따라서 용출되는 성분이 동일부위에서도 달라지기 때문에 이의 효능이나 생리활성도 차이를 보인다(lee et al, 2006). 이와 같은 결과에 따라 본 실험에서 연잎의 생리활성 탐색을 위한 추출 용매의 농도를 50% ethanol로 결정하였다.

Table 12. Comparison of the antimicrobial activity of lotus leaves extracted with different concentration of ethanol

Ethanol con.(%)	Inhibition zone diameter ¹⁾ (mm)		
	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
50%	12.31	10.68	11.67
70%	10.69	8.97	9.72
95%	8.94	7.22	8.68

2) 추출 용매의 농도별 Minimum inhibitory concentration

연잎 추출용매의 농도별 broth microdilution method를 시행하여 균주의 최소저해농도를 측정한 결과는 Table 13과 같다. 50% ethanol 추출물에서 모든 균주가 250~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 MIC 중 가장 낮은 값을 나타내어 높은 항균활성을 나타내었다. 70% ethanol 추출물에서는 500~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 50%로 추출물보다는 낮은 항균성을 보였다. 95% ethanol 추출물에서는 *S. aureus* 에서만 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 높은 MIC값을 보였으며 다른 균주에서는 항균성을 보이지 않았다.

특히 50% ethanol 추출물에서 *S. aureus*는 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 가장 낮은 MIC 값을 보여 3가지 균주들 중 가장 적은 양으로도 균의 성장을 억제하는 높은 항균활성을 보였으며, 70% ethanol 추출물에서도 *S. aureus*가 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 좋은 항균활성을 보였다.

이 같은 결과는 paper disc와 유사한 결과로 추출 용매별 항균 활성 중 50% ethanol 추출물에서 가장 높은 항균활성을 보였으며 연잎추출물의 항균활성은 피부상재균 중 *S. aureus*에서 가장 높았다.

Table 13. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the extract of lotus leaves against several microorganisms.

Ethanol con.(%)	MIC ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
50%	500	250	500
70%	1000	500	1000
95%	-	2000	-

¹⁾Not active.

(2) 항산화 활성

1) Total phenol contents

연잎의 총 페놀량을 측정한 결과는 Table 14에 나타내었다. 연잎의 총 페놀 화합물의 함량은 추출물의 농도가 높아질수록 증가하였으며, $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 당 약 $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 페놀을 함유하고 있는 것으로 측정되었다.

이진영(2010) 등의 연구에서 연잎의 총 폴리페놀 함량은 $213.5\text{ mg}/\text{g}$ 로 나타났으며, 임진아(2008) 등은 연잎 시료 1mg 당 총 페놀 함량이 $282.84\mu\text{g}$ 라고 보고하였다. 이경석(2009)의 연구에서는 연잎의 추출 용매별 페놀 함량을 측정하였으며 70% ethanol 추출 시 $6.75\text{mg}/\text{mL}$, 50% ethanol로 추출 시 $6.44\text{mg}/\text{mL}$ 로 나타났다.

폴리페놀계 물질들은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로써 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들 대부분은 식물기원으로 나무, 수피, 줄기, 잎, 과일, 뿌리, 꽃, 씨앗 등의 식물 모든 부분에 존재하고(Kim et al, 2000), 식물체에 특수한 색깔을 부여한다. 산화환원반응을 포함한 각종 반응에서 기질로 작용하며, 한 분자 내에 2개 이상의 phenolic hydroxyl(OH)기를 가진 방향족 화합물들을 가리킨다. 이들은 플라보노이드와 탄닌 등이 주성분으로 충치예방, 고혈압 억제, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다(Yoshizawa et al, 1987 ; Khan et al, 2006 ; Giovannini et al, 2007). 페놀성 물질은 단백질 또는 효소 단백질, 기타 거대 분자들과 결합하는 성질, 항산화 작용, 2가 금속이온과의 결합력을 가진다. 탄닌류가 높은 농도로 존재하며 떫은 맛을 내는 식물은 식이섭취량을 저하시키고 단백질과의 상호작용으로 효소활성의 저해와 단백질 배설을 증가시키며 Fe 이용률 저하와 동물체에서 변이원성과 발암성과 같은 독성을 일으킨다(Kumar et al, 1984). 반면 이와 같은 단백질과 결합하는 성질은

미생물 세포와 작용하여 성장저해를 유발시킴으로써 항미생물 작용, 항산화 작용에 의한 항암효과와 Pb, Cd과 같은 유해 중금속을 제거시키는 효과를 보인다.

오창석(2007)의 연구에서는 총 페놀 함량과 항균 활성이 일치하는 결과를 보였으며, 연잎의 페놀성 물질과 항균 활성 간에 양의 상관관계가 있다고 보고하였다. 또한 홍경천(Shim et al, 2004), 꾸지뽕나무(Lee et al, 2004), 감초(Ahn et al, 1998), 고삼(Ahn et al, 1998) 등 식물에서 항균물질을 분리 동정한 결과 대부분 페놀계 물질들로 나타났다. 식물체에 존재하는 페놀화합물은 항균활성에 영향을 미치는 주요 성분의 하나이며 식물체 내 존재하는 phenolic acid, flavonoid, tannin, lignin, coumarin, quinine, essential oil 및 유기산등의 다양한 성분들이 상호 복합적으로 작용하여 항균활성을 나타낸다.

Table 14. The total phenol content depending on concentration of lotus leaves

Sample ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Total phenol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
10	4.61
50	13.65
100	24.20
250	57.01

2) DPPH radical scavenging activity

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 라디칼을 갖는 물질로서 cystein, glutatione과 같은 함유황 아미노산과 항산화 효과가 있는 물질과 반응하면 라디칼이 소거되어 탈색되므로 항산화 물질 검색에 많이 이용된다.

본 연구에서는 연잎 추출물의 농도별 DPPH 자유 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 15와 같이 농도에 비례하여 DPPH 자유 라디칼 소거능이 증가하였으며 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 79.76%로 가장 높았다. 이와 같은 결과는 총 페놀 함량의 결과와 일치함으로써 항산화 작용은 전자공여능이 높은 페놀성 물질에 의한 작용으로 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 효과가 있다는 선행 연구들의 결과와 일치하였다.

황은성(2007)의 연구에서는 연잎 메탄올 추출물의 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 91.18%, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 70.15%의 강한 free radical 소거활성을 보였다. 또한 손기봉(2007)의 연구에서는 백연잎의 부탄올 분획물 농도 1mg/mL에서 96.61%, 홍련잎 부탄올 분획물 농도 1mg/mL에서 94.21%의 높은 DPPH 소거능을 보였다. 이와 같이 선행연구에서는 본 실험 결과보다 높은 DPPH 자유 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이는 실험에 사용한 연잎 시료의 재배지역, 수확시기, 품종, 건조 방법, 추출 용매 및 추출방법에 기인한 것으로 판단된다. 이 같은 결과로 보아 연잎은 우수한 free radical 소거 활성이 있음을 확인하였다.

Table 15. DPPH radical scavenging activity of lotus leaves

Sample ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH radical scavenging activity (%)
10	2.31
50	22.99
100	42.01
250	79.76

3) Ferric reducing antioxidant power

FRAP assay는 측정하려는 시료나 추출물의 화합물에 함유되어 있는 환원제(antioxidant)에 의해 Fe^{3+} (Ferric ion)을 Fe^{2+} (Ferrous ion) 형태로 환원시키는 능력을 측정하는 방법으로 항산화제라는 전자 공여체로 인해 산화된 중간산물을 안정한 형태로 환원시킴으로써 산화 연쇄반응을 종결시켜 환원력을 측정하는 2차적인 항산화 측정법이다(Tachakittirungrod et al, 2007).

본 연구에서는 지용성인 trolox를 표준물질로하여 연잎의 ferric의 소거능을 표준곡선에 준해 환산하여 항산화 능력을 검사하였다. 그 결과 Table 16과 같이 추출물의 농도에 따라 항산화능이 0.05 ~ 0.59 mM/mL로

농도에 비례하여 증가함을 보였다. 손기봉(2007)의 연구에서도 백연잎과 홍련잎 부탄올 분획물 1mg/mL의 농도에서 3.99, 3.85nm의 O.D값을 나타내어 본 연구와 같이 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

일반적으로 널리 사용되고 있는 BHA(butylated hydroxyl anisol), BHT(butylated hydroxyl toluene)와 같은 페놀계 합성 항산화제는 그 효과와 경제성, 그리고 안정성 때문에 많이 사용해 왔지만 과량 사용시 독성을 유발할 뿐 아니라 합성 첨가물의 기피 현상으로 인해 안전한 대체 항산화제의 개발이 요구되고 있다. 위와 같은 결과로 보아 연잎 추출물은 인체에 안전한 천연 대체 항산화제로서의 활용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 16. Ferric reducing antioxidant power of lotus leaves

Sample ($\mu\text{g/mL}$)	Fe^{2+} mM
10	0.05
50	0.14
100	0.24
250	0.59

4) ABTS scavenging activity

ABTS⁺ 소거활성은 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid ; ABTS⁺)의 색을 띤 양이온 라디칼이 추출물내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것에 근거하여 항산화능을 측정하는 방법으로 항산화 활성을 검증 하고자 하는 시료와 같은 효과를 내는 수용성 비타민 E의 유사물인 trolox의 총량(mM)으로 항산화능을 비교하여 측정하였다. ABTS 라디칼 소거능 활성은 Table 17 과 같이 시료의 농도에 비례하여 활성이 증가하여 250 μ g/ml 농도에서 46.31%로 나타났다.

선행 연구에서 Chen(2007) 등은 열수 추출한 품종별 구아바 잎의 총 페놀 함량과 ABTS 분석간의 고도로 높은 정의 상관 관계를 보고하였으며, Tachakittirungrod(2007) 등의 연구에서도 구아바잎 95% ethanol 추출물의 총 페놀 함량과 DPPH 자유 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, FRAP 분석간의 상관관계를 확인한 결과 고도로 높은 정의 상관 관계가 있다고 보고하였다. 부희옥(2009) 등의 연구에서도 동양 각국에 자생 또는 재배하는 여주를 대상으로 한 실험에서 ABTS 양이온 소거 활성과 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 유의한 상관관계가 있다고 보고하였다.

본 실험에서도 연잎 시료의 농도가 증가 함에 따라 총 폴리 페놀의 함량이 증가 하였으며, DPPH 자유 라디칼 소거능, FRAP 분석, ABTS 라디칼 소거 활성 또한 증가하는 결과를 보였다. 이는 페놀 화합물이 환원제, 수소 공여제, singlet oxygen 제거제 등 다양한 종류의 항산화제 역할을 한다는 이진실(2009) 등의 선행 연구들의 결과를 뒷받침 하는 유사한 결과로서 이상의 모든 항산화 활성이 나타난 것은 페놀함량과 양의 상관관계가 있는 것으로 판단된다.

Table 17. ABTS scavenging activity of lotus leaves

Sample ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ABTS radical scavenging activity (%)
10	-0.597
50	7.050
100	17.462
250	46.312

5) β -Carotene bleaching

β -carotene bleaching assay는 β -carotene의 황색이 lipid peroxy radical의 첨가에 의하여 탈색 되는 것을 측정하는 방법이다. β -carotene 용액이 시간이 지남에 따라 탈색되어 흡광도가 감소하고, 각각의 시료에 따라 다른 탈색 정도를 나타내 β -carotene의 산화를 억제하는 정도에 의해 시료의 항산화능을 평가하는 방법이다.

연잎 추출물의 β -carotene bleaching 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군의 β -carotene 용액은 시간이 흐름에 따라 탈색이 심해져 흡광도 값이 감소하였으며, 연잎 추출물 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 대조군과 유사한 흡광도의 감소를 보여 항산화능을 보이지 않았으나 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 대조군에 비하여 흡광도가 감소하는 것으로 보아

연잎 추출물은 항산화 기전 중 lipid peroxy radical의 억제능이 있음을 확인할 수 있었다. 항산화제의 사용은 피부노화 방지와 함께 여드름 피부의 염증 관리나 상처 부위의 재생 과정에서 중요한 역할을 한다. 그러므로 여드름 피부용 화장품에 항균, 항염 효과와 동시에 항산화 활성을 가진 성분을 첨가한다면 효과적인 여드름 관리를 할 수 있을 것이라 사료된다. 본 연구의 항산화 실험들의 결과로 보아 여드름 관리용 화장품에 연잎 추출물을 첨가한다면 활성산소종과 관련된 염증반응 및 여드름 상처 치유를 위한 재생 작용에 우수한 효과를 나타낼 것이다.

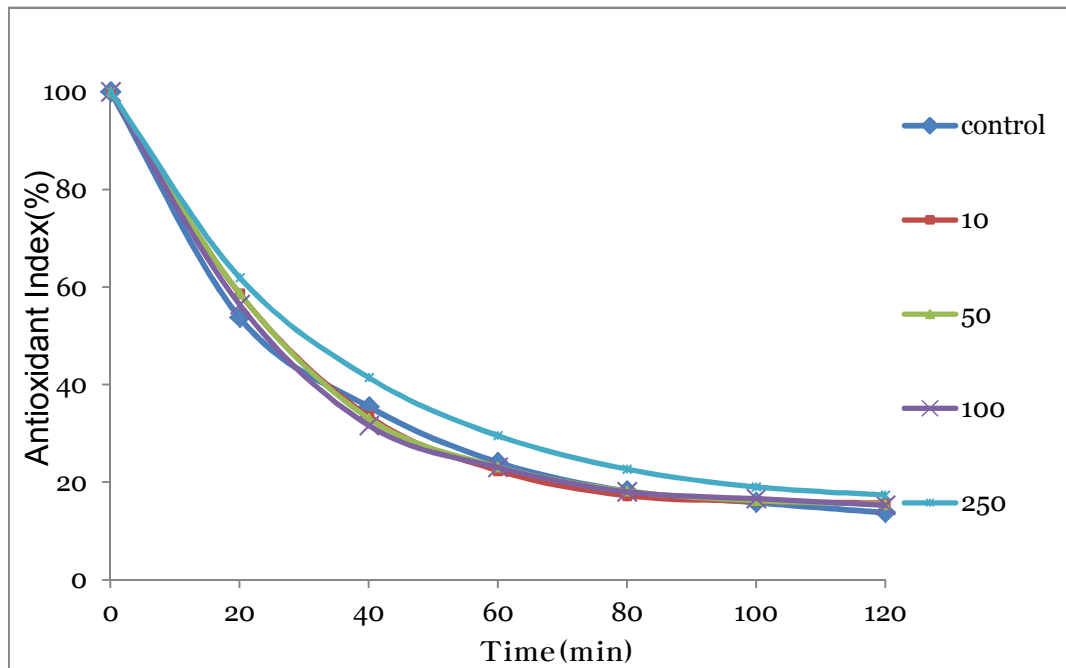


Figure 1. β -Carotene bleaching of lotus leaves

(3) MTT assay

연잎 추출물을 첨가한 화장품이 인체에 안전한 소재임을 평가하기 위하여 RAW 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay로 평가하였다. 7.81 ~ 500 μ g/mL 농도의 연잎 추출물로 세포 생존율을 평가한 결과 모든 농도에서 95.9% 이상의 생존율을 보였으며 세포독성은 나타나지 않았다.

Table 18. Effect of ethanol extract lotus leaves on the cell viability of RAW 264.7 cells

Concentration (μ g/mL)	Cell Viability (% of control)
control	100
7.81	95.89 \pm 1.47
15.63	96.50 \pm 1.07
31.25	96.76 \pm 0.84
62.50	97.08 \pm 1.40
125.00	97.15 \pm 1.08
250.00	97.13 \pm 0.61
500.00	97.24 \pm 0.95

(4) 항염 활성

1) Nitric oxide 저해능

염증은 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중 자극성 물질에 대한 생체 방어 반응이다. 염증 반응은 자극이 가해지면 histamine, prostaglandin(PG), serotonin과 같은 혈관 활성 물질에 의해 혈관투과성이 증가되어 염증을 유발하고, cytokines, free radical, lysosomal enzyme 등 다양한 매개 물질이 관여한다. 이 과정에서 대식세포와 같은 염증세포들이 활성화 되면서 NO와 PG, IL-1 β 와 TNF- α 등의 다양한 염증 매개 인자를 분비하게 된다(전명순 등, 2009). NO는 박테리아를 죽이거나 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다. 그러나 과도하게 생성된 NO는 염증을 유발시켜 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생성을 촉진하여 염증을 악화시킨다.

본 연구에서 LPS로 유도된 RAW 264.7 cell에서 NO 생성량은 대조구의 약 6.5배 증가하였다. 연잎 추출물 10, 25, 50 μ g/mL를 농도별로 첨가함에 따라 NO 생성 억제능은 51.61%, 63.15%, 60.90%로 모든 농도에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나 농도의존성은 관찰되지 않았다 ($P < 0.0001$).

전도산의 NO 생성 저해능을 측정한 선행 연구에서 20 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL의 농도에서 5.8%, 29.5%, 58.8%로 나타났으며(최관호, 2007), 상백피 500 μ g/mL의 농도에서 열수추출물 43.5%, 에탄올 추출물은 53.0%의 NO 생성 저해능을 보였다(지선옥, 2009). 오이풀 에탄올 추출물 10, 20, 50, 100 μ g/mL 농도에서의 NO 생성량은 20.6 μ m/mL, 18.7 μ m/mL, 15.0 μ m/mL, 12.5 μ m/mL로 나타났다(유민정 등, 2011). 또한 김선일(2011)의 연구에서 연잎 추출물 0.125 mg/mL의 농도에서 48.9%의 NO

생성 저해능을 보였으며, 대조구인 BHA에서는 0.5 mg/mL의 농도에서 49.2%의 NO 소거능을 보였다. 이처럼 연잎 추출물은 다른 식물추출물들과 비교하여 우수한 NO 소거활성을 보여 여드름 피부관리 시 항염 작용을 하는 화장품 소재로서 활용가능성을 확인할 수 있었다.

Table 19. Effect of ethanol extract of lotus leaves on NO production

Sample ($\mu\text{g/mL}$)	NO inhibition (% of control)	P value	
Control	100	-	
LPS (0.5 $\mu\text{g/mL}$)	0	-	
10	51.61 \pm 13.48	0.0004	
Sample ($\mu\text{g/mL}$)	25	63.15 \pm 4.48	0.0049
50	60.90 \pm 6.01	0.0031	

2) Cyclooxygenase(COX)-2 저해능

Cyclooxygenase 는 arachidonic acid로부터 eicosanoids의 일종인 prostaglandine과 leukotrienes의 생합성을 매개하는 효소로써 염증 반응에 주도적 역할을 한다. COX는 COX-1과 COX-2로 분류되며 COX-1은 혈소판의 형성, 위벽보호, 신장기능의 유지 등 정상적인 생체기능에 작용한다. COX-2는 염증반응 부위에서 활성화된 대식세포에 의해 염증 반응을 매개하는 PG 합성에 관여한다(Yi et al, 2008, Weisz et al, 1996). 여러 PG 중 염증과 관련이 깊은 것은 PGE₂, PGI₂, thromboxane 등이다. 이 중 염증 초기 단계에 작용하는 PGE₂가 가장 핵심적이다. 다수의 염증 억제 약물들의 작용기전은 PG 합성 억제와 관련하며 이는 COX-2의 생성 및 활성 억제에 의한 것이다. PGE₂는 COX-2에 의해 생성 되며 주로 비만세포나 대식세포에 의해 분비된다. 또한 염증 부위의 부종, 통증, 감각 과민을 초래하는 histamine, NO 등과 더불어 혈관 투과성을 증가시켜 백혈구의 염증 부위로의 화학 주성을 증가시킨다.

연잎 추출물의 염증 유발 매개체인 PGE₂의 생성 억제 효능 평가에서 LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포의 PGE₂ 생합성이 473.3 pg/ml로 약 6.5배 가량 급격히 증가하였다. 여기에 연잎 추출물을 농도별로 가하고 PGE₂ 생성 억제량을 측정한 결과는 Table 20과 같다. 연잎 추출물 25 μg/mL의 농도에서 62.7%, 50 μg/mL의 농도에서 68%로 LPS에 의한 PGE₂ 생성 증가를 유의하게 억제시켰다(P<0.0001). 그러나 농도 의존성은 보이지 않았다. 과량의 NO는 COX의 활성을 촉진시켜 PG 등의 합성을 유도하여 염증 반응을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 연잎 추출물의 PGE₂ 생성 저해는 NO 생성을 저해함으로써 COX의 활성을 억제시킨 결과로 사료되며, COX의 발현 및 활성에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

Table 20. Effects of ethanol extract of lotus leaves on cyclooxygenase-2 activity in RAW 264.7 cells

Sample		PGE ₂ Inhibition (% of control)	P value
Control		100	-
LPS (0.5 µg/ml)		0	-
Sample	25	62.70 ± 4.26	0.0022
(µg/mL)	50	68.00 ± 3.42	0.0040

4) IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현 평가

(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)

IL-1, IL-6 및 TNF- α 는 염증 부위에 높은 농도로 존재하는 염증성 cytokine이다. 최근 TNF- α 를 억제하면 IL-1, IL-6의 발생 또한 억제됨이 보고되어 염증과정의 핵심적인 cytokine으로서 TNF- α 를 차단하는 약물들이 염증의 치료제로 연구되고 있다.

연잎 추출물에 대한 염증성 cytokine IL-1 β 와 TNF- α 의 mRNA 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 RT-PCR을 시행한 결과 Fig. 2과 같이 연잎 추출물은 IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현에 영향을 주지 못하는 것으로 평가되었다. 따라서 추출물은 상기 염증매개인자와는 연관이 없었다.

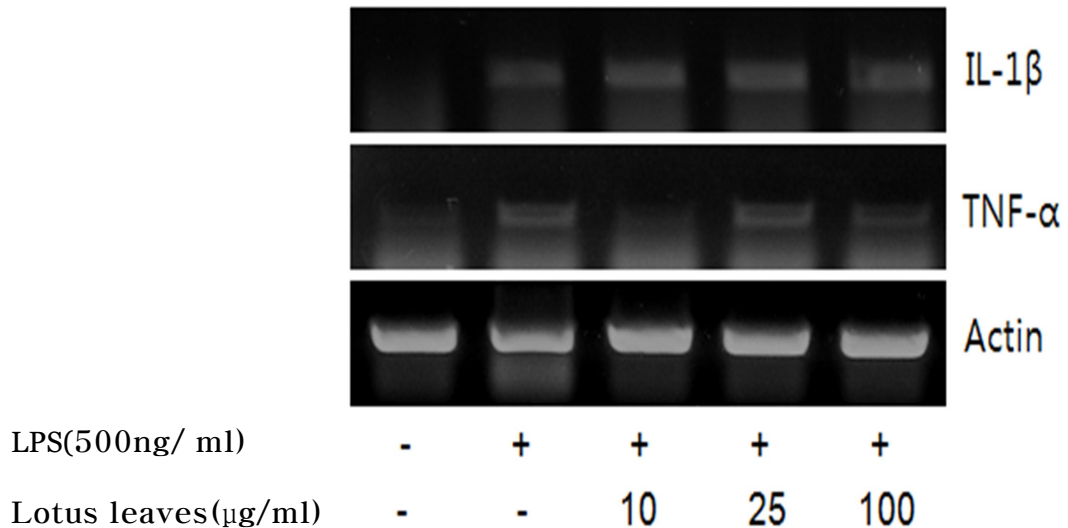


Figure 2. Effects of ethanol extract of lotus leaves on mRNA expression of IL-1 β and TNF- α

V. 결론

본 연구는 여드름 피부에 안전하고 부작용이 없는 화장품 소재로서 연잎 추출물의 사용 가능성을 제시하기 위한 목적으로 시행하였다. 연을 4부위로 나눠 연꽃, 연잎, 연씨, 연방을 70% ethanol로 추출하여 피부상재균 3종 (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*)에 대한 항균활성을 paper disc법으로 측정하였으며, 열과 pH 안정성을 고려하여 항균활성과 안정성이 가장 뛰어난 부위를 시료로 선정하였으며 추출용매의 농도를 정하였고 항산화, 항염 활성을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 연의 부위별 추출물을 Paper disc diffusion 법을 이용하여 항균성을 측정한 결과 4가지 시료 모두에서 피부상재균 3종에 대한 항균성을 나타냈으며 연꽃, 연잎, 연씨, 연방 순으로 항균활성이 높았다.
2. 연의 부위별 추출물의 농도를 1mg/disc로 하여 40, 80, 100, 120℃에서 1시간 동안 열처리 한 후 추출물의 열 안정성을 측정한 결과 연꽃, 연잎, 연씨, 연방 모두 열에 안정한 항균활성을 보였다. 또한 pH를 2, 5, 7, 9, 11로 조절하고 37℃에서 1시간 동안 방치하고 pH 7로 중화시킨 후, 안정성을 측정한 결과 연잎 추출물에서만 모든 pH에서 안정적인 항균성을 보였다. 따라서 4가지 시료 중 항균성과 안정성이 가장 뛰어난 연잎 추출물을 다음 실험에 이용하였다.
3. 가장 뛰어난 항균력을 보이는 추출용매 농도를 알기 위해 에탄올을 50, 70, 95%로 조정하고 연잎 추출물을 만들어 항균성을 측정한 결과 50% ethanol 추출물에서 가장 높은 항균활성을 보였다. MIC 측정 결과 S.

*aureus*에 대한 항균활성은 50% ethanol 추출물에서 250 μ g/ml로 가장 높게 나타났다. 따라서 이하의 실험에서는 50% ethanol 추출물을 시료로 사용하였다.

4. 연잎의 총 페놀 화합물의 함량은 연잎 추출물의 농도가 높아질수록 증가하였으며, 1 μ g/ml 당 약 0.3 μ g/ml의 페놀을 함유하고 있었다.

5. 연잎 추출물의 DPPH radical scavenging activity는 시료의 농도에 비례하여 증가하였으며, 250 μ g/ml의 농도에서 79.76%로 가장 높았다

연잎 추출물의 Ferric reducing antioxidant power는 0.05~0.59mM /mL으로 추출물의 농도에 비례하여 항산화능이 증가하였다.

ABTS scavenging activity 또한 시료의 농도에 비례하여 활성이 증가하였으며, 연잎 추출물 250 μ g/ml 농도에서 46.31%로 가장 높았다.

β -carotene bleaching assay는 연잎 추출물 10, 50, 100 μ g/mL 농도에서는 항산화능을 보이지 않았으나 250 μ g/mL의 농도에서는 활성이 나타나 항산화 기전 중 lipid peroxy radical의 억제능이 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 연잎은 항산화력이 뛰어난 물질임을 알 수 있었으며 이 기전은 lipid peroxy radical을 억제하는 것으로 생각되었다.

6. 연잎 추출물의 RAW 264.7 cell의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay로 평가한 결과 7.81~500 μ g/ml의 농도에서 95.9% 이상의 세포생존율을 보여 세포독성이 없음을 확인하였다.

7. 연잎 추출물의 Nitric oxide(NO) 생성 억제 효과를 RAW 264.7 cell을 이용하여 측정한 결과 시료에 lipopolysaccharide(LPS) 처리 시 NO 생성량이 약 6.5배 증가하였다. NO 억제 억제율은 연잎 추출물 10, 25,

50 μ g/mL의 농도에서 51.6%, 64%, 65%로 우수한 억제효능을 보였으나 나타나 농도의존성은 관찰되지 않았다.

염증을 유발하는 Prostaglandin E₂(PGE₂) 억제에 관여하는 효소인 Cyclooxygenase(COX)-2의 활성을 평가한 결과 연잎 추출물은 25 μ g/mL의 농도에서 62.7%, 50 μ g/mL의 농도에서 68.0%의 PGE₂ 생성 억제 효과를 보였다. 따라서 연잎 추출물은 항염증성이 우수한 것으로 확인되었다.

8. IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현 평가를 위한 PCR 실험 결과 연잎 추출물은 IL-1 β 와 TNF- α 유전자 발현에 영향을 주지 못하는 것으로 평가되었다.

위와 같이 연잎 추출물은 피부상재균에 대한 항균작용 및 항산화, 항염 활성을 보였다. 또한 세포독성이 없어 안전하기 때문에 피부에 부작용을 최소화 할 수 있는 여드름 관리를 위한 새로운 기능성 소재의 개발에 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

Reference

Abul KA, Andrew HL (2003) Cellular and Molecular Immunology. Saunders. 243-274

Ahn EY, Shin DW, Baek NI, Oh JA (1998) Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Korean J Food Sci Technol. 30 : 680-687

Ahn EY, Shin DW, Baek NI, Oh JA (1998) Isolation and identification of antimicrobial active substance from *Sophora flavescens* Ait. Korean J Food Sci Technol. 30 : 672-679

Akamatsu H, Horio T (1998) The possible role of reactive oxygen species generated by neutrophils in mediating acne inflammation. Dermatology. 196 : 82-85

Akamatsu H, Horio T, Hattori K (2003) Increased hydrogen peroxide generation by neutrophils from patients with acne inflammation. Int J Dermatol. 42(5) : 366-9

Amsterdam D(1996) Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. 50 : 52-111

Axtelle T, J Pribble (2001) IC14, a CD14 specific monoclonal antibody, is a potential treatment for patients with severe sepsis. J. Endotoxin Res. 7 : 310-314

Basal E, Kaushal GP, Agarwal SK (2002) Anti-inflammatory effects of erythromycin and tetracycline on *Propionibacterium acnes* induced production of chemotactic factors and reactive oxygen species by human neutrophils. Dermatol Online J. 8(2) : 2

Benzie IFF , Strain JJ (1996) Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a novel method for measuring total antioxidant power'. The Proceedings of the Nutrition Society. 56(1)111A

Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181 : 1199-1200

Borsch T, Barthlott (1983) Classification and distribution of the genus *Nelumbo adans* (*Nelumbonaccae*). Beitr Biol Pflazen 68 : 421-450

Brindha D, Arthi D (2010) Antiplatelet activity of white and pink *Nelumbo nucifera* Gaerth flowers. Pharm Sci. 46

Bull JJ, Muller-Rover S, Chronnell CM, Paus R, Philpott MP, McKay IA (2002) Contrasting expression patterns of CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors in the hair follicle and at different stages of the hair growth cycle. J Invest Dermatol. 118 : 17-24

Burkhart CN, Burkhart CG (2003) Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of acne vulgaris. Int J Dermatol. 42(12) : 925-932

Burkhart CG (2005) Acne biofilms, temperature and micro-environments. J Am Acad Dermatol. 52(1) : 182

Chen HY, Yen GC (2007) Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava(*Psidium guajava* L.) leaves. Food Chem. 101 : 686-694

Cho EJ, T Yokozawa, DY Rhyu, SC Kim, N Shibahara and JC Park (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Phytomedicine 10 : 544-551

Choi EH, Ahn SK, Lee SH (1997) The changes of stratum corneum interstices and calcium distribution of follicular epithelium of experimentally induced comedones(EIC) by oleic acid Exp Dermatol. 6 : 29-35

Dahlgren R, Rasmussen FN (1983) Monocotyledon evolution characters and phylogenetic estimation. J Evol Biol 16 : 255-265

Feibleman CE, Tasmusaen JE (1980) Gram negative acne. Cutis. 25 : 194

Feldman PL, Griffith OW, Sheuhr DJ (1993) The surprising life of nitric oxide. Chem Eng News. 26-38

Fimmel S, Zouboulis CC (2005) Influence of physiological androgen levels on wound healing and immune status in men. Aging Male. 8 : 166-174

Fritsch M, Orfanos CE, Zouboulis CC (2001) Sebocytes are the Key Regulators of Androgen Homeostasis in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 116 : 793-800

Furukawa H (1966) On the alkaloids of *Nelumbo nucifera* Gaertn, alkaloids of Loti Embryo. *Yakugaku Zasshi.* 86 : 75-77

GF Vile and RM Tyrrell (1995) Free radical biology & medicine. 18 : 721

Giovannini C, Scazzocchio B, Vari R, Santangelo C, D' Archivio M, Masella R (2007) Apoptosis in cancer and atherosclerosis : polyphenol activities. *Ann Ist Super Sanita.* 43(4) : 406-16

Golden BD and SB Abramson (1999) Selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Rheum Dis Clin North Am.* 25(2) : 359

Graham GM, Farrar MD, Cruse-Sawyer JE, Ilolland KT, Ingham E (2004) Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium* and *P. acnes* GroEL. *Br J Dermatol.* 150(3) : 421-428

Grange PA, Chereau C, Raingeaud J, Nicco C, Weill B, Dupin N, Batteux F (2009) Production of superoxide anions by keratinocytes initiates *P. acnes* - induced inflammation of the skin. *PLoS Pathog.* 5(7) : 1-14

Guo LY, TM Hung, KH Bae, EM Shin, HY, Zhou, YN Hnog, SS Kang, HP Kim, YS Kim (2008) Anti-inflammatory effects of

schisandrin isolated from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill.
Eur. J Pharmacol. 591: 293-299

Gutfinger T (1981) Polyphenol in olive oils. J Aocs 58 : 966-972

HY Lin, YH Kuo, YL Lin, Wenchang Chiang (2009) Antioxidative Effect and Active Components from Leaves of Lotus (*Nelumbo nucifera*). J Agric Food Chem. 57 : 6623-6629

Hanley K, Rassner U, Jiang Y et al (1996) Hormonal basis for the gender difference in epidermal barrier formation in the fetal rat. J Clin Invest. 97(11) : 2576-2584

Higuchi M, N Hisgahi, H Taki, T Osawa (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J Immunol. 144 : 1425-1431

Holleran WM, Feingold KR, Mao-Qiang M, et al (1991) Regulation of epidermal spingolipid synthesis by permeability barrier function. J Lipid Res. 32 : 1151-1158

Holland KT, Ingham E and Cunliffe WJ (1981) A review : the microbiology of acne. J Appl Bacteriol. 51 : 195

Jung BS, MK Shin (1998) Hyang-yak jipseongbang. p. 514-517. Younglim Book centre

Kashiwada Y, A Aoshima, Y Ikeshiro, YP Chen, H Furukawa, M Itoigawa, T Fujioka, K Mihashi, LM Cosentino, SL Morrisnatschke,

and KH Lee (2005) Anti-HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera* and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* 13 : 443-448

Kearney JK, Harnby D and Gowland G et al (1984) The follicular distribution and abundance of resident bacteria on human skin. *J Gen Microbiol.* 130 : 797-801

Kersey P, Sussman M, Dahl M (1980) Delayed skin test reactivity to *Propionibacterium acnes* correlates with severity of inflammation in acne vulgaris. *Br Dermatol.* 103 : 651-655

Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H (2006) Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* Mar 1 ; 66(5) : 2500-2505

Kim CM, MK Shin, KS Lee, DK An (1999) *JoongYakDaSaJeon* [10th]. JungDam publishes. Seoul Korea. p. 4623

Kim IH (1981) *Drug phytology*. Jinmyyong publishing Inc. Seoul Korea. p. 152, 440.

Kim, HJ, Cha, JY Choi, ML, Cho, YS (2000) Anti-oxidative activities by water soluble extracts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J.Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43 : 148-152

Kim HJ (2010) Antimicrobial activity and bactericidal potency of *Galla rhois* Extracts. Keimyung University master thesis

Knowles RG, Moncada S (1992) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS*. 17 : 399-402

Kumar R, Singh M (1984) Tannins : Their adverse role in ruminant nutrition. *J Agric Food Chem*. 32 : 447

Knor T (2005) The pathogenesis of acne. *Acta Dermatovenerol Croat*. 13(1) : 44-49

Kuenzli S, Saurat JH (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br J Dermatol*. 149 : 229-236

Lazarov S, M Balutsov, E Ianev (2000) The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock. *Vutr Boles*. 32 : 33-40

Lee ES, HK Ju, TC Moon, E Lee, Y Jahng, SH Lee, JK Son, SH Baek, HW Chang (2004) Inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) production by propenone compound through blockade of nuclear factor (NF)- κ B activation in cultured murine macrophages. *Biol Pharm Bull*. 27 : 617-620

Lee BW, Kang NS, Park KH (2004) Isolation of antibacterial prenylated flavonoids from *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 47 : 270-273

Lee JS. AND Jeong SS (2009) Quality characteristics of cookies prepared with button mushroom (*Agaricus bisporus*) powder. *Korean J Food Cookery Sci*. 25(1) : 98-105

Lee KS, MG Kim and KY Lee (2006) Antioxidative activity of ethanol extract from lotus(*Nelumbo nucifera*)leaf. J Kor Soc Food Sci Nutr. 35 : 182-186

Lowy FD (2000) Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? Trends microbial. 8 : 341-343

Lobo RA (1991) Androgen excess. In Mishell DR Jr. Davajan V, Lobo RA [eds]: Infertility, Contraception and Reproductive Endocrinology, 3rd ed. Cambridge, MA, Blackwell Scientific

Mah N, Stoehr H, Schulz HL, White K, Weber BH (2001) Identification of a novel retina-specific gene located in a subtelomeric region with polymorphic distribution among multiple human chromosomes Biochim Biophys Acta. 1522(3) : 167-241

Melich ME (1982) Staphylococci and the skin. Semin Dermatol. 1 : 101

Mattaus B (2002) Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. J. Agric. Food Chem. 50:3444-3452

Moon TC, Murakami M, Ashraf MD, Kudo I, Chang HW (1998) Regulation of cyclooxygenase-2 and endogenous cytokine expression by bacterial lipopolysaccharide that acts in synergy with c-kit ligand and Fc epsilon receptor I crosslinking in cultured mast cells. Cell Immunol. 185 : 146-152

Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329 : 2002-2012

Mu MM, D Chakravortty, T Sugiyama, N Koide, K Takagashi, I Mori, T Yoshida, T Yokochi (2001) The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res.* 7 : 431-438

Mingyu Li, Zhuting Xu (2008) Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Arch Pharm Res.* 31(5) : 640-644

Onoa Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y (2006) Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extracts in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 106 : 238-244

Ottaviani M, Alestas T, Flori E, Mastrofrancesco A, Zouboulis CC, Picardo M (2006) Peroxidated squalene induces the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes: a possible role in acne vulgaris. *J Invest Dermatol.* 126(11) : 2430-2437

Peter G, AL. Smith (1977) Group a *streptococcal* infections of the skin and pharynx *N Engl J Med.* 297-311

Posadas, I, MC Terencio, I Guilln, ML Ferrndiz, J Coloma, M Pay, and MJ Alcaraz (2000) Coregulation between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunun-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 361 : 98-106

Rosignoli C, Nicolas JC, Jomard A, Michel S (2003) Involvement of the SREBP pathway in the mode of action of androgens in sebaceous glands in vivo. *Exp Dermatol.* 12 : 480-489

Rosenfield RL, Deplwski D, Kentsis A, Ciletti N (1998) Mechanisms of androgen induction of sebocyte differentiation. *Dermatology.* 196 : 43-46

Rosenfield R (1999) Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 28 : 265-293

Ryu JH, H Anh, JY Kim, YK Kim (2003) Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytother. Res.* 17 : 485-489

Scott MG, RE Hancock (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* 20 : 407-431

Scholzen T, Armstrong CA, Bunnnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC (1998) Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exy Dermatol.* 7 : 81-96

Shin MK, Han SH (2006) Effects of lotus(*Nelumbo nucifera* Gertn) leaf powder on lipid concentration in rats fed high fat diet rats. *Kor. J. Food culture.* 21(2) : 202-208

Shim CJ, Lee GH, Yi SD, Kim YH, Oh MJ (2004) Isolation and identification of antimicrobial active substances from *Rhodiola sachlinensis*. Korean J Food Preservation 11 : 63-70

Smolinsk KN and Yan AC (2004) Acne update. Dermatology. 16 : 385-391

Soh HY, Kin YS, Kum EJ, Kwon YS, Son KH (2006) Screening of anti-acne activity of natural products *Propionibacterium acnes*. Kor J Microbiol. Biotechnol. 34(3) : 265-337

Stokes KY, Cooper D, Taylor A, Granger DN (2002) Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. Free Radical Biol. Med. 33 : 1026-1036

Szczeklik W, Szczeklik A, Sanak M (2005) Association of COX-2 gene haplotypes with prostaglandin production in bronchial asthma. J Allergy Clin Immunol. 116(1) : 221-223

Tachakittirungrod S, Okonogi S and Chowwanapoonpohn S (2007) Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand : Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. Food Chem. 103(2) : 381-388

Thiboutot D, Harris G, Iles V et al (1995) Activity of the type 1 5 alpha-reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. J Invest Dermatol. 105 : 209-214

Thiboutot DM, Knaggs H, Gilliland K, Hagari S (1997) Activity of type 1 5 alpha-reductase is greater in the follicular infundibulum compared with the epidermis. Br J Dermatol. 136 : 166-171

Vile G.F. and RM Tyrrell (1995) Free radical biology & medicine. 18: 721

Vowels BR, Yang S, Leyden JJ (1995) Induction of proinflammatory cytokines by a soluble factor of *Propionibacterium acnes* : implications for chronic inflammatory acne. Infect Immun. 63(8) : 3158-3165

Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. P Natl Acad Sci USA. 96 : 7563-7568

Weisz A, Cicatiello L, and Esumi H (1996) Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. Biochem J. 316 : 209-215

Xie Bin, Wan Jin, Wang Wenqing, Shi Chunyang, Hou Xiaolong and Fang Jianguo (2011) *Nelumbo nucifera* alkaloid inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation and improves high-fat diet-induced obesity and body fat accumulation in rats. Journal of Medicinal Plants Research. 5(10) : 2021-2028

Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Choi JW, Jung JH, Park SD. (2008) Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Draconis Resina in macrophage cells. *Kor J Herbology*. 23 : 179-192

Yoshizawa S, Horiuchi T, Yoshida T and Okuda T (1987) Anti-tumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of tannin in green tea. *Phytother. Res.* 1 : 44-47

Yuk CS (1990) Coloured medicinal plants of korea. Academy book Co Seoul Korea. 219-230

Yun SJ (2007) Quality characteristic of Sulgitteok added Lotus leaf powder. *Korean J Food Cookery Sci.* 23 : 433-442

Zaika IL (1988) Spices and herbs : Their antimicrobial activity and it's determination. *J Food Safety* 9 : 97-102

Zouboulis CC. (2004) Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol.* 22(5) : 360-366

고병섭, 전동화, 장진선, 김주호, 박선민 (2006) In vitro 에서 조릿대, 연근과 연잎이 인슐린 작용 및 분비에 미치는 영향. *한국식품과학회지*. 38 : 114-120

김금숙, 신미경, 김현영 (2008) 백련(白蓮) 잎의 영양 성분 및 항산화 활성. *J East Asian Soc Dietary Life.* 18(4) : 499-506

김경범, 이유진, 채옥희, 송창호, 정종문 (2007) 식물추출 복합물 (PEM381)의 제 I 형 알레르기 반응 억제 효과. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 36(2) : 155~162

김선일 (2011) 연잎 추출물의 항산화 활성 및 암세포 사멸 효과. 단국대학교 석사학위논문

김성빈, 노승배, 류동영, 김동욱 (2005) 고지혈증 및 동배경화 감응 Bio F1B 햄스터에서 연잎(*Nelumbo nucifera*)의 지질저하 효과, 생약학회지. 36 : 229-234

김창민(1998) 중약대사전. 정담. 서울. p. 4623-4624

김천현, 신미경, 김현영, 김금숙 (2008) 식중독 세균에 대한 연잎 추출물의 항균 작용 동아시아식생활학회 발표논문집. p. 82

김현숙 (2011) 마누카 오일의 항균활성과 여드름 개선 효과. 건국대학교대학원. 석사학위논문

박운점, 박용서, 임명희, 김현주, 안정숙, 조자용, 허복구 (2008) 백련 4종의 꽃과 잎 추출물의 항균활성. 생명자원과학연구. 30(2) : 25-34

박찬흠, 허종문, 송경식, 박종철 (2007) 연잎에서 DPPH 라디칼 소거활성을 가지는 페놀성 화합물의 분리. 생약학회지. 38(3) : 263-269

부희옥, 이현화, 이장원, 황성진, 박상언 (2009) 여주 품종별 폴리페놀, 플라보노이드 함량과 라디칼 소거활성 및 아질산염 소거능. 한국약용작물학회지. 17(1) : 15-20

손기봉 (2007) 백련과 홍련의 화학성분 및 생리활성. 경상대학교대학원 석사학위논문

안성구, 천승현, 황상민, 박하나, 홍승필, 이상훈, 전병언, 설근동 (2009) 여드름의 치료와 케어. 가분의학. 서울. 14-17

양응모, 김향미, 장문석, 박완수, 김원남, 김산용, 최동기, 이학철, 김윤경, 박성규 (2006) 연잎 에탄올 추출물이 피부 주름에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지. 14 : 67-75

오창석 (2007) 연잎 추출물로부터 항산화 · 항균효과 물질의 분리 및 동정. 호서대학교대학원 석사학위논문

유민정, 임요섭, 최다인, 이숙영 (2011) 오이풀 추출물의 비듬균에 대한 항진균 효과 및 RAW 264.7 세포에서의 항염증 효과. 한국미용학회지. 17(2) : 225-232

이경석, 김민규, 이기영 (2006) 연잎 에탄올 추출물의 항산화 효과. 한국식품영양과학회지. 35(2) : 182-186

이경석 (2009) 연잎 추출물의 생리활성 및 유효성분의 분리. 호서대학교 대학원 박사학위논문.

이은수, 한영숙 (2011) 구강위생균에 대한 연의 부위별 · 용매별 항균활성. 한국식품조리학회지. 27(1) : 1-9

이지영, 이영종, 박완수 (2010) 발효 어성초 물추출물의 마우스 대식세포 항염 활성 연구. Kor. J. Herbology. 25(3) : 27-34

이진영, 유미라, 안봉전 (2010) 백련(*Nelumbo nucifera* G.) 추출물 및 화장품에 첨가 시 생리활성 비교. 생명과학회지. 20(8) : 1241-1248

이창복 (1993) 대한식물도감. 향문사. 서울. 339-340

임명희 (2011) 무안산 백련의 생육특성 및 주요 영양성분에 관한 연구. 목포대학교대학원. 박사학위논문

임진아, 이은숙, 백승화 (2008) 연잎 에탄올 추출물의 항산화 효과 및 아질산염 소거능. 동의생리병리학회지. 22(3) : 654-659

장문석, 김향미, 양웅모, 김도림, 박은화, 고은빛, 최문정, 김휴영, 오지훈, 김경준, 윤지원, 박성규 (2007) 연잎, 연꽃 및 연꽃 수술 추출물의 Tyrosinase 활성억제 및 Melanin 생성억제에 의한 미백효과. 대한분초학회지. 22 : 87-94

장문석, 고은빛, 이호진, 김주성, 김진수, 지성원, 김휴영, 염명훈, 김덕희, 김한곤 (2011) 연잎, 연꽃, 연수 추출물이 UVB 자외선 조사에 의한 각질형성 세포의 보호 및 피부 노화방지에 미치는 영향. 대한분초학회지. 26 : 45-49

전명순, 윤태숙, 최고야, 김승주, 이아영, 문병철, 추병길, 김호경 (2009) 마우스 RAW 264.7 세포에 대한 4종 대황류 추출물의 항염증 활성비교. 한국약용식물학회지. 17(2) : 109-114

조현영 (2005) 동의보감. 여강출판사

지선옥 (2009) 상백피 추출물의 항산화 활성 및 미백효과. Korean J Plant Res. 22(2) : 145-151

최관호 (2007) 전도산이 여드름 유발균과 염증에 미치는 영향. 상지대학교 대학원 박사학위논문

최선주, 김소영, 정윤주, 구창섭, 하병집, 채희정 (2011) 연잎 추출물을 함유한 화장품의 안정성 평가. 한국생물공학회. 26 : 83-86

최혜연 (2009) Nelumbo nucifera Gaertner 추출물의 항산화 기능성 평가. 동국대대학원 석사학위논문

황은성 (2007) 한약 추출물의 라디칼 소거능과 치주질환 항미생물 효과 및
연잎의 활성 플라본 화합물 분리. 순천대학교 석사학위논문

Abstract

A Study on Lotus Leaf Extracts' Antioxidation, Anti-Inflammation and Antimicrobial Activity Against Resident Skin Flora

Lee, Sun-Sook

Department of Food & Nutrition,

The Graduate School,

Sungshin Women' s University

This study was conducted with the purpose of proposing a utilization possibility of lotus leaf extracts as cosmetics ingredients that are safe, with no side effects, for the acne-prone skins. Lotus flower, lotus leaf, lotus seed and lotus bulb, the four parts of the lotus, were extracted by using a 70% ethanol, and antimicrobial activation for the 3 species of resident skin flora *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* was measured using paper discs and MIC and, while taking into consideration the heat and pH stability, lotus leaf extracts with the most outstanding antimicrobial activity and stability were selected as samples. We also evaluated antioxidant and anti-inflammatory activity and the results are as follows.

1. In all of the 4 types of samples that used lotus extracts from different parts of lotus and with which antimicrobial property was measured, all 3 species of resident skin flora displayed excellent antimicrobial property. And the order of excellence was lotus flower, followed by lotus leaf, lotus seed and lotus bulb.

2. By setting the concentration levels of the extracts from different parts of lotus plant to 1 mg/disc, the heat stability of strains was measured after heat treating them at 40 °C, 80 °C, 100 °C and 120 °C for 1 hour. The result showed that lotus flower, lotus leaf, lotus seed and lotus bulb all displayed antimicrobial activity that was stable under heat. By setting the concentration levels of each of the sample types to 1 mg/disc, pH levels were adjusted to 2, 5, 7, 9 and 11 and each sample type was allowed to stand for 1 hour at 37 °C, and afterwards they were neutralized to pH 7 and their stability was measured: the result showed that only the lotus leaf extract sample displayed stable antimicrobial property at all pH levels. Based on these results, among the four samples lotus leaf extract with the most outstanding antimicrobial property and stability was selected as a sample for a next experiment.

3. By extracting from lotus leaf using 50%, 70% and 95% ethanol, the antimicrobial property of the extracts was measured and the result showed that antimicrobial activity was the highest in 50% ethanol extracts. In addition, MIC results showed antimicrobial

activity of *S. aureus* was the highest, 250 μ g/mL in the 50% ethanol extract. So the 50% ethanol extract was used as a sample in the following experiments.

4. It was observed that the total content of phenolic compounds increased as the concentration level of lotus leaf extract increased. 1 μ g/ml of extract includes 0.3 μ g/ml of phenol.

5. The DPPH radical scavenging activity of the lotus leaf extract increased proportionally with the concentration level of the sample, and it was the highest at a concentration level of 250 μ g/ml with 79.76%.

The ferric reducing antioxidant power of the lotus leaf extract -- in accordance with the concentration level of the extract in a manner dependent on the concentration level -- was 0.05 ~ 0.59mM/mL, whereby showing increases in antioxidant capacity.

ABTS scavenging activity showed increases in its activity in proportion with the concentration levels of the samples, and it showed 46.31% at 250 μ g/ml concentration.

The β -carotene bleaching assay did not show any antioxidant capacity when the lotus leaf extract concentration levels were 10 μ g/mL, 50 μ g/mL and 100 μ g/mL, however, in 250 μ g/mL it showed some activity; therefore, it was possible to confirm the inhibitory capability of lipid peroxy radical in the antioxidant mechanism.

Above results proved that the lotus leaf has excellent anti-oxidation effect which is expected to inhibit lipid peroxy radical.

6. As a result of the evaluation, by using MTT assay, of the effects exerted on the survival rate of RAW 264.7 cell in the lotus extract for the assessment of anti-inflammatory activity of lotus leaf, cytotoxicity did not appear.

7. By using RAW 264.7 cell, we measured the generation inhibitory effect of nitric oxide (NO) of the lotus leaf extract, and the result showed that, when the samples were treated with lipopolysaccharide(LPS), the creation of NO increased by about 6.5 times. In concentration levels of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the inhibitory effects were 51.6%, 64% and 65%, respectively, which is very sound. The dependence on concentration levels, however, was not observed.

In a result of evaluating the inhibitory effect of cyclooxygenase (COX)-2 which concerns the inhibition of prostaglandin E_2 (PGE_2) causing inflammation, the lotus leaf extract showed a PGE_2 generation inhibitory effect of approximately 67.3% and 71.2% at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration level, respectively. Therefore the lotus extracts proved to be excellent in anti-inflammatory effect.

8. In RT-PCR for the evaluation of IL-1 β and TNF- α gene expressions, the lotus leaf extract was evaluated to be not exerting any effect on the IL-1 β and TNF- α gene expressions.

As per the foregoing results, lotus leaf extracts were observed to have antimicrobial activity for resident skin flora and antioxidation and anti-inflammation activity. In addition, with no toxicity, they are safe to the human body and are deemed to be utilizable as the basic materials for the development of new functional ingredients for the management of skins that are susceptible to acne, with minimum side effects.