

커큐민과 대두 추출물의 RAW 264.7 대식세포에서의 항염증 효과 및 여드름 피부 개선효과에 관한 연구

유선희^a · 문지선^{b†}

건국대학교 생물공학과^a, 중원대학교 뷰티헬스학과^b
(2016년 5월 2일 접수; 2016년 5월 30일 수정; 2016년 6월 20일 채택)

Research regarding curcumin and soybean extract's influence on anti-inflammatory and acne and skin-repairing effect on RAW 264.7 macrophages

Seon-hee You^a · Ji-sun Moon^{b†}

^aDepartment of Bioengineering, Konkuk University,
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

^bDepartment of Beauty Health, Jungwon University, 85,
Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun, Chungbuk, 28024, Korea

(Received May 2, 2016; Revised May 30, 2016; Accepted June 20, 2016)

요약 : 울금의 주요 성분인 커큐민과 대두 추출물인 이소플라본의 피부 미용 측면에서 생리활성을 연구하여 화장품 소재로서 가능성 여부를 규명하고자 하였다. 본 연구는 세포실험을 통해 커큐민과 대두 추출물을 피부 세포에 대한 독성 및 항염증을 확인하고, HPLC을 이용하여 대두 추출물의 성분분석과 피부에 적용하였을 때 수분과 유분, 홍반변화를 측정하였다. 본 연구 결과 커큐민이 RAW 264.7 세포에 대한 독성이 적은 것으로 확인되었으며, 항염증에 대한 효과를 확인하였다. 8주 동안 커큐민과 대두 추출물이 함유된 화장품과 식이를 병행하여 사용하였을 때 수분함량 변화, 유분함량 변화, 홍반 지수의 감소가 통계적으로 유의미한 변화를 나타내었으며, 여드름 피부에 유의한 효과를 가질 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구는 커큐민과 대두 추출물이 화장품 소재로 사용 시 여드름 피부 개선에 효과적인 화장품 소재로서 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

주제어 : 여드름, 화장품, 항염증, 커큐민, 대두 추출물

Abstract : By studying bioactivity in the aspect of skin care via curcumin, the main component of turmeric, and isoflavones, the soybean extract, this research tried to prove the possibilities as cosmetic ingredients. This research identified the curcumin and soybean extract's anti-inflammatory

†Corresponding author
(E-mail:

and toxic effects on skin cells through cell experiment, and using HPLC, the moisture, oiliness, and changes in erythema were measured when the soybean extract was applied to the skin. The result showed that curcumin had the least toxin on RAW 264.7 cell and the anti-inflammatory effect was identified. There were statistically significant changes on the moisture, oiliness and erythema when cosmetics containing curcumin and soybean extract were used. Therefore, it showed the possibilities of the utilization of curcumin and soybean extract to be used as cosmetics for acne skin.

Keywords : Cosmetics, Acne, Soy bean extract, Anti-inflammatory, curcumin

1. 서론

피부는 자외선, 환경오염 등의 외적 요인과 연령의 증가, 정신적 스트레스 등의 내적 요인에 의해 진행되는 노화로 인하여 피부가 지닌 정상적인 기능이 저하된다. 더욱이 아토피, 건선과 더불어 3대 피부병 가운데 하나인 여드름 피부에 대한 관심이 점차 높아지고, 이에 따른 피부에 부작용 없이 안전하게 사용할 수 있는 천연 화장품 소재를 이용한 피부 장벽 기능 조절에 대한 관심이 점차 높아지고 있다[1].

여드름은 피부 과학적 용어로 심상성 좌창이라고 하는 모낭 피지선의 만성 염증성 질환으로 얼굴에 가장 큰 영향을 미치며 심한 경우 영구적인 흔적을 남길 수 있다. 이러한 여드름의 생성 원인은 크게 스트레스, 초조함, 불안 등의 심리적 요인(psychological elements), 자극성 물질에 대한 감각반응 등의 감각적 요인(sensual elements), 내분비계의 변동, 특히 androgen과 estrogen 분비의 증대가 피지선 기능 항진 또는 표피 각화를 촉진시켜 면포 형성을 하는 내분비 요인(hormonal elements), 모낭관 출구의 폐쇄에 의한 물리적요인(physical elements), 피부표면의 산성도(pH)의 차이로 발생하는 미생물 번식에 의한 화학적 요인(chemical elements), 모낭내에 상주하는 균 중에서 특히 Propionibacterium acnes(P. acnes)가 Triglyceride를 분해하여 free fatty acid를 형성하며 이것이 모낭을 자극하고 또 Chemotactic substance를 형성하여 염증세포의 침윤을 촉진하는 생리적 요인(physiological elements) 등을 들 수 있으며 이들 인자가 상호 복합적으로 작용하는 것으로 추적되지만, 가장 직접적인 요인으로 간주되는 것은 testosterone과 같은 남성 호르몬에 의해 피지선이 비대해서 피

지가 과잉 분비되고, 피부의 다양한 오염으로 인하여 모공이 막히면 1차적인 미세면포(Microcomedones)가 형성되고, 모공의 피지 내에 존재하는 여드름 유발 균주(Propionibacterium acnes)의 성장이 촉진되고 P. acne에서 분비하는 lipase에 의해 피지가 분해되어, free acid가 생성되어 이것이 모공벽을 자극하여 구진(papule), 농포(pustule), 낭종(cyst), 결절(nodule) 등의 염증이 발생됨으로써 여드름이 생성된다[2-5].

이소플라본은 주로 콩과류에 들어 있는 색소의 한 종류로 페놀계 화합물의 배당체로서 주요한 구성성분으로는 genistein과 daidzein, glycitein과 이들의 포도당 결합 유도체들이다. 이소플라본은 세포의 성장과 그 조절에 영향을 주어 암 방지 및 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [6-9]. 즉, 이소플라본은 여러 호르몬의 estrogen antagonist로 작용함으로써 여성들의 유방암, 골다공증의 예방 및 치료에 유효하며 이밖에 기타 암의 방지와 치료에 효과를 나타내며 daidzin은 뼈의 재흡수를 억제하고 genistein이 약한 estrogen활성을 발휘하여 노인과 여성의 골다공증 방지에도 효과적이라는 연구가 있으며, 또한 항산화 효과와 심혈관질환 및 심부전에서 genistein의 효용성에 대해 보고되고 있다[10-11].

이와 같이 이소플라본은 다양한 생리활성으로 콩의 품질에 중요한 요소로 인식되고 있으며 함유량에 대한 관심이 높아지면서 생리활성의 규명뿐만 아니라 이소플라본의 함량에 관한 연구가 많이 이루어지고 있지만[12], 이소플라본 섭취 수준과 관련한 연구에서도 아직까지 한국인의 이소플라본 섭취 수준에 관한 자료는 제한되어 있으며, 건강상의 유익한 효과를 얻기 위한 적정 섭취 및 유해 섭취 수준 등을 통한 적정 섭취 기준을 설정하기 위한 자료가 미비한 실정이며[13],

이소플라본의 보호 효과에 대해 일치하지 않는 부정적인 결과도 보고되어 이소플라본의 효과에 대한 다각도의 지속적인 연구가 요구되어 진다 [14-15]. 울금 뿌리와 줄기의 성분은 항산화와 세포보호 역할을 수행하는데 주성분은 커큐민과 그것의 유사물로서 알려져 있다[16]. 울금은 식품계에서 뿐만 아니라 생체계에서도 강한 항산화 활성을 가지며, 최근에는 생체계에서의 항산화 활성은 몇몇 과산화 관련 질환을 방어하는 것으로 주목을 받아왔다[17]. 최근 울금의 주요 성분인 커큐민과 그 유사 화학구조 성분들의 효능 때문에 항암 효능 효과가 우수한 것으로 보고되고 있으며[18-19], 한약재 자원의 부가가치가 높은 신약개발이나 식품산업에 있어서 매우 중요한 자원이 되고 있다. 그러나 커큐민의 약리적으로 활용되는데 가장 큰 장애는 바로 커큐민의 화학적 성질이 지닌 수용액에 대한 불용성이다. 이러한 커큐민의 불용성을 해결하기 위한 다양한 시도가 최근까지 484편의 보고서가 발표되었으며, 용해도를 현저히 증가시키고 다양한 약리학적 기능을 개선시킨 연구들이 보고되고 있다[20]. 현재까지 커큐민의 연구 보고로는 항산화, 항암, 항염증, 항바이러스, 혈중지질강하 작용과 소염 작용, 암세포 증식과 관련한 혈관신생 억제 작용, 콜레스테롤의 생합성에 관여하는 squalene synthase 억제 작용 및 간에 축적된 cholesterol 수치를 저하시켜 간 및 신경계에 효능을 나타내는 cefotaxime 효과[21-23] 등의 주로 건강 기능 소재로서 다양한 효과가 있는 것으로 알려져 있으나[24-25], 울금 추출물의 주요 성분인 커큐민과 대두 추출물을 함유한 화장품 소재로서의 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 커큐민의 피부 세포에 대한 독성 및 항염증 효과를 확인하고, 커큐민과 이소플라본을 함유한 제품을 통해 염증성 여드름 피부 개선 효능에 대한 연구를 수행하여 효과적인 여드름 화장품 소재로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 실험

2.1. in vitro 실험방법

2.1.1. 시료 준비 및 사용시약

본 실험에서 세포배양에서 사용한 커큐민은

Sigma Chemical (USA)에서 구입하여 -20°C 의 냉동고에서 보관하여 실험에 이용하였으며, 화장품 제형에 사용된 탈지대두박은 (주)신동방으로부터 제공 받아 -20°C 의 냉동고에 저장하면서 실험에 사용하였고, 이소플라본 함량 분석에 사용된 시약 genistein, genistin, daidzein, daidzin은 Sigma Chemical (USA)에서 구입하여 사용하였으며, HPLC용 methanol, acetic acid은 Baker (USA)사의 용매를 사용하였으며, 그 밖의 시약은 특급시약을 사용하였다.

2.1.2. 추출 및 분리

탈지대두 분말 50 g에 95% ethanol 500 mL를 가해서 상온에서 72시간 추출하여 9000 rpm, 15분간 원심분리 하여 상층액을 여과지(Whatman NO. 2)로 여과 감압 농축하여 동결 건조를 하였으며, 시료는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 membrane filter(0.22 μm)로 filtering하여 농도별로 희석한 후 본 실험에 사용하였다.

2.1.3. 세포주 및 세포 배양

실험에 사용한 세포주인 RAW 264.7(raw macrophage) 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 구입하여 사용하였으며, High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA)과 1% antibiotic-antimycotic (Sigma, USA)를 첨가하여 37°C 로 유지되는 5% CO_2 습윤 배양기에서 배양하였다.

2.1.4. HPLC를 이용한 대두 추출물 성분분석

탈지대두의 이소플라본은 HPLC (Waters Co, USA)를 사용하여 Wang 등의 방법을 수정 보완한 gradient solvent system으로 분석하였다. 분석 시 사용된 column은 Zorbax Eclipse C18 Reversed-Phase (4.6 mm \times 5 μm)을 사용하였고, Mobile phase은 시작 시 2% acetic acid in H^2O 100에서 시작하여 55분 후 100% acetonitrile solution이 100으로 마치며 detector와 column의 안정화를 가져오기 위하여 5분간 여유를 주었으며, flow rate는 0.5 mL/min이었고, injection volume은 1 μL 해주었으며, temperature은 25°C 로 하였다(Table 1).

Table 1. Analysis conditions of isoflavone for HPLC

Detector	DAD
Column	C ₁₈ (Reversed-Phase)
Mobile phase	2% acetic acid in H ₂ O : 100% acetonitrile solution
	92 : 8 - 10 : 90, Gradient
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	1 μ L
Temperature	25°C

2.1.5. Neutral red assay를 이용한 세포독성 측정

커큐민이 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 neutral red (NR) assay를 이용하여 측정하였다[26]. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well 당 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양기에서 부착시킨 후 시료를 0.1, 1, 5, 10, 50 μ g/mL의 농도로 희석하여 처리한 후 37°C에서 CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양한 세포 배양액을 NR solution (Sigma, USA)이 1% 포함된 무 혈청배지로 교환하여 3시간 동안 배양한 다음 현미경하에서 NR의 결정화 유무를 확인하였다. 세포고정액으로 10% formaldehyde 용액이 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100 mL로 20분간 처리하여 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 mL로 분주하여 세포 내의 NR을 추출하고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.1.6. Nitric oxide 생성능 측정

Green 등의[27] 방법에 따라 NO 생성 저해능을 측정하기 위해 세포 배양액내 NO양을 nitrite와 nitrate 형태로 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well당 5×10^4 cells/mL의 부유액에 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 LPS (1 μ g/mL) 처리된 무혈청 배지에 시료를 농도별로 희석하여 커큐민이 0.1, 1, 5, 10, 50 μ g/mL의 농도로 가하여 48시간 배양하였다. New plate에 배양된 세포 상층액 100 μ g에 griess reagent로 100 μ g를 가하여 차광된 상태에서 10분간 반응시키고 540 nm에서 흡광도를 측

정하였다.

2.1.7. 세포내 cytokine 생성 저해능 측정

세포배양액내 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 양을 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포를 6 well plate에 well당 1×10^6 로 분주하고 커큐민을 농도별로 가한 후 LPS 1 μ g/mL을 첨가하여 세포를 자극하였다. 배양액내 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 양은 ELISA kit (Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다.

2.2. in vivo 실험방법

2.2.1. 실험기간 및 대상

본 연구는 화장품 지침기분에 부합하여 자발적 참여 동의를 받은 서울 및 경기도 거주 20-30대 여성과 남성 30명을 연구 대상으로 하였으며, 총 8주간 진행하였다. 임상 실험 기간에는 연구 대상자가 평소가 사용하던 기초 화장품의 사용을 중지하고 본 실험제품만을 아침, 저녁 1일 2회 사용하도록 하여 임상 집단의 결과에 대한 변의를 최소화 하였으며 무작위로 두 군을 나누어 임상 실험을 하였다. 대조군 15명 실험군 15명으로 연구 시작 전 선정된 전체 시험 대상자들에게 임상 시험 참여 동의서 및 설문조사, 시험목적, 내용 및 준수사항, 피부측정, 화장품을 사용하는 방법 등을 설명하였다.

본 실험의 임상 대상자는 한국 식품의약 안전청의 기능성 화장품 지침에 따른 임상자 대상자의 기준에 부합되지 않은 사람을 제외하고 선정되었다.

2.2.2. 피부 자극도 시험

피험자의 상완의 안쪽에 0.5 mL의 각각의 커큐민과 이소플라본이 첨가된 화장품을 사용하고 대조군으로서 아무것도 처리하지 않는 첩포를 두었다. 방법은 각각의 피험자에 대해 finn chambers (Epitest®, Tuusula, Finland) 가 부착된 테이프를 사용하였으며, 테이프를 부착한 뒤 48시간 후 제거한 다음 1시간 후와 48시간 후에 육안으로 분석하였다. 판정기준은 국제 접촉 피부염 연구회의 판정기준으로 적용하였다(Table 2).

Table 2. A criterion of patch test

Signature	Criteria for judging
-	Negative
±	A slight erythema
+	Erythema, edema
++	Erythema, edema, papule, vesicle
+++	Big blister, necrosis

2.2.3. 피부측정 도구

2.2.3.1. 피부의 유분함량 측정

피부 표면의 유분량은 Skin visiometer (SV-600, Germany)를 이용해 유분량을 측정하였으며, corneofix 테이프를 피부표면에 올려놓고 5초간 눌러 묻어나온 각질을 특별한 광원을 조사하여 유분량에 대한 index을 측정하였다.

2.2.3.2. 피부의 각질함량 측정

피부 표면의 각질함량은 Skin visiometer (SV-600, Germany)를 이용해 각질층을 측정하고자 하는 부위에 corneofix 테이프를 피부표면에 올려놓고 5초간 눌러 묻어나온 각질을 특별한 광원을 조사하여 각질량에 대한 index을 측정하였다.

2.2.3.3. 피부의 홍반색소량 측정

여드름 피부의 색소침착과 여드름 흉터로 인한 색소침착정도를 파악하기위한 비 침습적 방법으로 피부표면의 Mexameter MX 18 (Courage-Khaza ka Electronic, Germany)는 narrow-band reflectance spectrophotometer로 probe에서 568 nm (green), 660 nm (red), 880 nm (infrared)의 빛을 방출해 피부에서 반사되는 빛을 측정하는 기구로서 홍반 색소량에 대하여 피부에 흡수되고

반사된 660 nm와 880 nm 빛이 강도를 계산해 melanin index 산출하였다. 측정 시 오차를 줄이기 위해 동일 시간대, 같은 장소, 동일 조명, 같은 자세로 측정하고 3번 측정 후 평균값을 가지고 계산하였다.

2.2.4. 측정 방법

본 연구에서 이소플라본은 탈지대두로부터 10배 부피의 ethanol로 추출한 후 동결 건조하여 사용하였으며, 커큐민은 (sigma, USA) 구입하여 사용하였다. 본 실험에서 사용한 여드름 개선제는 이소플라본 혹은 커큐민이 첨가된 제품으로 홈케어 전용으로 만들어진 CM 그룹은 커큐민이 0.01% 첨가되어 있고, CM+ISF 그룹은 커큐민이 0.01%와 이소플라본 0.5%가 첨가 되어있으며 (Table 3), CM+Oral CM 그룹은 커큐민 0.01%와 식이를 병행하였다. 대조군은 커큐민과 이소플라본을 제외하여 제조하였다. 8주간 실험방법은 대조군(커큐민, 이소플라본 무첨가 홈케어 토너 사용), CM그룹(커큐민 0.01%토너 사용), CM+ISF그룹(커큐민 0.01%+ 이소플라본 0.5%토너 사용), CM+oral CM그룹(커큐민 0.01% 토너와 커큐민 1.5 g/day 복용), 총 네 군으로 나누었다. 사용방법은 매일 아침, 저녁 하루 2회 세안 후 토너 단계에서 여드름 개선제를 1-2회 정도 펄프 하여 도포 하였으며, 네 군 모두 사용법을 8주간 동일하게 적용하였다. CM+oral CM그룹은 커큐민을 하루에 3캡슐(캡슐 당 500 mg) 식사 후 복용하도록 하였다. 정확한 피부 측정 위해 실험자들은 일정한 시간대를 정한 뒤 준비된 동일한 세안제를 사용하여 세안한 후 측정시의 실내 환경 조건은 실내 온도 22-24°C 실내 습도 40~60%를 유지하는 항온, 항습의 실내 조건에서 세안 후 1시간이 경과된 후에 측정하였다. 측정 시에는 부위를 얼굴의 오른쪽 볼(코 옆에서 3cm 지점), 이마(미간 위 3cm 지점), 턱(아랫입술 중앙 아래 1.5cm 지점)으로 나누어 측정하였으며, 정확도를 높이고자 측정 시 항상 일정한 부위를 5회 반복하여 측정하였다.

2.2.5. 통계분석

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, 통계 처리는 SPSS Window Version 17.0(SPSS Inc., Illinois, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 검증은 Paired t-test를 사용하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적 유의성의 차이가

있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. in vitro 실험결과

3.1.1. HPLC를 이용한 대두 추출물 성분분석

탈지대두 분말을 95% ethanol을 가하여 72시간 추출하여 원심 분리 후 상층액을 여과지로 여과하여 감압 농축 후 동결건조 하였다. 건조 된

시료를 DMSO에 녹여 membrane filter(0.22 μ m)로 filtering하여 농도별로 희석한 후 HPLC chromatogram를 이용하여 성분분석을 수행하였다. 추출물 된 이소플라본을 표준용액으로 한 검량선법에 의하여 시료 중의 이소플라본의 standard함량을 구하였고, daidzin, genistin, daidzein, genistein등을 이소플라본 95% ethanol로 추출한 sample 시료로 하여 total 함량을 구하였다. 그 결과를 Table 4에 나타내었다. daidzin 31.20%로 가장 높은 함량이 나타났으며, genistin 3.80%, daidzein 2.07%, genistein 0.70%로 순차

Table 3. Formulation of toner type cosmetic containing curcumin and isoflavone

Component	Contents(%)			Contents (g/mL)
	Control group	CM group	CM+ISF group	
A) 70%ethanol	20	20	20	200 mL
Isoflavone	0.0	0.0	0.5	5 g
Curcumin	0.0	0.01	0.01	100 mg
Tocopherol succinate	0.1	0.1	0.1	1 g
F68	0.5	0.5	0.5	5 g
Tween80	0.5	0.5	0.5	5 g
Tween20	0.5	0.5	0.5	5 g
BHT	0.03	0.03	0.03	300 mg
EDTA	0.01	0.01	0.01	100 mg
B) Glycerine	1	1	1	10 g
1.3BG	0.5	0.5	0.5	5 g
C) Triethanolamine	0.1	0.1	0.1	1 g
Xanthangum1% solution	40	40	40	400 mL
H2O				380 mL
pH	5.5	5.5	5.5	
Total				1,000 mL

Table 4. The contents of isoflavone(%)

Sample	Daidzin % (mg/g)	Genistin % (mg/g)	Daidzein % (mg/g)	Genistein % (mg/g)	Total % (mg/m)
95% ethanol	31.20 (311.99 ± 0.27)	3.80 (37.97 ± 0.07)	2.07 (20.74 ± 0.28)	0.70 (6.99 ± 0.11)	37.77%(377.69)

적으로 낮은 함량을 나타내었고, 총 이소플라본의 함량은 37.77%를 획득 하였다. 대두추출물 표준 물질 시료에 대한 HPLC chromatogram은 daidzin 21분, genistin 28분, daidzein 7분, genistein 37분 에 피크가 나타났으며, 양호하게 분리되었다(Fig. 1).

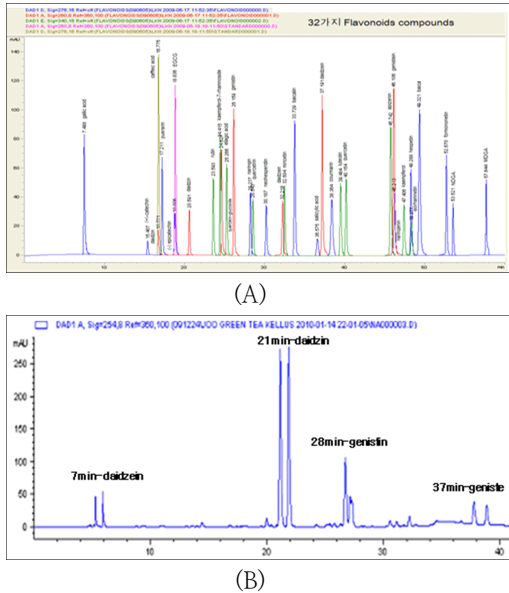


Fig. 1. HPLC chromatogram of isoflavone.
(A) Isoflavone standard peak,
(B) Isoflavone 95% ethanol sample peak.

3.1.2. RAW 264.7 세포에 대한 세포독성

RAW 264.7 세포에서 커큐민이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 커큐민 0.1, 1, 5, 10, 50 mg/mL의 농도로 처리하고, 48시간 배양하여 NR assay를 시행하여 세포 생존율을 측정하였다. 실험 결과 커큐민 0.1, 1, 5 mg/mL 농도까지 90% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며, 10 mg/mL에서 세포 생존률이 20% 감소함을 확인하였다. 이와 같은 결과로 본 연구에서는 커큐민이 RAW 264.7 세포에 대한 독성이 거의 나타나지 않는 것을 확인하였고, 추후 실험은 커큐민의 세포 생존율이 90% 이상인 10 mg/mL 농도 범위에서 세포 실험을 진행하였다(Fig. 2).

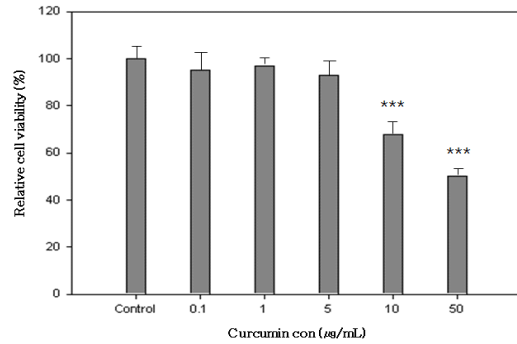


Fig. 2. Effects of curcumin on cell viability in RAW 264.7 cells. Values represent mean \pm standard deviation of three measurements.

3.1.3. RAW 264.1 세포에서 Nitric oxide 생성능 측정

Nitric oxide(NO)는 광범위한 생리적 활성으로 혈관계, 신경계, 면역계 등에 관여하고 종양 제거에 중요한 역할을 하지만, 과잉 생성 시 염증을 촉진하고 심화 시키는 것으로 알려져 있다[28]. NO를 생성하는 효소인 NOS는 nNOS, eNOS, iNOS 모두 3종으로 알려져 있으며[29], 이 중 iNOS가 염증이나 침해자극이 있는 경우 생성된다고 보고되어 있다[30]. 본 연구에서는 커큐민이 LPS에 의해 자극이 유도된 RAW 264.7 세포에서 항염증의 지표가 되는 NO 저해 활성을 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 0.1, 1 μ g/mL의 처리 농도에서 NO생성 저해율을 나타내지 않았으며, 5, 10 μ g/mL의 처리 농도에서는 NO 생성이 의존적으로 저해하였다. 50 μ g/mL에서는 NO 생성억제의 상당부분이 세포 생존율이 낮아지는 것으로 사료된다.

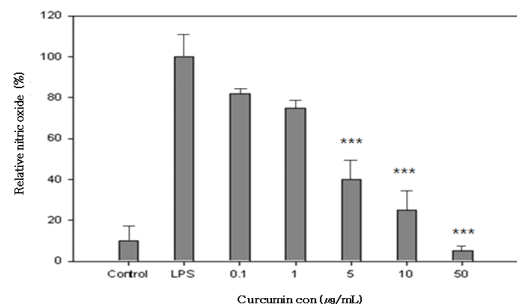


Fig. 3. Effect of nitric oxide production in RAW 264.7 cells by curcumin. Result is represented as mean \pm SD.

3.1.4. 세포내 cytokine 생성 저해능 측정

활성화된 RAW 264.7 세포에 의해 분비된 cytokine(TNF-a, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12), hydrogen peroxide(H² O²),NO 등이 염증유발을 유도하는 물질로 제시되어 왔다[31]. 일반적으로 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포로부터 분비된 cytokine생성 저해능을 측정함으로써 저해능도에 대한 지표로 삼았다[32]. 본 실험에서는 커큐민의 cytokine생성 저해능 측정하기 위해 커큐민을 처리한 RAW 264.7 세포의 LPS에 의해 유도된 pro-inflammatory cytokine의 형성을 억제하는지 알아보기 위해서 IL-1β, IL-6, TNF-a의 생성 저해능을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 IL-1β 경우 0.1 μg/mL부터 농도 의존적으로 생성이 억제되는 것으로 나타났다. IL-6 경우는 10, 50 μg/mL에서 저해 양상을 보였고, TNF-a 경우에는 IL-6 와 마찬가지로 10, 50 μg/mL 생성 저해율을 나타냈지만, IL-1β, IL-6 보다는 10% 정도는 약간 낮은 저해율을 나타나는 것으로 확인하였다.

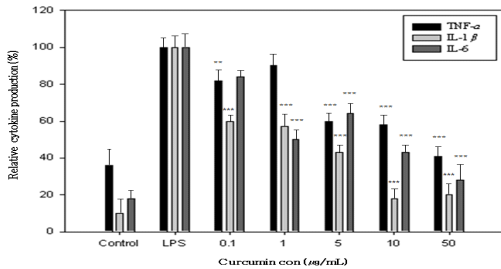


Fig. 4. Inhibition of cytokine production in RAW 264.7 cell by curcumin. Result is represented as mean ± SD.

3.2. in vivo 실험을 통한 피부 상태 변화 측정

3.2.1. 첩포 시험에 의한 피부 자극 평가

피험자에 대한 인체폐쇄첩포시험(closed patch test)을 실시한 결과는 Table 5와 같다. 커큐민과 이소플라본이 첨가된 화장품 제형의 안전성을 확인하기 위하여 실시한 첩포 시험에서 판정 시간 30분, 24시간, 48시간 후 첩포를 제거하고 2시간이 지난 후 연구자에 의한 육안적 관찰 후 평가하였다. 시험 평가 기간 중 피부 이상반응을 나타내는 지원자는 없었으며, 8주 동안 시험을 진행하는 동안에도 피험자 모두에서 이상반응이 나타나지 않는 것을 확인하였다.

3.2.2. 안면 피부의 유분변화

커큐민과 대두 추출물이 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하기 위하여 안면 피부의 유분변화량을 측정된 결과 Table 6에 의하면 대조군은 유분량이 증가하였고, CM 그룹 같은 경우에는 감소하는 경향을 보였지만 변화가 유의하지 않은 것으로 나타내었다. CM+ISF 그룹의 경우는 임상 전 76.1±1.198, 4주 후 74.07±1.551, 8주 후 69.33±1.004로 감소정도가 유의하였으며 (p<0.01), 커큐민을 복용한 CM+oral CM 그룹도 임상 전 73.24±0.974, 4주 후 60.38±2.029, 8주 후 58.03±3.156로 CM+ISF 그룹과 같이 유분량이 유의하게 감소하였다(p<0.001).

Table 5. Observation of skin disorder after 48 hours closed patch test

	Erythema	Allergy	Edema	Swelling
Subject 1	(-)	(-)	(-)	(-)
Subject 2	(-)	(-)	(-)	(-)
Subject 3	(-)	(-)	(-)	(-)
Subject 4	(-)	(-)	(-)	(-)
Subject 5	(-)	(-)	(-)	(-)

Table 6. Changes of skin oilness for each group. The data were presented mean±SD

	A Control (N=8)	B CM (N=7)	Control vs CM P	C CM+ISF (N=8)	Control vs CM+ISF P	D CM+oral CM (N=8)	Control vs CM+oral CM P
Before	60.3 (±9.44)	77.7 (±0.44)		76.1 (±1.19)		73.2 (±0.97)	
4 weeks	61.2 (±9.19)	75.4 (±0.72)	0.005	74.0 (±1.55)	0.02	60.3 (±2.02)	0.03
8 weeks	62.4 (±9.07)	74.7 (±1.56)		69.3 (±1.00)		58.0 (±3.15)	
p-value	0.135	0.067		0.001		0.0004	

Mean±S.D. ** p<0.01, *** p<0.001

A) Control: no add curcumin and isoflavone, B) CM: add 0.01% curcumin

C) CM+ISF: add 0.01% curcumin with 0.5% isoflavone, D) CM+oral: add 0.01% curcumin with oral curcumin

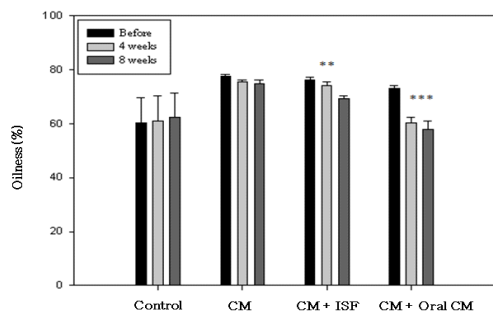


Fig. 5. Changes in skin oilness of each group before and after the experiment.

** p<0.01, *** p<0.001

3.2.3. 안면 피부의 각질변화

임상 대상자들의 안면 피부의 각질량 변화를 측정하기 위하여 각 그룹별 안면 피부의 각질 변화량을 Table 7에 나타내었다. 대조군에서는 임상 전 1.05 ± 0.0753 , 8주 후 1.1 ± 0.1324 , CM 그룹은 임상 전 1.354 ± 0.074 , 임상 후 1.237 ± 0.067 로 각질의 변화가 유의하지 않았으며, CM+ISF 그룹의 경우에는 임상 전 1.24 ± 0.168 , 8주 후 1.021 ± 0.177 로 전 후가 0.221지수로 피부 각질이 유의하게 감소하였다(p<0.01). CM+oral CM 그룹은 대조군과 CM 그룹 마찬가지로

가치로 임상 전 1.256 ± 0.132 , 1.601 ± 0.186 로 각질의 변화가 유의하지 않은 것으로 확인되었다.

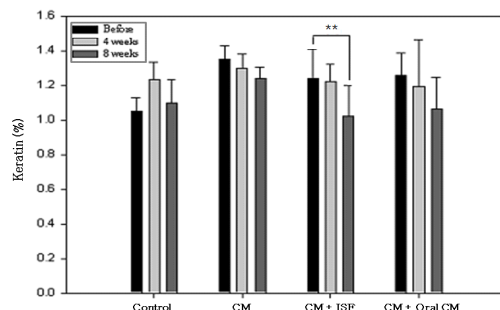


Fig. 6. Changes in skin keratin of each group before and after the experiment.

** p<0.01

3.2.4. 안면 피부의 홍반 변화

실험결과 Table 8에 도시하였듯 대조군과 CM 그룹에서는 임상전후 홍반지수의 변화가 유의하지 않았다. CM+ISF 그룹은 임상 전 $420.12 \pm 23.775 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 4주 후 $398.25 \pm 28.034 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 8주 후 $375 \pm 61.792 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 홍반 지수가 45.12로 유의하게 감소하였다(p<0.05). CM+oral CM 그룹 경우는 임상 전 $413.87 \pm 51.609 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 4주

Table 7. Changes of skin keratin for each group. The data were presented mean±SD

	A Control (N=8)	B CM (N=7)	Control vs CM P	C CM+ISF (N=8)	Control vs CM+ISF P	D CM+oral CM (N=8)	Control vs CM+oral CM P
Before	1.05 (±0.07)	1.35 (±0.07)		1.24 (±0.16)		1.25 (±0.13)	
4 weeks	1.23 (±0.40)	1.29 (±0.07)	0.07	1.22 (±0.10)	0.36	1.19 (±0.26)	0.14
8 weeks	1.1 (±0.13)	1.23 (±0.06)		1.02 (±0.17)		1.60 (±0.18)	
p-value	0.317	0.071		0.0074		0.0953	

Mean±S.D. ** p<0.01

A) Control: no add curcumin and isoflavone, B) CM: add 0.01% curcumin,

C) CM+ISF: add 0.01% curcumin with 0.5% isoflavone, D) CM+oral: add 0.01% curcumin with oral curcumin

Table 8. Changes of skin erythema for each group. The data were presented mean±SD

	A Control (N=8)	B CM (N=7)	Control vs CM P	C CM+ISF (N=8)	Control vs CM+ISF P	D Cm+oral CM (N=8)	Control vs CM+oral CM P
Before	424.2 (±24.3)	404.1 (±49.6)		420.1 (±23.7)		413.8 (±51.6)	
4 weeks	421.0 (±18.0)	398.2 (±36.4)	0.005	398.2 (±28.0)	0.091	256.1 (±48.1)	0.080
8 weeks	421.0 (±27.5)	392.4 (±51.1)		375 (±61.7)		242.7 (±50.6)	
p-value	0.1204	0.0646		0.0287		0.0001	

Mean±S.D. * p<0.05, *** p<0.001

A) Control: no add curcumin and isoflavone, B) CM: add 0.01% curcumin,

C) CM+ISF: add 0.01% curcumin with 0.5% isoflavone, D) CM+oral: add 0.01% curcumin with oral curcumin

후 256.12±48.101 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 8주 후 242.75±50.697 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 여드름 부위의 홍반 지수가 157.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 유의하게 감소하였다(p<0.001).

* p-value 값 위의 굵은 줄 삭제함~

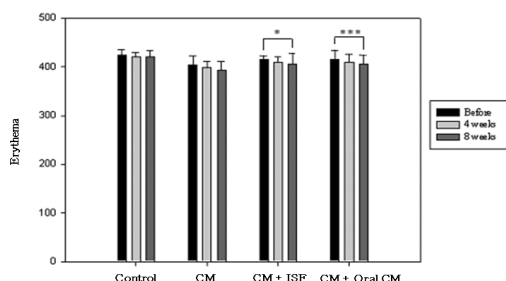


Fig. 7. Changes in skin erythema of each group before and after the experiment.

* p<0.05, *** p<0.001

4. 결론

본 연구에서는 울금의 커큐민 성분으로 세포독성과 항염증 실험을 수행하고, 탈지대두추출물 HPLC을 이용한 대두추출물 성분분석을 통하여 이소플라본을 38% 정도 확인하고, 이를 토대로 여드름 피부를 대상으로 여드름 개선효과를 측정하고자 커큐민과 이소플라본을 함유된 제품을 사용하여 변화를 알아보았다.

HPLC를 이용하여 성분분석 확인 후 탈지대두 95% ethanol로 추출하여 이소플라본의 총 함량을 구하였다. 분석결과 daidzin 31.20%로 가장 높은 함량이 나타났으며, genistin 3.80%, daidzein 2.07%, genistein 0.70%로 순차적으로 낮은 함량을 나타내었고, 총 이소플라본의 함량은 37.77% 획득 하였다.

in vitro 실험으로 커큐민의 세포독성 RAW 264.7 세포에 NR assay한 결과 0.1, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았으며, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리 농도에서는 세포 생존율이 70%정도로 나타나 미약한 독성을 나타냈으며, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리 농도에서는 세포 생존율이 50%로써 독성이 상당히 있는 것으로 확인하였다. RAW 264.7 세포에 대하여 항염증 실험결과 LPS에 의해 유도되는 NO생성을 억제시키는 역할을 하는지의 여부를 평가하기 위해 0.1, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리 농도에서 염증 저해율을 나타내지 않았으며, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리 농도에서는 NO생성이 억제되는 것으로 나타났으나 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 NO 억제의 상당부분이 세포 생존율이 낮아지는 결과 때문인 것으로 확인되었다. 커큐민을 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된

pro-inflammatory cyto kine의 형성을 억제하는지 알아보기 위해서 IL-1 β , IL-6, TNF-a의 생성을 측정한 결과 IL-1 β 경우 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 농도 의존적으로 생성이 억제되었다. IL-6 경우는 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 저해 양상을 나타내었으며, TNF-a 경우에는 IL-6 와 마찬가지로 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 생성 저해율을 나타냈지만 IL-1 β , IL-6 보다는 약간 낮은 저해율을 확인할 수 있었다.

이러한 실험을 토대로 여드름 피부에 8주간 피부 개선 효과를 측정한 결과 대조군에서의 피부 유분, 홍반, 각질함량은 시험 전 후 차이가 유의하지 않은 것으로 확인할 수 있었으며, 각질함량은 CM+ISF 그룹만 유의하게 감소하였고, 나머지 그룹에서는 개선 효과는 있었지만 유의하지 않았다. 마지막 커큐민 0.01% 함유 제품과 커큐민 95% 1회 3캡슐 복용한 CM+oral CM 그룹은 홍반측정 시험 전 후 개선도 차이가 가장 크게 나타났으며 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 커큐민과 이소플라본의 함유 화장품이 여드름 피부 개선효과를 가진 화장품 소재로서 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. S. Park, Skin barrier and beauty foods. *Food. Sci.*, **40**, 19-26(2008).
2. H. Arnold, R. Odom, W. James, Andrew's Diseases of the skin, Clinical dermatology, 8th Ed. WB Saunders Co. *Philadelphia*, pp 250-258(1990).
3. C. Kim, H. Lee, Microorganism isolated from acne and their antibiotic susceptibility. *Kor. J. Dermatol.*, **43**, 871-875(2005).
4. J. Lee, D. Chang, Suh K, S, Sung, E. Lee. The relapse rate after 1year treatment with oral isotrtinoin in Korean Patients with mild to moderate acnes. *Kor. J. Dermatol.*, **42**, 675-681(2004).
5. C. Kim, H. Lee, Microorganism isolated from acne and their antibiotic susceptibility. *Kor. J. Dermatol.*, **43**, 871-875(2005).
6. D. Knigh, J. Eden, review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.*,

- 87**, 897–904(1996).
- 7 . S. Bingham, C. Aykinson, J. Liggins, L. Bluck, A. Coward, phytoestrogens, where are we now. *Br. J. Nutr.*, **79**, 393–406 (1998).
 8. A. Cassidy, Physiological effect of phyto-oestrogens in relation cancer and other human health risks, *Proc. Nutr. Soc.*, **55**, 399–417(1996).
 9. L. King, B. Carr, Phytoestrogens, Fact and Fiction, Patient care(March)., 127–143 (1999).
 10. R. Koslak, R. Bookland, J. Bakei, H. Paaren, E. Appelbaum, Induction of Bradirhizobium japonicum coummon nod genes by isoflavones isolated from Glycine max. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 7428–7432(1987).
 11. F. Morris, M. Savard, E. Ward, Identification and accumulation of isoflavones and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to Phytophthora megasperma f.sp. glycinea, *Physiol. Molecular. Plant. Pathol.*, **39**, 229–224(1991).
 12. S. Park, Skin barrier and beauty foods. *Food. Sci.*, **40**, 19–26(2008).
 13. M. J. Lee, C. Y. Sohn, O. J. Park, Relation between Health Status and Intake of Soy Isoflavone among Adult Women in Seoul. *J. East Asian Soc Dietary Life.*, **20(2)**, 218–230(2010).
 14. F. M. Sacks, A. Lichtenstein, L. Van Horn, W. Harris, P. Kris–Etherton, M. Winston. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health. An American Heart Association Science Advisory for Professionals from the Nutrition Committee. *Circulation.*, **113**, 1034–1044 (2006).
 15. C. W. Xiao, Health effects of soy protein and isoflavones in Humans. *J. Nutr.*, **138**, 1244–1249(2008).
 16. S. Choi, Y. Kim, M. Choi, H. Rang, Y. Ahn and Yun, Screening of 5a–reductase inhibition and comedolytic effects from natural products. *Yakhak. Hoeji.*, **43**, 342–350(1999).
 17. A. Sharma, J. Gescher, P. Steward. Curcumin The story so far. *Eur. J. Cancer.*, **41**, 1995–1968(2005).
 18. R. Selvam. L. Subramanian. R. Gayathri. N. Angayarkanni. The antioxi dent activity of turmeric (*Curcuma longa*).*Journal of Ethnophar. macol. ogy.*, **47**, 59–67(1995).
 19. A. Sharma, J. Gescher, P. Steward, Curcumin The story so far. *Eur. J. Cancer.*, **41**, 1995–1968(2005).
 20. D. C. Kim, P. Song. Molecular Docking Affinity Comparison of Curcumin and Nano-micelled Curcumin with Natural Sea Salt on Transthyretin. *Journal of Life Science.*, **26(2)**, 253–258(2016).
 21. I. Calzuola, F. Giavarini, P. Sassi, L. De Angelis, G. L. Gianfranceschi, V. Marsili, Short acidic peptides isolated from wheat sprout chromatin and involved in the control of cell proliferation: Characterization by infrared spectroscopy and mass spectrometry. *Peptides.*, **26(11)**, 2074–2085(2005).
 22. Y. L. Binta, K. Hiroshi, H. S. Lee, Y. K. Kang, J. Y. Park, M. Yang, Inhibition by wheat sprout (*Triticum aestivum*) juice of bisphenol A-induced oxidative stress in young women, *Mutat. Res.*, **724**, 64–68(2011).
 23. C. Nathan, S. H. Snyder, Nitric oxide synthases : roles, tolls, and controls. *Cell.*, **78**, 915–916(1994).
 24. S. Balasubramanian, R. Eckert. Kerationcyte proliferation, differentiation, and apoptosis–differential mechanisms of regulation by curcumin, EGCG and apigenin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **224**, 314–219(2007).
 25. S. Balasubramanian, R. Eckert. Curcumin suppresses AP1 transcription factor–dependent differentiation and activates apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, **282**, 6707–6715(2006).
 26. E. Borenfreund, J. A. Puemer. Toxicity

- determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters.*, **24**, 119-124(1985).
27. C. L. Green stork, Radiation and aging free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med. Hypotheses.*, **41**, 473(1993).
28. R. A. Korhonen, H. E. Lahti Kankaanranta, Moilanen, Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. J. Drug Targets, Inflamm. Allergy.*, **4**, 471(2005).
29. J. MacMicking, Q. W. Xie, C. Nathan. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.*, **15**, 323(1997).
30. P. Forsythe, M. Gilchrist, M. Kulka, A. D. Befus, Mast cells and nitric oxide: control of production, mechanisms of response. *Int. Immunopharmacol.*, **1(8)**, 1525(2001).
31. H. P. Kim, K. H. Son, S. S. Kang. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacological. Sci.*, **96**, 229-245(2004).
32. D. S. Bredt, S. H. Snyder. A physiologic messenger molecule. *Annu Rev. Biochem.*, **63**, 175-195(1994).