

The Effect of Roots Extract from *Potentilla chinensis* as Cosmeceutical Material

You Jae Chon · Hae Soo Jung · Hyoung Shik Kim · Jeong Hun Lee · Sang Hyun Moh* 

화장품 소재로써의 딱지꽃(*Potentilla chinensis*) 뿌리 추출물의 효과

유재천 · 정해수 · 김형식 · 이정훈 · 모상현*

Received: 8 October 2015 / Accepted: 3 November 2015 / Published Online: 31 March 2016

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

Abstract As natural plant-based industry has been expanded, the use of oriental medicinal plants as cosmeceutical material received a lot of attentions in the cosmetic industry. Among various medicinal plants, *Potentilla chinensis* have drawn interests for its biological effects. Although several attempts were tried to study its biological effect as medicinal plant, only limited results were reported to evaluate its biological effect as cosmeceutical material. In this study, we examined the possibility of root extract from *Potentilla chinensis* as a cosmeceutical material because the root part has been reported to have several kinds of health promoting effects. After extraction of roots, biological evaluation including anti-inflammation, anti-wrinkle, whitening effect and moisturizing effect was performed. As a result, the root extract showed remarkable biological activities through stimulating synthesis of elastin and aquaporin-3, and inhibiting melanin synthesis, cyclooxygenase-2 expression and expression of metalloproteinase-1.

Keywords anti-inflammation · anti-wrinkle · moisturizing effect · root of potentilla chinensis · whitening effect

서론

최근 자연친화적인 천연식물을 활용하여 질병의 예방 및 치료로 건강을 지키려는 경향이 증가하는 추세로 화장품 시장에서도 화학성분에 기초한 기존 화장품과 달리 국내의 자연친화적인 원료를 사용한 한방 화장품이 큰 영향력을 보이며 이를 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다(Sa 등, 2013).

다양한 약재식물 중 장미과에 속하는 딱지꽃(*Potentilla chinensis*)은 산야의 양지에 자라는 다년초로 위릉채로도 알려져 있다(Mesicek과 Sojak, 1993). 노란 꽃이 피며 높이가 30~60 cm로 자라며 근육통, 지혈, 해독, 해열 등에 효능을 가진다. 딱지꽃의 전초와 뿌리는 다량의 flavonoid를 함유하고 saponin, kaempferol, cyanidin, catechin 등이 포함되어 있다(Shen 등, 2006; Wang 등, 2006; Xue와 Yang, 2008). 또한 딱지꽃에 들어있는 polyphenol 물질들은 티푸스막대균, 적리막대균, 포도알균에 대한 살균작용이 있고 항염증작용, 모세혈관 강화작용이 있다고 알려져 있으며, 딱지꽃 전초는 지혈제, 진통진정제, 염증약으로 쓰이고 있다(Jung 등, 2012; Wei 등, 2013; Lin 등 2014).

그러나 다양한 효과가 알려져 있는 반면 이를 이용한 식품이나 화장품 등의 산업적 응용은 거의 이루어지고 있지 않다. 특히, 딱지꽃의 뿌리 부분은 다른 부위에 비해 더 많은 약리 활성 효과를 보이지만 이를 활용한 사례는 거의 없다(Lee 등, 2003). 또한, 다른 부위의 추출물의 유효성분이 연구가 된 반면 뿌리 추출물의 유효성분 분석은 아직 미비한 실정이다(Tomczyk와 Latte, 2009).

Y. J. Chon
Dept of Chemical Engineering, Emulsion Institute, Soongsil University 369 Sangdo-Ro, Dongjak-Gu, Seoul, Republic of Korea

H. S. Jung · H. S. Kim · J. H. Lee · S. H. Moh
Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd, Smart valley A-510, 30, Songdomirae-ro, Yeonsu-gu, Incheon, Republic of Korea

*Corresponding author (S. H. Moh: biofdnc@gmail.com)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

따라서, 본 연구에서는 딱지꽃의 뿌리를 methanol로 추출한 추출액을 이용하여 일반적으로 화장품 소재로서 필요한 활성들을 테스트 하였다. 구체적으로, 항염증, 미백효과, 주름개선 그리고 보습 효과를 피부세포에서 테스트함에 따라 화장품소재로써의 딱지꽃 뿌리 추출물의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료. 딱지꽃은 장미과 식물로써 본 실험에 사용된 딱지꽃은 정선 배서영농조합과 진주 영농조합법인 이노플랜트 두 곳에서 수급하여 사용하였다. 수급 된 딱지꽃은 건조시킨 후 메탄올 추출하였으며 추출된 추출물은 냉장보관 하였다.

시약 및 기기. 딱지꽃 뿌리 추출물의 독성 평가를 위한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 또한 MTT assay 수행 시 UV Spectrophotometer (Thermo, Waltham, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 확인하였다. 그리고 딱지꽃 뿌리 추출물을 피부세포에 처리 후 특정 단백질의 양을 확인 하기 위해 real time PCR kit을 수행하였다. 이를 수행할 시 Rotor Gene Q Real-time PCR machine (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 주로 사용하였으며, SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo, Kita-ku, Osaka, Japan, TOSCQ-101)를 이용하여 세포의 RNA를 추출하였다. 실험에 사용한 피부세포로는 HaCaT (Keratinocyte), CCD986sk (Fibroblast), B16F10 (melanoma cell)를 한국세포주은행에서 분양하여 사용하였다.

딱지꽃 뿌리 추출 방법. 추출을 위하여 딱지꽃 뿌리를 60°C에서 2일 동안 건조하였고, 메탄올(2 L)을 사용하여 추출하였다. 추출 시 농도는 2 g/L로 추출한 후, 여과하여 그 액을 실험에 사용하였다.

세포독성 실험. 딱지꽃 뿌리 추출물의 독성을 평가 하기 위해 MTT assay를 수행하였다. HaCaT cell을 24 well plate에 1×10^5 개의 세포를 분주하여 배양하였다. 24시간 후 Fetal bovine serum (FBS)를 포함하지 않는 배지로 교체하고 24시간 동안 starvation하고, 시료를 농도별로 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양하고 배지를 제거한 뒤 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 각 40 μ L씩 처리 후 4시간 동안 추가 배양하였다. 4시간 뒤 배지를 제거하고, DMSO를 1 mL 씩 넣고 10분간 흔들어 준 다음 200 μ L씩 96 well에 취하여 UV Spectrophotometer로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포배양. 각각의 피부 세포주를 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (GIBCO, Grand Island, NY, USA)의 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 독성 실험, 염증 실험 그리고 보습효과 실험에는 HaCaT 세포를 사용하였고 주름개선 효과에는 CCD986sk 세포주가 사용되었다. 그리고 미백 효과실험에는 B16F10 세포주가 사용되었다. 위에 사용된 모든 세포는 한국세포주은행에서 분양 받아서 사용하였다.

Real time PCR 분석. 세포를 96 well plate에서 배양하고 FBS를 포함하지 않는 DMEM 배지로 교환하고 시료를 처리하여 24시간 동안 추가 배양하였다. 배양 후 SuperPrep™ Cell Lysis & RT Kit를 이용하여 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 하여 Thunderbird™ SYBR

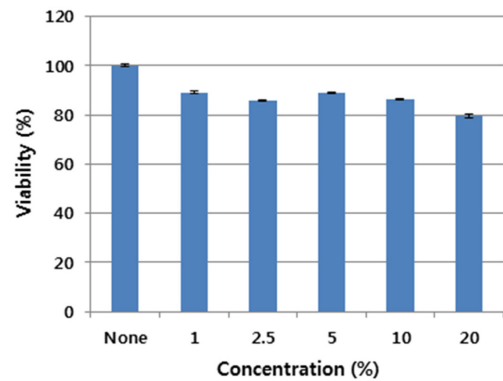


Fig. 1 Cytotoxicity of *Potentilla chinensis* roots extract on HaCaT cell. Data correspond to the mean \pm standard deviation (SD) from three independent experiments.

qPCR Mix (Toyobo, TOQPS-201)를 사용하여 매뉴얼에 따라 Rotor Gene Q Real-time PCR machine으로 real time PCR을 수행하였다. Primer는 QuantiTect® Primer Assays (Cat no. QT00040586, QT01005725, QT00014581, QT00212996, QT01192646) (QIAGEN, Valencia, California, USA)를 사용하였다.

Melanin 정량 실험. B16F10 cell을 6 well에 5×10^4 cells/well 이 되도록 분주하여 24시간 뒤, 각각의 well에 딱지꽃 추출물을 농도별로(1, 2.5, 5%) 처리하고 positive control로 kojic acid (16 μ M)를 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 phosphate buffered saline로 2회 세척한 후 12,000 rpm, 4°C, 30분간 원심 분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 150 μ L 첨가하고 60°C에서 1시간 용해하였으며 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

결과 및 고찰

딱지꽃 뿌리 추출물의 독성평가. 딱지꽃 뿌리 추출물을 피부세포에 처리하여 여러가지 활성을 확인하기 전에 세포독성에 대한 평가를 먼저 실행하였다. MTT assay를 통해서 추출물을 1, 2.5, 5, 10, 20%로 HaCaT 세포에 각각 처리함에 따라 보이는 독성을 평가하였다. 실험결과 10% 이상의 추출물 농도부터 약한 독성(80% of cell viability)이 확인됨에 따라 그 이하의 농도에서만 나머지 활성테스트를 수행하였다(Fig. 1).

딱지꽃 뿌리 추출물의 항염증 효과. 딱지꽃 뿌리 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 염증반응의 대표적인 단백질인 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현양을 real time PCR을 통하여 확인하였다. HaCaT 세포에 UV를 조사함에 따라 염증반응을 유도하여 COX-2 발현이 증가 할 때, 딱지꽃 뿌리 추출물의 처리 여부에 따라 HaCaT 세포에 미치는 영향을 확인하였다. 추출물의 농도가 높아짐에 따라 COX-2 발현양이 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며 2.5% 이상의 추출물 농도 처리시 대조군과 비교하여 약 30% 정도 COX-2 발현양이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 positive control로 사용한 10 μ M 농도의 dexamethasone (dex)이 COX-2의 발현양을 저해하는 수준과 비슷한 수준임을 확인할 수 있었다.

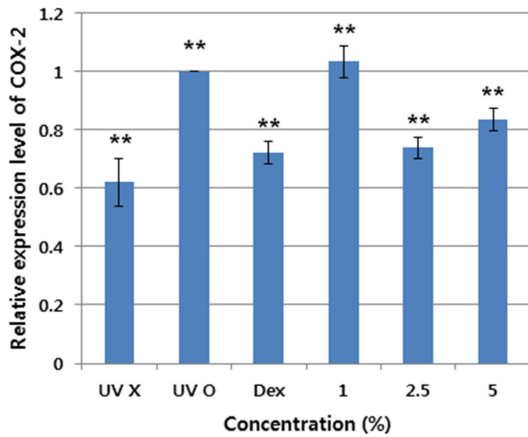


Fig. 2 Expression level of COX-2 after treatment of *Potentilla chinensis* roots extract (UV X: Untreatment of UV, UV O : treatment of UV, Dex : dexamethasone). All of extract treated panel was exposed by UV before treatment of extract. ** $p < 0.001$, as compared to the untreated group (control)

딱지꽃 뿌리 추출물의 주름개선 효과. 딱지꽃 뿌리 추출물의 주름개선 효과를 확인하기 위해 피부세포의 콜라겐과 엘라스틴 합성에 미치는 영향을 실험적으로 확인하였다. 콜라겐과 엘라스틴은 피부를 구성하는 주된 요소로 이들의 양이 줄어들게 되면 주름형성과 아주 밀접한 관계를 가지고 있다고 알려져 있다. 따라서 콜라겐과 엘라스틴의 합성량이 증가하거나 유지가 되면 주름개선에 효과적이라 할 수 있다. 본 실험에서는 콜라겐 합성

량을 조절하는 단백질인 Procollagen C-endopeptidase enhancer (PCOLCE)의 발현양과 엘라스틴 발현양을 real time PCR을 통해 확인하였다. 위와 같은 방법으로 콜라겐 합성량을 판단하는 실험이 여러 문헌에서 시도된 적이 있다(Cho 등, 2008; Atsushi 등, 2013). 또한, 콜라겐 분해에 중요한 Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1)의 발현양을 확인함으로써 추출물이 콜라겐 분해억제 효과가 있는지 확인하였다. 실험 결과 딱지꽃 뿌리 추출물을 CCD986sk 세포에 처리시 콜라겐 형성에 작용하는 PCOLCE 발현양은 큰 변화가 없는 반면 콜라겐 분해에 관여하는 MMP-1의 발현양이 대조군과 비교 시 2.5% 이상 농도에서 40%정도 감소하였음을 알 수 있다(Fig. 3A, B). 이는 콜라겐 분해효소의 발현양이 억제됨에 따라 콜라겐 유지에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또한 추출물 1% 이상 농도에서 대조군에 비해 약 3배정도의 엘라스틴 발현양이 증가됨을 확인되었다(Fig. 3C). 따라서 MMP-1 발현양을 억제시키고 엘라스틴 발현양을 증가시킴에 따라 딱지꽃 뿌리 추출물의 주름개선 효과에 대한 가능성을 확인하였다

딱지꽃 뿌리 추출물의 보습 효과. 딱지꽃 뿌리 추출물의 보습 효과를 확인하기 위해 피부세포에 많이 분포하고 있는 water channel인 aquaporin-3 (AQP-3)의 발현양을 확인하였다. AQP-3의 발현양이 증가함에 따라 수분의 공급이 원활해져 피부의 보습효과가 기대되기 때문에 추출물을 HaCaT 세포에 처리한 후 real time PCR로 AQP-3 발현양을 확인하였다(Verkman과 Mitra 등, 2000; Sougrat 등, 2002). 실험 결과 1% 농도의 추출물을 처리한 것이 대조군에 비해 AQP-3 발현양을 1.5배 정도 증가시켰고 5% 농도에서는 발현양을 2배까지 증가시키는 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

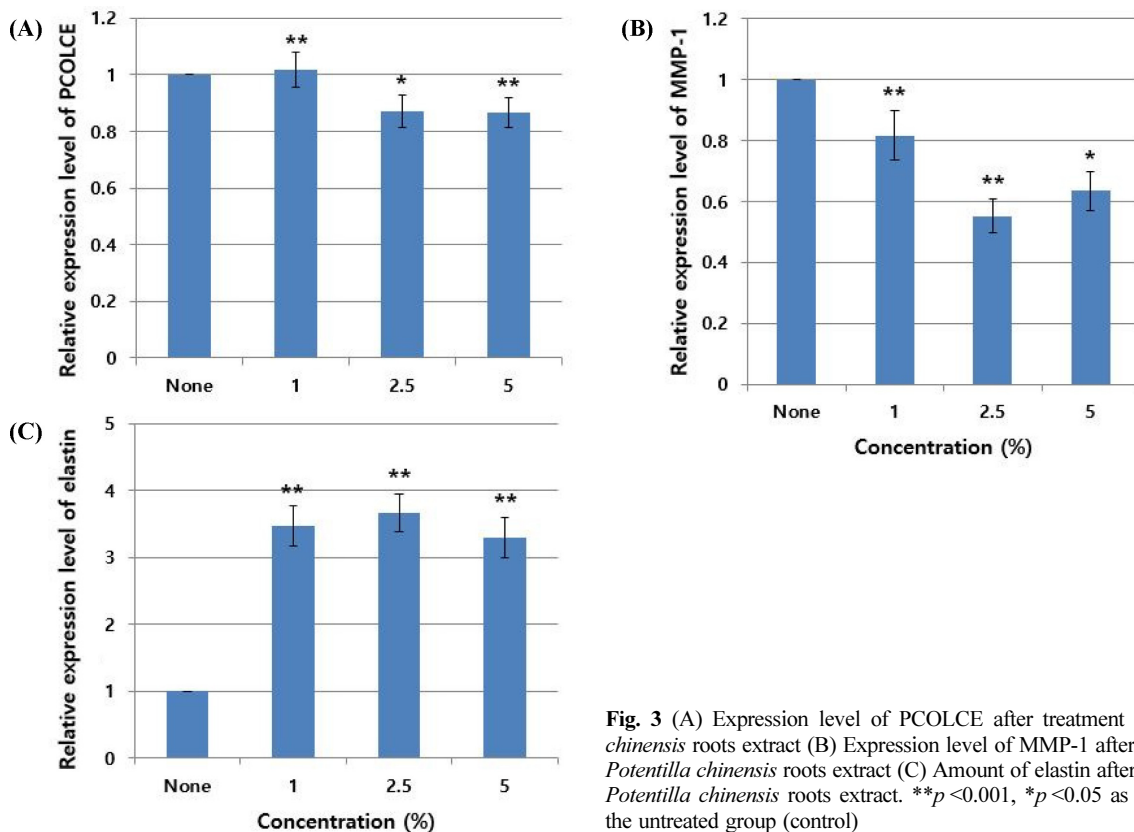


Fig. 3 (A) Expression level of PCOLCE after treatment of *Potentilla chinensis* roots extract (B) Expression level of MMP-1 after treatment of *Potentilla chinensis* roots extract (C) Amount of elastin after treatment of *Potentilla chinensis* roots extract. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ as compared to the untreated group (control)

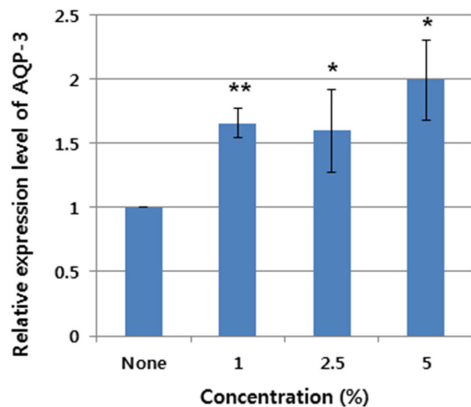


Fig. 4 Expression level of AQP-3 after treatment of *Potentilla chinensis* roots extract. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ as compared to the untreated group (control)

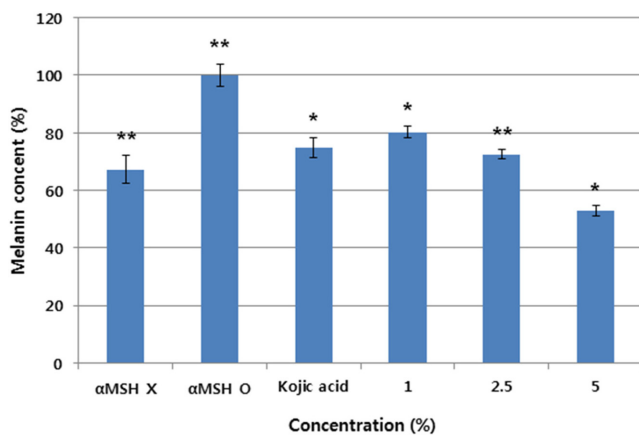


Fig. 5 Amount of melanin after treatment of *Potentilla chinensis* roots extract (αMSH X: α-Melanocyte-stimulating hormone untreated, αMSH O: α-Melanocyte-stimulating hormone treated, Kojic acid as positive control: 16 μM). All of extract treated panel was exposed by αMSH before treatment of extract. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ as compared to the untreated group (control)

딱지꽃 뿌리 추출물의 미백 효과. 딱지꽃 뿌리 추출물의 미백 효과를 확인하기 위해 melanin 합성에 중요한 단백질의 발현양을 확인하였다. Melanin은 피부의 색소 물질로 자외선 같은 자극에 피부세포가 노출 되었을 때 tyrosinase 같은 효소 등에 의해 melanin이 형성된다고 알려져 있다. 따라서 melanin의 형성이 억제되면 미백효과를 기대할 수 있게 된다(Hill 등, 1997; Ando 등, 2007). 본 실험에서는 B16F10세포에 α-Melanocyte-stimulating hormone (α-MSH)를 처리하여 melanin 색소 생성을 유도한 뒤, 딱지꽃 뿌리 추출물을 처리함에 따라 변화하는 melanin 양을 정량하였다. 그 결과 5% 농도의 딱지꽃 뿌리 추출물을 처리했을 경우 positive control로 사용한 16 μM 농도의 kojic acid 보다 10% 더 낮은 양의 melanin이 검출되었다. 즉, 대조군과 비교시 약 60%의 melanin양만이 검출됨에 따라 미백 효과가 있다는 것을 확인하였다(Fig. 5).

요약하면, 그 동안 좋은 활성에도 불구하고 산업적응용이 거의 되지 않았던 딱지꽃 뿌리 추출물을 피부세포에 처리함에 따라 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다. 딱지꽃 뿌리 추출

물 처리시 30% 정도 COX-2 발현양을 조절함에 따라 염증억제효과를 확인하였고, 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1의 발현을 40% 정도 저해하고 엘라스틴 발현양을 3배 정도 증가시킴으로써 주름개선 효과를 확인하였다. 또한 보습에 주요한 막 단백질인 AQP-3 발현양을 2배 증가시킴으로써 보습효과를 확인하였고 melanin 양을 40% 정도 감소시킴에 따라 미백효과를 확인하였다. 따라서 딱지꽃 뿌리 추출물이 항염증, 주름개선, 보습 그리고 미백 효과를 보임에 따라 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

초 록

천연물을 이용한 산업이 증가됨에 따라 전통약재식물들의 화장품소재로 사용하려는 관심이 높아지고 있다. 다양한 약재식물 중 딱지꽃(*Potentilla chinensis*) 역시도 다양한 약리활성이 알려짐에 따라 관심이 높아지고 있다. 그러나 다양한 약리활성을 지닌 반면 딱지꽃(*Potentilla chinensis*)을 이용한 산업적 응용은 거의 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 화장품소재로서의 딱지꽃 뿌리 추출물에 관한 연구를 수행하였다. 그 이유는 딱지꽃의 뿌리 부분이 다른 부분보다 더 많은 약리활성을 지녔다는 보고들이 있었기 때문이다. 딱지꽃 뿌리 추출물을 얻어낸 뒤 항염증, 주름개선, 보습 그리고 미백 효과를 확인함에 따라 딱지꽃 뿌리 추출물을 화장품 소재로 응용가능한지 확인하였다. 그 결과 elastin과 aquaporin-3 증가 효과를 확인할 수 있었고, cyclooxygenase-2, metalloproteinase-1 그리고 melanin 합성 억제효과를 확인할 수 있었다.

Keywords 딱지꽃 뿌리 추출물 · 미백 · 보습 · 주름개선 · 항염증

감사의 글 본 연구는 농림축산식품부 농림축산식품기술사업에 의해 이루어짐(과제명: 고령자 자생 딱지꽃을 활용한 기능성 제품 개발).

References

- Ando H, Kondoh H, Ichihashi M, and Hearing VJ (2007) Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *J Invest Dermatol* **127**, 751–61.
- Atsushi M, Shin H, Kazuhiro K, Tetsuya T, Shin M, Eriko N et al. (2013) The angiotensin II type I receptor blocker olmesartan inhibits the growth of pancreatic cancer by targeting stellate cell activities in mice. *Scand J Gastroenterol* **48**, 602–9.
- Cho S, Kim HH, Lee MJ, Lee S, Park CS, Nam SJ et al. (2008) Phosphatidylserine prevents UV-induced decrease of type I procollagen and increase of MMP-1 in dermal fibroblasts and human skin in vivo. *J Lipid Res* **49**, 1235–45.
- Hill HZ, Li W, Xin P, and Mitchell DL (1997) Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res* **10**, 158–61.
- Jung CH, Choi JK, Yang Y, Koh HJ, Heo P, Yoon KJ et al. (2012) A botulinum neurotoxin-like function of *Potentilla chinensis* extract that inhibits neuronal SNARE complex formation, membrane fusion, neuroexocytosis, and muscle contraction. *Pharm Biol* **50**, 1157–67.
- Lee TH, Kim HJ, and Kim YB (2003) Depigmentation activity of barley, unpolished rice, Job's-tear. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* **16**, 57–78.
- Lin X, Zhang S, Huang R, Tan S, Liang S, Wu X et al. (2014) Protective effect of tormentic acid from *Potentilla chinensis* against lipopolysaccharide/Dgalactosamine induced fulminant hepatic failure in mice. *Int*

- Immunopharmacol* **19**, 365–72.
- Mesicek J and Sojak J (1993) Annotated Chromosome-numbers of Selected Asiatic *Potentilla* Species. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* **28**, 437–46.
- Sa JH, Yoo MJ, Kim NS, Bae CM, Shim HY, Lee HH et al. (2013) Chemical characteristics and biological activities from *Potentilla chinensis* *Rep Inst Health & Environ* **24**, 14–24
- Shen Y, Wang QH, Lin HW, Shu W, Zhou JB, and Li ZY (2006) Study on chemical constituents of *Potentilla chinensis* *Ser. Zhong Yao Cai* **29**, 237–9.
- Sougrat R, Morand M, Gondran C, Barre P, Gobin R, Bonte F et al. (2002) Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* **118**, 678–85.
- Tomczyk M and Latte KP (2009) *Potentilla*-A review of its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacology* **122**, 184–204.
- Verkman AS and Mitra AK (2000) Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, 13–28.
- Wang QH, Li ZY, Shen Y, Lin HW, Shu W, and Zhou JB (2006) Studies on triterpenoids from *Potentilla chinensis*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **31**, 1434–6.
- Wei J, Huang Q, Huang R, Chen Y, Lv S, Wei L et al. (2013) Asiatic acid from *Potentilla chinensis* attenuate ethanol-induced hepatic injury via suppression of oxidative stress and Kupffer cell activation. *Biol Pharm Bull* **36**, 1980–9.
- Xue HJ and Yang XK (2008) Common volatiles are major attractants for neonate larvae of the specialist flea beetle *Altica koreana*. *Naturwissenschaften* **95**, 639–45