ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2019** Vol. 29. No. 11. 1192~1199 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.11.1192

Evaluation of Whitening Activity and Wrinkle Inhibitory Effect of Ethanol Extracts of Nelumbinis Rhizomatis Nodus

Young-Ah Jang[1], Bo-Seul Yeom[1], Se-Gie Kim[2]* and Jin-Tae Lee[1]*

[1]*Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38578, Korea*
[2]*Department of Pharmaceutical Science and Technology, Catholic University of Deagu, Gyeongsan 712-702, Korea*

Received September 26, 2019 / Revised November 20, 2019 / Accepted November 21, 2019

The intention of this study was to confirm the possible use of an ethanol extracts of Nelumbinis Rhizomatis Nodus (NRN) as a cosmetic material. To this end, we extracted NRN with 70% ethanol and performed biological activity evaluation of whitening efficacy and wrinkle reduction. We performed cellular tyrosinase inhibition and melanin contents assay to check the whitening activity of NRN and carried out a toxicity evaluation of NRN via an MTT assay and the amounts of associated proteins that affect melanin production in a melanoma cell line (B16F10). And collagenase inhibitory assay was performed for the evaluation of anti-wrinkle of samples. In addition, a toxicity evaluation using an MTT assay and matrix metalloprotease (MMP-1) and procollagen synthesis inhibition by NRN were evaluated in a fibroblast cell line (CCD-986sk). Western blot results for the whitening activity evaluation revealed that the levels of two proteins related to melanin production, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2), were decreased in a dose-dependent manner. Moreover, collagenase inhibition activity at a concentration of 500 μg/ml NRN by measuring epigallocatechin-3-gallate (EGCG) was increased by more than 80% compared to the control group. Meanwhile, procollagen synthesis was reduced by 68.8% in the UVB-induced CCD- 986sk cells group whereas collagen synthesis recovered by 80.2% with 25 μg/ml NRN. The MMP-1 expression rate showed 20.2% reduction at 25 μg/ml. The results of the experiments verified the whitening and wrinkle suppression effects of NRN and confirmed that it could be used as a safe natural cosmetic material in the future.

Key words : Cosmetic, Nelumbinis Rhizomatis Nodus, tyrosinase, whitening, wrinkle

서 론

우절(Nelumbinis Rhizomatis Nodus, NRN)은 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertner) 뿌리줄기의 마디이며, 연근의 가장자리를 말한다. 그 형태는 짧은 원기둥의 모양으로 길이는 2~4cm, 지름은 1~3cm이다. 겉 표면에는 잔뿌리와 수염뿌리의 자국이 남아있으며 황갈색이거나 회갈색을 띄며 횡단면에는 7개에서 9개 정도의 둥근 구멍이 나있다[3]. 연근에는 주로 nuciferin, nornuciferin, pronuciferin [25], dehydronuciferine, liensine, isoliensine, neferine 등의 alkaloid [7]와 flavonoids, tannic acid 및 tryptophan, asparagin, tyrosine 등의 amino acid [30]가 유효 화합물로 알려져 있고 현재까지 알려진 우절의 효능은 각혈, 토혈, 코피, 치질, 대변출혈 등에 지혈효과가 있으며, 약리작용은 대장벽의 자극을 통한 운동 촉진, 콜레스테롤 강하작용, 항염증 작용이 보고되어 있다[27]. 인간의 피부는 표피, 진피와 피하지방층으로 나눠지며 표피는 각질층, 투명층, 과립층, 유극층, 기저층으로 구분하고 동물이나 식물체 각 부분의 표면을 덮는 최외각층으로, 피부 상태를 나타내는 척도이다[5]. 표피층의 기저에 위치하는 멜라닌은 동물의 조직 및 피부에 존재하는 페놀화합물의 산화중합에 의해 생성되는 갈색 또는 흑색의 색소로 멜라닌의 양은 곧 인종의 피부색을 결정짓는다[9]. 멜라닌은 표피의 기저층에 위치한 melanocyte에서 생성되며 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할이 가장 크지만 자외선에 피부가 노출될 경우 표피층에 색소가 침착되어 기미, 주근깨 등을 형성하여 심미적으로 아름답지 않게 보이게 한다[23, 34] 멜라닌 생성과정의 핵심작용을 하는 것으로 알려진 물질은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)와 같은 효소들로 알려져 있다[12]. Tyrosinase는 구리를 함유한 효소이며 tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)으로 변환하고 효소적 산화반응을 거쳐 DOPA-quinone으로 변환시킨다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)을 carboxylated indole quinone으로 산화시키고 TRP-2는 DOPA-chrome tautomerase로 작용하여 DOPA-chrome을

***Corresponding author**
Tel : +82-53-819-1430, Fax : +82-53-819-1430
E-mail : yaviol@nate.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.

DHICA로 전환한다[29, 31]. 따라서 미백활성을 갖는 미용, 화장품 소재개발에 있어서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 활성을 억제하는 물질에 대한 연구가 미백 화장품 소재 개발의 중요한 부분을 차지하고 있다[1]. 현대인들은 건강하고 아름다운 피부를 정의할 때 피부미백과 주름이 적은 피부를 선호한다. 피부 진피층은 피부의 유연과 탄력성에 관계가 있는 콜라겐(Collagen)과 엘라스틴(Elastin)으로 이루어져 있으며, 대다수의 type I collagen과 약간의 type III collagen, elastin 및 세포외 기질(Extra Celluar Matrix)로 불리는 proteoglycan, fibronectin 등으로 구성되어 있다[8, 33]. 자외선과 활성산소는 콜라겐의 분해 및 엘라스틴의 탄력을 감소시켜 피부건조 및 주름을 생기게 하며 collagen감소에 원인이 되는 것은 진피층 내 기질금속 단백질 분해효소(matrix-metalloproteinase, MMP)의 작용이며 자외선에 의해 활성화된다[15]. MMPs는 세포외 기질의 재구성에 관여하는 Zn 의존성 펩티드 내부 가수분해효소(endopeptidase)로서 피부세포사멸, 피부궤양, 종양 침입 및 전이에 관여한다[10]. MMPs 중에서도 MMP-1은 세포 외 기질의 대부분을 이루고 있는 제 1형 콜라겐(type Ⅰ collagen)과 제 3형 콜라겐(type Ⅲ collagen)을 분해하며 자외선에 손상된 피부에서 MMPs발현 증가는 콜라겐 다발의 분절, 분산, 무질서화를 유발하는 것을 확인할 수 있다[14, 20]. 최근 여러 합성물질에 의한 피부 자극을 줄이기 위해 천연식물 소재로부터 얻어진 비타민 E, flavonoids, phenolic acid, carotenoid 등의 항산화, 항주름, 미백 등의 기능을 가진 기능성 화장품소재에 많은 관심이 집중되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 천연소재인 우절 에탄올추출물의 미백과 주름개선에 관여하는 효소 및 세포실험을 실시하여 그 효능을 입증하고 기능성화장품 미용 소재로서의 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 추출

본 실험에서 사용한 우절은 경남 창원시 의창구 동읍 무성리에서 2017년 3월에 채취한 후, 24시간 건조하여 부위별로 밀봉한 시료를 ㈜위드팜으로부터 제공받았다. 시료의 추출과정은 다음과 같다. 연근의 마디부분을 분리하여 우절(NRN)로 표기하고 건조, 파쇄한 후 95% 에탄올을 용매로 사용하여 시료중량의 10배 양을 첨가하여 실온에서 24 hr 동안 침지하고 상층액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 개별 시료를 원심분리 및 여과한 다음, rotary vacuum evaporator (HS-10SP; Hahnshin S&T, Korea)를 사용하여 농축한 후 동결건조기(FD5525; Ilshin BioBase, Korea)로 건조하였다. 표본시료(DCS-20103)는 대구한의대학교 피부면역약리실험실에 보관되어 있다.

세포배양

실험에 사용된 세포주 B16F10 mouse melanoma cell 및 CCD 986sk human fibroblast cell은 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS; Introgen Therapeutics, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, USA)을 100 μg/ml의 농도로 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2 incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다.

시약 및 재료

세포 독성을 확인하기 위해 사용한 3-[4,5-dimethylthiazol]2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), 항주름 실험에 사용된 Collagenase from *Clostridium histolyticum*은 Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, USA)에서 구입하였고, ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 분석하였다. 0.4% trypan blue stain, tyrosine, L-DOPA, Arbutin, griess reagent는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 단백질정량 시약 RIPA buffer는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 1차 항체 mouse anti-TRP-1, anti-TRP-2, goat anti-tyrosinase와 2차 항체 mouse-anti-goat IgG, rabbit-anti-mouse IgG 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. Western bolt의 band 결과 확인을 위한 기기는 EZ-Capture MG (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

Collagenase 저해활성 측정

반응구는 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM $CaCl_2$를 첨가하여 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/ml)를 녹인 기질액 0.25 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/ml) 0.15 ml를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 6% citric acid 0.5 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 ml를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 우절 에탄올추출물의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

세포독성 측정

B16F10 세포 및 CCD 986sk 세포는 96 well plate에 well당 0.5×10^5 세포로 180 μl씩 분주하고, 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24 hr 동안 배양하였다. 배양 후 우절 에탄올추출물의 최종 농도가 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/ml가 되도록 각각 20 μl씩 첨가한 후 24 hr 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 배양 후 각 well에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 20 μl를 첨가하여 4 hr 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide와 에

탄올을 1:1로 섞은 용액을 각 well당 150 µl씩 첨가하여 실온에서 30 min 동안 반응시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율 측정은 시료용액의 첨가군와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Cellular tyrosinase 저해율 측정

B16F10 세포를 6 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 접종하고 24 hr 안정화 시킨 후 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) 200 nM을 control군을 제외한 자극군과 시료처리군에 적용하였다. 1시간 후 각 well에 우절 에탄올추출물 (6.25, 12.5, 25) µg/ml 농도를 48 hr 동안 처리하였다. Phosphate buffered saline (PBS; Gibco, NY, U.S.A)로 2회 세척한 후 각 well에 lysis buffer (1% triton X-100, 0.1 M sodium phosphate buffer, 50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 용출시키고 13,500× g, 4℃, 30 min 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2 mg/ml 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160 µl에 효소용액 40 µl를 가하고 37℃에서 1hr 가온하고 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정한 후 억제율을 계산하였다.

Melanin contents 측정

B16F10 세포를 6 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 접종하고 24 hr 안정화 시킨 후 α-MSH를 200 nM을 control군을 제외한 자극군과 시료 처리군에 적용하였다. 1시간 후 각 well에 우절 에탄올추출물 (6.25, 12.5, 25) µg/ml 농도를 48 hr 동안 처리하였다. 처리 후 PBS로 2회 세척한 후 13,500x g, 4℃, 30 min 원심 분리하여 상층액을 버리고 침전물에 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Duksan, Korea)가 첨가된 1N NaOH 용액 150 µl를 첨가하고 60℃에서 1 hr 동안 용해하였으며 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

Procollagen type I C-peptide 측정

CCD-986sk세포에 시료를 농도 별로 처리했을 때 pro-collagen type I의 합성양을 측정하기 위해 96-well plate에 각 well당 1×10^4 cells/well 세포가 되도록 분주한 후 24 hr 동안 안정화시켰다. 이후, 배양된 배지를 제거하고 우절 에탄올추출물을 처리한 후 48 hr 동안 배양하였다. 각 well로부터 상등액을 회수하여 procollagen Type-I C-Peptide EIA kit (Takara-Bio Inc.) 의 각 well에 첨가한 후, 제조사의 방법에 따라 procollagen type I의 총 양을 측정하였다.

MMP-1 저해활성 측정

96 well plate에 각 well당 CCD 986sk 세포를 1×10^5 cells/well 되도록 분주한 후 24 hr 동안 안정화시켰다. 이 후, 배양된 배지를 제거하고 PBS을 첨가한 다음 자외선을 조사하고 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF-α를 10 ng/ml의 농도로 첨가하고 시료를 농도 별로 처리한 후 48 hr 동안 배양하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며 MMP-1 biotrack activity assay kit (Amersham Bioscience, USA)을 이용하여 측정하였다.

Western Blot을 이용한 단백질의 발현 측정

우절 에탄올추출물의 미백관련 인자인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 cell line (B16F10)을 6-well에 1×10^5 cells/well에 되도록 분주하고 24 hr 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 각 well에 시료를 48 hr 동안 처리한 뒤 PBS로 2번 세척해주었다. Lysis buffer를 이용하여 세포를 용해시키고, 4℃, 13,500 × g, 20 min 동안 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 20 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동 하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1hr blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. tyrosinase, TRP-1, TRP-2 각각의 1차 항체를 1:500으로 희석하여 4℃에서 over night 동안 반응시킨 다음, 다시 10 min 간격으로 TBST로 3회 washing하고 mouse anti-rabbit IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 실온에서 1 hr 동안 붙이고, 3회 세척 후 EZ-Capture MG (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량을 수행하였다.

통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software package (Version 22.0; IBM, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)를 이용하여 유의성을 확인한 후, $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test 및 t-test를 이용하여 분석하였다

결과 및 고찰

Collagenase 저해활성

Collagen은 세포기질 외 진피를 70% 이상 구성하여 피부를 지탱하고 탄력 및 보습 기능을 하는 것으로 알려져 있다[24]. 그러나 자연 노화에 따른 세포 활성의 감소 등의 내적인 요인에 의해 생성이 감소되고, 여러 가지 유해 환경에 의한 스트레스, 태양 광선에 의한 활성 산소종의 증가와 같이 외적요인에 의해 콜라겐 분해가 가속화되어 피부 기질이 파괴되면서 주름이 생성된다[35]. 우절 에탄올추출물의 주름생성 억제능을 알아보기 위해 collagenase 저해활성효과를 확인한 결과는 Fig.

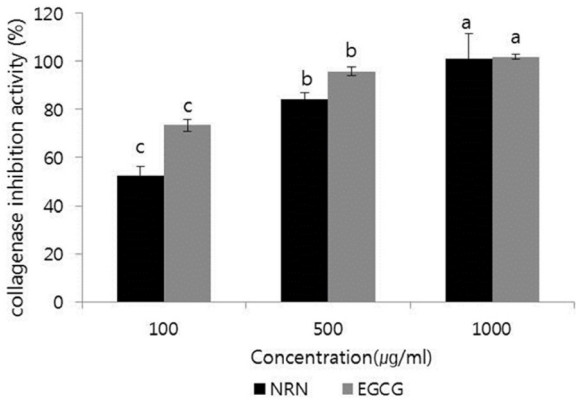

Fig. 1. Collagenase inhibition activity (%) of dependent on concentration from NRN. NRN; Nelumbinis Rhizomatis Nodus, EGCG; Epigallocatechin gallate. Results are expressed as means ± S.D. of triplicate data. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different at $p<0.05$.

1과 같다. 우절 에탄올추출물과, 대조군 epigallocatechin gallate (EGCG, Sigma-Aldrich Co.)는 100 μg/ml 농도에서 53.4, 73.4%, 500 μg/ml 농도에서 84.0, 95.8%, 1,000 μg/ml 농도에서 101.0, 101.9%의 collagenase 저해활성능을 나타내었으며 1,000 μg/ml 농도에서는 주름완화 물질로 알려져 있는 대조군과 유사한 효능을 나타내었다

우절추출물의 세포 생존율 측정

분자생물학적 검증을 위해 실험 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인하였다. Melanoma B16F10 cell과 섬유아세포 CCD-986sk cell에 대해 우절 에탄올추출물의 세포독성을 MTT assay를 평가하였다(Fig. 2). 실험에 사용될 유효농도 범위를 결정하기 위해 시료를 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/ml의 농도로 처리한 결과, B16F10 cell 내 25 μg/ml 농도에서 83.2%의 생존율이 CCD-986sk cell 에서는 25 μg/ml에서 87.1%의 생존율을 보였으며 두가지 세포주에서 50 μg/ml 농도에서 80% 이하로 세포독성을 나타낸 결과를 토대로 향후 우절 에탄올추출물의 미백, 주름완화 실험의 시료농도를 25 μg/ml 이내의 범위에서 진행하였다.

Cellular tyrosinase 및 melanin 생합성 저해율

최근 천연물의 melanin 과잉 생성을 억제하기 위해 미백 메커니즘을 밝혀내는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며 효능이 있는 것으로 알려진 tyrosinase의 저해제는 hydroquinone, arbutin 및 kojic acid 등이 있다[2]. 식약처 미백 고시원료로 사용되는 arbutin은 tyrosinase 활성 부위의 copper를 chelating하여 tyrosine에서 DOPA로 DOPA에서 DOPA quinone으로 진행되는 과정을 저해하는 것으로 밝혀졌다[11]. B16F10 cell을 이용한 우절 에탄올추출물의 미백활성을 분석한 결과, 세포 내 tyrosinase 저해활성 측정 결과는 α-MSH 자극군에 의해 증가된 tyrosinase 대비 우절 에탄올추출물을 농도별 (6.25, 12.5, 25 μg/ml)로 처리하였을 때 각 12.2, 25.5, 30.8%의 tyrosinase 활성이 저해 되는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 천연물 미백소재로 알려진 차전초 뿌리추출물의 tyrosinase 저해능은 100 μg/ml 에서 30%를 나타내었으며[37], 톳 분획물은 25 μg/ml에서 22.4%의 tyrosinase 저해능을 나타내어[13] 우절 에탄올추출물의 효능이 더 우수함을 확인하였다. 미백 화장품은 제형의 안정성을 위해 우수한 화학 소재 개발도 중요하지만 인체에 사용 한다는 점에서 안전성 측면이 매우 중요하다. 이러한 이유로 최근 합성 미백제와 약물에 대한 부작용의 대두와 함께 천연물질을 이용한 연구가 활발하다[22]. 우절 에탄올추출물을 처리한 melanoma cell내melanin 생합성량을 측정한 결과, 25 μg/ml의 농도에서 멜라닌의 합성을 28.3% 저해하였으며 동일농도에서 대조군 arbutin의 저해율인 12.2%와 대비하여 효능이 우수함을 나타내었다(Fig. 3B). 이러한 결과로 보아 우절 에탄올추출물은 B16F10 세포 내 tyrosinase 활성을 저해시킴으로써 멜라닌 생합성 저해에 영향을 주는 것으

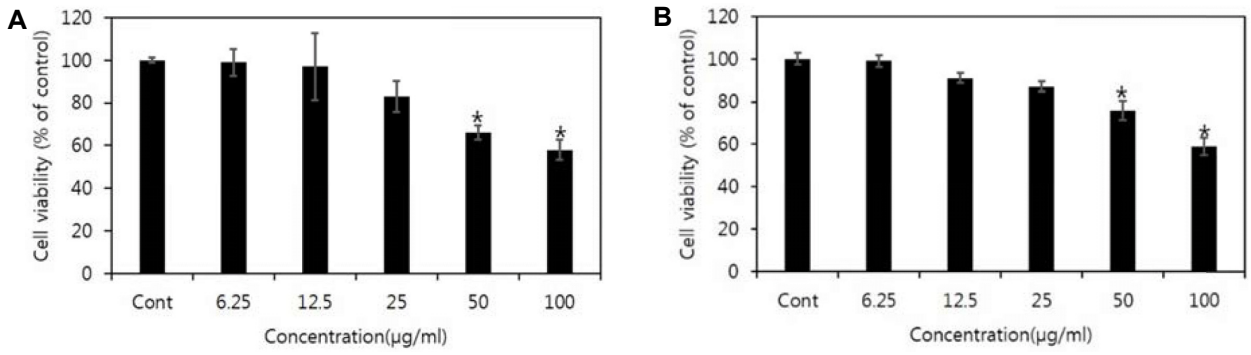

Fig. 2. Cell viability of NRN on treated B16F10 cells (A) and CCD-986sk cells (B). B16F10 cells were treated with various concentrations (6.25-100 μg/ml) of NRN. CCD-986sk cells were treated with various concentrations (6.25-100 μg/ml) of NRN. Cell viability was measured using the MTT assay. NRN; Nelumbinis Rhizomatis Nodus. The results are presented as mean±standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. *$p<0.05$ compared with control.

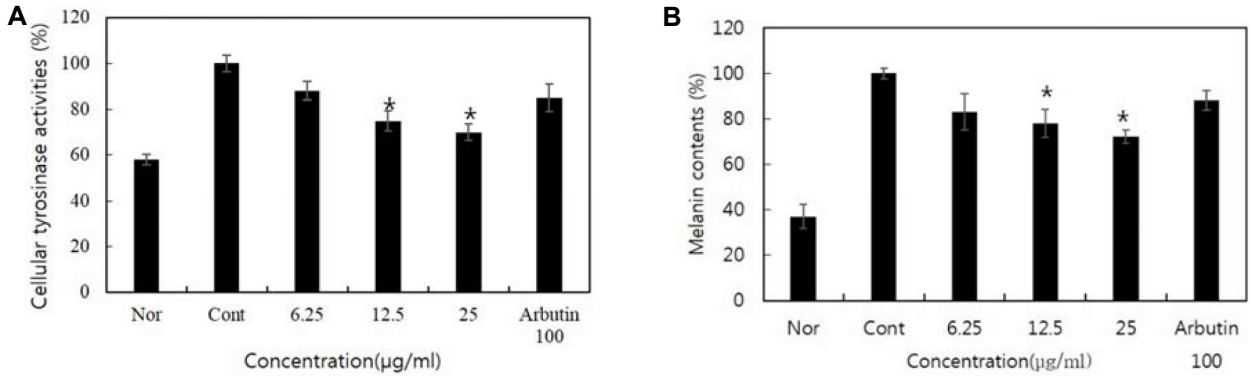

Fig. 3. Effect NRN on inhibition of intra cellular tyrosinase inhibition rate (A) and melanin synthesis rate (B) NRN; Nelumbinis Rhizomatis Nodus. The results are presented as mean ± standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. *$p < 0.05$, compared with control. Nor; normal group (α-MSH-untreated group, Cont; control group (α-MSH-treated group), Positive control; Arbutin.

로 확인되었으며 천연물 미백제로서 좋은 결과를 나타내었다.

B16F10에서의 미백관련 인자들의 단백질 발현량 측정

우절 에탄올추출물이 α-MSH 자극에 의해 유도된 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 억제하는 것을 확인하기 위하여 Western blot으로 미백 관련 전사인자인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현을 조사하였다. α-MSH는 tyrosinase의 활성을 자극시키고 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 TRP-1, TRP-2에 작용하여 eu-melanin을 합성하도록 유도한다[19]. 세포에 α-MSH를 단독처리한 경우에 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현은 현저히 증가 되었고 시료를 농도별(6.25, 12.5, 25 μg/ml)로 처리하였을 때 관련 단백질이 저해되는 것을 확인하였으며 TRP-2의 발현 저해가 가장 높게 나타났다. 이상의 결과로부터 우절 에탄올추출물은 멜라닌 생합성에 있어서 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2를 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 천연물의 미백활성능을 나타내는 선행연구에서 kaempferol, isorhamnetin, 8-hydroxygenistein (isoflavone)를 포함한 flavonoids 화합물은 mushroom tyrosinase 저해활성과 anti-melanogenic 활성을 갖는 것으로 보고되고 있으며[32] 우절의 미백활성 능력 또한 flavonoids 화합물로 인해 기여된 것으로 사료된다. 현재 화장품 미백제로 함유되는 물질은 멜라닌 세포 내에서 멜라닌 색소를 형성과정에 작용하여 멜라닌 색소의 과다발현을 억제하는 물질과 각질세포를 벗겨내어 침착된 멜라닌 색소를 제거하는 물질로 나뉘게 되는데 후자의 경우 사용되는 물질로는 Alpha hydroxy acid (AHA), Beta hydroxy acid (BHA), Retinoid등이 있다. 최근 피부안전성 및 제형개발에 있어 안정성이 높은 AHA가 가장 각광을 받고 있으나 그 함유량이 5% 이상이 되어야 피부가 약간 벗겨 지는 효과가 있어 피부자극이 있는 단점을 가지고 있다[4]. 현재 개발 동향은 멜라노사이트 내에서 멜라닌 생성의 억제, 멜라노사이트 자극물질의 조절, 멜라닌 배설을 촉진하는 방향의 연구가 활발하며 우절 추출물의 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현 저해능은 멜라닌 생성을 촉진하는 인자를 조절함으로써 미백제제로 우수한 천연물임을 입증하였다.

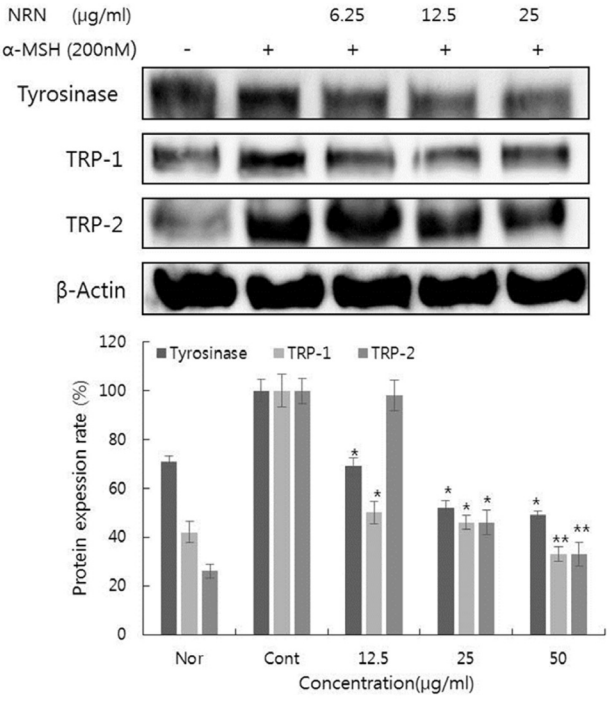

Fig. 4. Inhibitory effects of NRN on whitening related protein expression in B16F10 cells. B16F10 cells (1×10^5 / well) were treated with 200 nM α-MSH and NRN except Nor group. NRN; Nelumbinis Rhizomatis Nodus. The results are presented as mean±standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. *$p<0.05$, **$p<0.01$ compared with control. α-MSH; α-Melanocyte-stimulating hormone, Nor; normal group (α-MSH-untreated group), Cont; control group (α-MSH-treated group).

Procollagen type I C-peptide 측정

피부의 진피는 전체 피부 부피의 대부분을 차지하며, 유연성, 탄력성, 장력과 같은 피부의 특성을 반영하고 있으며 진피의 콜라겐 생합성 및 분해는 피부노화, 상처재생 과정에서 중요하게 관여하고 있다[36]. 진피의 90%를 차지하고 있는 collagen은 type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ가 있으며, 세포 내에서 pro-collagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포 외로 분비되어 collagen 섬유로 중합된다[18]. Collagen 중 80%는 Type-I collagen 이며 자외선에 의해 down-regulation 되고 분해에는 MMPs단백질이 관여한다[16]. Procollagen은 collagen의 전구체로서 propeptide라 불리는 peptide sequence를 가지고 있으며 소포체내에서 collagen 생성을 관여하고 있어 collagen 생합성의 양은 propeptide의 양을 측정함으로써 그 생합성 효과를 유추할 수 있다[17]. 우절 에탄올추출물의 procollagen 생합성량을 확인한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과, 우절 에탄올추출물의 경우 25 μg/ml의 농도에서 UVB (20 mJ/cm^2)를 조사한 control 군에 대비하여 유의성 있게 pro-collagen 합성을 나타내었다. 콜라겐 분해의 자극원으로 사용된 UVB (20 mJ/cm^2) 조사는 세포 내 활성 산소종에 의해 피부내의 MMPs 활성을 증가시켜 진피층 내의 콜라겐 등과 같은 세포 외 기질들의 붕괴에 영향을 미치며, 결국MMPs의 증가는 자연노화 대비 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다[26]. 따라서, 일상적으로 자외선에 노출되어 있는 현대인들의 피부 노화를 완화시키기 위해서는 자외선에 대항하여 MMPs 조절을 통한 콜라겐 합성을 촉진 할 수 있는 핵심 소재를 찾는 것이 중요하다고 볼 수 있다.

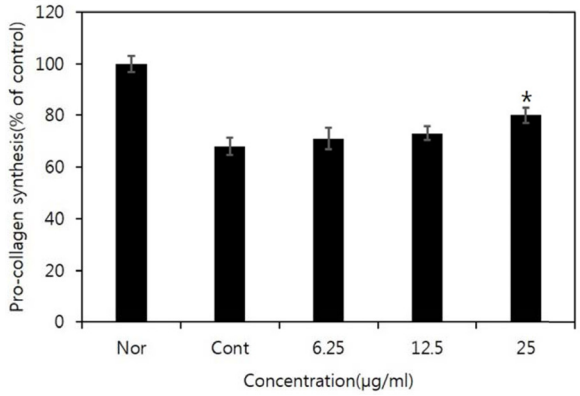

Fig. 5. Effect of node NRN in the expression of pro-collagen synthesis. CCD-986sk cells were incubated for 24 hr in DMEM medium containing 10% FBS, were treated with various concentrations of NRN for 48 hr. The supernatant was collected from each well and type I procollagen was determined by EIA kit. The values shown represent mean ± SEM of three different assays. *p<0.05 compared with absence of NRN. NRN; Nelumbinis Rhizomatis Nodus, Nor; normal (not UVB), Cont; control (UVB, not treated NRN)

MMP-1 저해활성 측정

MMPs는 type I collagen을 분해함으로써 collagen의 합성을 억제하는 분해인자로 피부노화를 일으키는 과정에서 중요한 역할을 한다[6]. MMP는 gelatinase, collagenase, stromelysin 및 막결합성 MMP군으로 분류 되며 최근 연구에 의하면 인간에서 26가지의 MMPs가 존재한다고 보고되었다[21]. MMP 중, MMP-1은 섬유성 콜라겐 1형과 3형의 콜라겐을 1차로 분해하며 MMP-2와 MMP-9은 gelatinase군으로서 MMP-1에 의해 분해된 콜라겐 조각들을 더 잘게 분해한다[28]. 그러므로, MMP-1 활성의 억제는 곧 collagen 분해를 감소시켜 피부 탄력의 유지 및 주름 형성을 억제 할 수 있으리라 판단되어 시료의MMP-1 저해활성을 평가를 측정하였다(Fig. 6). TNF-α 를 처리하지 않은 군과 처리한 군은 각각 71.1, 100.0%의 MMP-1을 생산하여 TNF-α를 처리함으로써 MMP-1 양이 활성화됨을 확인 할 수 있었다. 우절 에탄올추출물의 25 μg/ml의 농도에서 18.3%의 MMP-1의 발현 저해효과를 나타내어 항주름 소재로의 가능성을 나타내었다. 본 연구에서 연근의 마디부분인 우절의 에탄올추출물의 피부개선 효과를 확인하기 위해 미백 및 주름완화의 기능 관점에서 연구한 결과 미백효과를 측정하기 위해 cellular tyrosinase 저해활성 억제 melanin 생합성의 저해 및 관련 멜라닌생성 인자 들의 발현을 억제하는것을 확인하였고, 주름완화 기능을 알아보기 위해 collagen 합성 및 연관 단백질 분석을 실시하여 우절의 가능성을 확인하였다. 이러한 결과는 우절 추출물이 피부 미백과 피부노화억제에 효과적인 화장품, 미용 소재로 활용가능 할 것으로 판단된다.

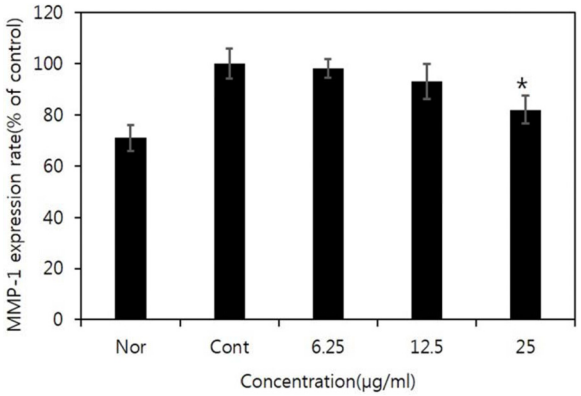

Fig. 6. MMP-1 inhibition rate of NRN on fibroblast cell (CCD-986sk). The cells were treated with various concentrations of NRN for 48 hr. The contents of MMP-1 in culture media was determined by the MMP-1 ELISA kit as detailed under the materials and methods. NRN; Nelumbinis Rhizomatis Nodus. The data represent the mean ± SD of three separate experiments (Significant as compared to control. *p<0.05). Nor; normal (not UVB), Cont; control (UVB, not treated NRN).

감사의 글

본 연구는 2016년도 산업통상자원부 바이오테라피 산업기반구축사업(과제번호 N0001805)에 의해 수행되었음.

References

1. Kang, M. C., Lee, J. Y., Lee, J. A., Han, J. H., Kim, B. S. and Kim, G. O. 2008. Antioxidant effects and melanin inhibitory effect of natural Pimpinella ko marovii extracts in Jeju island. *J. KSBB.* **23**, 77-82.
2. Kim, E. G. and Kim, D. M. 2008. Extract of Nigella glandulifera Freyn et Sinthaving whitening activity and the cosmetic composition comprising thereof. *Kor. Patent.* 10-0850686.
3. Kim, J. S., Cho, S. M., Kim, J. H. and Lee, M. W. 2001. Phenolic compounds from the Node of Lotus Rhizome (Nelumbo nucifera Gaertn). *J. Pharm. Soc.* **45**, 599-603.
4. Kim, K. S., Shin, M. K. and Kim, H. Y. 2008. Nutritional composition and antioxidant activity of the white Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn) Leaf. *J. East. Asian. Soc. Dietary. Life.* **18**, 499-506.
5. Kim, N. M., Koo, B. S., Lee, S. K., Hwang, E. I., So, S. H. and Do, J. H. 2007. Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and mmp-1 activity in human dermal fibroblast. *J. Ginseng. Res.* **31**, 86-92
6. Kim, S. H., Yong, H. J., Shin, C. and Ko, S. G. 2008. Research of traditional herbal medicines for anti-aging, inhibition effect of wrinkle and whitening effect in the skin. *Kor. J. Ori. Physiol. Pathol.* **22**, 691-698.
7. Bae, M. J., Kim, S. J., Ye, E. J., Nam, H. S. and Park, E. M. 2008. Study on the chemical composition of Lotus Root and functional evaluation of fermented Lotus root drink. *J. Kor. Soc. Food Cult.* **23**, 222-227.
8. Bailly, C., Drèze, S., Asselineau, D., Nusgens, B., Lapière, C. and Darmon, M. 1990. Retinoic acid inhibits the production of collagenase by human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **94**, 47-51.
9. Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T. J., Bille, K., Fisher, D. E., Orton ne, J. P. and Ballotti, R. 1998. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell. Biol.* **142**, 827-835.
10. Birkedal, H. H. 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 728-735.
11. Branza-Nichita, N., Petrescu, A. J., Dwek, R. A., Wormald, M. R., Platt, F. M. and Petrescu, S. M. 1999. Tyrosinase folding and copper loading *in vivo*: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 720-725.
12. Cabanes, J., Chazarra, S. and Garcia-Carmona, F. 1994. A Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Sci.* **46**, 982.
13. Choi, E. O., Kim, H. S., Han, M. H., Choi, Y. H., Park, C., Kim, B. W. and Hwang, H. J. 2013. Effects of Hizikia fusiforme fractions on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. *J. Life Sci.* **23**, 1495-1500.
14. Choi, M. S., Yoo, M. S., Son, D. J., Jung, H. Y., Lee, S. H., Jung, J. K., Lee, B. C., Yun, Y. P., Pyo, H. B. and Hong, J. T. 2007. Increase of collagen synthesis by obovatol through stimulation of the TGF-beta signaling and inhibition of matrix metalloproteinase in UVB-irradiated human fibroblast. *J. Dermatol. Sci.* **46**, 127-137.
15. Chung, J. H., Seo, J. Y., Choi, H. R., Lee, M. K., Choon, S. Y., Rhie, G. E., Cho, K. H., Kim, K. H., Park, K. C. and Eun, H. C. 2001. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin *in vivo*. *J. Dermatol. Sci.* **117**, 218-1224.
16. Davias, G. E. and Saunder, W. B. 2006. Molecular balance of capillary tube formation versus regression in wound repair: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **11**, 44-56.
17. Dumont, S., Cattuzzato, L., Trouve, G., Chevrot, N. and Stoltz, C. 2010. Two new lipoaminoacids with complementary modes of action: new prospects to fight out against skin aging. *Int. J. Cosmet. Sci.* **32**, 9-27.
18. Fish,r G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J. J. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1419-1429.
19. Fuller, B. B. and Meyskens, F. L. 1981. Endocrine responsiveness in human melanocyte and melanoma cell in culture. *Natl. Cancer. Inst.* **66**, 799-802.
20. Gilchrest, B. A. 1996. A review of skin ageing and its medical therapy. *Br. J. Dermatol.* **135**, 867-875.
21. Greenlee, K. J., Werb, Z. and Kheradmand, F. 2007. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol. Rev.* **87**, 69-98.
22. Han, J. S. and Yi, D. H. 2012. Effects of pine needles fermentation extracts on antioxidant activity and inhibition of melanin synthesis. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **10**, 619-624.
23. Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Michell, D. L. 1997. Melanin: a two edged sword. *Pigment. Cell. Res.* **10**, 158-161.
24. jang, M. J., Jun, D. H., Kim, S, H., Han, S. L. and Lee, J. T. 2013. Anti-wrinkle effect of chestnut Leaf. *J. Life Sci.* **23**, 751-756.
25. Lee, J. J., Ha, J. O. and Lee, M. Y. 2007. Antioxidaive activity of Lotu s Root (Nelumbo nucifera G.) extracts. *J. Life Sci.* **17**, 1237-1243.
26. Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A. and García-Borrón, J. C. 1998. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **255**, 139-146.
27. Mehta, N. R., Patal, E. P., Patani, P. V. and Shah, B. 2013. Nelumbo Nucifera (Lotus): A review on ethanobotany, phytochemistry and pharmacology. Indian. *J. Pharm. Biol. Res.* **4.** 152-167.
28. Moon, H. J., Lee, S. R., Shim, S. N., Jeong, S. H., Stonik, V. A., Rasskazov, V. A., Zvyagintseva, T. and Lee, Y. H. 2008. Fucoidan inhibits uvb-induced mmp-1 expression in

human skin fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 284-289.
29. Park, H. Y., Kosmadaki, M., Yaar, M. and Gilchrest, B. A. 2009. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *J. Cell. Mol. Life. Sci.* **66**, 1493-1506.
30. Park, S. Y., Hwang, T. Y., Kim, J. H. and Moon, K. D. 2001. Quality changes of minimally processed lotus root (*Nelumbo nucifer*a) with browning inhibitors. *Kor. J. Postharvest. Sci. Technol.* **8**, 164-168.
31. Seiberg, M. 2001. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *J. Pigment Cell Res.* **14**, 236-242.
32. Si, Y. X., Wang Z. J., Park, D., Jeong, H. O., Ye, S., Chung, H. Y., Yang, J. M., Yin, S. J., Yin, S. J. and Qian, G. Y. 2012. Effects of isorhamnetin on tyrosinase: inhibition kinetics and computational simulation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1091- 1097.
33. Sonoki, A., Okano, Y. and Yoshitake, Y. 2018. Dermal fibroblasts can activate matrix metalloproteinase-1 independent of keratinocytes via plasmin in a 3D collagen model. *Exp. Dermatol.* **27**, 520-525.
34. Tada, A., Suzuki, I., Im, S., Davis, M. B., Cornelius, J., Babcock, G., Nordlund, J. J. and Abdel-Malek, Z. A. 1998. Endothelin-1 is a paracrin e growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell. Growth. Differ.* **9**, 575-584.
35. Wulf, H. C., Sandby-Moller, J., Kobayasi, T. and Gniadeck, R. 2004. Skin aging and natural photoprotection. *Micron* **35**, 185-191.
36. Yoo, J. M., Kang, Y. J., Pyo, H. B., Choung, E. S., Park, S. Y., Choi, J. H., Han, G. J., Lee, C. H. and Kim, T. J. 2010. Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast. *J. Life Sci.* **20**, 1838-1843.
37. Yoon, M. Y. and Han, Y. S. 2014. Effect of anti-oxidant activity and the skin whitening action on *Plantago asiatica* L. root extract. *KSBB. J.* **29**, 199-204.

초록 : 우절 에탄올추출물의 미백활성능과 주름저해 효능평가

장영아[1] · 염보슬[1] · 김세기[2*] · 이진태[1*]
([1]대구한의대학교 화장품약리학과, [2]대구가톨릭대학교 제약공학과)

본 연구는 화장품 소재로서 우절 에탄올추출물의 가능성을 확인하기 위한 것이다. 이를 위해 우리는 연근의 마디부분을 70%에탄올로 추출하여 사용하였으며 미백효능 및 주름개선 효과에 대한 생물학적 활성 평가를 수행하였다. 시료의 미백활성을 알아보기 위해 멜라닌세포(B16F10 cells)의 MTT assay를 이용한 샘플의 독성평가와 멜라닌 생성에 영향을 주는 관련 단백질의 발현량을 확인하였다. 시료의 주름활성억제 평가를 위해 collagenase inhibition assay를 수행하였다. 또한 UVB로 유도된 섬유아세포(CCD-986sk cells)의 MTT assay를 이용한 샘플의 독성평가와 matrix metalloprotease (MMP-1) inhibition 및 procollagen synthesis를 평가하였다. 미백활성 평가를 알아보기 위한 western bolt 결과, 멜라닌 생성과 관련된 두 단백질 Tyrosinase related protein-1 (TRP-1, Tyrosinase related protein-2 TRP-2)의 합성이 농도의존적으로 감소됨을 나타내었다. 게다가 우절 에탄올추출물의 collagenase inhibiion 실험의 결과, 500 μg/ml의 농도에서 대조군인 EGCG와 효능이 비슷한 80% 이상의 효과를 나타내었다. Procollagen synthesis 결과 UVB 자극군에 의해 콜라겐 합성은 68.8%로 감소되었으며 시료의 25 μg/ml의 농도에서 80.2%의 콜라겐 합성에 회복능을 보였다. MMP-1 inhibition 실험결과는 25 μg/ml 농도에서 20.2%의 저해능을 나타내었다. 실험 결과는 NRN의 미백 및 주름 억제 효과를 검증하고, 향후 안전한 천연 화장품 재료로 사용될 수 있음을 확인했다.