

노근추출물의 미백과 주름개선 및 보습효능 평가

구현정¹, 하창우², 김성혁³, 장소희³, 임효선⁴, 김윤규⁴, 손은화^{2,3*}

¹한국농수산대학 특용작물학과, ²강원대학교 보건과학대학, ³강원대학교 바이오헬스융합학과, ⁴(주)한국생명과학연구소

Evaluation of Whitening, Anti-wrinkle, and Moisturizing Effects of *Phragmitis rhizoma*

Hyun-Jung Koo¹, Chang-Woo Ha², Sung-Hyeok Kim³, So-Hee Jang³, Hyo-Sun Lim⁴,
Youn-Kyu Kim⁴, Eun-Hwa Sohn^{2,3*}

¹Department of Medicinal and Industrial Crops, Korea National College of Agriculture and Fisheries

²College of Health Sciences, Kangwon National University

³Department of Bio-Health Convergence, Kangwon National University

⁴Korea Research Institute Bio Science Co., Ltd.

요약 노근(*Phragmitis rhizoma*)은 갈대의 뿌리줄기를 말린 한약재로 열을 내리고 진액을 북돋는 청열약으로 알려져 있다. 본 연구는 노근을 피부에 적용하기 위하여 안전한 추출조건에서 미백, 주름개선 및 보습효능에 대한 효과 기전을 규명하고 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 제시하고자 하였다. 70 % EtOH로 추출한 노근추출물을 이용하여 피부층을 이루는 멜라닌형성세포, 진피섬유세포, 각질형성세포에 미치는 세포독성을 측정하였다. 노근추출물의 미백, 주름개선, 보습에 대한 효능성을 평가하고, 노근의 지표성분 *p*-coumaric acid 함량을 분석하였다. 실험결과 노근추출물은 236±0.2 mg/kg의 *p*-coumaric acid를 함유하였으며, 200 µg/ml 이하의 농도에서 멜라닌형성세포, 진피섬유아세포, 각질형성세포 모두의 피부구성세포에 독성을 나타내지 않았다. 미백, 주름개선, 보습의 효능성 평가 부분에서 노근추출물 25와 50 µg/ml은 14.24 %, 17.52 %로 멜라닌 생성을 억제하는 미백효과를 나타내었으며($p<0.01$), 진피섬유아세포의 콜라겐 분해효소 matrix metalloproteinase-1의 mRNA 발현과($p<0.01$), 엘라스타제 활성을 유의성 있게 감소시킴으로서 주름개선 효과를 나타내었다($p<0.05$). 또한, 노근추출물은 자외선B 노출에 의해 감소된 각질형성세포의 보습인자 hyaluronic acid synthase-2의 발현을 크게 회복하여 증가시킴으로써 보습효과를 보여주었다($p<0.01$). 이와 같은 결과는 70 % EtOH로 추출한 노근추출물이 안전한 범위에서 미백, 주름개선, 보습 효과의 기능성 화장품 원료로 개발될 수 있다는 가능성을 제시한다.

Abstract Nogeun (*Phragmitis rhizoma*) is a dried herbal medicine derived from the rhizomes of reeds. The present study was aimed at investigating the whitening, anti-wrinkle, and moisturizing effects of *P. rhizoma* extracts and their safety aspects and to suggest the potential for its development as a functional cosmetic material. The study results showed that the 70 % ethyl alcohol (EtOH) extract of *P. rhizoma* contained 236±0.2 mg/kg of *p*-coumaric acid, and exhibited no cytotoxic effect on all the skin cells tested including melanocytes, dermal fibroblasts, and keratinocytes at concentrations at or below 200 µg/ml. In the evaluation of whitening, anti-wrinkle, and moisturizing effects, 25 and 50 µg/ml of *P. rhizoma* inhibited melanin production by 14.24 % and 17.52 %, respectively ($p<0.01$). *P. rhizoma* also reduced the mRNA expression of matrix metalloproteinase-1 and collagenase and decreased the activity of elastase in dermal fibroblasts. Additionally, *P. rhizoma* significantly increased the reduction of hyaluronic acid synthase-2, a moisturizing factor induced by UVB exposure in keratinocytes. These results suggest that the 70 % EtOH extract of *P. rhizoma* can be developed as a functional cosmetic material due to its skin whitening, anti-wrinkle, and moisturizing properties.

Keywords : *Phragmitis rhizoma*, Cosmetics, Melanogenesis, Wrinkle, Moisture

본 논문은 해양수산부 연구과제로 수행되었음.

*Corresponding Author : Eun-Hwa Sohn(Kangwon National Univ.)

email: ehson@kangwon.ac.kr

Received August 2, 2021

Revised August 26, 2021

Accepted November 5, 2021

Published November 30, 2021

1. 서론

갈대(*Phragmites communis* Trinius, Reed)는 바다근처, 강가, 호수, 습지에서 군락(群落)을 이루어 물속에 뿌리가 있고, 그 일부가 물위에 나와 있는 다년초 정수(挺水) 식물로 한국, 중국 그리고 러시아 등에 널리 분포하고 있다[1]. 갈대는 부위에 따라 뿌리줄기는 노근(蘆根), 줄기는 노경(蘆莖)이라고, 잎은 노엽(蘆葉), 꽃은 노화(蘆花)라고 부르기도 한다.

갈대의 뿌리줄기 근경을 말린 노근(*Phragmitis rhizoma*)은 전통적으로 폐를 맑게 하고 구토를 완화하며 생선과 계를 먹고 중독된 것을 풀어 주는 어해독(魚蟹毒)에 탁월한 효과가 있으며, 약성(藥性)이 차가워 열을 내리고 진액을 만드는 효과가 있어 청열약으로 처방되어 왔다[2]. 최근 약리학적 연구에서 노근추출물은 항당뇨, 항염증, 간보호 효능이 있으며, 유전 독성이 발견되지 않는다고 보고됨으로써 비교적 안전한 건강기능성 식품소재로 제시된 바 있다[3,4]. 노근에 함유된 생리활성성분에 대한 연구에서는 노근추출물에서 분리한 stigmasta-3,5-dien-7-one이 대식세포의 염증 유발 과정에서 NF- κ B(nuclear factor kappa B)의 활성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다[5]. 노근추출물의 또 다른 유효성분 β -sitosterol과 *p*-coumaric acid는 항고지혈 효과가 있다고 보고하였는데, 고지혈증 동물모델 쥐의 혈중 triglyceride 수치를 유의적으로 낮추었다고 보고하였다[6]. 이와 같이 노근추출물의 다양한 효능 연구에도 불구하고 피부 적용에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 갈대의 어린잎 부위에서 항산화 효과와 미백 효과를 보고한 바 있으며[7], *p*-coumaric acid가 melanogenesis 색소침착에 대한 억제 효과가 있어 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai)와 같은 *p*-coumaric acid 함유 식물이 미백효과가 있을 가능성이 제시된 바 있다[8,9].

피부는 표피(epidermis)와 진피(dermis) 그리고 피하조직(hypodermis)등 3개의 층으로 이루어져 있다. 피부는 자외선 노출과 같은 외부적 자극에 대하여 가장 역동적으로 반응하는데 광노화에 의한 외인성 요인과 시간적 흐름에 의한 내인성 요인에 의해 노화(aging) 과정을 거치게 된다. 자외선 노출에 의한 활성산소종의 생성은 세포내 과산화반응을 일으켜 피부층 구조에 물리적인 변화를 초래하고 멜라닌 합성을 촉진하여 색소를 침착시키고[10,11], 진피층의 유연성, 탄력성 및 결합조직 생성 능력을 약화함으로써 주름을 발생시키고 피부 건조 현상

을 유발한다. 이와 같이 다양한 자극에 나타나는 피부의 복합적인 변화는 피부층을 이루는 멜라닌형성세포, 진피 섬유아세포, 각질형성세포의 기능 변화에 따라 색소침착, 주름발생, 피부건조증을 일으키며, 지속될 경우 아토피, 건선, 피부염 등으로 진행될 수 있다[12].

본 연구자는 지난 연구에서 100 % EtOH 노근추출물의 미백과 주름에 관한 피부개선 효능을 보고한 바 있다[13]. 그러나, 100 % EtOH 노근추출물은 200 μ g/ml 이상에서 멜라닌형성세포에 독성이 나타나기 시작했다. 이에 본 연구에서는 노근추출물을 피부세포에 더 안전한 조건에서 기능성 소재로 개발하기 위하여 효능을 확보하고자 추출조건을 70 % EtOH로 조절하여 피부세포의 안전성을 확인하고 미백, 주름개선 및 보습효과에 대한 효능성을 확인하였다. 또한, 노근추출물 제조에 대한 품질 관리를 위하여 지표성분 *p*-coumaric acid 함량을 분석하여 70 % EtOH 노근추출물이 화장품 소재로 개발될 가능성을 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 노근추출물의 제조

노근(*P. rhizoma*) 건조 시료를 2018년 순천시 한약재 시장에서 구입한 후 (주)한국생명과학연구소에서 식물형태학적 검증을 거쳐 암소에 보관하였다. 노근추출물의 제조는 노근 10 g을 200 ml의 70 % EtOH과 혼합하고 60 $^{\circ}$ C의 수조에서 4시간 추출하였다. 추출물을 여과하고 여액을 감압농축기에 농축시킨 후 동결 건조하여 분말을 얻은 다음 4 $^{\circ}$ C 이하에 보관하면서 실험에 사용하였다. *p*-Coumaric acid의 함량을 비교 분석하기 위하여 100 % EtOH 노근추출물을 동일한 방법으로 제조하였다. 70 % EtOH 또는 100 % EtOH 노근추출물의 수율은 각각 4.1 % (w/w), 4.2 % (w/w)이었다.

2.2 세포주

멜라닌형성세포 B16F10(mouse melanoma)은 KCLB(Korean Cell Line Bank)에서, 인간진피섬유아세포 HDFs(human dermal fibroblast)는 Gibco에서, 인간각질형성세포 HaCaT(human keratinocyte)은 CLS(Cell Lines Service)에서 분양받아 실험에 사용하였다. B16F10, HDFs 및 HaCaT 세포는 모두 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)에 10

% fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 첨가한 배지를 사용하였다.

2.3 시약 및 재료

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)과 phosphate buffer saline(PBS)는 Welgene Inc.(Daegu, Korea)에서, fetal bovine serum(FBS)과 penicillin/streptomycin은 각각 GenDEPOT(Katy, TX, USA)과 Gibco(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 언급하지 않은 시약들은 모두 Sigma-Aldrich(St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2.4 HPLC 분석 조건 및 *p*-coumaric acid 함량 분석

70 % EtOH과 100 % EtOH 노근추출물에 대한 *p*-coumaric acid의 함량 분석의 비교는 Waters 600 HPLC(Milford, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. 각각의 동결 건조된 시료 1 mg에 메탄올 1 ml을 가하여 30 분 동안 초음파 처리와 함께 완전히 용해하고, 시료 20 µl를 HPLC에 주입하여 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다.

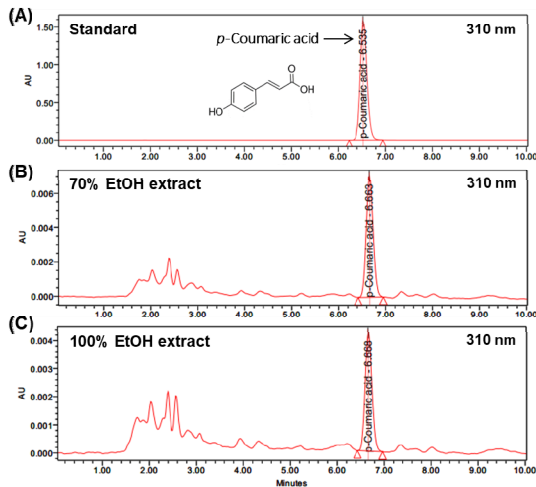


Fig. 1. HPLC analyses of (A) standard *p*-coumaric acid, (B) 70 % EtOH extract of *P. rhizoma*, and (C) 100 % EtOH extract of *P. rhizoma*.

이동상으로는 20 % acetonitrile(0.1 % trifluoroacetic acid)를 용매로 사용하였고, column은 VDSpher 100 C18-E(4.6 × 150 mm, 5 µm)를 이용

하여 흡광도 310 nm로 분석하였다. *p*-Coumaric acid의 retention time과 흡수 스펙트럼은 다음과 같다(Fig. 1).

2.5 세포 생존율 측정(MTT assay)

세포 생존율 측정은 Carmichael 등의 방법을 응용하여 실험하였다[14]. B16F10, HDFs 및 HaCaT 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well의 세포수를 부착한 후, 각 well에 농도별로 70 % EtOH 노근추출물을 첨가한 후 24시간 또는 48시간 후 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약(5 mg/ml)을 넣고, 4시간 동안 반응한 후 상등액을 제거하였다. 각 well에 형성된 formazan은 DMSO 200 µl를 첨가하여 녹이고, microplate reader VICTOR X3(PerkinElmer, Waltham, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군과 비교하여 흡광도의 백분율로 나타내었다.

2.6 멜라닌 생성 저해 활성 측정

멜라닌 함량 측정은 Hosoi의 방법[15]에 따라 B16F10 세포 2 × 10⁵ cells/well를 부착한 후, 농도별로 희석한 70 % EtOH 노근추출물과 α-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)을 처리하여 48 시간 배양하였다. 세포를 세척한 후, PBS 1 ml를 첨가하여 스크래퍼로 세포를 긁어내어 5,000 rpm에서 2분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 뒤 얻은 침전물의 색소침착에 대한 이미지를 확인하였다. 세포 침전물에 1 N NaOH 300 µl를 첨가하여 60 °C에서 1시간 현탁 후, 96-well plate에 60 µl씩 옮겨 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 함량은 대조군의 멜라닌 생성량에 대한 백분율로 계산하여 다음식에 의해 산출하였다.

$$\text{Melanin 생성량 (\%)} = \left(\frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

2.7 qRT-PCR

Trizol™(Ambion, Thermo, USA)로 total RNA를 추출하고 cDNA 합성 키트(ECDNA100, NanoHelix, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 Premier qPCR 키트(PQL-S500, NanoHelix)를 사용하여 PCR 증폭하였다. cDNA 합성 조건은 65 °C에서 6분간 RNA denaturation 시킨 후 42 °C에서 10분, 50 °C에서 50분 동안 반응하고, enzyme를 inactivation

시킴을 위해 70 °C에서 10분간 반응시켰다. PCR 조건은 95 °C에서 30초간 pre-denaturation 한 후 95 °C에서 5초, 60 °C에서 30초로 39회 반응하여 원하는 형광값을 검출하였다. 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다[Table 1].

Table 1. The primer sequence for real-time RT-PCR

Genes		Sequence
MMP-1	F	AGT GGC CCA GTG GTT GAA AA
	R	CCA CAT CAG GCA CTC CAC AT
HAS-2	F	TGG ATC TCA TTC CTC AGC AG
	R	TCC ACA AAC TCA TGC AAC AA
GAPDH	F	GTG GCA AAG TGG AGA TTG CC
	R	GAT GAT GAC CCG TTT GGC TCC

2.8 UVB 조사

UVB 노출은 HaCaT 세포주를 6-well plate에 2×10^5 cells/well로 세포를 부착한 후 배양하였다. 세포가 부착된 후 FBS가 없는 DMEM을 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 PBS를 넣고 UVB 램프(Sankyo Denki G8T5E, Kanagawa, Japan)가 장착된 UVC 500 UltraViolet Crosslinker(Amersham, Bucks, UK)를 이용하여 30 mJ/cm²로 UVB를 조사하였다. 세포를 PBS로 세척 후 노근추출물을 농도별로 처리하고 24시간 동안 추가 배양하였다.

2.9 엘라스타제(Elastase) 활성 억제 평가

엘라스타제 활성 억제 평가는 HDFs 세포를 100 mm dish에 2×10^5 cells/well로 분주한 후 90 % 이상 배양된 세포를 수확하여 5,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 세포 침전물에 protein lysis buffer(PRO-PREP™) 100 μl를 가하여 세포를 균질화하였다. 이 용액을 4 °C, 15,000 rpm으로 30분간 원심분리 후, 상등액을 취하여 엘라스타제 효소액으로 사용하였다. 효소액을 브래드포드(Bradford)법으로 단백질을 정량하여 각 well 당 100 μg의 단백질 함유량을 96-well plate에 넣고 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)을 넣어 88 μl가 되도록 하였다. 시료를 10 μl씩 넣고 기질인 STANA(N-succinyl-trialanyl-p-nitroanilide, 50 mM)액을 2 μl/well씩 넣고 37 °C에서 배양하였다. 90분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 엘라스타제 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.10 통계분석

실험은 3회 이상 반복한 값을 평균±표준오차(mean±SEM)로 나타내었다. 각 평균치 차이에 대한 유의성은 SPSS 26.0 version(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 one-way analysis of variance(ANOVA)로 Tukey HSD 다중분석법으로 사후검증하거나 t-test를 사용하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다(*p<0.05, **p<0.01).

3. 결과 및 고찰

3.1 노근추출물의 p-coumaric acid 함량 분석

p-Coumaric acid(4-hydroxycinnamic acid)는 낮은 독성을 가진 단일 페놀산으로 다른 페놀성 화합물의 전구체로도 작용한다. p-Coumaric acid의 우수한 생물학적 활성으로는 항산화, 항암, 항균, 항바이러스, 항염증, 항혈소판 응집효과, 불안 완화, 해열 및 진통 등 광범위한 효과가 보고되어 있다[16]. 최근에 p-coumaric acid의 melanogenesis 억제에 의한 미백 효과가 보고되었는데, p-coumaric acid 함유식물에서도 melanogenesis 효과가 있다고 제시되었다[8,9]. 따라서 미백 효과가 예측되는 70 % EtOH 노근추출물의 지표성분 p-coumaric acid 함량을 HPLC 방법으로 분석하였으며, 추출 용매 조절에 따른 미백 효과와의 관련성을 예측하고자 100 % EtOH 노근추출물의 지표성분 p-coumaric acid 함량과 비교 분석하였다. 실험결과 70 % EtOH 노근추출물에서 p-coumaric acid 함량은 236±0.2 mg/kg로 측정되었고, 100 % EtOH 노근추출물은 418±0.2 mg/kg로 측정되었다. 70 % EtOH 노근추출물의 p-coumaric acid의 함량이 100 % EtOH 노근추출물에 비해 56.46 % 낮음이 확인되었다[Table 2].

Table 2. p-Coumaric acid contents in ethanolic extracts of *P. rhizoma*

Compound	Contents(mg/kg)	
	70 % EtOH extract	100 % EtOH extract
p-Coumaric acid	236±0.2 ¹⁾	418±0.2 ^{**}

¹⁾Data are means±SEM (n=3). P values were calculated by t-test (p<0.01).

3.2 노근추출물의 세포 독성 평가

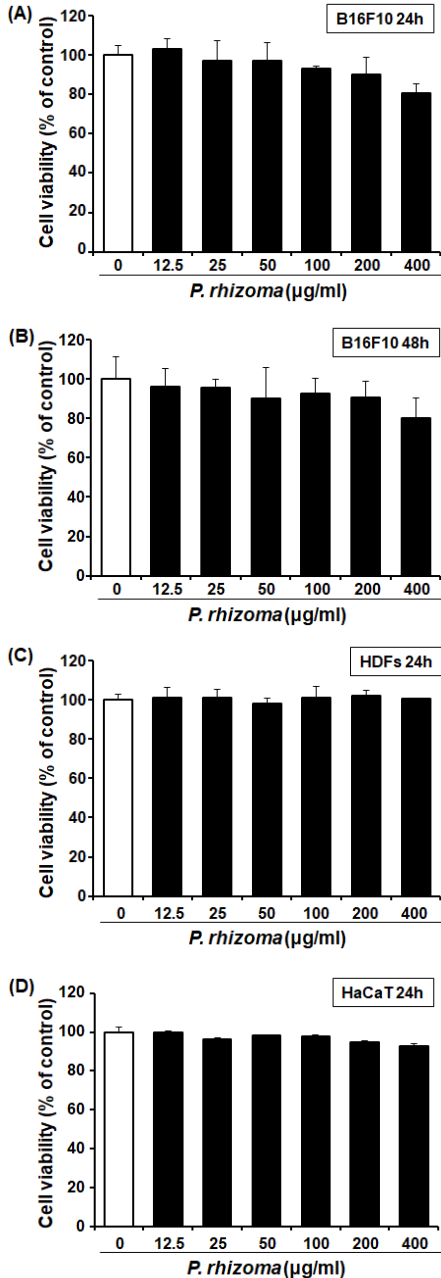


Fig. 2. Cytotoxicity of *P. rhizoma*. Melanocyte B16F10 cells were incubated with *P. rhizoma* for 24 h (A) and 48 h (B). Human dermal fibroblasts (HDFs) (C) and keratocytes (HaCaT) (D) were incubated in the presence of *P. rhizoma* for 24 h. P values were calculated by ANOVA and Tukey's test.

70 % EtOH 노근추출물이 피부세포에 세포독성이 있는지 안전성을 확인하기 위해 피부층의 주요 구성 세포 멜라닌형성세포 B16F10, 인간진피섬유아세포 HDFs, 인간각질형성세포 HaCaT 세포를 사용하여 MTT assay를 수행하였다. 70 % EtOH 노근추출물의 농도 범위를 12.5 ~ 400 µg/ml로 정하여 세포생존률을 측정 한 결과 노근추출물 400 µg/ml에서 일부 세포독성이 나타났는데, B16F10 세포주 24시간 및 48시간 처리군에 80.74±4.80 %와 80.09±10.37 %의 생존률을 나타내었고, HaCaT 세포주 24시간 처리군에서 92.86±1.05 %의 세포생존률이 나타났다. 하지만, 모두 20 % 이내의 미비한 효과였으며, 그 외 400 µg/ml를 처리한 HDFs 세포에서는 100.33±0.47 %로 세포독성이 나타나지 않았다. 또한, 노근추출물 200 µg/ml 이하의 농도에서는 실험에 사용한 모든 세포주에서 세포생존률에 안전성을 나타냈다[Fig. 2]. 이 결과를 토대로 유효성 실험을 위한 피부구성세포에 처리하는 70 % EtOH 노근추출물 200 µg/ml 이하를 유효농도 범위로 설정하였다.

3.3 노근추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

α-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)는 tyrosinase 활성을 증가시키는 강력한 유도제로서 자외선 노출 등의 자극에 의해 뇌하수체에서 분비되며 cAMP(cyclic adenosine monophosphate) 의존형 신호전달 경로인 PKA(cAMP-dependent protein kinase) 경로로 멜라닌 합성을 자극한다[17].

70 % EtOH 노근추출물의 멜라닌 생성 효과를 확인하기 위하여 멜라닌형성세포 B16F10에 α-MSH(100 nM)로 자극한 후 노근추출물을 처리하여 멜라닌 생성량을 측정하였다. 양성대조군으로 tyrosinase를 억제하여 멜라닌합성을 저해하는 상용화된 미백 원료 arbutin을 사용하였다. α-MSH로 자극한 B16F10 세포는 48시간 후에 멜라닌 생성을 크게 증가시켰으며(p<0.05), 양성대조군인 arbutin(100 µg/ml)은 α-MSH에 의해 증가된 멜라닌을 다시 크게 낮추어 미백 효능 실험조건이 잘 확립되었음을 알 수 있었다. 실험에 사용된 70 % EtOH 노근추출물 25 및 50 µg/ml 처리군은 α-MSH에 의해 증가된 멜라닌 생성을 각각 14.24 %와 17.52 %로 α-MSH를 단독처리한 군에 비하여 유의성 있게 억제하였다(p<0.01). 그러나 100 µg/ml 농도 이상에서는 멜라닌 생성 억제 효과가 관찰되지 않았다[Fig. 3]. 100 µg/ml 이상의 고농도에서 함유되는 성분이 오히려 미백효과를

나타내는 성분들의 효과를 상쇄시키는 것으로 생각된다. 이와 같은 현상은 Ha 등의 100 % EtOH 노근추출물의 실험결과에서도 동일하게 나타나는 것으로 보아[13], 노근의 EtOH 추출물에서 분리되는 개별 성분들에 대한 효능 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

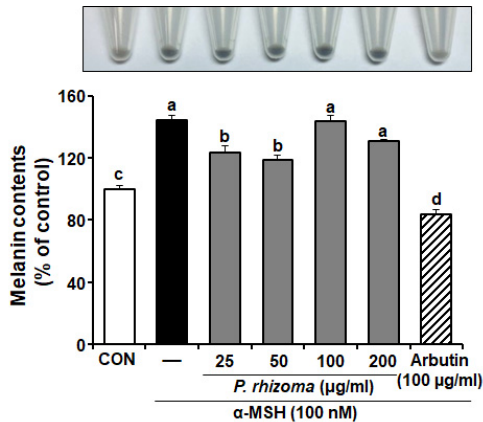


Fig. 3. Effects of 70 % EtOH extract from *P. rhizoma* on melanin production in α -MSH-induced B16F10 cells. Images of pellets of harvested B16F10 cells (upper panel) and the relative melanin contents (lower panel). P values were calculated by ANOVA and Tukey's test.

3.4 노근추출물의 MMP-1 발현 억제와 엘라스타제 활성 저해 효과

Matrix metalloproteinases-1(MMP-1)은 세포외기질(ECM: extracellular matrix, 이하 ECM)을 분해하는 주요 효소로서 collagen을 분해하는 interstitial collagenase이다[18]. 자외선 UVB에 노출되면 다양한 신호전달경로를 통해 전사인자 AP-1(activator protein-1)을 활성화시키고, MMPs의 발현 증가와 TGF- β 관련 신호전달경로를 방해하여 collagen 합성을 억제하고 ECM을 분해함으로써 피부장벽의 약화, 주름 발생 및 피부 노화를 일으킨다[19]. 인간진피섬유아세포 HDFs를 이용한 MMP-1의 mRNA 발현 측정 결과, 실험에 사용한 70 % EtOH 노근추출물의 유효농도 범위 모두에서 MMP-1 발현을 대조군에 비하여 크게 억제하였는데($p < 0.01$), 그 효과가 양성대조군으로 사용한 TGF- β 효과 수준으로 나타났다[Fig. 4A]. 70 % EtOH 노근추출물의 MMP-1 억제 효과는 *p*-coumaric acid가 더 많이 함유된 100 % EtOH 노근추출물 보다 더 크게 나타났는데[13], 이는 적어도 노근추출물의 MMP-1 억제 효과가 *p*-coumaric acid의 함유량과 비례하게 나타나지 않음

을 의미한다. 또한, 노근추출물은 저농도 25 μ g/ml에서부터 MMP-1 mRNA의 발현이 대조군에 비하여 크게 감소되었는데($p < 0.01$), 이러한 결과는 노근추출물 25 μ g/ml 이하의 농도 범위에서 진피층 collagen 양을 조절하는 MMP-1 효소 발현 기전 연구가 더 이루어져야 함을 보여준다.

UVB 자외선 노출은 엘라스타제(elastase)의 전구체 tropoelastin의 발현을 증가시켜 엘라스타제의 활성을 증가시키고 활성이 증가된 엘라스타제에 의해 결국 진피층내의 엘라스틴(elastin)양을 감소시켜 ECM의 구조 변화와 주름을 유발하게 된다. 따라서, 진피섬유아세포의 엘라스타제 효소 활성을 억제하는 효과는 피부의 결합조직을 유지하게 하여 주름 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다[20]. 본 실험에서는 *Pseudomonas aersa*에서 분리된 피부 섬유아세포 유래 elastase 억제제 phosphoramidon을 양성대조군으로 사용하여 노근추출물의 엘라스타제 활성 조절을 측정하였다[21].

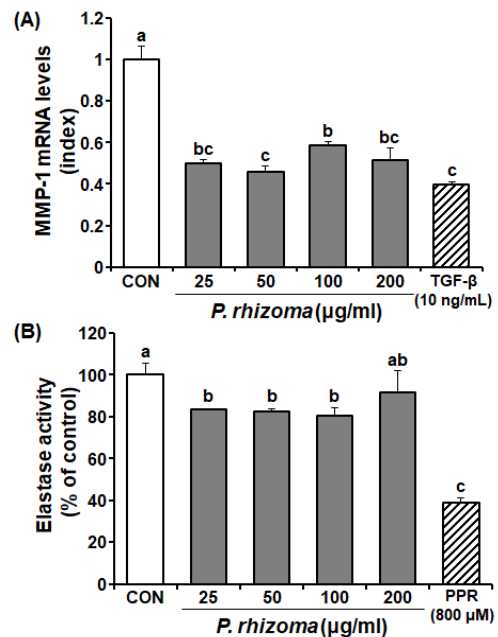


Fig. 4. Effects of 70 % EtOH extracts from *P. rhizoma* on MMP-1 expression and elastase activity in HDF cells. Levels of MMP-1 mRNA were evaluated by qRT-PCR (A) and determined elastase activity by an enzymatic activity assay (B). P values were calculated by ANOVA and Tukey's test. PPR; phosphoramidon.

70 % EtOH 노근추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 엘라스타제 활성을 대조군에 비하여 유의성 있게 억제하였으며($p < 0.05$), 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 억제효과가 나타나지 않았다[Fig. 4B]. 노근추출물 고농도에서 함유되는 새로운 성분이 추출물 저농도에서 발휘되는 효과들을 상쇄시킬 수 있음을 보여주는 결과로 노근추출물에서 분리되는 개별 성분들에 대한 함량과 효능에 대한 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

3.5 노근추출물의 HAS-2 발현에 미치는 영향

보습은 피부가 물분자를 유지하는 능력과 밀접한 관련이 있다. 막결합 효소 hyaluronan synthase(HAS)에 의해 세포외기질로 직접 합성되는 히알루론산 (HA: hyaluronic acid, 이하 HA) 또는 히알루론산 (hyaluronan)은 glycosaminoglycan으로 물분자 보유력(water retention)에 중요한 역할을 한다.

고 알려져 있다[22]. 70 % EtOH 노근추출물의 보습 효과를 확인하기 위해 UVB의 노출과 UVB를 노출하지 않은 HaCaT 세포에서 HAS-2의 mRNA 발현을 측정하였다. HAS 유전자 발현의 강력한 유도제로 알려진 레티놀(retinol)을 양성대조군으로 사용하였다[23]. 노근추출물은 UVB에 노출되지 않은 정상적인 조건에서 HAS-2의 mRNA 발현을 증가시키지 않았다[Fig. 5A]. 그러나 노근추출물은 UVB 조사에 의해 손상되어 감소된 HAS-2 유전자 발현을 UVB를 조사하고 추출물을 처리하지 않은 군에 비하여 HAS-2 발현을 크게 회복시켰으며, 양성대조군인 레티놀의 효과에는 미치지 않았지만, 대조군 수준 이상의 효과를 나타냈다[Fig. 5B]. 결과적으로 노근추출물은 UVB 노출에 의한 HAS-2 감소를 억제하여 HAS-2 발현을 다시 증가시킴으로써 피부 보습 효과를 가진다.

4. 결론

본 연구에서는 노근(*P. rhizoma*) 70 % EtOH 추출물이 피부층을 이루는 멜라닌형성세포, 진피섬유아세포, 각질형성세포를 이용하여 세포독성에 대한 안전성을 확보한 농도에서 미백, 항주름, 보습 활성화에 중요한 마커를 분석하여 효능성을 평가함으로써 70 % EtOH 노근추출물이 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 제시하고자 하였다. 70 % EtOH 노근추출물은 멜라닌생성 억제에 의한 미백 효과뿐만 아니라 주름발생 요인인 MMP-1 발현과 엘라스타제 활성을 억제하여 항주름 효과를 나타내었으며, UVB에 노출에 의한 보습인자 HAS-2의 발현을 크게 증가시킴으로써 우수한 보습효과가 있음을 보여주었다. 노근추출물의 지표성분으로 알려진 *p*-coumaric acid는 생체내 멜라닌을 만드는 tyrosine과 구조적 유사하여 tyrosine과 상경적 결합반응으로 tyrosinase 활성을 억제함으로써 멜라닌 합성을 억제하는 미백효과의 유효성분으로 제시되고 있다[15]. 노근추출물의 지표성분 *p*-coumaric acid 함량과 미백효과와의 관련성을 예측하고자 70 % EtOH 추출물에서 *p*-coumaric acid의 함량을 측정하고 그 효능을 비교 분석하였다. 70 % EtOH 노근추출물은 100 % EtOH 추출물에 비하여 *p*-coumaric acid의 함량이 56.46 % 낮은 함량을 나타내었지만[Table 2], 미백 효과는 감소되지 않았고, 주름 억제에 효과적인 MMP-1 발현억제와 UVB 노출에 대한 보습관련 효소 HAS-2의 발현을 더 크게 증가시키는 결과를 나타내었다[13]. 이는 노근추출물의 미백효과가

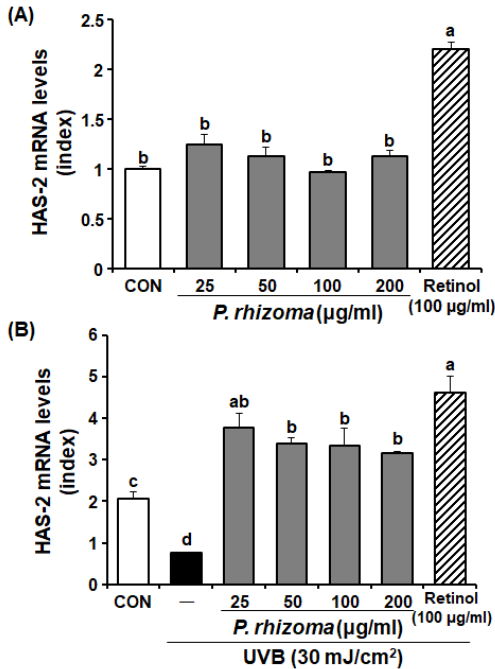


Fig. 5. Effects of 70 % EtOH extracts of *P. rhizoma* on the HAS-2 expression. The mRNA expression levels of HAS-2 were determined in the presence of *P. rhizoma* after UVB irradiation. P values were calculated by ANOVA and Tukey's test.

피부가 노화되는 과정에서 나타나는 건조증은 HA 함량의 현저한 감소와 HAS-2 발현의 억제가 관련이 있다

p-coumaric acid외에도 노근추출물에 함유된 다른 성분이 크게 기여함을 의미한다. 본 연구결과에서는 70 % EtOH 노근추출물이 피부부구성세포에 안전하게 적용할 수 있으며, 미백뿐만 아니라 항주름 및 보습 더 나아가 항노화에 유용한 개발 소재임을 제시하며, 향후 노근추출물의 미백과 주름개선 및 보습효과에 대한 유효성분 연구가 *p*-coumaric acid에 국한되지 않고 활발히 이루어져야 할 것임을 시사한다.

References

- [1] J. Kohl, P. Woitke, H. Kuhl, M. Dewender, G. Konig, "Seasonal changes in dissolved amino acids and sugars in basal culm internodes as physiological indicators of the C/N-balance of Phragmites australis at littoral sites of different trophic status", *Aquatic Botany*, Vol.60, No.3, pp.221-240, Mar. 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(97\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(97)00096-X)
- [2] J. C. Park, G. Choi, "Review on herbal medicinal materials in the Korean pharmacopoeia and the Korean herbal pharmacopoeia", *Korean Herbal Medicine Informatics*, Vol.4, No.2, pp.9-35, July. 2016. DOI: <https://doi.org/10.22674/KHMI-4-2-2>
- [3] S. Derouiche, M. Azzi, A. Hamida, "Effect of extracts aqueous of Phragmites australis on carbohydrate metabolism, some enzyme activities and pancreatic islet tissue in alloxan-induced diabetic rats", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol.9, No.6, pp.54-58, Jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i6.17321>
- [4] N. S. Kim, S. Shin, G. G. Shin, O. S. Bang, "Genotoxicity evaluation of a Phragmites rhizoma extract using a standard battery of in vitro and in vivo assays", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol.241, No.112025, Sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112025>
- [5] S. J. Park, Y. W. Kim, M. K. Park et al., "Anti-inflammatory steroid from phragmites rhizoma Modulates LPS-mediated signaling through inhibition of NF- κ B pathway", *Inflammation*, Vol.39, No.2, pp.727-734, Apr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0299-6>
- [6] J. S. Choi, J. H. Lee, H. S. Young, "Anti-hyperlipidemic effect of Phragmites communis and its active principles", *Journal of The Korean Society of Food and Nutrition*, Vol.24, No.4, pp.523-529, Feb. 1995.
- [7] M. O. Sim, J. R. Ham M. K. Lee, "Young leaves of reed(Phragmites communis) suppress melanogenesis and oxidative stress in B16F10 melanoma cells", *Biomedicine & Pharmacotherapy Biomedecine & Pharmacotherapie*, Vol.93, pp.165-171, Sep. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.037>
- [8] S. M. An, S. I. Lee, S. W. Choi, S. W. Moon, Y.C. Boo, "*p*-Coumaric acid, a constituent of Sasa quelpaertensis Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by alpha-melanocyte stimulating hormone", *The British Journal of Dermatology*, Vol.159, No.2, pp.292-299, Aug. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08653.x>
- [9] P. S. Ferreira, F. D. Victorelli, B. Fonseca-Santos, M. Chorilli, "A review of analytical methods for *p*-coumaric acid in plant-based products, beverages, and biological matrices", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, Vol.49, No.1, pp.21-31, May. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1459173>
- [10] H. Kim, S. Lee, "Induction of ATP synthase β by H₂O₂ induces melanogenesis by activating PAH and cAMP/CREB/MITF signaling in melanoma cells", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol.45, No.7, pp.1217-1222, July. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.006>
- [11] Y. Wang, M. Hao, Y. Sun et al., "Synergistic promotion on tyrosinase inhibition by antioxidants", *Molecules*, Vol.23, No.1, pp.106, Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23010106>
- [12] R. Ganceviciene, A. I. Liakou, A. Theodoridis, E. Makrantonaki, C. C. Zouboulis, "Skin anti-aging strategies", *Dermato-Endocrinology*, Vol.4, No.3, pp.308-319, July. 2012. DOI: <https://doi.org/10.4161/derm.22804>
- [13] C. W. Ha, S. H. Kim, S. R. Lee, E.H. Sohn et al., "Anti-skin aging potential of alcoholic extract of Phragmites communis Rhizome", *Korean Journal of Plant Resources*, Vol.33, No.6, pp.604-614, Dec. 2020. DOI: <https://doi.org/10.7732/kjpr.2020.33.6.604>
- [14] J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F.Gazdar, J. D. Minna, J. B. Mitchell, "Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing", *Cancer Research*, Vol.47, pp. 936-942, Feb. 1987.
- [15] Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. "Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid", *Cancer Research*, Vol.45, pp. 1474-1478, Apr. 1985.
- [16] Y. C. Boo, "*p*-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects", *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, Vol.8, No.8, pp.275, Aug. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8080275>
- [17] T. Bito, K. Koseki, R. Asano, N. Ueda, T. Yamada, Y. Yabuta, T. Ichiyana, A. Ishihara, K. Watanabe, F. Watanabe, "5-hydroxymethyl-2-furaldehyde purified from Japanese pear (Pyrus pyrifolia Nakai cv. Nijisseiki) juice concentrate inhibits melanogenesis in B16

mouse melanoma cells", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol.84, pp.2374-2384, Nov. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1792762>

- [18] G. J. Fisher, T. Quan, T. Purohit, Y. Shao et al., "Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin", *The American Journal of Pathology*, Vol.174, No.1, pp.101-114, Jan. 2009.
DOI: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080599>
- [19] J. S. Bang, S. Y. Choung, "Inhibitory effect of oyster hydrolysate on wrinkle formation against UVB irradiation in human dermal fibroblast via MAPK/AP-1 and TGFbeta/Smad pathway", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol.209, pp.111946, Aug. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111946>
- [20] F. Antonicelli, G. Bellon, L. Debelle, W. Hornebeck, "Elastin-elastases and inflamm-aging", *Current Topics in Developmental Biology*, Vol.79, pp.99-155, 2007.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)79005-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)79005-6)
- [21] J. F. Alcorn, J. R. Wright, "Degradation of pulmonary surfactant protein D by Pseudomonas aeruginosa elastase abrogates innate immune function", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.279, No.29, pp.30871-30879, July. 2004.
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M400796200>
- [22] E. Papakonstantinou, M. Roth, G. Karakiulakis, "Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging", *Dermato-Endocrinology*, Vol.4, No.3, pp.253-258, July. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.4161/derm.21923>
- [23] J. O. Lee, S. H. Hwang, T. Shen, J. H. Kim, L. You, W. Hu, J. Y. Cho, "Enhancement of skin barrier and hydration-related molecules by protopanaxatriol in human keratinocytes", *Journal of Ginseng Research*, Vol.45, pp.354-360, Mar. 2021.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2020.12.003>

구 현 정(Hyun-Jung Koo) [정회원]



- 2004년 8월 : 성균관대학교 약학대학원 약학과 독성학전공(약학석사)
- 2012년 2월 : 성균관대학교 약학대학원 약학과 면역학전공(약학박사)
- 2012년 6월 ~ 2015년 1월 : 가천대학교 바이오나노연구센터 연구교수
- 2015년 1월 ~ 현재 : 한국농수산대학 특용작물학과 교수

<관심분야>
천연물, 독성학, 약리학

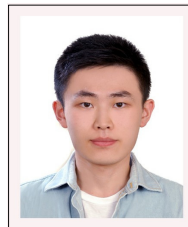
하 창 우(Chang-Woo Ha) [정회원]



- 2021년 2월 : 강원대학교 생약자원개발학과 (이학석사)
- 2021년 3월 ~ 현재 : 유한책임회사 트루비연구소 팀장

<관심분야>
화장품, 천연물 효능평가

김 성 혁(Sung-Hyeok Kim) [정회원]



- 2021년 2월 : 강원대학교 생약자원개발학과 (이학석사)
- 2021년 3월 ~ 현재 : 강원대학교 일반대학원 박사과정 (바이오헬스융합학과)

<관심분야>
면역학, 천연물 효능평가

장 소 희(So-Hee Jang) [준회원]



- 2021년 3월 ~ 현재 : 강원대학교 일반대학원 석박통합과정 (바이오헬스융합학과)

<관심분야>
면역학, 천연물 효능평가

임 호 선(Hyo-Sun Lim)

[정회원]



- 2006년 2월 : 서울대학교 자연과학대학원 생물정보학과 (이학석사)
- 2021년 2월 : 충남대학교 분석과학기술대학원 분석과학기술학과 (이학박사)
- 2016년 7월 ~ 2021년 5월 : (주)한국생명과학연구소 소재개발팀 팀장

<관심분야>

정보경영, 정보통신

김 윤 규(Youn-Kyu Kim)

[정회원]



- 1997년 8월 : 건국대학교 일반대학원 생화학박사
- 2000년 4월 : 중근당바이오(주) 책임연구원
- 2006년 7월 ~ 현재 : (주)한국생명과학연구소 대표

<관심분야>

기능성원료, 기능성화장품 연구개발

손 은 화(Eun-Hwa Sohn)

[중신회원]



- 1998년 2월 : 성균관대학교 약학대학원 생명약학 (약학석사)
- 2004년 2월 : 성균관대학교 약학대학원 생명약학 (약학박사)
- 2004년 10월 ~ 현재 : 강원대학교 바이오헬스융합학과 교수

<관심분야>

염증, 천연물 효능평가