

저분자 당단백을 함유하는 다마스크 장미추출물의 항노화 효과

한정희·송지훈·김영은·이유희·이정민·이지연[†]

(주)모아캠

(2018년 2월 28일 접수, 2018년 3월 23일 수정, 2018년 3월 24일 채택)

Anti-aging Effects of *Rosa damascena* Extract Containing Low Molecular Glycoprotein

Jeung Hi Han, Ji Hoon Song, Young Eun Kim, Yu Hee Lee, Jung Min Lee, and Ji Ean Lee[†]

606 Heungdeok IT Valley, 13 Gil Heungdeok 1 ro, Giheunggu Yongin-si, Gyeonggi-do 16954, Korea

(Received February 28, 2018; Revised March 23, 2018; Accepted March 24, 2018)

요약: 본 연구에서는 다마스크 장미 내 고분자 당단백을 bioconversion 기술을 이용하여 저분자화한 다마스크 장미추출물(*Rosa damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG)의 항노화 효능을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능을 이용한 RELG의 항산화능 평가(IC₅₀)는 22.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 양성대조군인 ascorbic acid 21.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 비교하여 비슷한 수준의 항산화능을 나타내었고 피부세포실험에서는 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 자외선과 H₂O₂에 의한 활성산소 생성을 28% 억제하였다. 또한 같은 농도에서 자외선에 의한 콜라겐 분해 효소(MMP-1)의 생성을 48% 억제하고 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군 대비 보습인자인 aquaporin 3 (AQP3)의 발현을 44%, 중성지질 생합성을 10% 촉진하여 항주름 효과와 더불어 보습효과까지 나타났다. 추가적으로 두피 모 유두세포에서는 스트레스로 인한 세포사멸을 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 10% 억제하고 활성산소의 생성을 90% 감소시켰다. 본 연구 결과, RELG는 효과적인 항노화 화장품 소재임을 확인하였다.

Abstract: In this study, we investigated the anti-aging effect of *Rosa damascena* extract containing low molecular glycoprotein (RELG) converted from the high molecular glycoprotein by bioconversion. Free radical scavenging activities were performed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Antioxidant activities (IC₅₀) of RELG and the positive control ascorbic acid were 22.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 21.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. For skin cells, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RELG showed 28% antioxidant activity by inhibiting the production of active oxygen species induced by ultraviolet ray and hydrogen peroxide. 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RELG prevented 10% the cell death caused by stress in human hair follicle dermal papilla cells (HDPC) and reduced 90% the production of active oxygen species. In addition, the glycoprotein showed not only anti-wrinkle effect but also moisturizing effect by 48% inhibition of matrix metallo proteinase-1 (MMP-1) production by ultraviolet stress and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RELG enhanced 10% neutral lipid synthesis with 44% aquaporin 3 (AQP3) expression, which is moisture factor. In conclusion, the RELG can be used as an anti-aging cosmetic material.

Keywords: *Rosa damascena*, anti-oxidation, moisturizing, anti-wrinkle, anti-aging

1. 서론

일반적으로, 사람은 성장을 멈추는 시점에서 노화가 시작되게 되고 피부의 노화 또한 일어나게 된다[1]. 하

지만 현대에 들어 자연스런 피부의 노화보다 외부로부터 오는 스트레스가 피부노화를 가속화시키는 주요 인자로 인식되면서 스트레스로부터 피부를 보호하는 것이 항노화의 주요한 기전으로 인정받고 있다[2]. 피부 스트레스 증가의 주된 요인은 외부로부터 오는 자외선과 피부세포 내 발생하는 활성산소이다. 이들은 피부의 탄력을 부여하는 콜라겐의 생성을 억제하고

[†] 주 저자 (e-mail: jelee@morechem.net)
call: 031)214-5822

matrix metalloproteinase (MMP)를 증가시킴으로써 콜라겐을 분해하여 주름과 노화를 촉진한다[3,4].

또 다른 피부 노화의 원인은 피부가 수분을 유지하는 능력이 저하되어 나타난다. 건조피부는 노인층에서 가장 흔한 피부과적 문제로 피부 노화 시 보습 단백질의 감소와 지질 합성 능력의 감소로 노화 피부에서 보습 및 장벽기능이 저하된다. Aquaporin 3는 피부상피세포에 존재하며 세포막에서 수분통로를 열고 닫는 중요한 역할을 한다. Aquaporin 3가 증가하면 수분의 이동이 활발해지면서 피부 깊은 곳까지 수분을 이동시켜 피부를 촉촉하게 하는 윤택 작용을 한다[5]. 또한 보습에 중요한 역할을 하는 또 다른 요인은 피부장벽 사이의 지질이다. 피부장벽은 각질세포와 각질세포를 둘러싼 지질로 구성되며 지질이 부족해지면 피부장벽은 무너지고 피부 수분을 보호할 수 없다[6]. 피부장벽의 지질생합성이 촉진되면 피부장벽이 강화되며 피부 보습에 도움이 되어 노화를 예방한다. 노화 현상은 피부뿐만 아니라 두피에서도 일어나며 두피의 노화는 머리결 손상 및 탈모를 유발하게 된다. 두피는 자외선에 노출되기 쉬우며 계속하여 분화하기 때문에 산화적 스트레스를 많이 받는 부위이다. 이는 머리결 손상 및 탈모를 유발하여 산화적 스트레스로부터 모발세포를 보호하는 것은 두피건강에 중요한 인자로 알려져 있다[7,8].

다마스크 장미(*R. damascena*)는 크고 아름다운 꽃 덕분에 아홉 종의 장미 원종 중 가장 널리 알려졌고 관상용 식물로 불가리아, 이란 및 터키 등지에서 주로 재배되고 있다. 또한, 고대부터 장미오일이나 증류추출을 통한 장미수가 통증을 완화시키고 목의 염증을 치료하는 효능이 있다고 알려져 사용되어 왔으며, 그 오일의 향은 긴장을 완화시키는 효능이 있어 그리스인에 의해 향수로 사용되었다. 최근에는 화장품소재로도 많이 개발되어 오일, 샴푸, 향수 등 다양한 제품에 사용된다[9].

근래에 장미는 당, 단백질, 각종 지방산과 미네랄 등 영양성분이 풍부하여 식품소재로도 검토되고 있다[10]. 그중 70% 이상을 차지하는 영양소인 당과 단백질은 그 사이가 공유결합으로 이어진 당단백의 형태로도 존재하며 세포의 면역시스템이나 세포를 보호하는 등 다양한 역할을 수행한다[11]. 당단백 중 당이 차지하는 비율은 1-80%로 다당류부터 올리고당까지 다양하여 넓은 분자량을 갖는 것이 특징이다[12]. 특히 꽃잎에

존재하는 당단백은 꽃의 생식작용을 위한 화분형성에 주요한 역할을 수행한다고 알려졌다[13]. 지금까지는 꽃잎의 각종 폴리페놀이나 플라보노이드 등 2차대사 산물에 초점을 맞추어 효능탐색이 이루어졌으나 최근에는 꽃잎의 주성분인 당과 단백질에 대한 연구가 진행되고 있다[14,15]. 하지만 일반적으로 당단백질은 한 가지 형태로 존재하지 않고 여러 개의 서로 다른 당 복합체로 존재하며, 펩타이드의 배열이 같더라도 공유 결합되어 있는 형태가 달라지는 등 그 복잡성 때문에 당단백의 역할 및 효능에 대해서는 많은 연구가 되어 있지 않다[16].

본 연구에서는 효소처리를 통해 고분자물질들을 저분자화 하여 흡수율 증진 및 효능을 증가시키는 bioconversion 기술을 바탕으로 다마스크 장미추출물 내 함유된 고분자 당단백을 저분자화 하였고 그에 따른 변화와 유효성 평가를 진행하여 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 다마스크 장미추출물 제조 및 효소처리를 통한 저분자화

건조된 불가리아산 다마스크 장미(*Rosbio bulgaria* LTD., Bulgaria) 100 g에 1,000 g 3차 증류수를 가하고 3 h 동안 60°C 이상으로 열수 추출하여 장미추출물(*Rosa damascena* extract, RE)을 711 g 얻었다. 그 추출물에 펙티나아제(Pectinex Ultra Pulp, Novozymes, Danmark)와 셀룰라아제(Celluclast, Novozymes, Danmark), 글루코시다아제(BGL600, Sunson Industry group co., LTD., China) 효소처리를 통하여 추출물 내 고분자 당단백을 저분자화 하였고 4-8°C의 저온에서 7일간 저온 숙성과 0.45 μm (Whatman, England) 필터를 통한 여과 과정으로 불용성 물질들을 제거하여 저분자 당단백을 함유한 다마스크 장미추출물(*Rosa damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) 704 g을 제조했다.

2.2. 장미 당단백의 총 당과 단백질 함량측정

다마스크 장미추출물 704 g을 감압농축기(Eyela, Japan)를 이용하여 60°C에서 농축한 후 140 g의 농축액을 얻었다. 이 농축액을 교반하며 560 g의 에탄올을 서서히 첨가하여 당단백을 침전시킨다. 침전된 당단백

질을 수득하고 50 °C에서 건조하여 10.2 g의 장미 당단백을 얻었다. 이어서 총 당 함량과 총 단백질 함량을 측정했다. 총 당 함량은 phenol-sulfuric acid 법[17]에 따라 glucose (Sigma, USA)를 표준물질로 사용하여 측정하였고, 총 단백질 함량은 Lowry 등[18]의 방법에 따라 bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA)를 대조로 하여 실험하였다.

2.3. 장미 당단백의 IR-spectrum 분석

분리한 당단백의 주요 반응기 특성 및 당과 단백질 사이의 공유결합을 확인하기 위하여 FT-IR spectrophotometer (Varian 640-IR, Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.4. 장미 당단백의 분자량 측정

GPC-RI system (Gel Permeation Chromatography-refractive index) System (Agilent 1260 series system, Agilent, USA)과 Column (Agilent PL Aquagel Mixed-M column and Agilent PL Aquagel OH-30 column, Agilent, USA)으로 분자량을 분석하여 효소 처리에 의한 당단백의 저분자화를 확인했다. 증류수를 이동상으로 유속 1 mL/min으로 35 °C에서 분석하였으며 polysaccharide와 glucose를 표준물질로 검량선을 작성하여 대조하였다.

2.5. DPPH Radical Scavenging Activity 측정

DPPH법은 천연물의 수용성 혹은 유기용매 추출물의 항산화 활성 측정법으로 널리 사용하는 방법이다. 본 실험에서는 항산화 활성 측정방법 중 Blois의 방법에 따라 측정했다[19]. DPPH 라디칼 소거능을 평가하기 위해 시료 0.1 mL에 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma, USA) 용액을 0.1 mL 분주하여, 30 min 방치시킨 후 520 nm에서 ELISA reader (Eon, Biotek, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였고 대조구는 시료 대신 용매를 가하여 동일한 방법으로 측정했다. 또한 시료 자체의 색에 대한 흡광도 값을 보정해주기 위해 0.2 mM DPPH 대신에 에탄올을 첨가하여 흡광도를 측정 후 DPPH 라디칼 소거능을 아래와 같이 백분율로 나타내었다. 이때, DPPH 라디칼 소거능의 양성대조군으로써 L-ascorbic acid (Sigma, USA)를 사용하여 이의 효과를 대비 판단했다.

DPPH radical scavenging activity (%)

$$= \{1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도 값} / \text{무첨가구의 흡광도 값})\} \times 100$$

2.6. 세포 배양

인간 각질형성세포주(human keratinocyte, HaCaT)는 Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM, Welgene, Korea)에 fetal bovine serum (FBS, Welgene, Korea) 10%, 인간유래섬유아세포(human dermal fibroblast, HDF)는 DMEM (Gibco, USA)에 FBS 10%, 모유두세포(human hair follicle dermal papilla cells, HDPC)는 mesenchymal stem cell medium complete kit (MSCM, Sciencecell, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양했다.

2.7. 형광물질을 이용한 활성산소종(ROS) 소거능

ROS 측정은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma, USA)를 사용하여 형광을 측정하는 방법을 사용했다[20,21]. 인간 각질형성세포주와 인간 모유두세포는 형광측정용 검은 96-well 마이크로플레이트에 접종하고 24 h 배양했다. 이후 각각의 무혈청 DMEM에 희석하여 시료를 넣고 24 h 배양했다. 24 h 후 Hanks' balanced salt solution (HBSS, Welgene, Korea)로 세척하여 남아있는 배지를 제거하고, HBSS에 50 μM로 준비된 DCFH-DA 100 μL 가하고 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 1 h 배양하고, HBSS로 세척했다. 이후 HBSS에 50 μM로 준비된 자극원(H₂O₂ 100 μM, UVB 50 mJ/cm²)을 가한 다음, 형광도를 형광플레이트 리더 (tecan plate reader, Switzerland)를 이용해 Excitation = 485 nm, Emission = 530 nm로 형광 강도를 측정했다.

2.8. MMP-1 발현 억제 효과

사람 섬유아세포를 6-well 플레이트에 1 × 10⁵ 수만 큼 분주한 후, 37 °C, 5% CO₂에서 24 h 동안 배양했다. 이후 배지를 제거하고 HBSS를 넣어준 후 UVB 비조사 균을 제외한 나머지 세포군에 220 mJ/cm²의 UVB를 조사한 뒤 추출물을 농도별로 첨가하여 72 h 동안 추가로 배양했다. 그 후 human total MMP-1 ELISA KIT (R&D SYSTEMS, USA) 방법대로 MMP-1을 정량했다.

Table 1. Carbohydrates and Protein Contents of Glycoprotein from *R. damascena* Extract

Materials	Ingredient	Carbohydrates (wt%)	Protein (wt%)
	Glycoprotein	31.5	59.2

2.9. 보습 단백질 유전자 발현 확인

인간 각질형성세포를 6-well 플레이트에 접종한 후 24 h 동안 배양했다. 이후, 시료를 처치했다. 72 h 배양 후, 세포를 phosphate buffer saline (PBS, Welgene, Korea)로 세척하고, 회수하여 PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)방법에 따라 mRNA를 추출했다. 이후 High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)방법에 따라 cDNA를 합성했다. 그 후 시험 세포 및 대조군 세포를 Real Time PCR하여 aquaporin 3 유전자 발현 수준을 분석했다.

2.10. 지질 염색법

인간 각질형성세포를 6-well 플레이트에 접종한 후 24 h 배양하고, 시료와 양성 대조군인 rosiglitazone (Sigma, Korea) 처치했다. 처리 후 배지를 교환하며 2 주일 동안 배양한다. 지질 염색은 Oil Red O (Sigma, USA)를 이용하여 현미경으로 염색된 세포를 촬영하였고 isopropanol (Sigma, USA)을 이용하여 용해시켜 500 nm에서 흡광도를 측정했다.

2.11. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 3회 반복하였으며, 실험결과를 평균값 ± 표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's *t*-test 방법으로 분석하였으며, 유의성 수준은 $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ 로 표시했다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 장미 당단백의 총 당, 단백질 함량

일반적으로 당단백은 당이 차지하는 비율이 다양하기 때문에 장미에 함유된 당단백 중 당과 단백질의 함량을 확인하기 위하여 추출물에서 분리한 당단백의 총 당, 단백질 함량을 측정하였다[12]. 당단백을 분리하여 회수한 결과, 건조된 원물 대비 수율 10.2 wt%를 나타냈으며 당단백질 내 함유된 총 당과 총 단백질 함량을 측정한 결과, 총 당 함량은 31.5 wt%, 총 단백질 함량

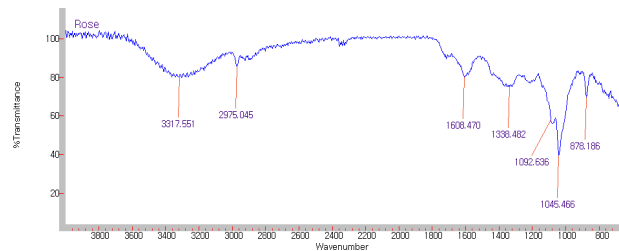


Figure 1. IR spectrum of the glycoprotein from *R. damascena* extract.

은 59.2 wt%를 나타냈다(Table 1). 위 결과를 통해 장미 내 함유된 당단백의 경우, 단백질 함량이 당보다 높은 특징을 나타냄을 확인하였다.

3.2. 장미 당단백의 IR-spectrum 분석

분리한 당단백의 주요 반응기 특성 및 당과 단백질 사이의 공유결합을 확인하기 위하여 FT-IR을 이용하여 분석하였다(Figure 1). 3,300-3400 cm^{-1} 부근은 당 고리의 전형적인 O-H stretching frequency, 2,900 cm^{-1} 부근의 C-H stretching frequency, 1,600⁻¹ 부근은 단백질의 기본구조인 펩타이드의 아미노카보닐기 C=O의 conjugated stretching frequency, 1,100-1,000 cm^{-1} 부근의 C-O binding frequency 등 일반적인 다당류, 단백질류, 당단백류에서 확인되어지는 spectrum 양상을 관찰할 수 있었다[22]. 880 cm^{-1} 부근은 glucose 등의 C-O-C skeletal을 반영하였다[23]. 이 spectrum은 당단백질의 특징을 잘 나타내고 있다.

3.3. 효소처리에 의한 장미 당단백의 저분자화 확인

Bioconversion 기술은 플라보노이드를 aglycone형태로 전환하여 보다 높은 체내 흡수율 및 우수한 생리적 효과를 위해 적용된 기술이다[24]. 당단백은 일반적으로 단백질에 당이 결합된 형태로 단백질의 구조나 결합된 당이 다양하여 넓은 범위의 분자량을 나타내는데 [25], bioconversion 기술을 고분자 당단백에 적용시켜 저분자화 하였고 GPC 분석을 통해 이를 확인하였다.

분석결과, RE에서 분리한 당단백은 중량평균 분자

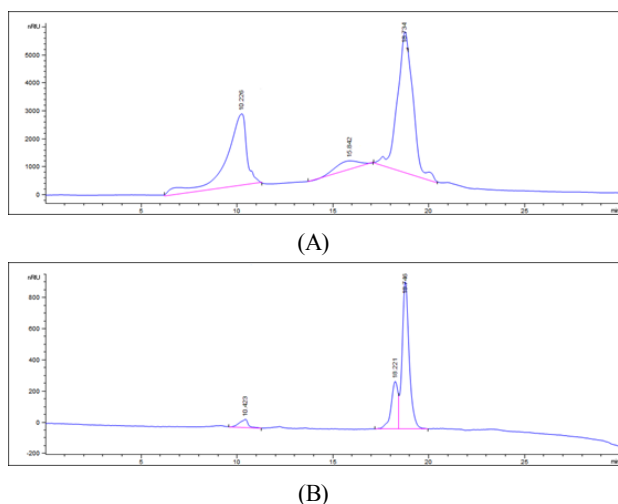


Figure 2. Molecular weight distribution of glycoprotein of RE (*R. damascena* extract, RE) and RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG). (A) A gel permeation chromatogram of glycoprotein of RE. (B) A gel permeation chromatogram of glycoprotein of RELG.

량 650 kDa의 고분자와 1 kDa의 저분자로 장미와 같은 속인 해당화에서 분리한 당단백의 분자량이 8-150 kDa 인 것과 비교하여 더 다양한 분자량 분포를 나타내었다[15]. 반면 RELG에서의 분자량을 측정한 결과 90% 이상이 중량평균 분자량 1 kDa대의 저분자 당단백으로 확인되었으며 장미 고분자 당단백이 효소처리에 의하여 저분자화 됨을 알 수 있었다(Figure 2).

3.4. 저분자 당단백을 함유한 다마스크 장미추출물의 세포 독성평가

각질형성세포와 섬유아세포에 대한 장미추출물의 독성효과를 측정하였다. 저분자 당단백을 함유한 다마스크 장미추출물의 세포독성을 평가한 결과 5-15 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포 독성이 보이지 않음을 확인하였다(Figure 3, 4). 세포에 영향을 주지 않는 수준의 시료농도로 이후 실험을 평가하여 장미추출물의 효과가 세포생존율에 관계없이 장미추출물 본연의 효과임을 확인하였다.

3.5. 저분자 당단백을 함유한 다마스크 장미추출물의 항산화효과

분자량이 큰 물질일수록 점성과 탄성이 커지는 특징이 있지만, 피부에 적용하면 진피층을 통과하지 못하

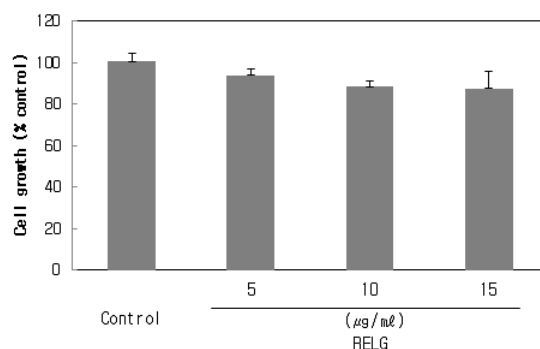


Figure 3. Cytotoxicity of RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) in human keratinocyte.

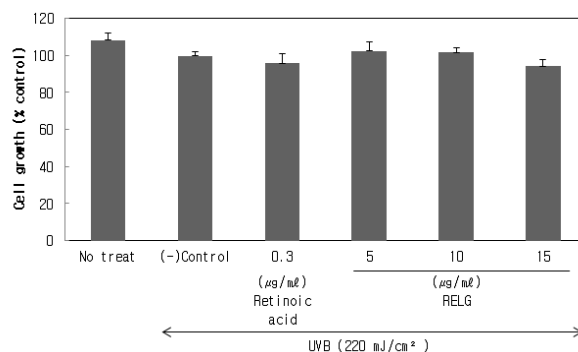


Figure 4. Cytotoxicity of RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) from ultraviolet-B in human dermal fibroblast.

는 문제점이 있다[26,27]. 따라서 독성이 없고 피부 투과도가 높은 저분자 물질을 개발하여 피부 내 효능을 높이려는 노력이 계속되고 있다[28]. 이를 바탕으로 저분자 당단백을 함유한 다마스크 장미추출물의 항산화 효능을 평가하기 위해 ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하여 RE와 RELG의 DPPH 억제 활성을 측정했다(Figure 5). IC_{50} 값을 확인한 결과 ascorbic acid는 21.1 $\mu\text{g/mL}$, RE는 37.0 $\mu\text{g/mL}$, RELG는 22.6 $\mu\text{g/mL}$ 를 나타냈으며 이는 효소처리에 의한 저분자화가 항산화능을 높인다는 것을 확인한 결과이다. RELG의 피부세포 내 항산화능을 확인하기 위하여 피부 내 활성산소 발생의 주 원인이라고 알려진 자외선과 H_2O_2 를 이용해 각질형성세포 내에서의 활성산소제거능을 확인했다. 그 결과 RELG 15 $\mu\text{g/mL}$ 처치 시 UV와 H_2O_2 에 의해 증가된 ROS가 28%씩 감소했다(Figure 6).

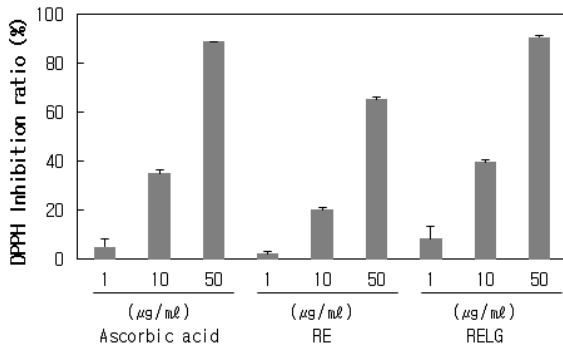


Figure 5. DPPH Inhibition ratio of RE (*R. damascena* extract, RE) and RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG).

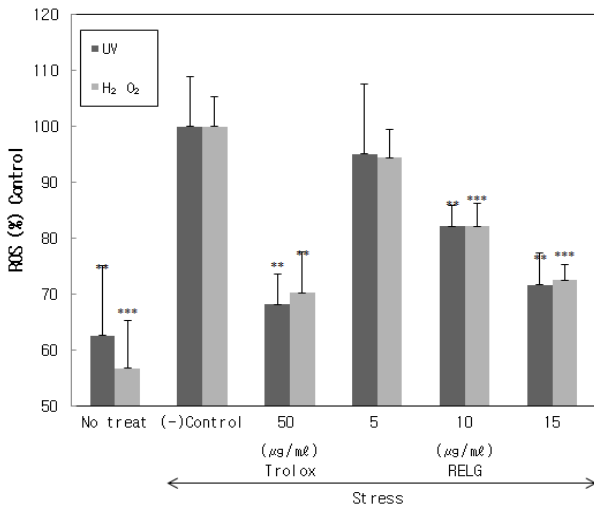


Figure 6. Effect of RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) on ROS inhibitory activity from stress in human keratinocyte. The data shown represent the mean ± S.D. derived from three determinations. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.

3.6. MMP-1 생성 억제효과

ROS는 피부 내에서 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP의 유도를 일으킨다. 항산화 결과를 바탕으로 RELG 처치 시 MMP저해 효과도 있을 것이라고 예상했다. 자외선 조사 후 콜라겐 타입 I, II, III를 분해하여 주름을 형성하는 MMP-1의 발현을 확인했다. RELG 처치군은 자외선 처치로 인하여 증가된 MMP-1의 발현량을 농도 유의적으로 감소했으며, 최대 시료 15 μg/mL 처치 시 자외선 처치군 대비 MMP-1 발현량이

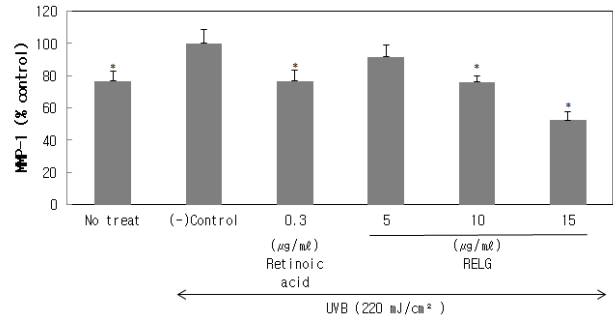


Figure 7. Effect of RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) on MMP-1 inhibitory activity from ultraviolet-B in human dermal fibroblast. The data shown represent the mean ± S.D. derived from three determinations. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.

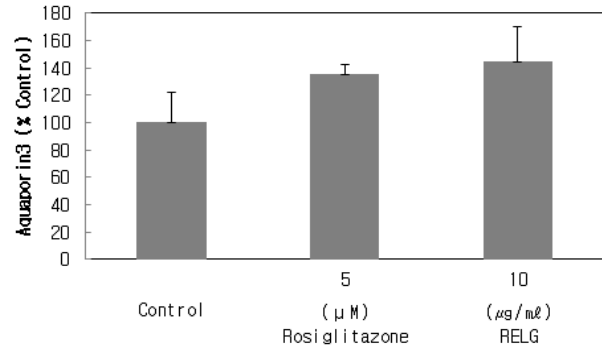


Figure 8. Effect of RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) on moisturizing-related gene expression levels in human keratinocytes. The data shown represent the mean ± S.D. derived from three determinations. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.

48% 감소했다(Figure 7).

3.7. 보습 유전자 증가와 피부 장벽 강화를 통한 보습효과

보습 유전자 증가와 피부 장벽 강화를 통한 보습효과 확인을 위하여 보습 유전자인 AQP-3와 피부 장벽 구성 물질인 지질 생합성 증가를 평가했다.

유전자 발현 분석결과 시료 10 μg/mL 처치 시 세포막에서 수분통로를 여는 AQP-3의 발현이 대조군 대비 44% 증가했다(Figure 8).

피부 장벽 강화능은 피부장벽 구성 물질인 지질을 Oil Red O 염색방법으로 염색하여 효능을 확인했다.

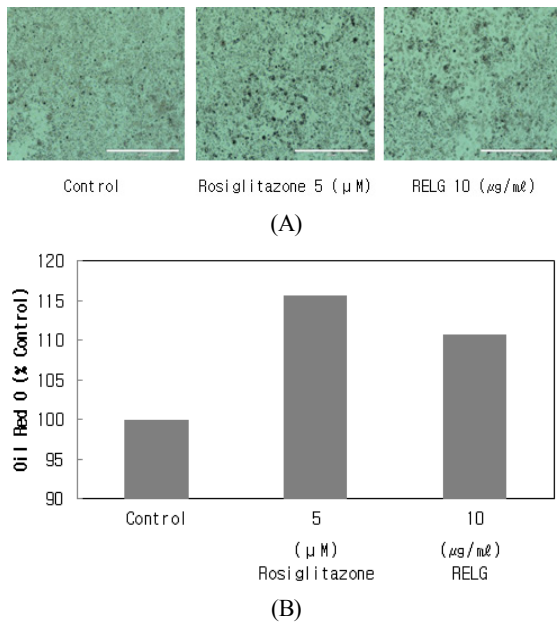


Figure 9. Effects of RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) on lipid synthesis in human keratinocytes. (A) Oil Red O staining (B) Oil Red O absorbance.

그 결과, 시료를 10 µg/mL 처치한 현미경 사진에서 붉은색으로 염색된 지질이 증가됨을 확인했다(Figure 9A). 염색된 세포를 용해시켜 흡광도를 측정하여 그래프로 나타낸 결과 지질 생합성이 대조군 대비 10% 증가했다(Figure 9B). 이를 통하여 RELG는 AQP-3의 발현을 증가시켜 수분통로를 열고 피부 내 지질의 합성을 증가시켜 피부장벽구조를 견고히 함으로써 피부 내 수분이 증발하는 것을 막아 보습 효능이 있음을 확인하였다.

3.8. 모유두세포의 항산화 효과

모유두세포의 항산화 효과를 확인하기 위해 두피의 성장과 탈모에 주요한 역할을 하는 모유두세포에서 RELG의 활성을 평가했다. 먼저 두피에 작용하는 스트레스로부터 모유두세포 보호능을 확인하기 위해 모유두세포에 UV와 H₂O₂를 처리하여 모유두세포의 세포 사멸을 확인했다. 그 결과, RELG가 모유두세포를 보호하여 15 µg/mL 처치 시 자극 처치군 대비 10%의 세포 사멸 억제를 확인했다(Figure 10).

또한 모유두세포에 자극 처치 시 ROS가 증가함을 확인하였으며, RELG의 ROS 감소효과를 확인했다. 특

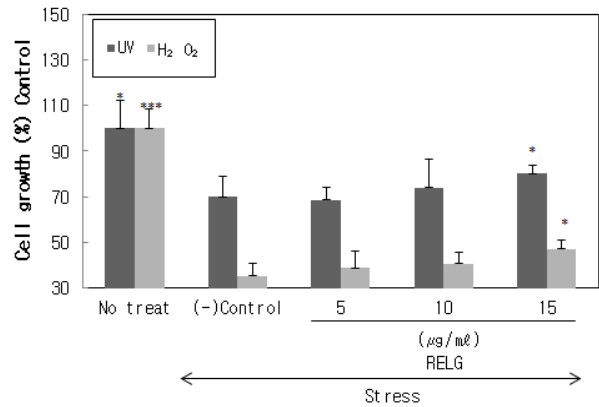


Figure 10. Effect of RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) on cell protection from stress in human hair follicle dermal papilla cells. The data shown represent the mean ± S.D. derived from three determinations. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.

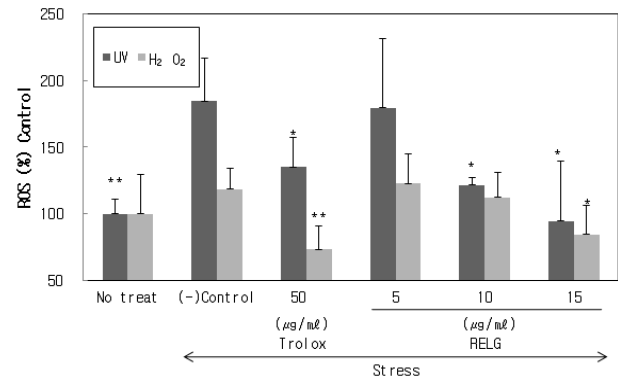


Figure 11. Effect of RELG (*R. damascena* extract containing low molecular glycoprotein, RELG) on ROS inhibitory activity from stress in human hair follicle dermal papilla cells. The data shown represent the mean ± S.D. derived from three determinations. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05 indicated statistically significant differences from the control group.

히 자외선 처치군에서 RELG 처치 시 15 µg/mL의 농도에서 ROS를 90% 감소시켰다(Figure 11).

4. 결 론

본 연구는 다마스크 장미에 존재하는 고분자 당단백을 bioconversion 기술을 이용하여 저분자화 시켰으며 이를 함유한 추출물을 이용해 항노화 효과를 확인하여

기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하였고 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 저분자 당단백을 함유한 다마스크 장미추출물의 항산화 효능을 확인한 결과 IC₅₀ 값이 22.64 µg/mL 으로 양성대조군인 ascorbic acid와 비슷한 수준의 항산화 효능을 나타내었고, 피부세포에서의 활성산소 제거능 확인결과 스트레스에 의해 증가된 활성산소가 15 µg/mL 처치 시 28% 감소한 것을 확인했다.
2. 콜라겐 분해효소인 MMP-1 발현 저해능을 확인한 결과 15 µg/mL 처치 시 자외선을 처치한 군 대비 MMP-1 발현량이 48% 감소했다.
3. 세포막에서 수분통로를 여는 보습유전자인 aquaporin 3와 피부 장벽 구성물질인 지질 생합성능을 확인한 결과 aquaporin 3는 10 µg/mL 처치 시 대조군 대비 44% 증가하였고 지질 생합성능은 대조군 대비 10% 증가하였다.
4. 모유두세포에서의 효능으로는 15 µg/mL 처치 시 스트레스 처치 군 대비 세포사멸을 10% 억제하고 활성산소의 생성을 90% 감소시켰다.

위 결과들을 통하여 저분자화된 당단백을 함유한 다마스크 장미추출물은 피부세포 내에서의 항산화, 항주름, 보습효과를 통한 항노화 효과를 가지며 모유두세포에서 또한 항산화 효능을 나타내어 효과적인 항노화 화장품 소재임을 확인하였다.

Reference

1. A. K. Balin and R. G. Allen, Mechanism of biologic aging. *Dermatol. Clin.*, **4**(3), 347 (1986).
2. M. Podda and M. Grundmann-Kollmann, Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin. Exp. Dermatol.*, **26**(7), 578 (2001).
3. F. Liebel, S. Kaur, E. Ruvolo, N. Kollias, and M. D. Southall, Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes. *J. Invest. Dermatol.*, **132**(7), 1901 (2012).
4. L. Rittie and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.*, **1**(4), 705 (2002).
5. L. S. King, D. Kozono, and P. Agre, From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**(9), 687 (2004).
6. Z. Nemes and P. M. Steinert, Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.*, **31**(1), 5 (1999).
7. S. M. Staufienbiel, B. W. Penninx, A. T. Spijker, B. M. Elzinga, and E. F. van Rossum, Hair cortisol, stress exposure, and mental health in humans: a systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, **38**(8), 1220 (2013).
8. R. M. Trueb, Oxidative stress in ageing of hair. *Int. J. Trichology*, **1**(1), 6 (2009).
9. M. H. Boskabady, M. N. Shafei, Z. Saberi, and S. Amini, Pharmacological effects of *Rosa damascena*. *Iran J. Basic Med. Sci.*, **14**(4), 295 (2011).
10. M. O. Yang, E. J. Cho, and J. H. Ha, Chemical composition of rose petals (*Rosa hybrida* L.) as a food material, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **31**(3), 539 (2002).
11. C. Cahoreau, D. Klett, and Y. Combarnous, Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors, *Front Endocrinol (Lausanne)*, ecollection (2015).
12. M. Shylaja and H. S. Seshadri, Glycoprotein: An overview, *Biochemical education*, **17**(4), 170 (1989).
13. J. M. Losada and M. Herrero, Pollen tube access to the ovule is mediated by glycoprotein secretion on the obturator of apple, *Ann. Bot.*, **119**(6), 989 (2017).
14. A. Schieber, K. Mihalev, N. Berardini, P. Mollov, and R. Carle, Flavonol glycosides from distilled petals of *Rosa damascena* Mill., *Z. Naturforsch. C.*, **60**(5-6), 379 (2005).
15. T. B. Ng, Z. F. Pi, H. Yue, L. Zhao, M. Fu, L. Li, J. Hou, L. S. Shi, R. R. Chen, Y. Jiang, and F. Lui, A polysaccharopeptide complex and a condensed tannin with antioxidant activity from dried rose (*Rosa rugosa*) flowers, *J. Pharm Pharmacol.*, **58**(4), 529 (2006).
16. K. S. Heo and K. T. Lim, Antioxidative effects of glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L., *J. Med. Food*, **7**(3), 349 (2004).

17. A. K. Saha and C. F. Brewer, Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method, *Carbohydr. Res.* **254**, 157 (1994).
18. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**(1), 265 (1951).
19. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**(4617), 1199 (1958).
20. H. Wang and J. A. Joseph, Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader, *Free Radic. Biol. Med.*, **27**(5), 612 (1999).
21. Y. Rong, Z. Geng and B. H. Lau, Ginkgo biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **20**(1), 121 (1996).
22. K. J. Cho, Y. S. Lee, and B. H. Ryu, Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180, *Bull. Korean Fish. Soc.*, **23**(5), 345 (1990).
23. Prabu K. and Natarajan E., Isolation and FTIR spectroscopy characterization of chitin from local sources, *Adv. Appl. Sci.*, **3**(2), 1870 (2012).
24. M. Lee, D. Huh, D. Jo, G. Lee, and S. Yoon, Flavonoids components and functional properties of citrus peel hydrolysate, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **36**(11), 1358 (2007).
25. M. Pinelo-Jiménez and A. S. Meyer, Enzyme-assisted extraction of antioxidants: release of phenols from vegetal matrixes, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, **7**(8), 3217 (2008).
26. K. H. Kim, K. T. Kim, Y. H. Kim, G. Kim, C. S. Han, S. H. Park, and B. Y. Lee, Preparation of oligo hyaluronic acid by hydrolysis and its application as a cosmetic ingredient, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **33**(3), 189 (2007).
27. Y. S. Soh, Hyaluronic acid; properties and applications, *Polym. Korea*, **12**(6), 484 (1988).
28. E. J. Shin, J. W. Park, J. W. Choi, J. Y. Seo, and Y. I. Park, Effects of molecular weights of sodium hyaluronate on the collagen synthesis, anti-inflammation and transdermal absorption, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **42**(3), 235 (2016).