

A Study of Anti-wrinkle Activities as a Functional Cosmetic Ingredient of *Rhododendron brachycarpum* Extracts

Hyeon-Ji Yeom¹, Min-Jeong Oh¹, Jung-Woo Chae² and Jin-Young Lee^{1*}

¹Division of Cosmetics Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Korea

²Gyeonggi-do Forest Environment Research Institute, Osan 12408, Korea

Received February 23, 2022 / Revised July 21, 2022 / Accepted August 9, 2022

The purpose of this study was to investigate activities as functional cosmetic materials, focusing on *Rhododendron brachycarpum* (RB) and *Rhododendron fortunei* (RF). The tyrosinase inhibitory effect, related to skin-whitening, was 32.6% and 39.3% respectively at the concentration of 1,000 µg/ml. The elastase inhibitory effect, related to skin anti-wrinkling activity, was 30% and 36.2% at 1,000 µg/ml concentration. Collagenase inhibitory activity showed 77.7%, and 80.2% respectively at 1,000 µg/ml concentration, which demonstrated excellent inhibitory activity. For a cell viability test, that measured on fibroblast cells by RB and RF extracts. Furthermore, the cell viability test showed 100.9% and 98.9% with cell viability at 100 µg/ml concentration in CCD-986Sk. The protein expression inhibitory effect of RB and RF extracts was measured by western blot at 25, 50, and 100 µg/ml concentrations, and the β-actin was used as a positive control. As a result, western blot of RB and RF extracts was measured by the expression inhibition rate of the MMP-1, MMP-2, MMP-3 protein, and was decreased by 67.2%, 65.5%, 13.6%, and 89.1%, 85.0%, and 62.7% at 100 µg/ml concentration. The mRNA expression inhibitory effect of RB and RF extracts was measured by RT-PCR at 25, 50, and 100 µg/ml concentrations, and the GAPDH was used as a positive control. According to the results of RT-PCR of RB and RF extracts, the expression inhibition rate of the MMP-1, MMP-2, and MMP-3 mRNA was decreased by 70.1%, 9.1%, 37.9%, and 38.2%, 8.3%, 57.3% at 100 µg/ml concentrations. So, RB and RF extracts showed the anti-wrinkle effectiveness as a functional cosmetic material.

Key words : Anti-wrinkle effects, MMP-2, MMP-3, *Rhododendron brachycarpum*, *Rhododendron fortunei*

서 론

빠르게 발전되는 의학과 향상된 생활수준에 의해 평균 수명이 과거에 비해 증가된 현대 사회에서는 건강에 대한 관심이 증가하고 있으며 외적인 아름다움과 노화에 대한 소비자들의 관심과 요구가 늘어나고 있다[30]. 또한 지속적인 환경오염으로 인한 자연주의 확산으로 여러 분야에서 천연, 유기농 및 친환경 제품이 선호되고 있으며 이로 인해 식용 또는 단순 치료 개념으로 사용해왔던 천연 소재들은 시대적인 요구에 의해 사용범위가 확대되고 있다. 특히 화장품 산업에서 기능성 화장품 소비 증가에 따라 항염증 및 노화방지, 주름 개선, 항산화 등의 효능을 가지

는 친환경 소재에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다 [18, 24].

피부는 표피, 진피, 피하조직의 세 가지 층으로 구성되어 있으며 진피는 피부의 90% 이상을 차지하는 결합조직 층으로써 다량의 교원섬유 및 탄력섬유 등의 단백질과 히알루론산이 존재하여 피부 구조를 지지하고, 표피의 각질형성세포에 영양소와 산소를 공급하는 역할을 한다. 섬유아세포에 의해 생성되는 섬유성 단백질(fibrous protein)은 glycosaminolytan (GAG), proteoglycan 및 세포 간 물질들과 함께 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 구조를 형성하고 있다. 이러한 ECM을 이루고 있는 섬유성 단백질은 조직의 구조와 피부의 탄력성에 관여하는데 피부에 조사되는 자외선이 섬유아세포와 각질형성세포에 유해한 영향을 미치게 되며 이로 인해 세포 내에 hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (HO·), superoxide anion radical (·O₂-) 및 singlet oxygen (¹O₂-)을 비롯한 다양한 ROS를 발생시켜 산화적 스트레스를 유도함으로써 세포외기질을 분해하는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현이 촉진되어 collagen 및 elastin의 생성이 억제되고 피부 세포

*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9552 Fax : +82-41-540-9538

E-mail : jylee@hoseo.edu

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.

의 탄력 감소와 항산화 방어체계를 무너뜨려 세포막 손상 및 세포 내 구조의 분해로 인해 외인성 피부 노화가 가속화된다[16, 24, 27, 36]

자외선 등으로 인한 자극 및 피부 노화는 단백질 인산화효소의 일종인 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 활성화에 의한 신호전달을 거쳐 AP-1 전사인자의 발현을 유도한다. AP-1은 세포의 성장, 분화 및 세포사멸에 관련되는 유전자의 발현에 관여하며 MMPs의 발현을 조절한다. Matrix metalloproteinases (MMPs)는 세포의 기질을 분해하는 금속단백질분해효소의 총칭으로 zinc²⁺ 의존성 endopeptidase로 기질 특이성에 따라 collagenase, gelatinase, matrilysin, stromelysin 및 membrane-type MMP 등으로 분류된다[20, 33]. 그 중 collagen을 분해하는 효소 중 가장 많이 알려진 MMP-1은 collagenase 1으로 type I 과 III collagen을 기질로 한다. MMP-2 (gelatinase-A, 72 kDa type IV collagenase)는 stromelysin 1인 MMP-3에 의해 분해되어 zymogen인 proMMP-1을 활성화한다. 이들의 과다발현을 저해함으로써 세포외기질 구조의 파괴를 완화하여 주름 생성을 억제하고 피부 탄력 감소를 개선시킬 수 있다[7, 11, 33].

만병초(*Rhododendron brachycarpum*)는 진달래과의 진달래속(*Rhododendron*)에 속하며[23], 대표적으로 만병초, 홍만병초(*Rhododendron brachycarpum* var. *roseum*), 노랑만병초(*Rhododendron aureum*) 등이 우리나라에 자생하고 있다[1]. 이 중 홍만병초는 만병초의 변종으로 대부분 울릉도에서 자생하고 있으며 높은 산의 숲 속에서 서식하고 관상용으로도 쓰인다. 또한 노랑만병초는 북방계 희귀식물로 러시아, 중국 및 일본 등지에 분포하며 해발 1,500 m 이상의 고산지역에 서식하여 국내에도 자생지가 존재하지만 적은 개체수를 가지고 있다. 울릉도는 고유의 지형과 지질, 기후 특성 및 지리적 위치로 인한 특유의 식물 분포를 가지고 있으며, 이곳에 자생하고 있는 식물들 중 울릉도 만병초(*Rhododendron brachycarpum*)는 고산지대에 서식하며 내한성과 내음성이 강한 특징이 있다. 울릉도 만병초는 만병초와 같은 계열의 DNA를 가지고 있어 *Rhododendron brachycarpum*과 같은 학명으로 명명되나 옆으로 퍼져 자라는 조금 다른 형태를 가진 식물이다. 최근 기후의 변화 및 등산객들이나 도민들의 무분별한 채취로 인한 훼손으로 피해를 받고 있으며 환경부로부터 지정된 보호수종으로써 산림청 희귀 및 멸종 위기식물로 지정되어 있다. 이에 따라 소중한 식물자원인 울릉도 만병초의 군락 서식지를 유지하고 보호하기 위해[23] 생육 및 재배 환경 등 생태학적 특성을 분석하여[9, 10] 서식지의 복원과 증식에 관한 연구가 진행되고 있다.

전 세계적으로 분포하고 있는 만병초 중에서 중국 고유의 *Rhododendron* 종 중 하나인 운금 만병초(*Rhododendron fortunei*)는 다양한 기후조건에 강하며 높은 내한성으로

우리나라 중남부의 기후에서도 잘 자라는 특성을 가진다. 처음에는 학명을 따라 포르투네이 만병초로 등록되었으나, 최근 중국 이름을 따라 운금(雲錦) 만병초로 명명되고 있다. 비단 구름을 뜻하는 雲錦은 꽃이 만개하였을 때 크고 밝은 색상의 아름다운 꽃들[22]이 모여 있는 모습이 마치 꽃구름처럼 보인다고 하여 붙여진 이름이라고 한다. 아름답고 강한 향의 꽃을 가진 운금 만병초는 장식성과 높은 환경적 가치로 우리나라에서도 조경 식물로 많이 사용되고 있는 추세이다.

본 연구에서는 다양한 만병초 중 대량 생산이 가능하고 채취가 쉬운 울릉도 만병초와 운금 만병초를 소재로 하여 주름 개선 활성을 검증함으로써 기능성 화장품 소재로서의 응용 가능성 및 이용가치를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험의 소재인 울릉도 만병초와 운금 만병초는 경기도 산림환경연구소에서 받아 다음의 공정에 따라 추출하였다. 건조된 시료를 각각 파쇄한 후 10배의 70% ethanol을 가하여 실온에서 24시간 침지하였다. 그 후 침전물과 상등액을 분리하여 반복 추출하였으며 각 시료의 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과하였다. EYELA evaporator를 사용해 감압 농축하여 용매인 ethanol을 완전히 제거한 후 동결 건조를 통해 수분을 제거한 파우더 상태로 -20°C에 보관하며 실험의 시료로 사용하였다.

세포주

본 연구에서 세포 배양 및 세포 독성 측정에 사용된 fibroblast cell line인 CCD-986Sk는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS), trypsin, phosphate buffered saline (PBS)는 Thermo Fisher Scientific (HyClone™, USA) 및 GIBCO BRL Co. (Grand Island, USA)에서 구입하여 세포 배양에 사용하였다.

시약 및 기기

미백 활성 측정 시약인 tyrosinase from mushroom, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) 등은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 주름개선 활성 측정에 사용된 시약은 elastase from porcine pancreas, collagenase from clostridium histolyticum, N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-p-nitroanilide는 Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH trifluoroacetate salt는 Bachem Holding AG (Bubendorf, Switzerland)에서 구입하여 사용하였다.

세포 생존을 측정 실험에 사용된 시약인 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 dimethylsulfoxide (DMSO)는 BioShop Inc. (Ontario, Canada)에서 구입하여 사용하였다. 주름 개선 활성에 대한 단백질 발현 측정 실험에 사용된 primary antibody인 β -actin, MMP-1, MMP-2, MMP-3와 secondary antibody로 사용한 anti-mouse는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였으며 mRNA 발현 측정 실험에 사용된 primer인 GAPDH, MMP-1, MMP-2, MMP-3는 BIONICS Co. (Seoul, Korea)에서 구입하였고 GoScript™ Reverse Transcription system은 Promega Corp. (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 대조군으로 사용되었다.

실험에 사용된 기기는 autoclave (JS Research Inc., Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), freeze drier (IlShinBioBase Co., Ltd., Korea), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), vortex (Scientific Industries, Inc., USA), microplate reader (TECAN, Austria), ELISA (Biotek Co., USA), UV/VIS spectrophotometer (Hitachi, Japan), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), centrifuge (Hanil Science Inc., Korea), microcentrifuge (Gyrozen, Korea), digital shaker (Daihan Scientific, Korea), microscope (Olympus, Japan), microvolume spectrometer (Colibri, Germany), Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA), Mini-PROTEAN® tetra cell (Bio-Rad, USA), Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co., Korea), PCR (ASTEC Co., Japan), UV transilluminator (BioTop, Switzerland)를 사용하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

멜라닌(melanin) 생합성 경로에 관여하는 중요한 효소인 tyrosinase 저해 활성을 측정하는 실험은 Yagi 등[37]의 방법에 따라 진행하였다. 농도별 시료용액 40 μ l에 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 μ l과 10 mM의 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)를 녹인 40 μ l의 기질 액을 첨가한 혼합액에 200 U/ml tyrosinase from mushroom 40 μ l를 첨가하여 37°C 조건에서 10분간 반응시켰다. 그 후 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm의 흡광도에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

Elastase 저해활성 측정

피부 주름 생성의 원인으로 작용하는 elastase의 저해 활성을 Cannell 등[2]의 방법에 따라 측정하였다. 일정 농

도가 되도록 각 시험용액을 희석한 후 40 μ l씩 96-well plate에 취하고, 50 mM의 tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 2.5 U/ml elastase from porcine pancreas 용액 40 μ l를 가한 후 37°C에서 2분간 반응시켰다. 그 후 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-L-ala-ala-ala-p-nitroanilide (0.5 mg/ml) 기질 액 80 μ l를 첨가하여 동일한 온도에서 30분간 반응시켜 생성되는 p-nitroanilide의 양을 445 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

Collagenase 저해활성 측정

피부의 교원섬유로 섬유성 단백질인 collagen을 분해하는 효소인 collagenase 저해활성 측정은 Wunsch E와 Heindrich HG의 방법[35]에 따라 측정하였다. 각 농도별 시험용액 50 μ l와 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM calcium chloride (CaCl₂)를 첨가하여 Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH trifluoroacetate salt (0.3 mg/ml)를 녹인 기질 액 125 μ l의 혼합액을 반응구로 설정하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 그 후 반응 정지 시약으로 6% citric acid 250 μ l를 넣고 1.5 ml의 ethyl acetate를 첨가하여 UV/VIS spectroscopy를 이용해 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

세포 배양

본 연구에서 사용된 섬유아세포인 CCD-986Sk는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 37°C의 온도와 5% CO₂ 조건의 incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

시험용액 처리에 따른 세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[3]에 따라 실시하였다. 96-well plate에 CCD-986Sk cell을 1×10^6 cells/well이 되도록 200 μ l씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였고, 농도별로 희석한 시료용액을 20 μ l씩 첨가하여 동일 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 여기에 MTT 용액을 2.5 mg/ml의 농도로 제조하여 40 μ l씩 첨가하여 3시간 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 형성된 formazan에 DMSO 100 μ l씩 각 well에 가하여 실온 조건에서 10분간 반응시킨 뒤 ELISA reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료를 처리하지 않은 구의 흡광도를

100%로 하여 시료첨가구의 상대적인 세포 생존율을 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

주름 생성과 관련된 MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3)에 대한 항주름 활성을 알아보기 위해 Western blot을 통한 단백질 발현 정도를 알아보았다. 섬유아세포인 CCD-986 Sk cell을 100 mm tissue culture dish에 1×10⁶ cells/dish가 되도록 seeding한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였으며, 배지를 제거한 후 각 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하여 다음 과정을 진행하였다. Complete mini 1 tab을 radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 가한 용액 80 µl를 각 dish에 분주하여 세포를 lysis한 후 centrifuge를 이용해 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 그 후 BCA protein assay kit를 사용해 상층액을 정량하였으며, 20 µl 단백질을 10% SDS-PAGE 상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer한 후 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에 1시간 동안 blocking을 진행하였다. Primary antibody를 1:500의 비율로 3% skim milk in TBST에 희석하여 4°C에서 over night한 후, 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하였다. Secondary antibody는 1:2,000으로 희석하여 실온에서 90분간 반응시켰으며 다시 TBST로 10분씩 3회 세척하여 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM system을 이용하여 밴드를 확인하였다.

RNA 추출 및 cDNA 합성

섬유아세포인 CCD-986Sk는 100 mm tissue culture dish에 1×10⁶ cells/dish로 seeding하여 24시간 동안 배양하였고 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 배지 상층액을 제거하여 trizol lysis buffer를 dish에 1 ml씩 분주하

여 각각의 세포를 lysis한 후 lysate를 e-tube에 옮겨주었다. 수거한 lysate에 chloroform을 200 µl씩 첨가한 후 30초간 inverting 하였으며 centrifuge를 이용해 4°C에서 13,200 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 상층액 400 µl를 새로운 e-tube에 옮겨 isopropanol 400 µl를 1:1의 비율로 혼합하여 inverting한 뒤 -20°C에서 보관하여 over night한 후 앞의 과정과 동일한 조건으로 원심분리하고 상층액을 제거하여 tube 바닥에 precipitation된 RNA pellet을 획득하였다. 75% EtOH-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 각 tube에 1 ml씩 분주하여 세척한 후 동일 조건에서 5분간 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 따라내고 실온에서 모두 증발시킨 뒤 DEPC를 처리한 water를 50 µl씩 분주하여 RNA pellet을 녹여주었다. A260/A280의 비율을 사용하여 1.8~2.0 순도의 total RNA를 추출하였으며 microvolume spectrometer를 이용해 total RNA 값을 측정하였다.

Reverse transcription-PCR

항주름 관련 인자인 MMP-1, MMP-2, MMP-3의 mRNA 발현양을 측정하기 위하여 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 실시하였다. 실험에 사용된 primer의 sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 합성한 cDNA와 primer, 5x green buffer, MgCl₂, 10 mM PCR nucleotide mix, GoTaq® DNA polymerase, nuclease free water를 첨가하여 혼합한 후 PCR을 진행하였다.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 96°C에서 10초, 64°C에서 30초, 72°C에서 60초로 총 30 cycles, MMP-1은 96°C에서 10초, 58°C에서 30초, 72°C에서 60초로 총 40 cycles, MMP-2는 96°C에서 10초, 63°C에서 30초, 72°C에서 60초로 총 40 cycles, MMP-3는 96°C에서 10초, 55°C에서 30초, 72°C에서 60초로 총 40 cycles로 구성하여 진행하였으며, PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide (EtBr)을 첨가한 1.5% agarose gel에 10 µl씩 100 V에서 30분간 전기영동 후 UV transilluminator를 이용해 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

| Gene | Primer | Sequence (5' →3') |
|-------|------------|-----------------------------------|
| GAPDH | Sense | ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC |
| | Anti-sense | TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA |
| MMP-1 | Forward | AGC GTG TGA CAG TAA GCT AA |
| | Reverse | GTT TTC CTC AGA AAG AGC AGC AT |
| MMP-2 | Forward | TTG CCA TCC TTC TCA AAG TTG TAG G |
| | Reverse | CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC |
| MMP-3 | Forward | TTG TTC TTT GAT GCA GTC AGC |
| | Reverse | GAT TTG CGC CAA AAG TGC |

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해활성 측정 결과

자외선 및 산화적 스트레스에 의해 표피 기저층에 존재하는 melanocyte가 활성화되며 tyrosine이 산화되고 melanin 과생성으로 기미, 주근깨 등의 색소 침착이 발생된다. 멜라닌 합성 억제 기전에 핵심적인 역할을 하는 효소인 tyrosinase는 tyrosine을 산화시켜 L-3,4-dihydroxy-phenylalanine (L-DOPA) 생성 후 DOPA-quinone으로 전환하며 melanin과 비례한 양을 형성한다. 이로 인해 tyrosinase 억제활성 실험은 피부 노화 방지 및 미백 소재 개발에 있어 유용한 평가법으로 인정되고 있다[4, 6, 26].

울릉도와 운금 만병초 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정 결과를 Fig. 1과 같이 나타내었다. 저해활성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 1,000 µg/ml에서 울릉도 만병초는 32.6%, 운금 만병초는 39.3%로 40%에 가까운 억제활성을 나타내었다. Kwak [21]의 연구에서 만병초 추출물과 같은 1,000 µg/ml의 농도의 선화 뿌리 추출물이 14.9%, Han 등[8]에서 포도씨 methanol 추출물은 18%의 tyrosinase 저해활성을 나타낸다고 보고됨에 따라 울릉도와 운금 만병초 에탄올 추출물의 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

Elastase 저해활성 측정 결과

진피조직 속의 세포외기질을 형성하고 높은 탄력성을 가진 중요한 단백질인 elastin [25]을 분해하는 효소인 elastase는 백혈구 과립 효소 중 하나로 비 특이적 가수분해 효소이다[14]. 피부 내 그물망 구조 조직이 elastase에 의해 파괴되며 탄력성 손실로 인해 피부가 처지고 주름 생성으로 인한 내인성 피부 노화가 발생하므로 이를 저해함으로써 피부 주름 생성을 개선할 수 있다[12, 28].

울릉도와 운금 만병초 에탄올 추출물이 elastase 활성에

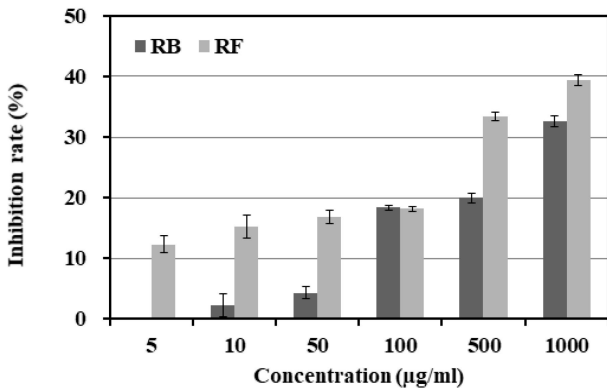


Fig. 1. Inhibition rate of extracts from *Rhododendron brachycarpum* on tyrosinase. ■ RB: *Rhododendron brachycarpum*, □ RF: *Rhododendron fortunei*. Result are means ± SD of triplicate data.

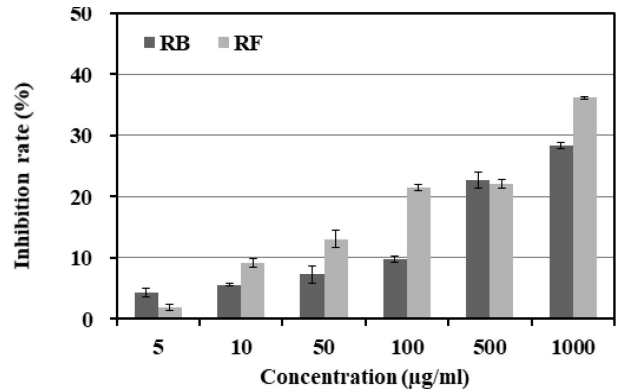


Fig. 2. Inhibition rate of extracts from *Rhododendron brachycarpum* on elastase. ■ RB: *Rhododendron brachycarpum*, □ RF: *Rhododendron fortunei*. Result are means ± SD of triplicate data.

미치는 영향을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 농도가 증가함에 따라 elastase 저해활성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 울릉도 만병초 추출물은 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 30%에 가까운 저해능을 보였으며, 운금 만병초 추출물은 같은 농도에서 36.2%의 억제활성을 나타내었다. Jeong 등[15]의 연구에서 사과육 EtOAc 분획물에서는 저해활성이 나타나지 않았으며, 청미래덩굴 열수 추출물이 1,000 µg/ml의 농도에서 16.3%의 저해활성을 보였다고 보고한 Lee 등[29]의 결과와 비교하였을 때 울릉도와 운금 만병초 추출물은 이에 비해 높은 elastase 저해 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

Collagenase 저해활성 측정 결과

유연한 결합 조직인 collagen은 피부 내 진피층의 80% 이상을 차지하고 있는 구조 단백질로 탄력 및 보습기능을 한다. 이외에도 elastin, fibronectin, laminin 등이 세포외기질을 구성하고 있다[5]. 자연노화와 같은 내적 요인에 의해 체내의 collagen 생성이 감소하고, 자외선에 의한 활성산소종 증가 및 외부 환경에 의한 스트레스에 의해 collagen 분해가 가속화되어 피부 기질이 파괴된다. 또한 collagenase에 의해 collagen이 다른 세포외기질과 가교결합을 이루지 못하게 되어 수분, 탄력이 감소하며 주름이 생기게 된다. 이로써 피부의 주름 생성에 있어 collagenase 활성을 저해하는 것은 피부노화를 개선함에 있어 매우 중요하다[13, 19].

Collagen을 분해하는 효소인 collagenase 억제활성에 울릉도와 운금 만병초 추출물이 미치는 영향을 알아보았으며, Fig. 3과 같이 나타내었다. 농도 의존적으로 저해능이 증가하였고 낮은 농도에서도 50%에 가까운 저해활성을 보였다. 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 울릉도와 운금 만병초 추출물은 각각 77.7%, 80.2%의 collagenase 억제 효과를 확인할 수 있었다. Kim [17]의 연구에 따르면 진생베리

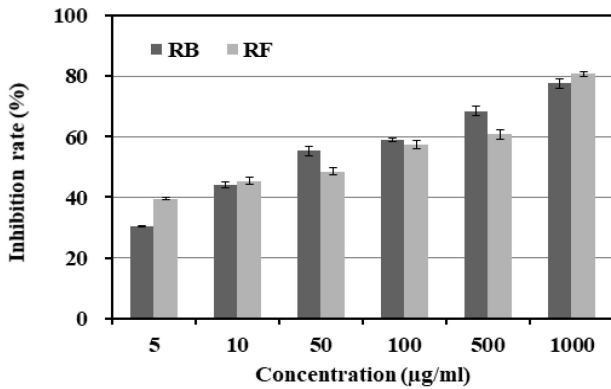


Fig. 3. Inhibition rate of extracts from *Rhododendron brachycarpum* on collagenase. ■ RB: *Rhododendron brachycarpum*, □ RF: *Rhododendron fortunei*. Result are means ± SD of triplicate data.

발효물은 1,000 µg/ml에서 33.44%의 저해 활성이 보고되었고, 선복화 가압 열수 추출물이 1,000 µg/ml에서 34.62%라고 보고한 Seo 등[32]의 결과와 비교하면 울릉도와 운금 만병초 추출물은 이에 비해 약 2배 높은 collagenase 저해 활성을 나타내었다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 결과

세포 증식 및 사멸도를 측정하며 tetrazolium salt를 이용한 방법으로 세포 독성을 판단하기에 비교적 간단한 실험이다[31]. Tetrazolium salt는 dehydrogenase 및 환원형 화합물 등의 효소에 의해 쉽게 환원되어 formazan을 형성한다. 미토콘드리아의 전자전달계 과정을 통해 왕성한 대사활동을 하고 있는 세포는 에너지를 생산하며, 전자전달계에 존재하는 탈수소효소가 tetrazolium salt를 분해하여 for-

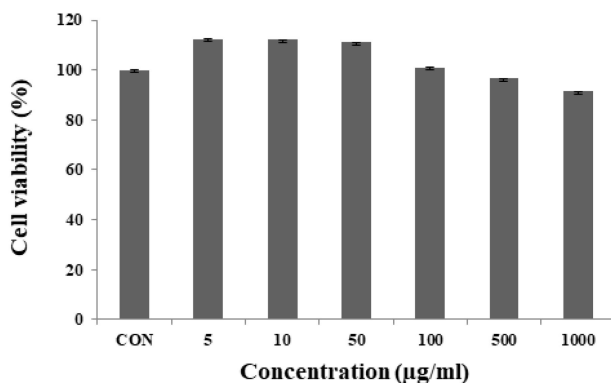


Fig. 4. Cell viability of extract from *Rhododendron brachycarpum* on fibroblast cell (CCD-986Sk). CCD-986Sk cells were incubated for 24 hr in DMEM containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *Rhododendron brachycarpum* for 24 hr and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean ± SD of three individual experiments.

mazan을 생성한다. 또한 노란색의 수용성 MTT tetrazolium을 세포에 처리하면, 온전한 대사과정이 가능한 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소효소에 의해 tetrazolium의 ring 구조가 파괴되면서 자주색을 띄는 비수용성의 MTT formazan 결정으로 환원되는 원리이다[34].

울릉도 만병초와 운금 만병초 추출물이 섬유아세포인 CCD-986Sk cell의 증식에 미치는 영향을 확인하였기 위하여 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 시료용액을 Fig. 4, Fig. 5와 같이 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/ml의 농도로 처리하여 측정한 결과 농도 의존적으로 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 울릉도 만병초 추출물은 모든 농도구간에서 90% 이상, 운금 만병초 추출물은 80% 이상의 생존율을 나타내었으며 이하의 실험에서는 추출물이 세포 증식에 영향을 거의 미치지 않아 생존율이 100%에 가까운 농도인 25, 50, 100 µg/ml를 사용하여 진행하였다.

Western blot을 통한 단백질 발현 측정 결과

피부노화 및 주름 개선을 위해서는 collagen, elastin, fibronectin, laminin 등으로 이루어진 세포외기질 구조를 파괴하는 MMPs의 활성을 저해하는 것이 중요하다[5, 20]. 이에 울릉도와 운금 만병초 추출물이 MMPs 관련 인자인 MMP-1, MMP-2, MMP-3의 단백질 발현을 억제하는지 확인하기 위하여 Western blot을 실시한 결과 Fig. 6, Fig. 7과 같이 나타내었다. 이때 세포의 다양한 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 미비한 house keeping gene인 β-actin을 positive control로 사용하였다. 두 가지 추출물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 결과, 모두 농도 의존적으로 모든 인자에 대해 단백질 발현량이 감소함을 확인할 수 있었다. 울릉도 만병초 추출물은 MMP-2 인자에 대해 86.4%의

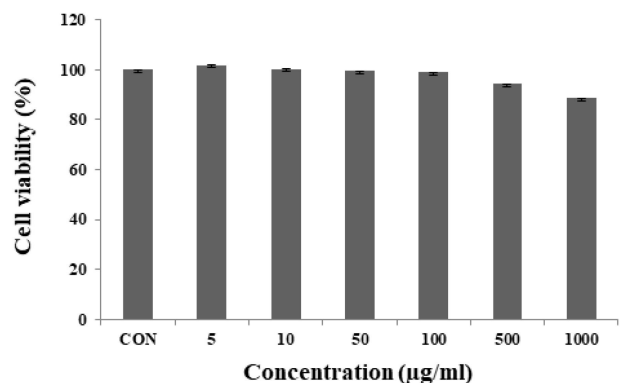


Fig. 5. Cell viability of extract from *Rhododendron fortunei* on fibroblast cell (CCD-986Sk). CCD-986Sk cells were incubated for 24 hr in DMEM containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *Rhododendron fortunei* for 24 hr and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean ± SD of three individual experiments.

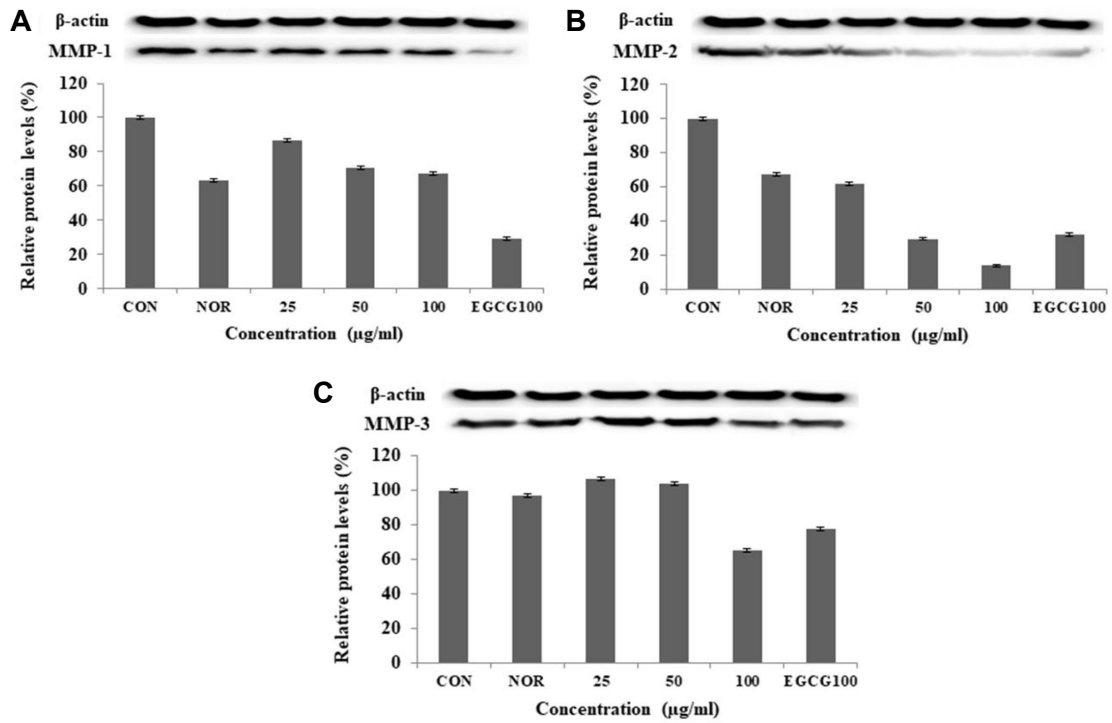


Fig. 6. MMP-1, MMP-2 and MMP-3 protein expression rate of extract from *Rhododendron brachycarpum* on fibroblast cell (CCD-986Sk). After CCD-986Sk cell (1×10^6 cells) were incubated in DMEM containing 10% FBS for 24 hr, the cells were treated *Rhododendron brachycarpum* extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ concentrations for 24 hr. Results are means \pm SD of three individual experiments.

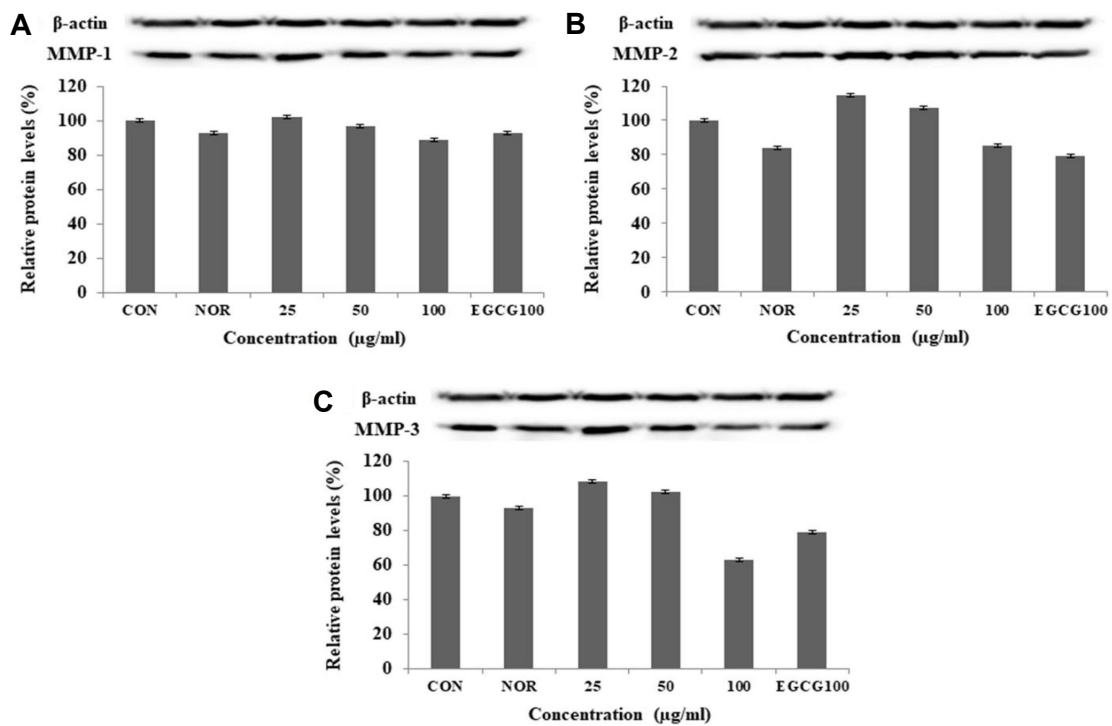


Fig. 7. MMP-1, MMP-2 and MMP-3 protein expression rate of extract from *Rhododendron fortunei* on fibroblast cell (CCD-986Sk). After CCD-986Sk cell (1×10^6 cells) were incubated in DMEM containing 10% FBS for 24 hr, the cells were treated *Rhododendron fortunei* extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ concentrations for 24 hr. Results are means \pm SD of three individual experiments.

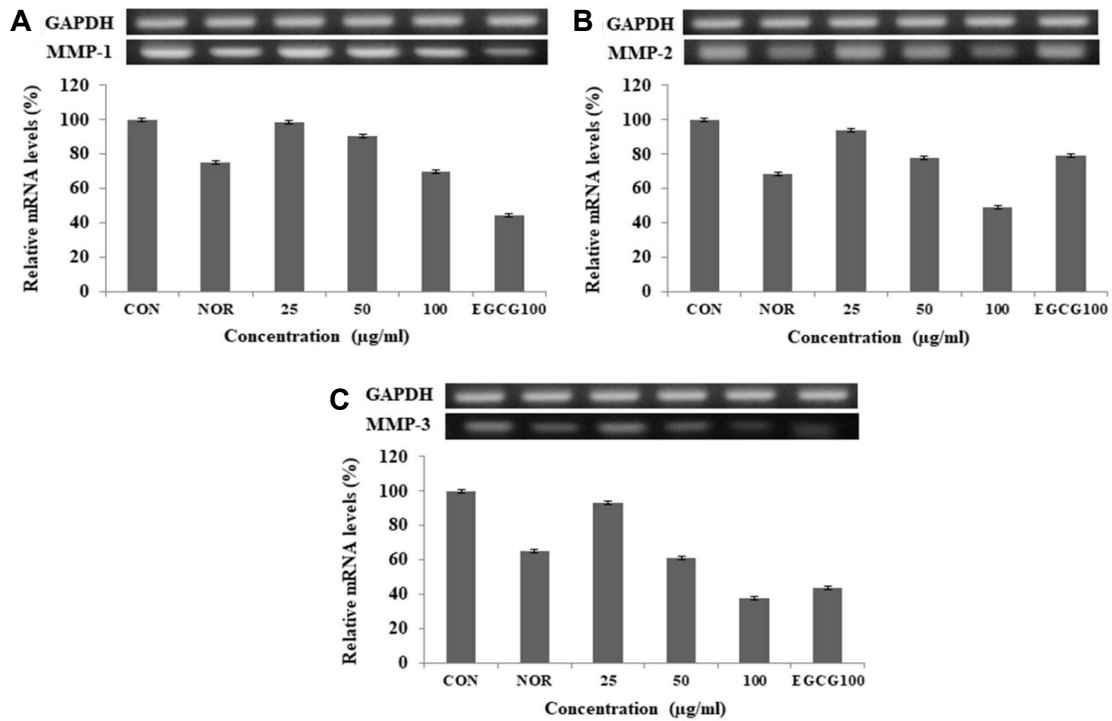


Fig. 8. MMP-1, MMP-2 and MMP-3 mRNA expression rate of extract from *Rhododendron brachycarpum* on fibroblast cell (CCD-986Sk). After CCD-986Sk cell (1×10^6 cells) were incubated in DMEM containing 10% FBS for 24 hr, the cells were treated *Rhododendron brachycarpum* extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ concentrations for 24 hr. Results are means \pm SD of three individual experiments.

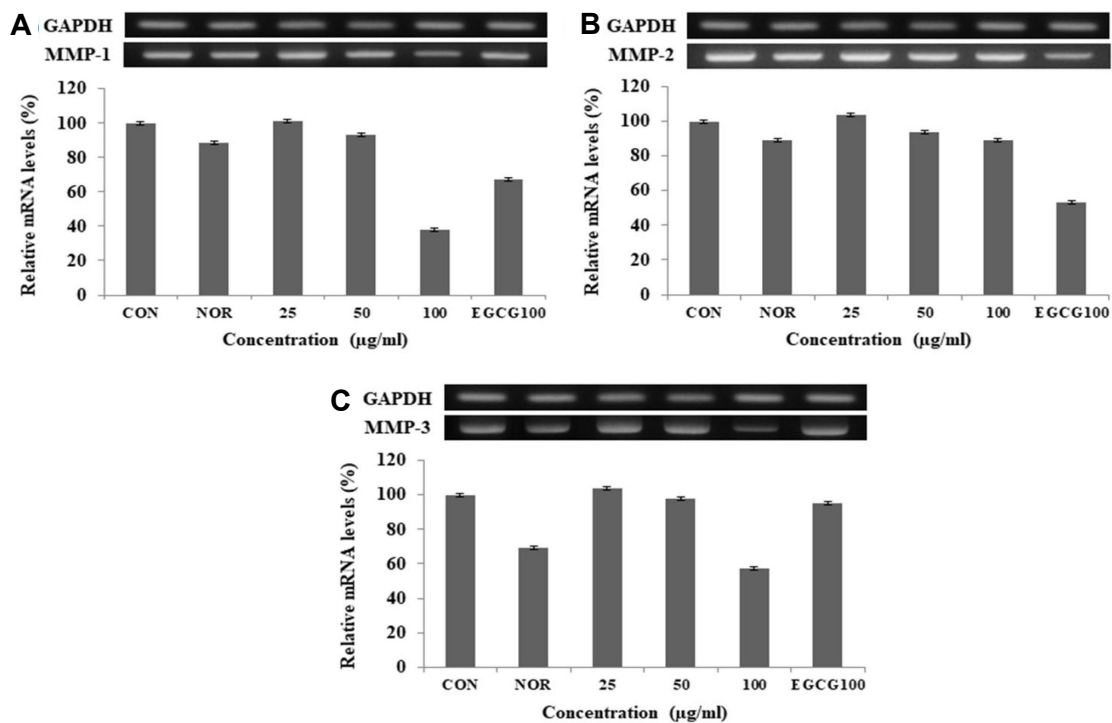


Fig. 9. MMP-1, MMP-2 and MMP-3 mRNA expression rate of extract from *Rhododendron fortunei* on fibroblast cell (CCD-986Sk). After CCD-986Sk cell (1×10^6 cells) were incubated in DMEM containing 10% FBS for 24 hr, the cells were treated *Rhododendron fortunei* extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ concentrations for 24 hr. Results are means \pm SD of three individual experiments.

우수한 단백질 발현 억제를 보였으며, MMP-3는 대조군과 유의한 결과를 나타내었다. 운금 만병초 추출물은 MMP-1과 MMP-2는 대조군인 EGCG와 유의한 결과를 보였고, MMP-3는 대조군에 비해 높은 단백질 발현 억제율을 확인할 수 있었다.

Reverse transcription-PCR을 통한 mRNA 발현 측정 결과

울릉도와 운금 만병초 추출물이 주름개선 관련 인자인 MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3)에 대한 mRNA 발현양에 미치는 영향을 알아보기 위하여 reverse transcription-PCR을 진행하였다. 첨유아세포인 CCD-986Sk에 울릉도와 운금 만병초 추출물 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리하였으며, positive control로 GAPDH를 사용하였다. 그 결과 Fig. 8, 9와 같이 MMP-1, MMP-2, MMP-3의 mRNA 발현양이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. 울릉도 만병초 추출물에 대해 MMP-2가 100 µg/ml에서 50%의 mRNA 억제율을 보여 가장 우수한 발현 억제를 나타내었으며, 운금 만병초 추출물에 대해서는 MMP-1과 MMP-3가 각각 100 µg/ml에서 61.9%, 42.6%의 mRNA를 억제하여 대조군과 비교하였을 때 높은 발현 억제를 확인할 수 있었다. 이로써 울릉도와 운금 만병초 추출물의 주름 예방 및 개선 효과를 통해, 향후 항주름 관련 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성 및 가치를 확인할 수 있었다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Byun, K. S., Lee, Y. W., Jin, H. J., Lee, M. K., Lee, B. Y., Lee, K. J., Heo, M. Y., Yu, C. Y. and Lee, J. H. 2005. Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpum* D. Don leaves. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* **13**, 199-205.
- Cannell, R. J. P., Kellan, S. J., Owsianks, A. M. and Walker, J. M. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**, 10-14.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Choe, Y. S. and Choe, T. B. 2014. Melanogenesis inhibitory effects of *Allium hookeri* extract in B16F10 mouse melanoma cell. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **12**, 163-168.
- Choi, M. E., Jeon, B. K., Kim, D. S., Mun, J. Y. and Woo, W. H. 2009. A study on application for beauty food of mixture of Korean red ginseng and *Fagopyrum esculentum* : Anti-oxidative effect and collagenase inhibitory activity. *Herb. Formula Sci.* **17**, 153-162.
- Choi, M. H. and Shin, H. J. 2015. Anti-oxidative and antimellogenesis effects of blueberry extract. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **13**, 261-266.
- Fisher, G. J., Datta, S., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J. J. 1996. Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**, 335-339.
- Han, J. Y., Sung, J. H., Kim, D. J., Jeong, H. S. and Lee, J. S. 2008. Inhibitory effect of methanol extract and its fractions from grape seeds on mushroom tyrosinase. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 1679-1683.
- Hong, H. O., Lee, K. E. and Yoo, K. C. 1984. Studies on the wild *Rhododendron brachycarpum* in Korea (3) - With special reference to the growth environments and cultural requirements. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **25**, 50-55.
- Hong, H. O., Lee, K. E., Yoo, K. C. and Han, K. H. 1983. Studies on the wild *Rhododendron brachycarpum* in Korea (2) - With special reference to the growth environments. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **24**, 57-61.
- Hong, S. H., Park, K., Junji, M., Kunio, A., Lee, T. S., Kwon, T. K., Kwak, J., Kim, C. H. and Chang, Y. C. 2005. Ascochlorin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing activator protein-1-mediated gene expression through the ERK1/2 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 25202-25209.
- Hwang, J. Y., Cho, H. Y. and Pyo, Y. H. 2016. Effect of unpolished rice vinegar containing *Monascus*-fermented soybean on inhibitory activities of tyrosinase and elastase. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **45**, 149-154.
- Jang, Y. A. 2016. A verification of cosmetic effect about anti-oxidant and anti-wrinkle of 11 Native Plants. *J. Life Sci.* **26**, 782-788.
- Jeon, Y. S., Jo, B. S., Park, H. J., Kang, S. A. and Cho, Y. J. 2012. Screening of biological activity of *Caragana sinica* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1211-1219.
- Jeong, H. R., Jo, Y. N., Jeong, J. H., Jin, D. E., Song, B. G. and Heo, H. J. 2011. Whitening and anti-wrinkle effects of apple extracts. *Kor. J. Food Preserv.* **18**, 597-603.
- Kim, E. S., Kim, J. S. and Kim, G. N. 2012. Anti-oxidant function of genistein against H₂O₂-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **10**, 541-547.
- Kim, I. C. 2020. Study on cosmeceutical activities from fermented ginseng berry extracts. *J. Kor. Appl. Sci. Technol.* **37**, 28-37.
- Kim, K. D. and Kim, S. J. 2007. The study on the efficacy of herbal plant extracts by the part and solvent extraction. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **33**, 127-135.
- 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-I activity in human der-

- mal fibroblast. *J. Ginseng Res.* **31**, 86-92.
20. Kim, N. S., Lee, C. M., Lee, S. H. and Kim, Y. C. 2013. Inhibitory efficacy of water-soluble extracts from green, white and black teas on MMP-2 activity and MMP-1 gene expression in human dermal fibroblasts. *J. Invest. Cosmetol.* **9**, 21-26.
 21. Kwak, C. G. 2009. Analysis on the contents and tyrosinase inhibitory effect of *Calystegia japonica*. Master's thesis, Daegu Haany University, Korea.
 22. Lan, M. O., Chen, J. H., Chen, F., XU, Q., Tong, Z., Huang, H., Dong, R., Lou X. and Lin, E. 2020. Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl. *J. Integr. Agric.* **19**, 2016-2026.
 23. Lee, B. C. 2012. Physiological and biochemical characteristics concerning to the cold tolerance of Korean *Rhododendron* species. Ph.D. dissertation, The University of Seoul, Korea.
 24. Lee, H. B., Lee, H. B., Lee, C. Y. and Kim, E. K. 2007. Trend of depigmenting research based on patent analysis. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **33**, 209-217.
 25. Lee, K. K., Kim, J. H., Cho, J. J. and Choi, J. D. 1999. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. *Inter. J. Cosm. Sci.* **21**, 71-82.
 26. Lee, S. H., Kim, S. Y., Kim, J. I., Jang, T. S. and Chung, S. Y. 1999. The isolation of the inhibitory constituents on melanin polymer formation from the leaves of *Cercis chinensis*. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**, 397-403.
 27. Lee, S. H., Park, S. H., Lee, K. H., Park, S. J. and Kim, Y. H. 2011. Effect of *Inonotus obliquus* extract on the expression MMPs and HAS-2. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **37**, 237-245.
 28. Lee, S. Y., Chun, H., Cho, H. Y. and An, J. H. 2003. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* Bunge in fibroblast cell line HS68 cells. *J. Appl. Biol. Chem.* **46**, 60-65.
 29. Lee, S. Y. and Lee, J. Y. 2013. Inhibitory efficacy of *Smilax china* L. on pro-collagen type-1 activity and MMP-1 gene expression in fibroblasts (CCD-986sk). *J. Life Sci.* **23**, 1239-1245.
 30. Na, E. J., Jang, H. H. and Kim, G. R. 2016. Review of recent studies and research analysis for anti-oxidant and anti-aging materials. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **14**, 481-491.
 31. Park, E. H., Min, S. K., Park, Y. K., Park, S. H., Kim, N. H., Hwang, S. J. and Jin, S. H. 2011. Study for antiviral activity of methanol extracts in indigenous plants by MTT assay. *The Annual Report of Busan Metropolitan City Institute of Health & Environment* **21**, 9-15.
 32. Seo, S. J., Park, E. J. and Kim, N. W. 2015. Anti-wrinkle and antioxidant activity of a water soluble extract from *Inulae flos*. *J. Invest Cosmetol.* **11**, 107-114.
 33. So, S. H., Lee, S. K., Hwang, E. I., Koo, B. S., Han, G. H., Chung, J. H., Lee, M. J. and Kim, N. M. 2008. Mechanisms of Korean red ginseng and herb extracts (KTNG0345) for anti-wrinkle activity. *J. Ginseng Res.* **32**, 3-47.
 34. Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T. and Sawamura, M. 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(Phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **251**, 206-209.
 35. Wünsch, E. and Heidrich, H. C. 1963. Zur quantitativen bestimmung der kollagenase. *Bio. Chem.* **333**, 149-151.
 36. Xuan, S. H., Kim, G. Y., Yu, J. Y., Kim, J. W., Yang, Y. R., Jeon, Y. H., Jeong, Y. J., Kim, A. R. and Park, S. N. 2016. Antioxidant and cellular protective effects against oxidative stress of *Calendula officinalis* flowers extracts in human skin cells. *Appl. Chem. Eng.* **27**, 620-626.
 37. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by Aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.

초록 : 만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 주름개선 활성에 관한 연구

염현지¹ · 오민정¹ · 채정우² · 이진영^{1*}

(¹호서대학교 화장품생명공학부, ²경기도산림환경연구소)

본 연구는 많은 만병초의 종류 중 울릉도 만병초와 운금 만병초를 중심으로 주름개선 활성 검증을 통해 기능성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하고자 하였다. 울릉도와 운금 만병초 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정 결과 1,000 µg/ml의 농도에서 울릉도 만병초 추출물은 32.6%의 저해능을, 운금 만병초 추출물은 39.3%의 억제활성을 나타내었다. 또한 두 가지 추출물의 elastase 저해활성을 알아본 결과, 농도 의존적으로 활성을 억제하였으며 1,000 µg/ml에서 28.3%, 36.2%의 억제활성을 확인할 수 있었다. Collagenase 저해활성을 측정한 결과, 울릉도 및 운금 만병초 추출물 1,000 µg/ml의 농도에서 각각 77.7%, 80.7%의 우수한 저해활성을 확인할 수 있었다. 만병초 추출물들의 주름개선 활성을 알아보기 위해, 섬유아세포인 CCD-986Sk의 세포 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과 울릉도와 운금 만병초 추출물 모두 모든 농도 구간에서 80% 이상의 생존율을 보였으며, 이하의 실험은 100%에 가까운 생존율을 나타낸 25, 50, 100 µg/ml의 농도구간으로 설정하여 진행하였다. Western blot을 통해 주름개선 관련 인자인 MMP-1, MMP-2, MMP-3의 단백질 발현양을 측정한 결과 두 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 발현양이 감소하였으며, 100 µg/ml의 농도에서 울릉도 만병초는 67.2%, 65.5%, 13.6%, 운금 만병초는 89.1%, 85.0%, 62.7%의 발현양을 나타내었다. Reverse transcription-PCR을 통해 동일한 인자의 mRNA 발현양을 측정한 결과, 울릉도와 운금 만병초 추출물 모두 농도 의존적으로 발현양이 감소되었으며, 100 µg/ml의 농도에서 울릉도 만병초는 70.1%, 9.1%, 37.9%, 운금 만병초는 38.2%, 8.3%, 57.3%의 발현양을 나타내었고 MMP-3 인자에서 대조군에 비해 우수한 mRNA 발현 억제율을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과로 울릉도 만병초와 운금 만병초의 주름개선 활성을 검증함으로써 기능성 화장품 소재로서의 이용 가치를 확인할 수 있었다.