

사과 ‘히로사키’ 캘러스 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 특성

고승희, 김영수, 이진혁, 김일현, 김승범, 노경백, 신승우, 정은선, 박덕훈*

Functional Characterization of Callus Extracts of Apple ‘Hirosaki’ for Cosmetic Materials

Seunghee Ko, Young-Soo Kim, Jin-Hyuck Lee, Il-Hyun Kim, Seungbeom Kim, Kyungbaeg Roh, Seungwoo Shin, Eunsun Jung, and Deokhoon Park*

접수: 2013년 7월 4일 / 게재승인: 2013년 8월 26일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In order to investigate functional characterization of callus extracts of apple ‘Hirosaki’ for cosmetic materials, biological activities of its extracts including wrinkle improvement, hair growth, and anti-inflammatory effect were investigated. The callus extract showed similar activity with TGF- β used as positive control at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the test of collagen synthesis, and increased 40% of proliferation of hair follicle dermal papilla cells. Especially, in case of anti-inflammatory effect, callus extract inhibited about 50% of COX-2 expression which was known as response for intermediating inflammation, and about 70% of eotaxin-1 production which was increased by atopy dermatitis.

Keywords: Apple, Callus extract, Plant cell culture, Anti-wrinkle, Hair growth, Anti-inflammation

1. 서론

사과 (*Malus domestica* Borkh.)는 식이섬유, 미네랄, vitamin C와 같은 영양분을 함유하고 있으며, 그 외에도 carotenoids, flavonoids, isoflavonoids, phenolic acids 등의 다양한 phytochemical에 의해서 항산화, 항암 및 심혈관 질환과 비만 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [1,2].

이러한 사과를 활용한 화장품 소재로서의 국내 연구로 지금까지 열매와 꽃잎 추출물의 효능이 보고되어 있다. 사과의 과육과 과피 추출물은 높은 항산화 활성과 미백 효능이 보고되었으며, 특히 과피의 경우 콜라겐 생합성 증진 효과를 보여 과육보다는 과피의 효능이 더 높은 것으로 보고되었다 [3]. 꽃잎 추출물에서는 항산화 활성, 미백, 콜라겐 생합성 증진 효과와 여드름균인 *P. acnes*에 대해서도 항균 활성을 나타내었으며, 이러한 효능은 추출물에 함유되어 있는 다량의 페놀성 화합물로부터 기인한 것으로 판단되고 있다 [4]. 하지만, 사과 캘러스 관련 연구는 스위스 사과 품종인 ‘Uttwiler Sptlauber’ 캘러스 추출물의 Human stem cell 증식 및 보호 효과, 모낭세포의 노화 억제, 임상에서의 눈가의 주름개선 효과가 알려져 있을 뿐 다른 효능에 관한 연구는 미비한 실정이다 [5].

최근에 식물의 탈분화 세포인 캘러스를 이용한 화장품 소재로서의 효능 연구가 이루어지면서, 국내에서는 은행과 홍경천 캘러스 추출물에서의 항산화 활성과 가가이모과잎 캘러스 추출물의 항비만 효과 등 여러 연구가 보고되고 있지만 [6-8], 식물의 캘러스 배양은 배양조건, 배양방식, 캘러스 유도에 사용된 식물 조직 등에 따라 유효성분의 함량과 활성의 차이가 나타나는 것으로 알려져 있다. 은행 (*Ginkgo biloba* L.)의 캘러스 배양은 배양조건에 따라 항산화 활성의 차이를 나타내었고 [6], 또한 바질 (*Ocimum sanctum* L.)의 캘러스와 캘러스유래 식물 조직 (잎, 줄기)의 성분을 분석해본 결과, 총 폴리페놀 함량과 DPPH radical 소거능에서 차이를 나타내었다 [9]. 이러한 연구결과로 보아 다른 품종과 다른 배양 조건에서 배양된 사과 캘러스 추출물 또한 이미 알려진 ‘Uttwiler Sptlauber’의 캘러스 추출물과는 다른 효능을 나타

낼 가능성이 높은 것으로 판단하였다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 재배되고 있는 히로사키 (Hirosaki) 품종의 켈러스 추출물의 생리활성 검증을 통해 기능성 화장품 소재로서의 응용가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험의 재료로 히로사키 품종의 사과나무를 서울 화훼시장에서 구입 후 이용하였다. 사과나무의 당년생 줄기를 70% 에탄올에 30초간 침지, 중성세제로 10분간 세척, 2% 차아염소산나트륨으로 15분간 살균한 후 멸균수로 3회 세척하여 켈러스 유도에 사용하였다. 표면 살균된 줄기는 두께 2~3 mm의 크기로 잘라서 켈러스유도배지 위에 치상하였다. 켈러스유도배지는 MS 기본배지 [10] 조성액에 3% sucrose, 0.8% agar를 첨가하였고, 식물생장조절제로 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0.5 mg/L와 6-benzylaminopurine (BA) 1.0 mg/L를 혼합 처리하였다. pH는 1 N KOH를 이용하여 pH 5.8로 보정 후 121°C에서 15분간 고압멸균 후 사용하였다. 배양 조건으로는 24±1°C에서 암배양하였고, 유도된 켈러스는 켈러스유도배지에서 3주 간격으로 계대배양하여 증식하였다.

2.2. 시료 추출

건조된 켈러스에 70% 에탄올을 시료대비 1:10 (w/v)의 비율로 첨가하여 1시간 동안 초음파 추출을 3회 반복하였다. 이 추출물을 여과지 (Whatman No.1)로 여과한 후 회전압축축기 40°C에서 농축하였고, 농축된 추출물은 동결건조하여 시료로 사용하였다.

2.3. 콜라겐 생합성 증진 활성 분석

켈러스 추출물의 콜라겐 생합성 증진 활성은 인간유래 섬유아세포의 콜라겐 생합성량을 측정하였다. 섬유아세포를 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 37°C, 5% CO₂조건으로 배양하고 계대 후 4~15세대 세포를 실험에 사용하였다. 세포를 96 well plate에 1×10⁴ 개/well씩 분주하여 10% FBS가 첨가된 DMEM에서 24시간 동안 배양한 후, DMSO에 녹인 시료를 FBS가 포함되지 않은 새로운 DMEM에 1, 10, 50 µg/mL 농도 별로 첨가하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 배지 중에 유리된 콜라겐의 양은 배양액을 procollagen Type I C peptide EIA kit (Takara bio, Japan)를 이용하여 측정하였다. 표준검량선은 콜라겐 측정키트에 포함된 표준용액을 희석한 후 450 nm에서 ELISA plate reader (Powerwave X, Bio-tek INC, VT)로 흡광도를 측정하여 작성하고, 이를 이용하여 콜라겐 생성량을 산정하였다.

2.4. 세포생존력 분석

세포생존력은 MTT assay를 이용해 측정하였다. 배양이 끝난

후 전체 배지의 1/10되는 양으로 MTT 용액 (1 mg/mL in PBS)을 넣어주고, 37°C, 5% CO₂배양기에서 4시간 반응하였다. 배양액을 모두 제거하고 DMSO를 500 µL씩 넣고 세포 내 형성된 formazan을 용해시킨 후, 540 nm에서 ELISA plate reader로 흡광도를 측정하여 세포 증식을 확인하였다.

2.5. 모유두 세포 증식 활성 활성 분석

켈러스 추출물의 발모소재로서의 이용가능성을 검토하기 위해 모유두 세포의 세포증식을 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 통하여 측정하였다. 모유두 세포는 Supplement Mix follicle dermal papilla cell GM이 첨가된 Follicle dermal papilla cell growth medium에서 37°C, 5% CO₂조건으로 배양하였고, 계대 후 4~11세대 세포를 실험에 사용하였다. 세포를 12 well plate에 5×10⁴ 개/well씩 분주하여 24시간 동안 배양한 후 serum-free media로 바꾸어주고 DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 50 µg/mL 농도별로 처리한 후 72시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 후 MTT assay를 통하여 세포 증식력을 측정하였다.

2.6. Cyclooxygenase-2 (COX-2) 저해 측정

RAW 264.7 세포를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM에서 37°C, 5% CO₂조건으로 배양하였고, 12 well plate에 5×10⁴ 개/well씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 transfection reagent를 이용하여 COX-2 reporter vector를 transfection시켰다. 24시간 배양 후 FBS가 포함되지 않은 새로운 DMEM로 바꾸어준 후, DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 100 µg/mL 농도별로 전처리하여 1시간 동안 전배양시켰다. 전배양 후 lipopolysaccharide (LPS)를 200 ng/mL의 농도로 각각의 시험군에 처리하여 14시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 수확하여 얻어진 pellet을 50~100 µL의 reporter lysis buffer를 이용하여 얼음 안에서 1시간 용해하였다. 1시간 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 luciferase substrate solution과 1:1 (v/v)로 첨가한 다음 luminometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. Eotaxin-1 저해 측정

NIH/3T3 세포를 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM에서 37°C, 5% CO₂조건으로 배양하였고, 12 well plate에 1×10⁵ 개/well씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 FBS가 포함되지 않은 새로운 DMEM로 바꾸어주고, DMSO에 녹인 시료를 1, 10, 100 µg/mL 농도별로 전처리하여 1시간 동안 전배양시켰다. 전배양 후 interleukin-4 (IL-4)를 50 ng/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양 후 배양상등액을 회수하여 ELISA를 수행하여 eotaxin-1의 분비 정도를 비교 측정하였다.

2.8. 통계처리

측정된 표준치는 평균±표준편차의 형태로 표시하였고, 통계의 유의성은 Duncan test를 이용하여 p<0.05 이하일 경우 유

의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 콜라겐 생합성 증진 활성

외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호, 유지하는 콜라겐은 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에, 콜라겐의 감소는 피부노화 및 주름생성과 관계되어 있다 [13]. 따라서 사과 줄기로부터 유도된 켈러스 추출물의 주름개선 활성은 사람의 섬유아세포에 대한 콜라겐 생합성능을 측정하여 콜라겐 합성 촉진 효과를 조사하였다. 그 결과, 켈러스 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 콜라겐 생합성량이 약 14% 증가하여 양성대조군인 10 ng/mL TGF- β 와 비슷한 수준의 활성을 보였으며 (Fig. 1a), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서는 생합성량이 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다 (data not shown). 켈러스 추출물 처리농도 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 섬유아세포에 처리했을 때 유의한 세포생존력 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 1b).

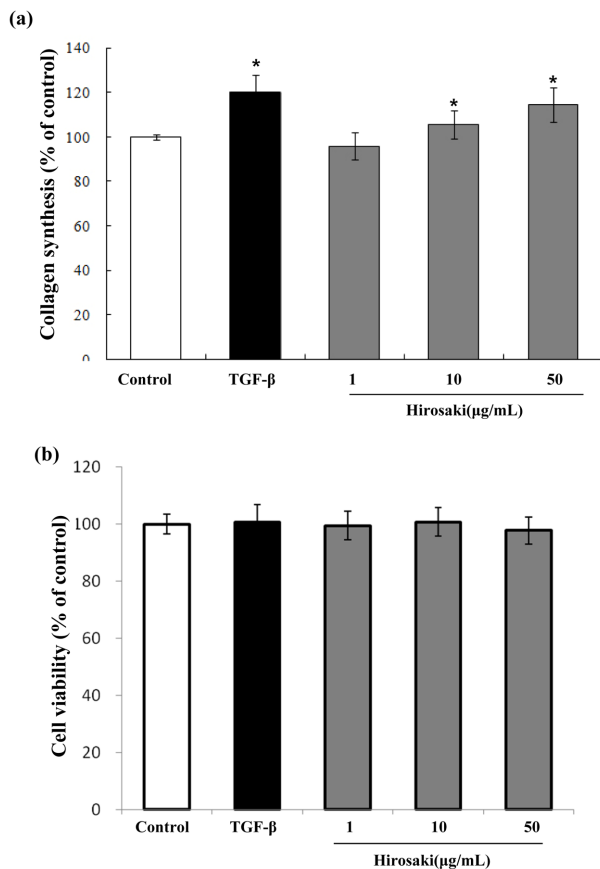


Fig. 1. Effect of callus extract on the collagen synthesis in human fibroblast cells. Collagen synthesis assay. TGF- β (10 ng/mL) was used as positive control (a). Cell viability assay (b). Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. * p <0.05 vs. control group.

3.2. 모유두 세포 증식 활성

모유두 세포 (dermal papilla cells)는 모낭 아래쪽에 위치하여 모발의 발생, 성장과 주기를 조절하는 역할을 담당하며, 모유두 세포의 증식은 발모 활성을 측정하는 하나의 방법으로 이용되고 있다 [14]. 따라서 켈러스 추출물의 모유두 세포 증식 활성도 모유두 세포의 증식을 조사하여 확인하였으며, 모유두 세포의 증식은 MTT assay를 통하여 확인하였다.

대조군에 대한 켈러스 추출물 처리구의 상대적 증식 활성을 확인하였을 때, 모유두 세포의 증식은 켈러스 추출물을 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 수준에서 처리하였을 때에는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 약 40% 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이는 사과 줄기로부터 유도된 켈러스 추출물이 모유두 세포의 증식을 촉진하는 모유두 세포 증식 활성 활성을 가지고 있기 때문인 것으로 판단되었다.

3.3. Cyclooxygenase-2 (COX-2) 저해

염증은 유해한 자극에 대한 몸의 생리적 방어 반응으로, 지속적인 염증 반응은 점막 손상을 촉진시켜 결과적으로 통증, 부종, 발적, 발열 등을 일으켜 기능장애를 유발한다 [15,16]. 이 중 cyclooxygenase (COX)는 COX-1과 COX-2로 분류되며, arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)로 전환시킨다. COX-1은 일정하게 발현하여 생리적인 기능을 담당하지만, COX-2는 염증매개물질인 PGs을 생성시킨다 [17].

LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포에 켈러스 추출물을 처리한 후 COX-2 저해활성을 분석하여 본 결과, COX-2 발현은 켈러스 추출물 처리농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 COX-2 발현량이 50% 정도 감소하는 것으로 나타나 높은 저해활성이 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 3). 히로사키 켈러스추출물의 COX-2 억제효과가 세포독성 때문에 나타난 것인지 확인하기 위해 세포생존력을 측정한 결과 사과켈러스 처리농도내에서 유의한 세포수의 변화는 관찰되지 않았다. 이는 사과 줄기로부터 유도된 켈러스 추출물이 항염 활성을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

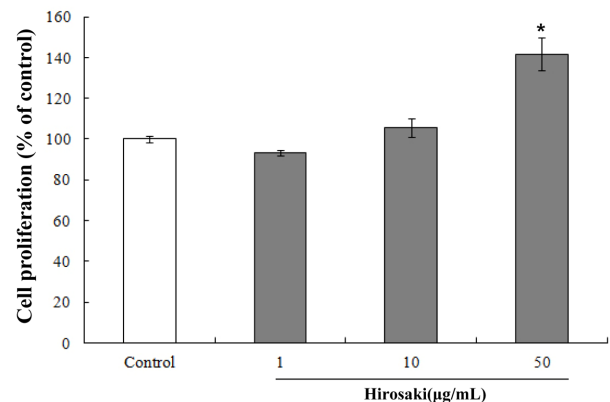


Fig. 2. Relative growth stimulations of hair follicle dermal papilla cells by callus extract. Data are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments. * p <0.05 vs. control group.

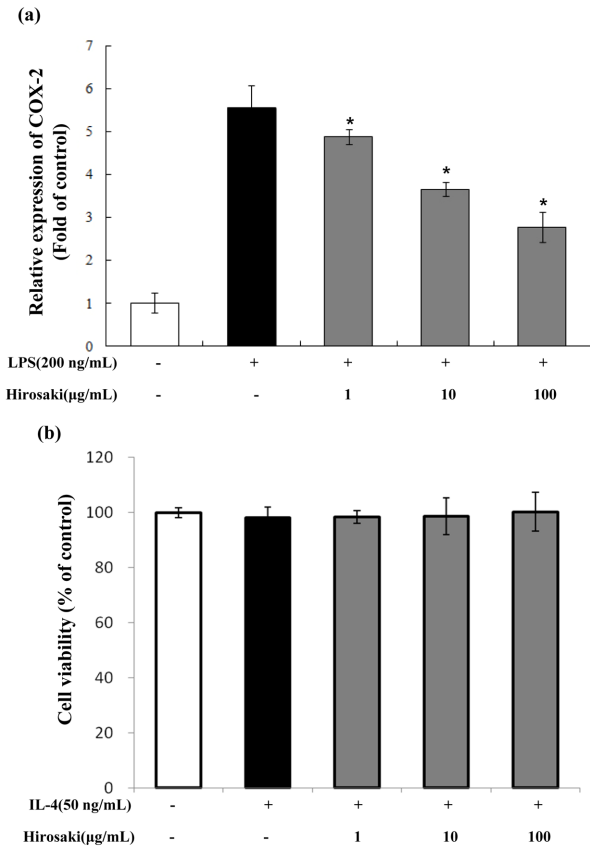


Fig. 3. Effect of callus extract on COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. COX-2 luciferase activity assay (a). Cell viability assay (b). Data are expressed as means±S.D. of three independent experiments. **p*<0.05 vs. control group.

3.4. Eotaxin-1 저해

Eotaxin은 C-C chemokine 중 하나로, 대표적인 호산구의 화학 물질이며 호산구 뿐만 아니라 림프구, 대식세포, 섬유아세포 등 다양한 세포에서 분비된다 [18]. 그 중 Eotaxin-1은 아토피 피부염 병변에서 증가하며, 피부 섬유아세포에서 interleukin-4 (IL-4)에 의해 분비가 증가한다고 알려져 있다 [19].

IL-4에 의해 활성화된 NIH/3T3 세포에서 켈러스 추출물을 처리한 후 Eotaxin-1 저해 활성을 분석하여 본 결과, eotaxin-1 생성량은 켈러스 추출물 처리농도에 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 100 µg/mL에서 약 70%의 높은 저해 활성을 보이는 것으로 확인되었다 (Fig. 4a). 히로사키 켈러스추출물의 Eotaxin-1 저해효과가 세포독성 때문에 나타난 것인지 확인하기 위해 세포생존력을 측정할 결과 켈러스 처리농도 내에서 유의한 세포수의 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 4b). Eotaxin-1 저해 활성은 아토피 피부염 치료제로서의 개발 가능성도 시사한다고 볼 수 있어, 사과 줄기로부터 유도된 켈러스 추출물의 경우는 아토피 피부염 치료제 개발 원료로서의 가치도 높을 것으로 사료되었다.

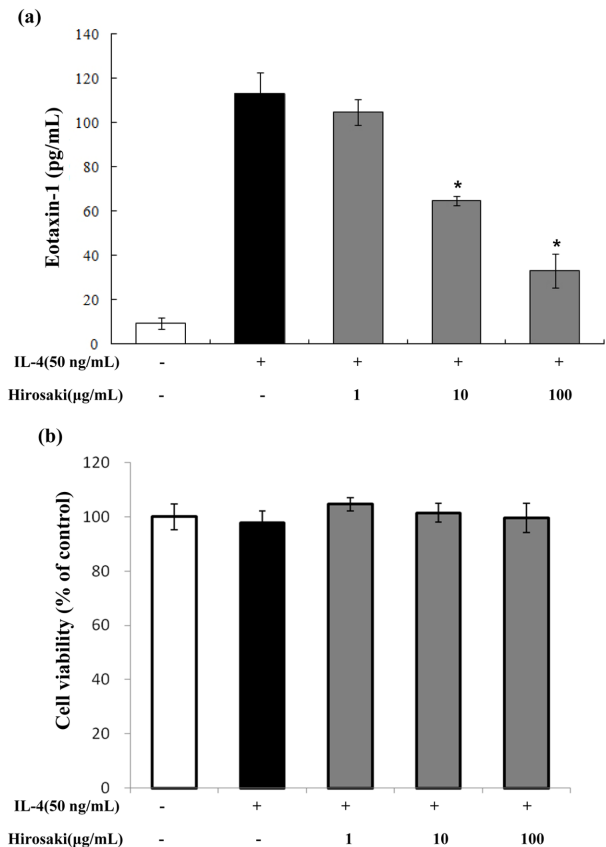


Fig. 4. Effect of callus extract on eotaxin-1 production in IL-4-stimulated NIH/3T3 cells. Eotaxin-1 elisa assay (a). Cell viability assay (b). Data are expressed as means±S.D. of three independent experiments. **p*<0.05 vs. control group.

4. 결론

본 연구에서는 사과 품종 중 하나인 히로사키로부터 유도된 켈러스 추출물의 화장품 소재로서의 특성을 알아보기 위하여 켈러스 추출물을 이용하여 콜라겐 생합성 증진, 모유두 세포 증식 활성, 항염 (COX-2, eotaxin-1 생성억제) 등에 대한 기능성 화장품소재로서의 특성에 대한 분석을 수행하였다.

켈러스 추출물의 피부 효능은 인간유래 섬유아세포 내에서의 콜라겐 생합성 증진 활성에서는 50 µg/mL에서 TGF-β가 처리했을 때와 유사한 효과를 나타내었으며, 모유두 세포 증식 활성 실험에서는 사람의 모유두 세포 증식이 50 µg/mL에서 약 40% 증가하여 높은 효과를 나타내었다. 특히, 항염 활성 실험에서는 켈러스 추출물의 100 µg/mL 수준으로 처리한 경우 COX-2와 eotaxin-1 생성이 대조군에 비해 각각 약 50%와 약 70% 이상 저해되는 것으로 확인되었다.

이러한 결과로 볼 때, 히로사키 품종의 사과 줄기로부터 유도된 켈러스 추출물은 콜라겐 생합성 증진, 모유두 세포 증식 활성 및 항염에 대한 효과가 높은 것으로 판단되었으며, 그에 따른 기능성 화장품 소재로서의 개발 가치도 높은 것으로 사료되었다.

사사

본 연구는 제주권 광역경제권 선도산업(R0001467)의 지원을 받아 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Choi, S. Y., S. S. Kim, Y. M. Lee, B. H. Lee, and C. K. Han (2010) Phenolic compounds content and tyrosinase inhibitory effect of unripe apple extracts. *J. Appl. Biol. Chem.* 53: 87-90.
- Boyer, J. and R. H. Liu (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.* 3: 5.
- Jeong, H. R., Y. N. Jo, J. H. Jeong, D. E. Jin, B. G. Song, and H. J. Heo (2011) Whitening and anti-wrinkle effects of apple extracts. *Kor. J. Food Preserv.* 18: 597-603.
- Choi, S. J., E. A. Cho, E. H. Cho, Y. J. Jeong, C. S. Ku, B. J. Ha, and H. J. Chae (2011) Screening of functional materials from solvent fractions of apple flower leaf extract. *KSBB Journal* 26: 165-171.
- Schmid, D., C. Schurch, and P. Blum (2008) Plant stem cell extract for longevity of skin and hair. *SOFW Journal* 134: 30-35.
- Kim, J. S., H. J. Park, and H. Y. Park (2011) Antioxidative activity and flavonol glycosides analysis in callus derived from leaf tissue of *Ginkgo biloba* L. *Korean J. Plant Res.* 24: 461-471.
- Ha, J. H., H. S. Jeong, M. H. Jeong, S. S. Kim, L. Jin, J. H. Nam, B. Hwang, C. J. Ma, and H. Y. Lee (2009) Comparison of anticancer activities of ultrasonification extracts of callus and roots from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 552-559.
- Park, C. M., M. S. Joung, and J. W. Choi (2009) Tissue-cultured *Gymnema sylvestre* leaf extract enhance anti-adipogenic effects through inhibition of C/EBP- α expression and lipid droplet accumulation. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 35: 111-116.
- Hakkim, F. L., C. G. Shankar, and S. Girija (2007) Chemical composition and antioxidant property of Holy Basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems, and inflorescence and their in vitro callus cultures. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9109-9117.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Singleton, V. L. and J. A. Rossi (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Metcalfe, L. D., A. A. Schmitz, and J. R. Pelka (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38: 514-515.
- Park, K. J., S. H. Park, and J. K. Kim (2010) Anti-wrinkle activity of *Acanthopanax senticosus* extract in ultraviolet B (UVB)-induced photoaging. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 42-46.
- Won, C. H., O. S. Kwon, Y. J. Kang, H. J. Yoo, D. H. Lee, J. H. Chung, K. H. Kim, W. S. Park, N. H. Park, K. Cho, S. O. Kwon, and J. S. Choi (2012) Comparative secretome analysis of human follicular dermal papilla cells and fibroblasts using shotgun proteomics. *BMB Rep.* 45: 253-258.
- Zamora, R., Y. Vodovotz, and T. R. Billiar (2000) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* 6: 347-373.
- Leem, H. H., E. O. Kim, M. J. Seo, and S. W. Choi (2011) Anti-inflammatory effects of volatile flavor extract from herbal medicinal prescriptions including *Cnidium officinale* Makino and *Angelica gigas* Nakai. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 37: 199-210.
- Park, S. J., J. Y. Kim, Y. P. Jang, Y. W. Cho, E. M. Ahn, N. I. Baek, and K. T. Lee (2007) Inhibition of LPS induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by genistein-4'-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranoside through the NF- κ B inactivation in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* 38: 339-348.
- Yawalkar, N., M. Ugucconi, J. Schrer, J. Braunwalder, S. Karlen, B. Dewald, L. R. Braathen, and M. Baggiolini (1999) Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 113: 43-48.
- Mochizuki, M., J. Bartels, A. I. Mallet, E. Christophers, and J. M. Schrder (1998) IL-4 induces eotaxin: A possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J. Immunol.* 160: 60-68.