

## 표고버섯 추출물의 화장품약리활성 검증과 천연화장품 소재로써의 활용에 관한 연구

서명성<sup>1\*</sup> · 장영아<sup>1</sup> · 이진태<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 바이오융합학부

(2018년 9월 17일 접수: 2018년 12월 12일 수정: 2018년 12월 12일 채택)

### The Study of Cosmeceutical Activities from *Lentinula edodes* extracts and Application a Natural Cosmetic Material

Myeong-Seong Seo<sup>1</sup> · Young-Ah Jang<sup>1</sup> · Jin-Tae Lee<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University,  
Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, Korea

(Received September 17, 2018; Revised December 12, 2018; Accepted December 12, 2018)

**요약** : 본 연구는 화장품 소재로써 표고버섯의 기능성을 확인하기 위한 것이다. 이를 위해 우리는 표고버섯 추출물을 사용하여 항산화, 항염증 효과에 대한 생물학적 활성 평가를 수행하였다. 표고버섯을 열수와 70% 에탄올로 추출한 후 농도 (100, 500, 1000)  $\mu\text{g/ml}$  에 따라 처리하여 항산화 실험인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)-diammonium salt (ABTS) 양이온 라디칼 소거능과 Superoxide dismutase (SOD) 유사활성을 평가하였다. 또한 항염증 효과를 평가하기 위해 대식세포(Raw 264.7)를 이용해 샘플의 독성 평가와 nitric oxide 생성 저해 활성을 평가하였다. 표고버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거능, ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능과 SOD유사활성 측정결과 1,000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. MTT assay를 통한 샘플의 독성평가 결과로는 표고버섯 추출물의 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 독성이 나타나지 않았다. Nitric oxide 저해 활성 결과에 따르면 표고버섯 추출물의 농도 의존적으로 NO가 저해됨을 보아 항염증 효과가 우수함을 알 수 있다. 표고버섯은 염증성 Cytokine인 TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ 의 활성을 낮추었으며 Western blot 실험결과 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 최고농도인 25  $\mu\text{g/ml}$  에서 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다. 상기 실험결과로부터 표고버섯의 우수한 항산화, 항염증 효능을 확인하였으며 향후 안전한 천연 화장품 소재로 사용될 수 있음을 보여준다.

**주제어** : 항산화, 항염증, 화장품 소재, 천연화장품, 표고버섯

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: audtjd9408@naver.com)

**Abstract** : This study is for checking the possibility of *Lentinula edodes* as cosmetic materials. For this we carried out biological active evaluation about anti-oxidant and anti-inflammatory effects by *Lentinula edodes* extracts. We extracted *Lentinula edodes* with water and 70% ethanol and then in order to evaluate anti-oxidant activity we treated samples by concentrations (100, 500, 1000)  $\mu\text{g/ml}$  and carried out 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, the activity of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)-diammonium salt (ABTS) cation radical scavenging and superoxide dismutase(SOD) like activity. Also, in order to evaluate effect of anti-inflammatory the samples in macrophages(RAW 264.7 cells), we carried out evaluation of cell viability, nitric oxide inhibitory activity western blot. The results of DPPH, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity and SOD-like activity of the *Lentinula edodes* extracts increased in dose-dependent manner. The cytotoxic of samples by MTT assay showed no toxicity at the concentrations of 10, 25 and 50  $\mu\text{g/ml}$  of *Lentinula edodes* extract. Nitric oxide inhibition activity results showed that the extracts reduced NO productions in a concentration-dependent manner. Expression of inflammatory cytokines as TNF- $\alpha$ , PGE2 and IL-1 $\beta$  decreased in a concentration-dependent manner and iNOS and COX-2 proteins expression rates were decreased significantly in western blot analysis. From the results of the experiment, it was confirmed that the *Lentinula edodes* extracts had excellent anti-oxidant and anti-inflammatory effect and could be used as a safe natural cosmetic material in the future.

**Keywords** : Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Cosmetic material, Natural cosmetic, *Lentinula edodes*

## 1. 서론

최근 사회적으로 평균수명 연장과 여성의 사회 활동 증가로 인한 소득의 증가로 미에 대한 관심이 증가하여 피부유효성을 가진 소재와 친환경을 강조한 원료로 만들어진 화장품에 대한 수요가 증가하고 있다. 이에 따라 천연원료를 통한 항산화, 미백, 항염증 등의 효능을 갖는 기능성 제품을 개발하고, 합성원료에 대한 심각한 독성과 부작용에 경쟁력을 갖는 천연물 소재를 개발하려는 노력이 활발하게 이루어지고 있다[1]. 미세먼지나 황사 같은 현대의 각종 환경오염과 화학물질, 스트레스, 자외선, 흡연 및 음주에 의해 체내에 생성된 활성산소종이 세포 내에 과도하게 발생하면 산화적 스트레스가 증가하여 피부노화 및 만성질환의 원인이 된다[2]. 활성산소종은 슈퍼옥시드( $\text{O}_2^-$ ), 일산화질소(NO), 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 수산화이온( $\text{OH}^-$ ), 일중항산소( $^1\text{O}_2$ )가 대표적이며 이러한 활성산소종은 세포의 미토콘드리아에 있는 전자전달계의 전자를 산소로 전달하여 에너지와 물을 생성시키는 과정 중에 일부가 물이 되지 않고 전자만 받아 라디칼 상태가 되어 생성된다[3]. 사람의 몸은 활성산소 생산계 및 소거계가

균형을 이뤄 생체 내 항상성을 유지하고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 균형이 무너져 산화 촉진 쪽으로 기울게 되면 산화적 스트레스가 유발된다[4]. 활성산소종은 매우 산화력이 강력하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 세포 손상을 일으킬 뿐만 아니라, 세포 내의 주요 염증 유발인자를 활성화시킴으로써 염증을 초래한다[5]. 염증반응의 대표적인 예로는 염증성 매개물질인 lipopolysaccharide (LPS)는 lipopolysaccharide binding protein (LBP)과 복합체를 형성하여[6] 대식세포 표면에 있는 CD14 receptor를 자극시키며 자극된 CD14 receptor는 toll-like receptor (TLR4)를 자극시켜 다양한 신호전달 분자들을 활성화 시킨다[7,8,9]. 활성화된 TLR4는 Myeloid differentiation primary response gene88 (MyD88) pathway를 통해서 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF 6)로 이른다. TRAF6는 TAK1을 통해 IKK- $\beta$ 를 인산화 시키며, 활성화된 IKK는 세포 내 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)를 유도한다[10]. NF- $\kappa$ B는 세포질에서는 inhibitory kappa B(I $\kappa$ B)와 결합되어 비활성인 형태로 존재하나 ROS, TNF- $\alpha$  등 다양한 자극에 의해 I $\kappa$ B를 인산화 시켜 분해하도

록 한다[11]. NF- $\kappa$ B가 활성화 되어 핵으로 이동하게 되면 염증성 사이토카인인 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 유전자 발현을 유도하며, iNOS에 의해서 염증반응 시 지표물질인 NO가 L-arginine으로부터 합성된다[12].

NO는 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 염증매개조절 인자로, nitric oxide synthase(NOS)에 의해 형성되며, 과잉 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진시키고, 염증 매개체의 생합성을 촉진하는 강력한 염증 인자이다[13,14]. 따라서 NO생성을 제어하면 피부홍반 유도[30] 및 keratinocyte cell migration 촉진[31]을 예방 할 수 있다. 예로부터 식용으로 널리 이용되어온 버섯은 탄수화물, 단백질, 무기질, 비타민 등 다양한 영양성분을 함유하고 있으며, 맛과 향이 우수하다[15]. 뿐만 아니라 다양한 버섯들의 항산화 및 항암, 항당뇨, 항고혈압 등의 생리활성 효과가 입증 되어 건강기능 식품 소재로 이용되고 있다[16,17,18]. 그 중에도 표고버섯 (*Lentinula edodes*)은 비타민C의 함량이 가장 높고 맛과 향 성분인 guanosine<sup>5'</sup>-monophosphate (5'-GMP), 항혈소판 작용 및 항산화 효능을 가진 lenthionine과 혈압강화작용과 혈액 속의 콜레스테롤을 억제시키는 Erithadenine을 함유하고 있다[19,20].

지금까지 잘 알려져 있는 표고버섯의 효능인 항암효과와 항당뇨에 관한 약리적인 작용에 대해서는 연구가 많이 되어있으며 화장품 소재로서의 항산화 항염증에 관련된 연구는 부족하여 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 화장품 소재 개발의 일환으로 항산화 및 항염증 활성을 분석하여 천연 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인해보고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험 재료

#### 2.1.1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 표고버섯(*Lentinula edodes*)은 (주)가가표고라로부터 경북 문경시 가은읍 하곡리에서 채취한 후 건조시킨 시료를 제공받았다.

#### 2.1.2. 실험 세포 및 시약

항산화 실험에 사용된 시약은 DPPH (1, 1 - Diphenyl 1 - 2 - picrylhydrazyl)와 ABTS(2,2'-azino-bis ( 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid )-diammonium salt), Trizma base, Pyrogallol은 Sigma-Aldrich Co.(Saint Louis, USA)에서, 세포주 Raw 264.7 mouse macrophage (murine macrophage cell line)은 한국세포주은행(Korea)에서 구입하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS; Introgen Therapeutics, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, USA) 100 U/mL을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific)에 적응시켜 계대 배양하였다. 세포독성실험을 위한 시약 3-[4,5-dimethylthiazol2yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) 와 0.4% trypan blue stain는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질정량 시약 Lysis buffer는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, 1차 항체 mouse anti-iNOS, mouse anti-COX-2, mouse anti-TNF- $\alpha$ , mouse anti-IL-1 $\beta$ , mouse anti-PGE<sub>2</sub>와 2차 항체 mouse-anti-goat IgG, rabbit-anti-mouse IgG 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다.

#### 2.1.3. 추출물의 제조

표고버섯 열수추출은 물을 시료중량의 10배 양을 가하여 실온에서 85°C에서 3hr 씩 3번 나눠 추출하였으며, 에탄올추출은 70% 에탄올을 용매로 하여 시료중량의 10배 양을 가하여 실온에서 24 hr 침지하고 상층액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 개별 시료를 원심 분리 후 여과한 다음, rotary vacuum evaporator (HS-10SP; Hahnshin S&T, Korea)를 사용하여 농축한 후 동결기(FD5525; Ilshin BioBase, Korea)로 건조하였다. 건조한 시료는 냉장실에 보관하여 사용하였다.

### 2.2. 실험 방법

### 2.2.1. DPPH radical scavenging activity 측정

추출물의 DPPH radical scavenging activity (Electron donating abilities, EDA)는 다음과 같이 측정하였다. 각 시료용액 100  $\mu$ l에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 50  $\mu$ l를 넣고 교반한 후 차광하여 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능 효과는 시료용액의 첨가량과 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.2.2. ABTS<sup>+</sup> radical cation scavenging activity 측정

ABTS<sup>+</sup> radical cation scavenging activity 실험은 ABTS<sup>+</sup> radical cation은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)을 1:1로 혼합하여 암실에서 실온으로 24시간 동안 반응하였다. 사용 전에 ABTS<sup>+</sup> 용액을 에탄올에 희석하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.706±0.001이 되게 하여 사용하였다. 라디칼 소거활성 효과는 시료용액의 첨가량과 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.2.3. Superoxide Dismutase like activity 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정하였다. 각 시료용액 0.2 ml에 Tris-HCl 완충 (50mM tris+10mM EDTA, pH 8.5) 2600  $\mu$ l와 7.2mM pyrogallol 200  $\mu$ l 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 1M HCl 100  $\mu$ l 를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가량과 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.2.4. 세포독성 측정

세포생존율 측정은 다음과 같이 측정하였다. Raw 264.7 세포는 96 well plate에 well당 1×10<sup>5</sup> 세포로 180  $\mu$ l 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 h 배양하였다. 배양 후 표고버섯추출물의 최종농도가 10, 25, 50, 75, 100  $\mu$ g/ml이 되도록 각각 20  $\mu$ l씩 첨가한 후 24 hr 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 배양 후 각 well에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT (Sigma-Aldrich) 용액 20  $\mu$ l를 첨가하여 4 hr 배양한 후 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide

와 에탄올을 1:1로 섞은 용액을 각 well당 200  $\mu$ l를 가하여 실온에서 30 min 동안 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율 측정은 시료용액의 첨가량과 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

### 2.2.5. Nitric oxide (NO) 측정

Raw 264.7 세포를 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 24 hr 배양 후 phosphate buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich)으로 2번 세척한 후 무혈청 배지를 사용하여 24 hr 배양한 후 표고버섯추출물을 농도별(10, 25, 50)  $\mu$ g/ml로 처리한다. 샘플처리 30min후 LPS를 Normal 군을 빼 모든 well에 넣어서 자극시키고 24 hr 배양하였다. 배양 후 상층액 100  $\mu$ l와 griess reagent 100  $\mu$ l를 1:1로 15 min 동안 반응시킨 후에 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 확인하였다.

### 2.2.6. PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 생성량 측정

Raw 264.7 세포를 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml로 24 hr 배양 후 LPS 1  $\mu$ g/ml 와 농도별(10, 25, 50  $\mu$ g/ml)로 제조한 sample을 처리한 후 18시간 뒤 세포 배양액을 취하여 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 를 측정하였다. 상층액을 수거하여 측정 전까지 -70 °C에서 보관하였고 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 함량은 ELISA kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 측정하였으며, 함량은 표준물질의 반응으로부터 얻어진 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

### 2.2.7. Western Blot을 이용한 단백질의 발현 측정

Raw 264.7 세포는 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 접종 및 배양하여 세포 밀도가 80% 되었을 때 무혈청 배지로 교환하고 24 hr 배양한 후 표고버섯추출물을 농도별(10, 25, 50)  $\mu$ g/ml로 처리한다. 샘플처리 30min후 LPS를 Normal 군을 빼 모든 well에 넣어서 자극시키고 24 hr 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후에 scrapper로 세포를 수확하였다. 수확된 각 세포에 Lysis buffer를 well 당 100  $\mu$ l 를 첨가하여 1 hr동안 냉장하여 세포를 용해시키고 그 후 원심분리 하여(12,000 rpm, 4° C, 10 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정

량하였으며, 10  $\mu$ l의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 transfer하였다. Transfer가 끝나면 5% skim milk에 1~2시간동안 방치하여 background를 제거시켰다. 1×TBST로 3회 washing 후 1차 antibody (1:1000)를 24 hr 붙인 후 1×TBST로 3회 washing 후 2차 antibody (1:1000)를 2 hr 반응한 후 ECL kit (Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Image Quant LAS-4000 (GE life sciences, Taiwan)으로 Band density를 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH radical scavenging activity 측정은 항산화 효과를 측정하는 가장 보편적인 방법이다. DPPH는 화학적으로 안정화 된 수용성 free radical로써 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타낸다. 이 라디칼은 항산화 활성이 있는 시료와 만나면 환원되어 보라색에서 노란색으로 바뀌며 라디칼이 소멸된다[21]. 이런 반응을 통하여 DPPH 라디칼이 감소되는 정도를 측정하여 간접적으로 시료의 항산화 능력을 측정한다. 표고버섯의 열수, 에탄올 추출물의 DPPH radical scavenging activity 측정 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 열수와 에탄올 추출물 모두 시료의 농도를 100, 500, 1000  $\mu$ g/ml로 실험한 결과 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. 표고버섯 열수 추출물은 1000  $\mu$ g/ml 농도에선 50.9%, 에탄올 추출물은 16.5%로 에탄올추출물보다 열수 추출물이 항산화 활성이 더 우수하였다.

#### 3.2. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity 측정

ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity 측정은 DPPH 라디칼 소거능 측정방법과 유사한 방법으로 라디칼의 탈색을 원리를 이용하여 항산화 효능을 측정한다[22]. ABTS<sup>+</sup>는 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성되는 짙은 청록색의 free radical이며, 734nm에서 광흡수를 나타낸다. 항산화 활성이 있는 시료에 의해 라디칼이

소거되면 청록색이 탈색되어 색이 없어진다. 이를 흡광도 수치로 나타내어 항산화 활성을 평가하였고 표고버섯추출물의 ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity 측정 결과는 Fig. 2와 같다. 표고버섯 열수 추출물은 1000  $\mu$ g/ml 농도에선 52.8%, 에탄올 추출물은 15.6%로 에탄올추출물보다 열수 추출물이 항산화 활성이 우수하였다.

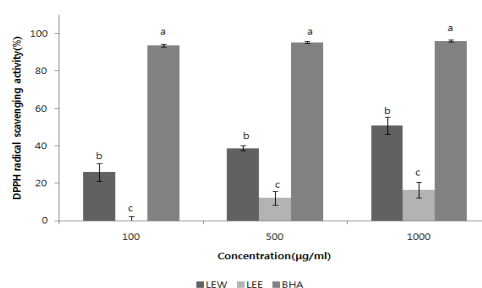


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity(%) of dependent on concentration from extracts of *Lentinula edodes*. LEW : *Lentinula edodes* extracted with water. LEE : *Lentinula edodes* extracted with Ethanol. BHA : Butylated hydroxyanisole. The data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$ .

#### 3.3. Superoxide Dismutase like activity 측정

SOD는 항산화 효소 중 하나이며, SOD에 의해 생성되는 과산화수소는 peroxidase 또는 catalase에 의해 물과 산소분자로 전환되어 노화 억제 등과 같은 항산화 역할을 하며, 생체를 보호하는 기능을 한다[23]. SOD 유사 활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하며 phytochemical에 속하는 저분자 물질이다. Superoxide Dismutase 유사활성 측정은 Superoxide와 반응하여 갈변물질을 나타내는 pyrogallol의 자동산화반응을 측정하는 원리를 이용하여 측정한다. 염기성 pyrogallol 수용액은 산소를 흡수하여 흑갈색으로 변색되는데 이를 흡광도 수치로 나타내어 항산화 활성을 평가하였다. Superoxide Dismutase like activity 측정결과는 Fig. 3과 같다.

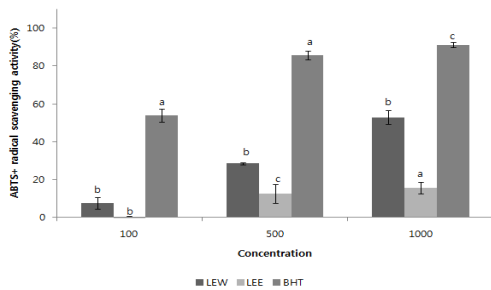


Fig. 2. ABTS<sup>+</sup> cation radical scavenging activity(%) of dependent on concentration from extracts of *Lentinula edodes*. LEW : *Lentinula edodes* extracted with water. LEE : *Lentinula edodes* extracted with Ethanol. BHT : Butylated hydroxytoluene. The data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$ .

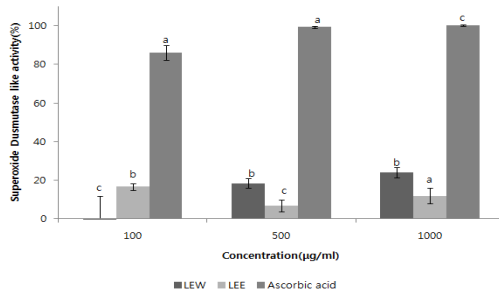


Fig. 3. Superoxide dismutase like activity(%) of dependent on concentration from extracts of *Lentinula edodes*. LEW : *Lentinula edodes* extracted with water. LEE : *Lentinula edodes* extracted with Ethanol. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different at  $p < 0.05$ .

### 3.4. 세포 생존율 측정

세 가지 항산화 생리활성 결과 모두 표고버섯 에탄올 추출물보다 열수추출물에서 항산화효과가 좋았기 때문에 세포실험은 열수추출물만 진행하였다.

안전한 화장품소재로 활용 가능함을 알아보기 위해 표고버섯 추출물이 세포 생존률에 미치는

영향을 확인하기 위해 마우스 대식 세포인 Raw 264.7 cell을 사용하여 세포독성을 확인하였다. 세포독성실험으로 가장 보편적으로 널리 사용되고 있는 방법인 MTT assay로 실험하였다. MTT assays는 세포내의 전자전달계에 존재하는 탈수소 효소가 tetrazolium salt를 분해하여 formazan을 생성하는 원리를 이용하여 살아있는 세포를 정량적으로 평가할 수 있다[24].

시료의 농도는 10, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였으며 그 결과 50  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서 세포생존율이 85% 이상으로 나타났다. 따라서 이 결과를 토대로 표고버섯 추출물의 cell NO 활성측정 농도를 50  $\mu\text{g/ml}$  이내의 범위에서 진행하였다. 표고버섯의 세포생존율 측정 결과는 Fig. 4과 같다.

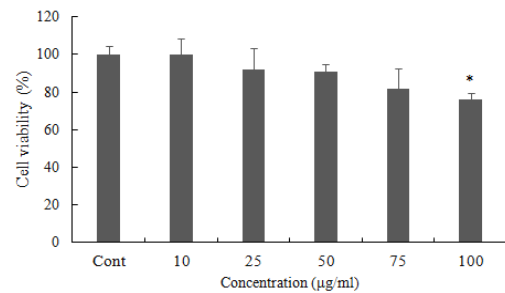


Fig. 4. Cell viability of dependent on concentration of *Lentinula edodes* extracts(LEW) using MTT assay. LEW : *Lentinula edodes* extracted with water. The data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $p < 0.05$ .

### 3.5. Nitric oxide (NO) 저해능 측정

그람음성박테리아의 외벽에 존재하는 LPS(lipopolysaccharide)로 활성화된 대식세포는 염증을 유발하는 사이토카인(proinflammatory cytokine)과 NO를 생성하여 여러 염증성 질환에 중요한 역할을 한다[25,26].

NO는 L-arginine이 L-citrulline 으로 변화되는 과정에서 부산물로 생성되며, 신경 전달 체제, 항균물질, 면역조절 등 생체 내에서 항상성 유지에 중요한 역할을 하나, 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, 혈관 확장, 염증 반응 유발에 의한 조직손상을 초래한다고 알려져 있다. NO 저해능 측정은 시료의 항염증 효과를 확인하기 위

해 측정하였다. LPS 처리군인 Control군은 LPS 무처리 군인 Normal군에 비하여 4배 이상의 NO발현을 나타냈으며 표고버섯추출물을 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리 하였을 때 농도가 증가할수록 NO 발현량이 저해됨을 확인하였다. 표고버섯의 NO 저해능의 결과는 Fig. 5와 같다.

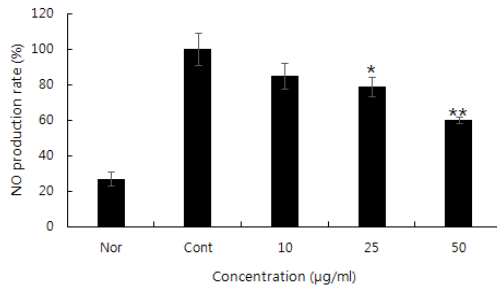


Fig. 5. Inhibitory effects of extracts of *Lentinula edodes* extracts(LEW) on the production of nitric oxide Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were cultured with LPS in the presence or absence of sample for 24hr to determine the level of NO. Nor : LPS not induced group, Cont : LPS induced group. LEW : *Lentinula edodes* extracted with water. The data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.

### 3.6. 표고버섯추출물의 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 생성량 측정

PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 pro-inflammatory cytokine으로써 염증 반응의 매개체로 작용한다. PGE<sub>2</sub>는 COX-2에 의하여 생성되며 염증성 질환 및 다양한 생체반응에 있어서도 세포분열과 증식에 영향을 줌으로써 각종 질병을 유발시키거나 진행에 관여한다[27]. TNF- $\alpha$ 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되며 다른 pro-inflammatory cytokine들을 증가시켜 염증반응을 일으킨다[28] IL-1 $\beta$ 는 병원균 감염에 의해 유도되는 염증성 사이토카인으로서 면역과 염증반응을 조절하여 숙주방어에 관여한다[29].

항염증효과를 확인하기 위해 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포에서 염증성 cytokine을 측정하였다. 그 결과 표고버섯추출물을 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리 하였을 때 농도 의존적으로

cytokine인 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  와 IL-1 $\beta$  생성량이 저해됨을 확인하였다. 표고버섯의 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  와 IL-1 $\beta$  생성량의 결과는 Fig. 6과 같다.

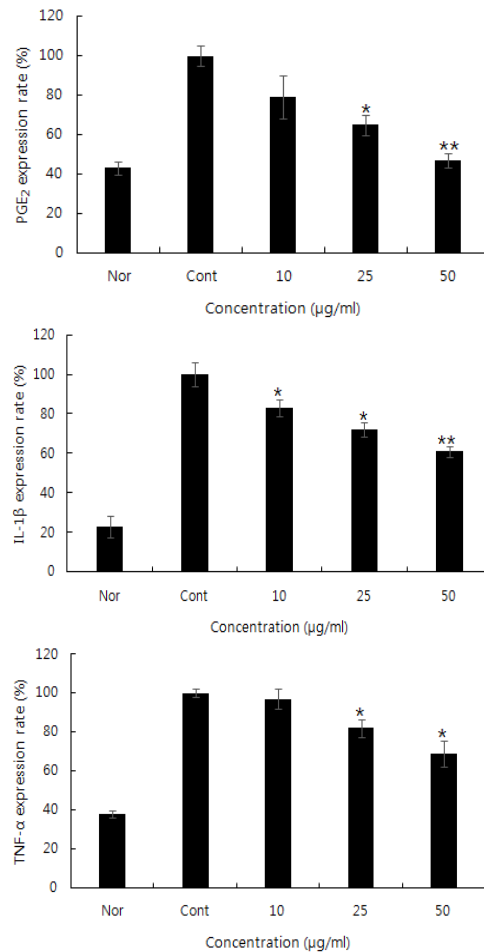


Fig. 6. Inhibitory effects of extracts of *Lentinula edodes* extracts(LEW) on production of pro-inflammatory cytokines. The expression levels of PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the protein was measured after treatment of LPS(1  $\mu\text{g/ml}$ ) for 30min and the indicated concentration of *Lentinula edodes* extracts. Nor : LPS not induced group, Cont : LPS induced group. LEW : *Lentinula edodes* extracted with water. The data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.

### 3.7. 표고버섯추출물의 염증 관련 단백질

#### 발현에 미치는 영향

염증 관련 단백질인 iNOS, COX-2에 대한 표고버섯의 저해능을 확인하기 위하여 표고버섯 열수추출물을 각 농도별로 처리한 후 30분 뒤 LPS를 처리하여 Western blot을 통해 단백질의 발현량을 확인하였다. 그 결과 LPS로 유도된 control 군 대비하였을 때 iNOS와 COX-2 농도가 증가함에 따라 유의적으로 발현양이 감소됨을 확인하였다. 이를 통해 표고버섯추출물은 염증 관련 단백질 발현을 저해하는 것으로 나타났으며 기능성 화장품의 항염증 소재의 가능성을 보였다.

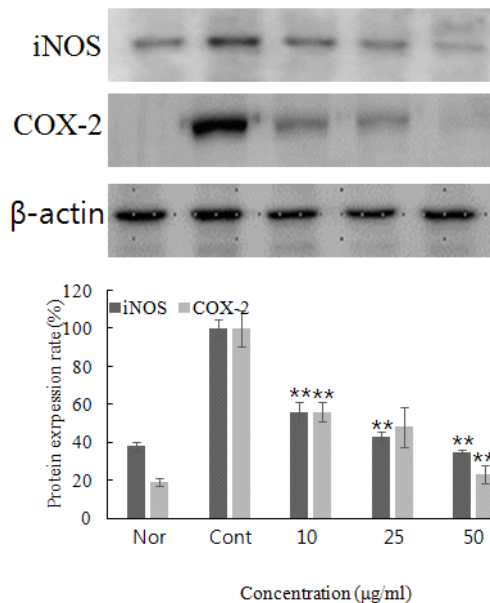


Fig. 7. Effects of *Lentinula edodes* extracts (LEW) on LPS-induced iNOS, COX-2 protein expression. The expression levels of iNOS, COX-2 in the protein was measured after treatment of LPS(1 μg/ml) for 30min and the indicated concentration of *Lentinula edodes* extracts. Nor : LPS not induced group, Cont : LPS induced group. LEW : *Lentinula edodes* extracted with water. The data represent the mean ± SD of three separate experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control

### 4. 결론

본 연구에서는 표고버섯의 추출물이 천연화장품 기능성 소재로써 가능성을 평가하기 위해 항산화, 항염증 실험을 진행하였으며 결론은 다음과 같다. 표고버섯의 항산화효능을 알아보기 위하여 DPPH radical scavenging activity, ABTS+ radical scavenging activity 와 Superoxide Dismutase-like activity 실험을 진행하였다. DPPH radical scavenging activity 실험결과 표고버섯의 열수추출물은 1000 μg/ml 농도에서 각각 50.9 % 에탄올추출물은 16.5 %, 효능이 있었다. 표고버섯의 열수, 에탄올추출물 모두 농도 100, 500, 1000 μg/ml로 실험한 결과 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. ABTS+ radical scavenging activity 실험결과도 또한 시료의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 라디칼 소거능이 증가하였다. Superoxide Dismutase-like activity 측정결과는 열수추출물은 1000 μg/ml 농도에서 23.9 % 에탄올추출물은 1000 μg/ml에서 11.9% 농도 의존적으로 활성이 증가하였으나 대체적으로 활성이 낮았다. 열수추출물이 에탄올추출물보다 항산화 효능이 우수하였으므로 항염증실험은 열수추출물만 진행하였다. 대식세포인 Raw 264.7 세포의 독성이 없는 범위의 농도 내에서 NO생성 저해활성을 측정하였다. 그 결과 표고버섯추출물의 10, 25, 50 μg/ml의 농도로 처리 하였을 때 농도가 증가할수록 NO발현량이 저해됨을 확인하였다. 염증성 Cytokine인 TNF-α, PGE<sub>2</sub>, IL-1β의 발현량이 농도 의존적으로 감소하였고, Western blot 실험결과 iNOS, COX-2염증성 단백질의 발현도 유의적으로 감소함을 알 수 있었다.

위 결과로 보았을 때 표고버섯추출물은 세포독성이 없는 안전한 범위내의 농도에서 항산화 및 항염증효능에 안전함을 확인하였다. 따라서 이후 추가적인 표고버섯 추출물의 항산화 및 항염증 연구의 결과에 따라 표고버섯 추출물이 피부 트러블을 개선할 수 있는 천연화장품의 소재로 이용 가능성을 보여준다.

### References

1. S.H. Yu, "Studies of Physiological Activity of Wheat Sprout Extract Cosmetic



- material", Konkuk university, (2016).
2. C. S. Eun, E. Y. Hwang, S. A. Yang, M. H. Yu, "Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of Barely sprout extract", *J. Life Sci.* Vol.26, NO.5 pp. 537-544, (2016).
  3. H. Barry, G. John, "1 Iron toxicity and oxygen radicals", *J. Baillière's Clinical Haematology*, Vol.2, No.2 pp.195-256, (1989).
  4. Q. W. Xie, R. Whisnant, C. Nathan, "Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon  $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide", *J. Exp. Med.* Vol. 177 pp.1779-1784, (1993).
  5. S. H. Lee, G. S. Jin, Y. R. Son, H. J. Kwon, B. W. Kim, "Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of Desmodium heterocarpon Extract in RAW 264.7 Cells", *J. Life Sci.* Vol.28, NO.2 pp. 216-222, (2018).
  6. J. Zhang, S. Rivest, "Is survival possible without arachidonate metabolites in the brain during systemic infection?", *News Physiol Sci*, Vol.18 pp.137-42, (2003)
  7. T. Roger, C. Froidevaux, C. Martin, T. Calandra, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4)", *J. Endotoxin Res*, Vol.9, NO.2 pp.119-23, (2003).
  8. L. L. Santos, D. Lacey, Y. Yang, M. Leech, E. F. Morand, "Activation of synovial cell p38 MAP kinase by macrophage migration inhibitory factor", *J. Rheumatol*, Vol.31, NO.6 pp. 1038-43, (2004).
  9. M. W. Lin, L. T. Tsao, L. C. Chang, Y. L. Chen, L. J. Huang, S. C. Kuo, C. C. Tzeng, M. R. Lee, J. P. Wang, "Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated NO macrophages involving the blockade of MEK4/JNK/AP-1 pathway", *J. Biochem Pharmacol*, Vol.73, NO.11 pp.1796-806, (2007).
  10. J. Y. Lee, D. H. Yu, Y. S. Jung, S. H. Ju, J. W. Chae, "Verification of Anti-inflammatory Activities of the Ethanol Extracts of *Glechoma hederacea* var. *longituba* in RAW 264.7 Cells", *J. Life Sci.* Vol.28, NO.4 pp.429-434, (2018).
  11. P. A. Baeuerle, T. Henkel, "Function and activation of NFkappa B in the immune system", *Annual Review of Immunology*, Vol.12, pp.141-179, (1994).
  12. D. H. Shon, D. W. Choi, M. H. Kim, "Improvement of anti-inflammation activity of *Gardeniae fructus* extract by the treatment of  $\beta$ -Glucosidase", *J. Food Sci. Technol.* Vol.44 pp.331-336, (2012).
  13. K. A. Kim, H. S. Yi, H. J. Yun, S. D. Park, "Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of fractionated extracts of *Cynomorium songaricum*", *J. Ori. Physiol. Pathol*, Vol.23 pp.1320-1331, (2009).
  14. S. S. Lee, J. Y. Imm, Y. S. Han, "The improvement effect of lotus leaf extracts on acne skin.", *J. Aesthetic and Cosmetology*, Vol.10, NO.2 pp. 405-413, (2012).
  15. Z. Bano, S. Rajarathnam, "Pleurotus mushrooms, Part II. chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food", *J. Crit Rev Food Sci Nutr.* Vol.27, NO.2 pp.87-158, (1988).
  16. G. Y. Kim, H. W. Jung, D. J. Jung, H. B. Song, H. G. Lee, "Effects of Shiitake Mushroom on Anti-platelet Aggregation and Anti-thrombotic", *J. Oriental Physiology & Pathology*, Vol.27, NO.2 pp.239-245, (2013).
  17. M. Y. Kang, S. Kim, H. J. Yun, S. H. Nam, "Antioxidative activity of the extracts from browned oak mushroom (*Lentinula edodes*) with unmarketable quality", *Korean J Food Sci Technol*, Vol.36 pp.648-654, (2004).

18. M. O. Choi, B. J. Kim, S. K. Jo, H. K. Jung, J. T. Lee, H. Y. Kim, D. J. Kweon, "Anti-allergic activities of *Castanea crenata* inner shell extracts fermented by *Lactobacillus bifementans*", *J. Food Preserv*, Vol.20, NO.4 pp.583-591, (2013).
19. M. Y. Choi, T. Y. Jung, K. J. Hahm, "Cytotoxic effects of hot water soluble polysaccharide from mushroom, *Lentinus edodes* and vitamin A&E Supplementation against P388 cells", *Korean J Nutrition*, Vol.28, NO.11 pp.1091-1099, (1995).
20. R. J. Suhadolink, "Induction of hypocholesterolemia, In Nucleosides as Biological probes", *J. Q Rev Biol*, pp.298-310, (1979).
21. J. D. Hwang, J. S. Choi, J. B. Kim, Y. S. Lee, "Antioxidant Activities of Bark Extracts from *Kalopanax pictus*", *J. Investigative Cosmetology*, Vol.7, No.4 pp.329-337, (2011).
22. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", *J. Agricultural and Food Chemistry*, Vol.53, No.10 pp. 290-4302, (2005).
23. J. V. Bannister, G. R. Bannister, "Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase", *J. Crit Rev Biochem*, Vol.22, pp.111-180, (1987).
24. J. G. Park, B. S. Karmer, S. M. Steninberg, J. Carmichael, J. M. Collins, J. D. Minna, A. F. Gazdar, "Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay", *J.Cancer Res*. Vol.47, pp.5875-5884, (1987).
25. T. J. Guzik, R. Korbust, T. Adamek-Guzik. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, Vol.54, No.4 pp.469-487, (2003).
26. J. K. Kundu, Y. J. Surh, "Emerging avenues linking inflammation and cancer", *J. Free Radical Biology and Medicine*, Vol.52, No.9 pp.2013-2037, (2012).
27. J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M. Leahy, W. G. Smith, P. C. Isakson, K. Seibert, "Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic", *J. Proc Natl Acad Sci*, Vol.91, pp.3228-3232, (1994).
28. B. Beutler, A. Cerami, "The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response", *J. Annu Rev Immunol*, Vol.7, pp.625-655, (1989).
29. S. G. Harris, J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, R. P. Phipps, "Prostaglandins as modulators of immunity", *J. Trends Immunol*, Vol.23, pp.144-50, (2002).
30. R. Zhan, S. Yang, W. He, F. Wang, J. Tan, J. Zhou, "Nitric oxide enhances keratinocyte cell migration by regulating Rho GTPase via cGMP-PKG signalling", *J. PLoS One*, Vol.10, No.3, (2015).
31. R. Spitler, R. Schwappacher, T. Wu, X. Kong, K. Yokomori, R. B. Pilz, "Nitrosyl-cobinamide (NO-Cbi), a new nitric oxide donor, improves wound healing through cGMP/cGMP-dependent protein kinase", *J. Cell Signal*, Vol.25, pp.2374-2382, (2013).