



저령 추출물의 멜라닌 생성억제 작용

강리아민주¹ · 박설아² · 문연자^{1,3} · 우원홍^{4,5}

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, ²원광대학교 일반대학원 뷰티디자인학과,
³원광대학교 한의과대학 해부학교실, ⁴원광대학교 환경과학연구소, ⁵원광대학교 한국전통의학연구소

Inhibitory Effect of *Polyporus umbellatus* Extract on Melanogenesis

Lea Minju Kang¹, Seol-a Park², Yeun-Ja Mun^{1,3}, Won-Hong Woo^{4,5}

¹Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,

²Department of Beauty Design, Graduate School, Wonkwang University,

³Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

⁴Research Center of Environmental Science, Wonkwang University,

⁵Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Objectives : The purpose of this study was to investigate melanogenesis inhibition of ethanol extract of Polyporus (EP) by using B16F10 melanoma cells. **Methods :** We measured antioxidant effect of EP by using 1,1-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and we confirmed melanin contents and tyrosinase activity of EP in cells. Additionally, the expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and TRP-2 was observed by Western blot. **Results :** EP showed significantly high radical scavenging activity and inhibition of melanogenesis in dose-dependent manner by decreasing cellular tyrosinase activity and melanin content with or without α -melanin stimulating hormone. TRP-1 and TRP-2 expressions were also suppressed by EP in B16F10 cells. **Conclusions :** These results suggest that EP inhibits the melanogenesis and it could be a new organic ingredient for hyper-pigmentation.

Key words : Polyporus, tyrosinase activity, melanin, tyrosinase-related protein-1, tyrosinase-related protein-2, α -melanin stimulating hormone

서론

風寒之邪先入皮毛 (풍한의 사기는 피부를 통해 침범한다)로서 한의학에서 피부는 외부로부터 방어(보호)하고 기화(氣化)되고 남은 노폐물을 땀으로 배출하는 체내·외의 항상성을 유지하는 역할을 한다. 또한 햇빛과 반응해 피부에서는 vitamin D 합성 및 당질 대사 활성이 증가되지만 자외선은 발암물질로 선정이 될 만큼 피부에 직접적인 영향을 미친다. 자외선에 노출되면 피부에 활성산소가 생기는데, 활성산소는 피부 속 인지질과 단백질 등을 손상시켜

피부 주름이나 노화를 촉진한다. 우리 몸은 자외선에 대한 피부와 세포손상에 대한 방어기전으로 멜라닌 색소를 생성하는데¹⁾, 멜라닌 세포는 동물뿐만 아니라 사람의 피부, 머리 및 눈동자색을 결정하는 세포로 널리 알려져 있다²⁾. 멜라닌은 표피 기저층의 멜라닌세포(melanocyte)에서 합성되어 표피의 각질세포(keratinocyte)로 이동된다. 이러한 멜라닌 생성 기전은 매우 복잡한 과정으로 125개가 넘는 유전자와 연관되어 있다³⁾. 이 중 가장 잘 알려진 경로로는 cAMP response element-binding protein (CREB)이 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)를 활성화를

Received February 17, 2020, Revised March 9, 2020, Accepted March 10, 2020

Corresponding author: **Won-Hong Woo**

Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 460 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

Tel: +82-63-850-6942, Fax: +82-63-850-7324, E-mail: whwoo@wku.ac.kr

This paper was supported by Wonkwang University in 2019.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

시키고 MITF는 멜라닌 합성 효소인 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) 및 tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)의 유전자 발현을 증가시키는 것이다. 알부틴(arbutin)과 코직산(kojic acid) 또한 tyrosinase inhibitor로 미백 화장품에 사용되고 있지만, 부작용으로 피부염과 홍반 등 피부 안정성의 문제로 의약계나 화장품업계에서는 제한된 양만이 사용되고 있어 독성이 적고 친환경적인 천연물에 대한 관심이 커지고 있다.

豬苓(Polyporus)은 *Polyporus umbellatus Fries* (구멍장이버섯과 Polyporaceae)의 균핵으로 주로 단풍나무나 참나무속뿌리⁴⁾에 부착되어 형성된다. 저령의 겉은 검은 껍질에 싸여 있고 속은 백색으로 충실하며 맛은 달면서 쓰고 성질이 평(平)하여 독이 없다고 하였고, 족태양과 족소음경으로 들어가 습을 제거하고 수도(水道)가 막혀 소변이 잘 나오지 않고 부종, 창만 및 번열과 갈증을 치료하고⁵⁾ 심신치료 및 간장의 기운을 돋운다는 보고가 있다⁶⁾.

저령의 유효성분으로는 ergone⁷⁾, ergosterol, ergosta peroxide⁸⁾, polyporosterones A~G^{9,10)}, 3,4-dihydroxybenzaldehyde^{9,11)} 등이 보고되었고, 콜레스테롤 저하¹²⁾, 항암⁷⁾, 항종양^{7,13)}, 스트레스 억제¹⁴⁾, 항균^{7,15)}, 방사선으로부터 보호 작용¹⁶⁾ 및 모발성장⁹⁾ 작용이 보고되었다. 또한 Hong 등(2013)은 상황버섯으로부터 추출된 ergone과 ergosterol peroxide가 미백효과를 나타내었으며¹⁷⁾ Cho 등(2006)은 반하에서 추출된 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 tyrosinase 활성을 저해한다고 보고하였다¹⁸⁾. 이들 성분은 저령의 유효성분으로서 본 연구에서는 저령 에탄올추출물(ethanol extract of Polyporus, EP)의 멜라닌 생합성 저해효과 및 멜라닌 합성 효소인 TRP-1, TRP-2의 발현에 미치는 영향을 확인해 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 약재 및 시료추출

본 연구에서 실험에 사용된 저령(Polyporus)은 청명약초(Seoul, Korea)에서 구입 후 1 kg을 세척하고 자연건조 시켰다. 시료 증량에 10 배의 95% EtOH을 가하여 상온에서 72시간 보관하고 그 추출액을 여과지(whatman No. 2)로 여과하였다. 이를 회전감압농축(Eyela, Japna)하여 5일간 동결 건조하여 추출물 13.39 g (수율 0.15%)을 얻었다. 시료는 냉동보관하였으며 95% EtOH에 녹여 20 μ m filter (advantec)로 여과하여 침전물을 제거한 후 실험에 사용하였다.

2. 세포 생존율 측정

한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받은 B16F10 melanoma 세포를 5% fetal bovine serum (FBS; Welgene, Korea)가 첨가된 dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Welgene, Korea)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포 생존율 측정은 24 well plate에 1.5×10⁴개를 분주하고 24시간 부착시킨 뒤 저령 에탄올추출물을 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 0.05% (W/V) thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; Sigma, USA)을 넣어 3시간 배양한 다음 상층액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO; Junsei, Japan)에 녹여 ELISA reader (Tecan, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. DPPH 활성산소 소거능 측정

항산화활성은 Blois방법을¹⁹⁾ 이용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma, USA)를 사용하여 라디칼 소거능을 확인하였다. 96 well plate에 MeOH에 희석한 0.3 mM DPPH 용액 180 μ l과 시료액 20 μ l을 첨가하여 실온에서 차광된 상태로 30분간 반응시키고 517 nm에서 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid (100 μ M)를 사용하였다.

$$\text{DPPH 활성산소 소거능} = 100 - \left(\frac{\text{시료첨가군흡광도}}{\text{무첨가군흡광도}} \times 100 \right)$$

4. Mushroom tyrosinase assay

96 well plate에 160 μ l의 phosphate buffer (pH 6.8)에 20 μ l의 2% L-dopa와 10 μ l의 시료를 농도별로 첨가 후 10 μ l의 mushroom tyrosinase (2,500 U/ml)을 넣고 37°C에서 반응시킨 후 475 nm에서 30분마다 1시간 흡광도를 측정하였다.

5. 세포 내 tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Matinez-Esparza 등²⁰⁾의 방법으로 측정하였다. 10 cm 배양용기에 5×10⁴개의 세포를 분주하여 24시간 동안 세포를 부착시켰다. 시료를 농도별로 처리 하고 1시간 후 α -MSH (10 μ M)을 처리하여 48시간동안 배양하였다. Phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 lysis buffer (5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer (SPB, pH 7.0), triton X-100, 0.1 M PMSF)로 세포를 용해하여 4°C에서 15,000 rpm으로 15분간 원심 분리(Hanil, Korea)하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정용액으로 사용하였다. Protein assay 용액으로 595 nm에서 흡광도를 측정 후, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 동일량의 단백질과 0.1 M SPB (pH 6.8)의 총량이 150 μ l가 되도록 분주하

고 0.1% L-dopa를 50 μ l씩 분주하여 혼합한 후 ELISA reader로 475 nm의 파장으로 30분에 흡광도의 변화를 측정하였다.

6. 세포 내 멜라닌 함량

멜라닌 정량은 Hosei 등²¹⁾의 방법을 변형해 사용하였다. 10 cm 배양용기에 5×10^4 개의 세포를 분주하여 24시간 동안 세포를 부착시켰다. 시료를 농도별로 처리하고 1시간 후 α -MSH (10 μ M)을 처리하여 48시간동안 배양하였다. PBS로 2회 세척하고 lysis buffer (5 mM EDTA, 0.1 M SPB (pH 7.0), triton X-100, 0.1 M PMSF)로 세포를 용해하고 원심 분리하여 얻은 세포침전물에 EtOH를 가하여 세척 후 건조시켰다. 1% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액에 90°C에서 1시간동안 멜라닌을 용해시키고, 96 well plate에 60 μ l씩 넣고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 세포 Pellet 및 형태학적 관찰

10 cm 배양용기에 2.5×10^4 개의 세포를 심고 24시간동안 부착 후 시료를 농도별로 처리 하고, 1시간 후 α -MSH (10 μ M)를 처리하여 72시간 배양 하였다. PBS로 2회 세척 하고 세포를 모아 ep-tube로 옮긴 후 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 관찰하였다. 세포의 형태적 관찰은 6 cm 배양용기에 1.5×10^4 개의 세포를 분주하여 부착시킨 뒤 시료 처리 1시간 후에 α -MSH (100 μ M)를 처리하였다. 72시간 배양 후 세포의 수직상 돌기의 변화를 위상차도립현미경(Leica, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

8. Western blot

10 cm 배양용기에 6×10^4 개의 세포를 분주하고 24시간 부착시킨 뒤 시료를 농도별로 처리하였다. 1시간 후 α -MSH (10 μ M)을 처리하고 48시간 배양하여 사용하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척 후 수거하여 lysis buffer (RIPA buffer 1 ml, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2 mM DTT)로 30분간 용해시키고 15,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 이용하였다. 단백질은 bradford 시약을 이용하여 정량하였고, 동량의 sample buffer (Sigma, USA)를 혼합한 후 전기영동 하였다. 5% non-fat skim milk (Becton, France) 또는 bovine serum albumin (Gibco, USA)가 첨가된 TBST (0.1% tween-20)로 blocking 후 1차 antibody를 blocking 버퍼에 희석하여 4°C에서 overnight 하였다. 2차 antibody는 anti-rabbit IgG, anti-mouse, anti-goat를 1:5000의 비율로 희석하여 반응시킨 다음 TBST로 세척하고 ECL (Millipore, USA) 용액으로 발색 후 chemiDoc (Bio-Rad, USA)을

이용해 촬영하였다.

9. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 sigmaplot 10.0 (San Jose, CA, USA)을 이용하여 student's *t*-test를 이용하여 *p*-value를 구하였으며, *p*<0.05인 경우 * (*)로 표기하였고, *p*<0.01인 경우 ** (**)로 표기하여 유의성을 나타내었다. 모든 실험은 3회 이상 반복으로 평균값을 구하여 평균±표준편차로 표시하였다.

결 과

1. 세포독성

세포 생존율 측정은 세포의 대사 과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소와 MIT tetrazolium이 반응하면 MIT formazan이 형성되고 이를 다시 DMSO로 재수화시키면 보라색으로 나타나는 비색법으로 측정하였다. 저령 에탄올추출물을 농도별로 처리하고 24시간 후에 평가하였다. 실험결과 시료 25, 50, 100 μ g/ml의 농도에서 대조군의 94.1%, 88%, 77.8%로 감소하였고, 추후 실험은 같은 농도에서 시행하였다(Fig. 1).

2. 항산화효과

DPPH는 항산화 활성이 있는 물질과 반응하게 되면 free radical이 소거되어 탈색되는 점을 이용해서 항산화 활성을 측정하는데 널리 사용되고 있는 방법이다. 플라보노이드 등 환원력이 높은

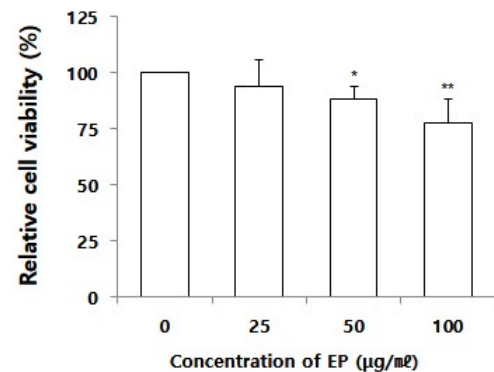


Fig. 1. Effect of ethanol extract of Polyporus on B16F10 cell viability. Cells were plated 1.5×10^4 cells/well and treated with various concentrations of EP for 24 h. and measured cell viability by MTT assay. Results represent the mean \pm S.D. of three independent experiments performed. **p*<0.05, ***p*<0.01 compared to the untreated group.

물질들이 DPPH 라디칼을 소거능이 높다고 보고되어 저령 에탄올 추출물의 항산화능을 DPPH를 이용해 측정하였다. 실험결과 시료 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 71.6%, 91.2%와 90.4%의 높은 항산화능을 보였다(Fig. 2).

3. Mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향

Mushroom tyrosinase는 버섯이 생물/비생물적 요인으로부터 보호하기 위해 멜라닌을 생성하는데 이를 이용하여 멜라닌 생성을 측정하는 방법 중 하나로 저령 에탄올추출물이 mushroom tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조군에 비해 tyrosinase inhibitor 중 하나인 kojic acid는 38.2% 감소한 반면에 저령은 농도별로 96.5%, 133.3% 증가하였다(Fig. 3). 하지만 멜라

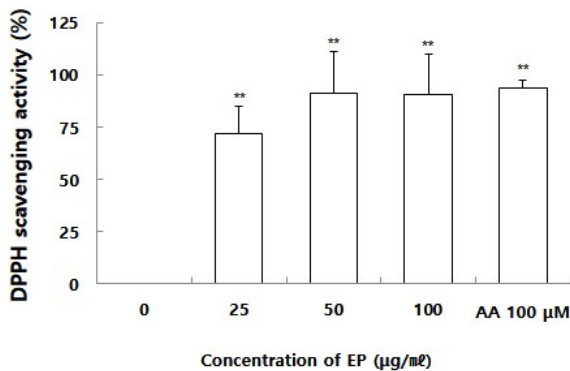


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of ethanol extract of *Polyporus*. Various concentration of EP or ascorbic acid (100 μM) was incubated with the 0.3 mM DPPH solution. 100 μM ascorbic acid was used as a positive control. The results represent the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the untreated group.

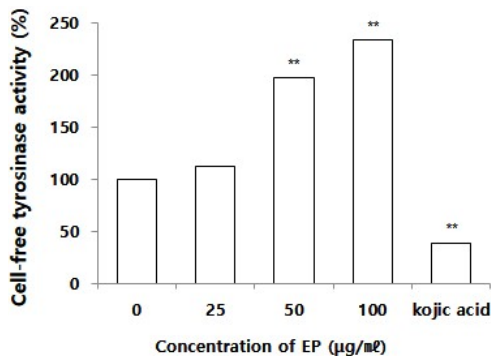


Fig. 3. Effects of ethanol extract of *Polyporus* on mushroom tyrosinase. Various concentration of EP or kojic acid (25 mM) was incubated with the same units of mushroom tyrosinase and measured at 475 nm. 25 mM kojic acid was used as a positive control. The results represent the mean \pm S.D. of three independent experiments performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the untreated group.

닌세포에서 tyrosinase는 멜라노솜 안에 존재하기 때문에 mushroom tyrosinase의 결과와 멜라닌세포에서 멜라닌 합성에 미치는 영향이 다를 가능성이 있다.

4. 세포 내 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성에 미치는 영향

저령 에탄올추출물이 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 추출물을 농도별로 48시간 처리하여 tyrosinase 활성 및 멜라닌 합성에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과 시료 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 대조군보다 18.5%, 22%, 20%로 tyrosinase 활성이 감소되었음을 확인하였다(Fig. 4A). 세포 내 멜라닌 합성량 또한 tyrosinase 활성이 감소한 것과 동일한 경향으로 시료의 농도가 높아질수록 멜라닌량이 감소하였다(Fig. 4A). 멜라닌세포는 수지상 돌기를 가지고 있으며 멜라노솜이 성숙되면 이 돌기를 통해 30~40개의 각질세포로 이동된다고 알려져있다²²⁾. 본 실험에서 저령 에탄올추출물 처리 시 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 대조군의 세포는 크기가 작고 수상돌기의 수가 많았으며 시료(100 $\mu\text{g/ml}$)군에서는 세포의 길이가 증가하고 수상돌기가 현저하게 감소함을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4B, C).

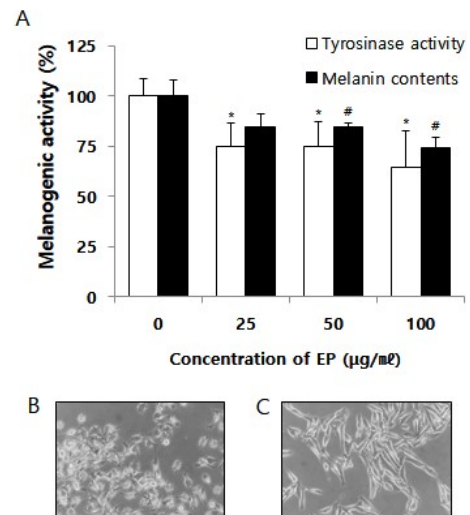


Fig. 4. The inhibitory effect on melanogenesis of ethanol extract of *Polyporus*.

(A) Cells were seeded at 5×10^4 and incubated with various concentration of EP for 48 h. Tyrosinase activity and melanin contents were evaluated as described in materials and methods. For morphological changes of the cell, 1.5×10^4 of cells were seeded and increased number of dendrites in (B) untreated group (0 $\mu\text{g/ml}$) was significantly decreased with (C) EP (100 $\mu\text{g/ml}$) treatment. Results represent the mean \pm S.D. of three independent experiments performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the untreated group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared to α -MSH treated group.

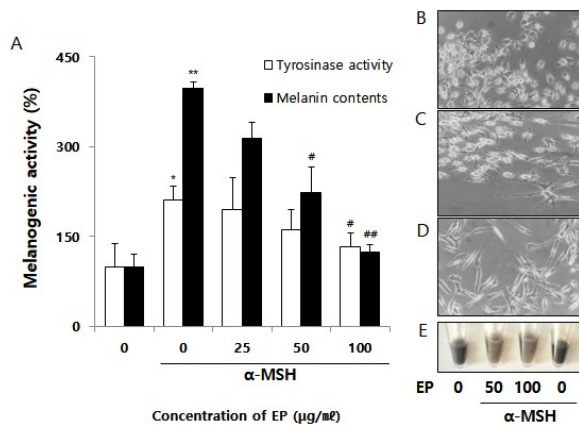


Fig. 5. The inhibitory effect on α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) induced melanogenesis of ethanol extract of Polyporus. (A) Cells were seeded at 5×10^4 and incubated with various concentration of EP and α -MSH (10 μ M) for 48 h. Tyrosinase activity and melanin contents were evaluated as described in materials and methods. 1.5×10^4 of cells were seeded and incubated with EP (100 μ g/ml) and α -MSH (100 μ M) for 72 h. and morphological changes were observed. (B) untreated group (0 μ g/ml) (C) α -MSH (100 μ M) (D) EP (100 μ g/ml) and α -MSH (100 μ M) (E) after EP (50, 100 μ g/ml) treatment, α -MSH (100 μ M) was treated for 72 h and cells were moved to ep-tube. Results represent the mean \pm S.D. of three independent experiments performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the untreated group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared to α -MSH treated group.

5. α -MSH로 촉진된 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성에 미치는 영향

α -MSH는 생체 내 멜라닌의 생성을 촉진하는 호르몬으로 본 실험에서는 α -MSH를 세포에 처리하여 과색소형성 유도 시 저령 에탄올추출물의 효과를 조사하였다. 실험 결과, α -MSH (10 μ M) 처리군은 210%로 대조군(100%)보다 약 2배 증가하였으며, 시료 50, 100 μ g/ml 처리군에서 각각 161%, 133%로 감소하였다(Fig. 5A). 한편 세포 내 멜라닌 함량은 α -MSH (10 μ M) 처리군에서 400%로 대조군(100%)보다 약 4배 증가하였으며, 시료 50, 100 μ g/ml 처리군에서 각각 223%, 124%로 감소하였다(Fig. 5A). 따라서 세포 내 멜라닌 함량은 tyrosinase 활성 결과와 유사한 경향으로 감소하였다. 또한 세포의 형태학적 비교결과 α -MSH (100 μ M)로 처리시 대조군에 비해 수상돌기가 증가하였으며, 저령(100 μ g/ml)에 의해 수상돌기의 수가 현저히 감소되었다(Fig. 5B, C, D). 또한 α -MSH로 증가된 멜라닌이 저령추출물 50, 100 μ g/ml에 의해 감소함을 육안적으로 관찰하였다(Fig. 5E).

6. 멜라닌 합성관련 효소의 단백질 발현

저령 에탄올추출물이 tyrosinase를 안정화시키고 활성을 조절하는 TRP-1과 멜라닌 생성에 관여하는 TRP-2의 발현을 확인하기

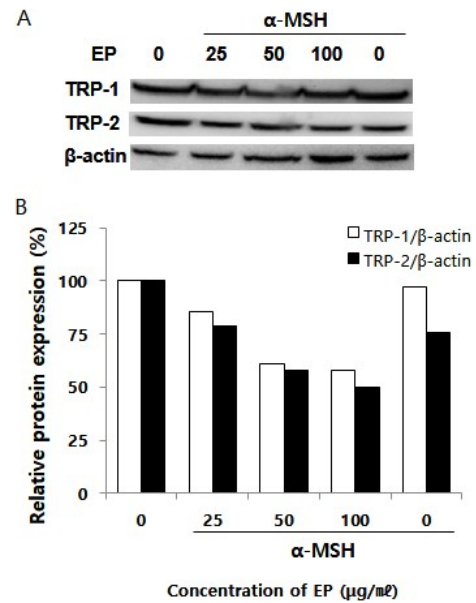


Fig. 6. Inhibitory effect of ethanol extract of Polyporus on TRP-1 and TRP-2 protein expression.

(A) Cells were treated with various concentration of EP and α -MSH (10 μ M) for 48 h. and protein expression levels were evaluated by Western blotting. (B) bar graphs show densitometric evaluation of TRP-1 and TRP-2.

위해 시료를 농도별로 처리하고 α -MSH를 처리하여 Western blot을 시행했다. 실험결과 TRP-1과 TRP-2 발현이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 6A, B). 따라서 저령 에탄올추출물은 TRP-1과 TRP-2의 발현을 감소시킴으로 tyrosinase 활성과 멜라닌 형성을 억제할 것으로 확인된다.

고 찰

색소침착은 나이를 불문하고 흔히 볼 수 있는 증상으로 색소 질환은 번지는 성질을 가지고 있어 초기에 치료가 필요하다. 최근 연구 결과에 따르면 흔히 바르는 자외선 차단제를 하루만 사용하 여도 차단제의 성분이 혈액 속에 흐르고, 사용 기간에 비례하게 혈액 속 성분 수치가 증가한다는 연구결과에²³⁾ 의료계와 미용계는 화학 복합체보다는 식물성으로 안전하게 사용할 수 있는 소재에 관심이 커지고 있다.

저령은 버섯균사체로 중국, 한국, 일본에서 오랫동안 사용되어 온 약재이며 저령의 유효성분으로 알려진 ergone과 polyporusterone A-G는 protein kinase B (AKT)를 하향 조절하여 유선종양의 세포사멸을 촉진하고²⁴⁾ polyporusterone A와 B는 모발의

성장을 촉진함이 보고되었다⁹⁾. Park 등(2003)은 in vivo로 마우스에 저령 열수추출물을 투여하여 항피로능을 측정하였을 때, 저령 추출물이 스테로이드제인 oxymetholone 투여군과 비슷한 항피로 효과를 나타냈다¹⁴⁾. 또한 Ha 등(2001)은 저령 추출물이 사람 위암세포에서 71%의 저해 활성을 보였지만 정상 임파구에서는 90% 이상의 높은 생존율을 확인하였다¹⁵⁾. 이와 같이 저령과 저령의 다양한 유효성분들에 대한 의학 외에 미용 연구도 이루어졌는데, ergone은 B16F10 세포에서 α -MSH 투여군에 비해 멜라닌 생성을 98% 억제하였고, ergosterol peroxide도 tyrosinase의 mRNA 발현과 멜라닌 생성을 억제하였다¹⁷⁾. 또한 저령의 유효성분 중 하나인 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 0.01% 농도에서 kojic acid보다 약 9배, arbutin보다 약 150배의 우수한 억제 효과를 확인하였다¹⁸⁾. 현재까지 저령에 대한 다양한 연구가 되었고 일부 유효성분의 멜라닌 생성 억제 효과가 보고되었으나, 저령에 대한 미백연구는 아직 확인되지 않았다.

피부 색소의 형성은 자외선에 노출된 인체에서 활성산소종이 과다하게 생성되며, 이로 인한 산화적 스트레스에서 기인한다는 연구가 있어³⁾ 저령 에탄올추출물의 항산화능을 관찰한 결과 저령 50 μ g/ml 농도에서 91.2%의 높은 항산화능을 보였다. 이는 Park 등(2003)의 저령 열수추출물이 100 μ g/ml 농도에서 superoxide radical을 78.1% 제거함과¹⁴⁾ 유사한 결과이다. 또한 저령 메탄올 추출물은 천연 항산화제로 알려진 caffeic acid, quercetin, 및 catechin보다 H₂O₂의 세포독성에 대해 보호효과가 높게 나타났다¹⁵⁾. 따라서 저령의 높은 항산화능은 미용소재로도 잠재적 가능성이 크다고 사료된다.

Tyrosinase는 멜라닌 합성에 직접적으로 관여하는 효소로 색소 침착에 중요한 역할을 한다. 저령 에탄올추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하였으며 과색소형성 유도 시에 그 효과는 더욱 우수하였다. Tyrosinase 활성은 결과적으로 멜라닌을 생성하므로 멜라닌 합량 또한 같은 경향으로 억제되었다. 본 실험을 통해 저령의 미백효과를 육안적으로 비교하고 멜라닌세포의 돌기 변화를 확인 할 수 있었다. α -MSH는 자외선이나 외부의 화학적 자극에 의해 유도되며 특이적 G 단백질 연관수용체인 melanocortin-1 receptor (MC1R)과 결합하여 cAMP/PKA 경로를 활성화시키는데, 저령에탄올추출물이 α -MSH로 멜라닌이 촉진된 상태에서 tyrosine을 멜라닌 색소로 변환시키는 TRP-1과 TRP-2 단백질 발현이 농도별로 감소함을 확인 하였다. 따라서 저령 에탄올추출물의 높은 항산화능과 세포 내 tyrosinase의 활성 및 멜라닌 생성의 억제를 통해 미백과 색소침착 완화제로 활용가능성이 많을 것이라 생각되며 향후 추가

연구를 통해 저령의 멜라닌 억제경로 외 tyrosinase 단백질측정 등 다양한 연구가 이루어져 저령이 미용분야에서도 다양히 활용될 수 있기를 기대해본다.

Acknowledgement

This paper was supported by Wonkwang University in 2019.

Funding

None.

Data availability

The authors can provide upon reasonable request.

Conflicts of interest

저자들은 아무런 이해 상충이 없음을 밝힌다.

References

1. Jang TW, Park JH. Evaluation of whitening activities of flower and fruit of *Sophora japonica* L. Korean J Plant Res. 2017 ; 30(1) : 22-8. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2016.30.1.022>
2. Yu JS, Kim AK. Effect of combination of taurine and azelaic acid on antimelanogenesis in murine melanoma cells. J Biomed Sci. 2010 ; 17 Suppl 1: S45. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-s1-s45>
3. Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. J Biol Chem. 2007 ; 282(38) : 27557-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700026200>
4. Hwang BH. Medicinal Mushrooms mushrooms used in Traditional Oriental Medicine. Forest Bioenergy. 2008 ; 27(1): 36-46.
5. Jin JP, Jang JS. Edible medicinal herbal dictionary. 1st ed. Seoul :

- Bubinprint. 2013 : 880.
6. Kaminage T, Yasukawa K, Kanno H, Tai T, Nunoura Y, Takido M. Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of *Poria cocos*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology*. 1996 ; 53(5) : 382-5. <https://doi.org/10.1159/000227592>
 7. Lee WY, Park Y, Park Y, Ahn JK, Park SY, Lee HJ. Cytotoxic activity of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from the sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *Bull Korean Chem Soc*. 2005 ; 26(9) : 1464-6.
 8. Lu W, Adachi I, Kano K, Yasuta A, Toriizuka K, Ueno M, et al. Platelet aggregation potentiators from cho-rei. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1985 ; 33(11): 5083-7. <https://doi.org/10.1248/cpb.33.5083>
 9. Ishida H, Inaoka Y, Shibatani J, Fukushima M, Tsuji K. Studies of the active substances in herbs used for hair treatment. II. Isolation of hair regrowth substances, acetosyringone and polyporusterone A and B, from *Polyporus umbellatus* fries. *Bio Pharm Bull*. 1999 ; 22(11) : 1189-92. <https://doi.org/10.1248/bpb.22.1189>
 10. Ohsawa T, Yukawa M, Takao C, Murayama M, Bando H. Studies on constituents of fruit body of *Polyporus umbellatus* and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1992 ; 40(1) : 143-7. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.143>
 11. Nguyen TPT, Hung TM, Cuong TD, Huh JI, Kwack SJ, Kim JM, et al. Analysis and stability test of the extract from *Ephedrae herba*, *Phytolacca radix* and *Polyporus* for toxicity study. *Korean J Pharmacogn*. 2010 ; 41(2) : 141-6.
 12. Lee HS, Hwang IH, Kim JA, Choi JY, Jang TS, Osada H, et al. Isolation of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory constituents from the sclerotia of *Polyporus umbellatus* fries. *Bull Korean Chem Soc*. 2011 ; 32(2) : 697-700.
 13. Lee JW, Shin YJ, Cho DJ, Lim HJ, Choi WE, Lee YK. Antitumor and antimutagenic effect of the protein polysaccharides from *Polyporus umbellatus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2004 ; 33(3) : 475-9. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2004.33.3.475>
 14. Park JC, Yoo BG. The effects of inhibited on superoxide radical to *Grifola umbellata* extract on mice. *Journal of radiological science and technology*. 2003 ; 26(4) : 47-52.
 15. Ha YD. Antitumoral, Antioxidant and antimicrobial activities of solvent fractions from *Grifola umbellatus*. *Korean J Postharvest Sci Technol*. 2001 ; 8(4) : 481-7.
 16. Park JC. The radioprotective effects of *Grifola umbellata* hot water extract on mice. *Journal of radiological science and technology*. 2005 ; 28(4) : 333-40.
 17. Hong YJ, Jang AR, Yang KS. Inhibition of melanin production and tyrosinase expression of ergosterol derivatives from *Phellinus pini*. *Nat Prod Sci*. 2013 ; 19(3) : 258-62.
 18. Cho YK, Shin DS, Paik DH, Yoon DY, Shin D. Tyrosinase inhibitory effect of 3,4-dihydroxybenz aldehyde Isolated from *Pinellia ternate*. *Kor J Herbology*. 2006 ; 21(2) : 1-7.
 19. Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181: 1199-200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
 20. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse Mmlanoma cells. *Eur J Biochem*. 1998 ; 255 : 139-46.
 21. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res*. 1985 ; 45 : 1474-8.
 22. Videira, IFS, Moura DFL, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol*. 2013 ; 88(1) : 76-83. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962013000100009>
 23. Matta MK, Zusterzeel R, Pilli NR, Patel V, Volpe DA, Florian J, et al. Effect of sunscreen application under maximal use conditions on plasma concentration of sunscreen active ingredients: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2019 ; 321(21) : 2082-91. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.5586>
 24. Tan XL, Lei G, Wang GH. *Polyporus umbellatus* inhibited tumor cell proliferation and promoted tumor cell apoptosis by down-regulating AKT in breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2016 ; 83 : 526-35. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.049>