

Verification of Whitening Activity of *Inonotus obliquus* Extracts in B16F10 Melanoma Cells

Song-Yoon Choi, Je-Back Lee, Hyeon-Ji Yeom, Min-Jeong Oh and Jin-Young Lee*

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

Received November 3, 2023 /Revised January 8, 2024 /Accepted January 9, 2024

In this study, the various whitening activities of *Inonotus obliquus* were assessed for potential use as functional cosmetic materials. When measuring electron donating ability to confirm the antioxidant ability of *I. obliquus* extract, increased activity was observed as the concentration increased, and it was found an outstanding antioxidant capacity of 82.1% at a 1,000 µg/ml concentration. Also, the tyrosinase inhibitory effect, related to a whitening effect, was found to have inhibitory activity that increased in a concentration-dependent manner. The results of verifying the viability of melanoma cells (B16F10) using an MTT assay showed cell viability of more than 80% at concentrations below 100 µg/ml. Therefore, cell-related experiments were conducted at 25, 50, and 100 µg/ml concentrations. By measuring protein expression related to melanin synthesis via treating B16F10 cells with *I. obliquus* extract, it was confirmed that protein expression was inhibited in all factors, depending on the concentration. TRP-1 and MITF appeared by 40.1% and 64.2% amount of expression, respectively, at 100 µg/ml concentrations, and tyrosinase and TRP-2 were verified as having better protein expression inhibition than arbutin. In measuring mRNA expression related to melanin synthesis by treating B16F10 cells with *I. obliquus* extract, it was confirmed that mRNA expression was suppressed as the concentration increased. Accordingly, it was confirmed that *I. obliquus* extract has excellent whitening activity and could be used as a cosmetic material.

Key words : *Inonotus obliquus*, melanoma cells, TRP, tyrosinase, whitening

서 론

피부와 눈의 색 및 머리카락의 색을 결정하는 melanin은 흑색 또는 갈색을 띠며, 단백질 복합체 형태로 구성된 페놀계 고분자 물질이다[13]. 이러한 melanin은 melanocyte 내의 melanosome이라 하는 세포소기관에서 생합성되며 표피의 기저층에 존재하다가 melanocyte의 수직상 돌기를 통해 keratinocyte를 거쳐 피부 각질층으로 이동하게 되며[27] 이런 피부 각질화 과정을 통하여 외부로 배출되기까지 없어지지 않는 안정한 물질로 존재한다[31]. 또한 melanin은 햇빛에 포함되어 있는 UV 빛 에너지를 흡수해 UV를 통한 손상으로부터 진피 이하 피부 기관을 보호해 주며, 자외선이외에도 각종 화학물질, 미세먼지 등의 외부 유해 인자로부터도 피부를 보호해주는 중요한 역할

을 한다[5, 7]. 하지만 자외선, 약물 부작용 및 호르몬 등의 여러 요인들로 인하여 melanin의 과도한 생성 및 분포 이상은 기미, 주근깨 등의 원치 않는 색소 침착 유발 및 피부암 등의 원인이 된다[4, 20].

Melanin의 생성은 자외선 및 free radical이 melanin 합성을 촉진하는 tyrosinase 단백질 발현 유도로 일어난다. 자외선(UV)에 의해 keratinocyte에서 p53 단백질이 활성화되면 pro-opiomelanocortin (POMC)에서 adrenocorticotrophic hormone (ACTH)에 의해 생성된 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH)가 keratinocyte로부터 생성된다[6]. 생성된 α-MSH는 melanocyte 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor와 결합하여 c-AMP 농도를 증가시켜 protein kinase A (PKA) 활성화가 되며 cAMP response element binding protein (CREB)의 인산화를 일으키며 인산화가 된 CREB는 microphthalmia associated transcription factor (MITF)의 발현을 유도한다[26]. MITF는 melanin 생성에 중요한 인자인 tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase 및 TRP-2의 전사를 촉진한다[28]. Melanin 합성 기전의 출발 물질인 L-tyrosine은 tyrosinase에 의해 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)를 DOPA quinone으로 산화된다[27]. 이후 짙은 검정색 및 갈색의 eumelanin과 황색 및 적색의 pheomelanin으로 나누어지게 되며 eumelanin은

*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.

DOPA quinone이 자동 산화반응 및 효소 반응으로 DOPA chrome이 된다. DOPA chrome은 TRP-2의 작용을 통해 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환되고 TRP-1의 DHICA oxidase 작용으로 indole-5,6-quinone-2-carboxy acid로 전환되어 멜라닌 중합에 의해 eumelanin으로 합성된다[14, 25]. 또한, pheomelanin는 DOPA quinone이 cysteine과 합성하여 생성이 된다[10]. 이렇게 생성된 melanin을 제거하기 위해 기존 화장품 산업에서는 kojic acid, arbutin, α -bisabolol, 및 L-ascorbic acid와 유도체 등의 미백 성분이 사용되며, 이러한 성분들은 melanin 세포 사멸을 통해 hydroquinone, tyrosinase 효소를 저해하여 미백 효능을 부여한다. 이렇게 사용되는 미백 물질들은 이취, 분해 및 착색의 안정성 문제와 인체 알레르기 반응 및 피부 독성 등의 부작용으로 사용에 제한이 있다. 이런 기존 미백 물질들의 단점을 극복하기 위해 독성이 없어 피부에 안전한 천연 미백 물질 개발을 위한 연구 필요성이 증대되고 있다[12, 13, 32].

차가버섯은 다른 버섯들과 다르게 자작나무에 기생해 나무의 영양분을 흡수하는 기생균주의 형태로 소나무비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*)에 속하는 버섯이다. 또한 일본의 북해도, 러시아 시베리아, 중국과 북한의 일부 지역 및 캐나다 북부 등 북위 45° 이상 지역에서 자생한다고 알려져 있다. 차가버섯은 위암, 당뇨 심혈관계 등에 처방되어 왔으며 물질의 대사를 활발하게 하는 저분자 다당체 및 β -D-glucan 구조의 수용성 단백다당체를 다량 함유하고 있다고 알려져 있다[9, 29]. 주요 성분으로는 lignin, magnesium, lanosterol, obliquol, isoprenoid, polyphenol, triterpene 및 polysaccharides 등이 있으며 기타 mangan, zinc, natrium, chromium, iron 및 kalium 등이 함유되어 있다고 알려져 있다[22].

본 연구에서는 polyphenol 및 다양한 성분 등이 함유되어 있는 차가버섯을 멜라노마 세포를 이용하여 미백 활성 검증을 통해 화장품 소재로서의 응용 가능성 및 이용가치를 연구하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료 추출

본 실험에서 사용한 차가버섯은 전라남도 장흥군에서 수확된 것으로 Food sense업체를 통해 구매하였으며 다음의 공정에 따라 추출하였다. 구매한 시료는 증류수로 세척한 후 실온 건조하였으며 건조된 시료를 분쇄한 후 시료 중량 10배로 70% ethanol을 가하여 실온에서 24시간 침전 시켜주었다. 침전물과 상층액을 분리하여 추출하였으며 여과지(Whatman No.2)를 사용해 시료 추출물을 여과하였다. 그 후 EYELA evaporator를 사용해 감압농축을 하여 용매인 ethanol을 완전히 제거하였고 동결 건조를 통

해 수분을 제거하여 파우더화 된 시료를 -20°C에서 보관, 사용하였다.

세포주

본 실험에서 세포 배양 및 독성 등 세포 실험에 사용된 melanoma cell line인 B16F10은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)를 통해 구입하여 사용하였다. Phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), trypsin 및 penicillin/streptomycin은 GIBCO BRL Co. (Grand Island, USA) 및 Thermo Fisher Scientific (HyClone™, USA)에서 구매하여 사용하였다.

시약 및 기기

전자공여능 측정 시약인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 실험에 사용하였으며, L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA) 및 mushroom tyrosinase 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 세포 생존율 측정 시약인 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop Inc. (Canada)에서 구매하였으며 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. 미백 활성에 대한 단백질 발현 측정에 사용된 1차 항체인 β -actin, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF와 2차 항체인 anti-mouse는 Santa Cruz Biotechnology. (CA, USA)에서 구매하여 사용하였으며, mRNA 발현 측정에 사용된 primer인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 및 GAPDH은 Bionics (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

본 실험에서 사용한 기기는 pH meter (Mettler Toledo AG, Switzerland), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co., Korea), microscope (Olympus, Japan), autoclave (JS Research Inc., Korea), PCR (ASTEC Co., Japan), centrifuge (Hanil Science Industrial Co., Korea), Mini-PROTEAN® tetra cell (Bio-Rad, USA), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), vortex (Scientific Industries, Inc., USA), digital shaker (Daihan Scientific, Korea), microplate reader (Tecan, Austria), Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA) 및 freeze drier (ILShinBioBase Co., Korea)을 사용하였다.

실험 방법

전자공여능 측정

항산화 활성 측정을 위한 전자공여능(electron donating abilities, EDA) 실험은 Blois의 방법[2]을 토대로 하여 진행하였다. 농도별 sample 120 μ l와 DPPH 60 μ l를 넣고 암실

조건하에 15분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용해 517 nm 흡광도에서 측정하였다. 전자공여능의 측정은 시료 용액의 첨가구의 흡광도와 무첨가구의 흡광도 감소 비율을 통해 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Tyrosinase 저해활성 측정

미백 활성 측정을 위한 tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[30]을 기초로 하여 실험을 진행하였다. 0.067 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 μ l, 농도별 sample 40 μ l 기질액인 0.01 M L-DOPA 40 μ l 및 200 U/ml mushroom tyrosinase 40 μ l를 첨가하여 37°C 암실 조건하에 10 분간 반응하였다. 반응 후 생성된 DOPA chrome을 492 nm 흡광도에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성 측정은 시료 용액의 첨가구의 흡광도와 무첨가구 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

세포 배양

본 연구에서 사용된 멜라노마 세포인 B16F10는 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin을 첨가해준 DMEM 배지를 사용해 5% CO₂ 및 37°C 조건의 incubator를 이용해 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율을 측정하기 위한 MTT assay는 Carmichael의 방법[3]을 토대로 하여 실험을 실시하였다. B16F10 cell을 96 well plate에 200 μ l씩 1 \times 10⁵ cells/well이 되도록 분주하여 37°C 및 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 그 후 농도별로 희석한 sample을 20 μ l 첨가하여 동일 조건하에서 24시간 배양한 뒤 2.5 mg/ml 농도인 MTT 시약 40 μ l를 첨가하여 3시간 반응하였다. 반응 후 배양액을 제거한 후 DMSO를 형성된 formazan에 200 μ l씩 각 well에 분주하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용해 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 시료 처리를 하지 않은 구의 흡광도를 기준으로 하며 각 농도별 시료 첨가구의 흡광도와 무첨가구 흡광도의 감소 비율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

미백 활성 측정을 위한 미백관련 인자인 TRP-1, TRP-2,

tyrosinase 및 MITF의 단백질 발현 정도를 알아보기 위해 western blot을 이용하여 실험을 진행하였다. 먼저 100 mm tissue culture dish에 1 \times 10⁶ cells/dish이 되도록 B16F10 cell을 seeding 해준 후 37°C 및 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 α -MSH를 2시간 처리한 뒤 농도 희석한 sample을 분주하여 24시간 반응시킨 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 2회 세척하였다. M-PERTM Mammalian Protein Extraction Reagent를 처리하여 세포를 lysis한 뒤 centrifuge를 이용해 13,200 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후 BCA protein assay kit를 이용하여 상층액을 정량하였다. 정량한 단백질 20 μ l을 10% SDS-PAGE상에서 전기영동하여 분리한 후 transfer 과정을 통하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 이동시켰다. 그 후 blocking buffer를 5% skim milk in tris buffered saline and tween 20 (TBST)로 제조 후 실온 1시간 동안 blocking을 진행한 뒤 1차 항체를 3% skim milk in TBST로 희석해 4°C 조건에서 over night하였다. TBST를 이용해 3회 10분 간격으로 washing 한 뒤 2차 항체를 희석하여 1시간 30분 동안 반응시킨 후 다시 3회 washing한 후 Davinch-ChemiTM Imager CAS-400SM system을 사용하여 밴드를 분석하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

본 연구에서 사용하는 cell line인 B16F10을 1 \times 10⁶ cells/dish가 되도록 100 mm tissue culture dish에 seeding해준 뒤 incubator에서 24시간 배양하였으며 그 후 α -MSH를 2시간 처리 및 배지로 희석한 농도별 sample을 24시간 반응시켜주었다. 반응 후 PBS로 2회 세척 및 trizol lysis buffer를 이용하여 세포를 lysis 한 후 lysis 된 세포에 chloroform을 200 μ l 첨가한 후 13,200 rpm, 4°C에서 20분간 원심 분리하였으며 상층액을 isopropanol과 동일 비율로 새로운 e-tube에 옮겨 혼합하여 inverting한 후 -20°C에서 over night하였다. 다시 동일 조건으로 원심분리 한 후 상층액을 제거하여 e-tube 바닥에 precipitation된 RNA pellet을 얻었으며 75% EtOH-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 1 ml씩 분주해 세척한 후 13,200 rpm 및 4°C에서 5분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 DEPC를 처리한 water를 분주하여 RNA pellet을 녹여준 뒤 A260/A280 비율로 1.8~2.0 순도의 total RNA를 추출한 후 microvolume spectrometer를 이용하여 total RNA 값을 측정했다. Oilgo (dT)₁₅ primer 1 μ l와 추출한 RNA 및 nuclease free water를 통해 10 μ l를 맞춘 후 5분간 75°C에서 5분간 반응시킨 후 MgCl₂, reverse transcriptase, PCR nucleotide mix, reaction buffer, nuclease free water 및 RNasin inhibitor를 첨가해 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응을 시켜주어 cDNA를 합성하였다.

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

Gene	Primer	Sequence (5' →3')
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	Anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
TRP-1	Forward	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Reverse	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

본 실험에서 미백 활성을 측정하기 위해 사용된 인자 tyrosinase, MITF, TRP-1 및 TRP-2의 mRNA 발현 억제를 알아보기 위해 RT-PCR을 진행하였으며 시험에서 사용했던 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 합성해준 cDNA와 MgCl₂, 10 mM PCR nucleotide mix, 5x green buffer, nuclease free water, primer 및 GoTaq® DNA polymerase를 첨가한 후 혼합하여 PCR을 진행하였다. Glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 96°C에서 2분, 같은 온도에서 10초, 64°C에서 30초 및 72°C에서 60를 1 cycle로 30번 반복해주었으며 tyrosinase는 94°C 30초, 60°C 45초 및 72°C 45초를 1 cycle로 40번 반복하였으며 MITF, TRP-1 및 TRP-2는 94°C 30초, 58°C 45초 및 72°C 60초를 1 cycle로 40번 반복하였다. 그 후 PCR로 합성시킨 후 ethidium bromide (EtBr)을 첨가해준 1.5% agarose gel에서 10 µl를 30분간 100 V에서 전기영동한 후 UV trans-illuminator를 통해 밴드를 확인 및 분석 정량하였다.

결과 및 고찰

전자공여능 측정 결과

전자공여능은 항산화 활성의 주요 기전 중의 하나로 인체 내에 생성되는 free radical에 전자를 공여하여 free radical에 의한 질병 및 노화를 억제하며, 항산화 작용의 주요 지표로서 천연물이 가지고 있는 항산화 활성 측정에 많이 사용된다[11]. 전자공여능 측정에 사용되는 DPPH는 radical 전자의 비환원화로 인해 안정된 free radical이며 보라색을 띠고 있으나 항산화제 등으로부터 수소 및 전자를 받아 노란색으로 탈색되는 정도에 따라 항산화능을 나타내는 방법이다[23, 24].

이러한 방법으로 차가버섯 추출물의 전자공여능 측정 결과를 Fig. 1과 같이 나타내었으며, 농도가 증가함에 따라 전자공여능의 활성이 증가함을 보였고 최고 농도인

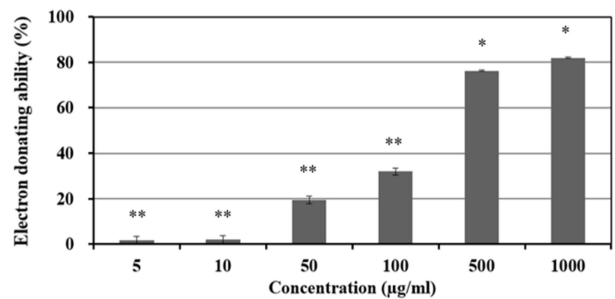


Fig. 1. Electron donating ability of *Inonotus obliquus* extract. The results were expressed as the average of triplicate samples (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

1,000 µg/ml에서는 82.1%로 우수한 활성을 확인하였다. Kim 등[18]의 연구에 따르면 가시막 ethanol 추출물 1 mg/ml에서 30.2%의 활성이 보고되었으며, 측백나무 잎 추출물이 1 mg/ml 농도에서 44.7% 활성을 나타낸다고 보고한 Ahn 등[1]의 결과와 비교했을 때 차가버섯 추출물은 높은 전자공여능 활성을 가지는 것을 확인하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정 결과

멜라닌은 자외선 등 피부를 보호하는 역할도 하지만 과다 생성되게 되면 기미 및 주근깨 등 피부 반점이 형성되며 더 나아가서는 피부 노화 및 피부암을 야기한다[15]. Tyrosinase는 이러한 멜라닌을 생성하는 과정에서 중요한 역할을 가지는 효소로 기질인 tyrosine을 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)로 변환시키는 hydroxylase 활성 및 DOPA를 DOPA quinone으로 전환시키는 DOPA oxidase 활성 모두를 가지고 있다[33]. 이러한 이유로 tyrosinase 저해 활성 측정은 미백 소재 개발에서 유용한 평가방법으로 활용되고 있다[21].

차가버섯 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 Fig. 2와 같이 나타내었다. 차가버섯 추출물의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 억제 활성도 증가하는 것을 확인하였으며 최고 농도인 1,000 µg/ml에서 21.3%의 저해

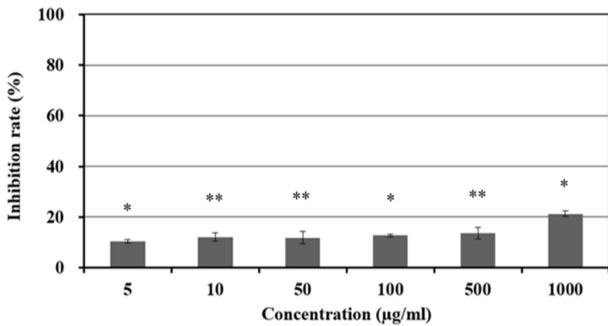


Fig. 2. Inhibition rate of *Inonotus obliquus* extract on tyrosinase. The results were expressed as the average of triplicate samples (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

활성을 나타내었다. 이는 선화 뿌리 추출물의 1,000 µg/ml 농도에서 14.9%의 억제 활성이 있다고 보고한 Kwak 등 [19]의 결과와 Han 등[8]의 연구에서 18% 저해활성을 가진다고 보고된 포도씨 methanol 추출물과 비교하였을 때 유의한 결과를 확인하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 결과

MTT assay는 세포 증식, 사멸 및 성장 등의 세포 생존율을 측정하는 방법이며 다양한 물질이 세포에 미치는 영향을 평가하기 위해 사용되며, 세포 독성에 관하여 많은 시료를 신속, 정확 및 객관성 있게 판독할 수 있어 널리 응용되고 있다. 본 방법은 세포의 미토콘드리아 내 탈수소효소가 노란색 tetrazolium salt를 환원시켜 자주색을 띄는 formazan 결정을 생성하는 원리를 이용한 것이다. 생성된 formazan의 양은 세포 생존율과 비례하여 생성된 formazan의 흡광도를 측정해 비교적 정확하게 세포의 생존율을 평가할 수 있다. Formazan crystal은 dimethyl sulfoxide와 같은 유기용매를 이용하여 세포막을 파괴하고 용해시켜 흡광도를 측정하게 된다[16, 17].

이러한 방법으로 차가버섯 추출물이 멜라노마 세포인 B16F10에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였으며 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 차가버섯 추출물을 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/ml의 농도로 처리한 결과 농도가 증가할수록 생존율이 감소하는 것을 확인하였으며 500 µg/ml의 농도에서 84.5%의 세포 생존율을 나타내었다. 이에 따라 아래의 실험에서는 세포 생존율이 80% 이상인 25, 50, 100 µg/ml 농도로 선정하여 진행하였다.

Western blot을 통한 단백질 발현 측정 결과

차가버섯 추출물이 세포 내 멜라닌 합성 과정의 주요 인자인 tyrosinase, MITF, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 western blot을 진행하였으며 그 결과를 Fig. 4와 같이 나타내었다. 세포의 다

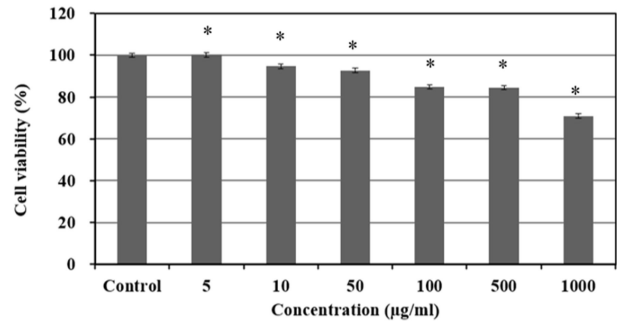


Fig. 3. Cell viability of *Inonotus obliquus* extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^5 cells/well) were incubated for 24 hr in DMEM, the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml of *Inonotus obliquus* extract for 24 hr. Result are means \pm SD of triplicate data. Values are expressed as mean of triplicate measurements (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

양한 조건에도 발현 정도의 차이가 매우 적은 house keeping gene으로 β -actin을 양성 대조군으로 사용하였으며 차가버섯 추출물은 25, 50, 100 µg/ml로 처리하였고, control은 α -MSH를 처리해 melanin 세포를 과발현시켰으며, normal은 추출물 및 α -MSH 모두 처리하지 않은 구간으로 설정하였다. 미백 관련인자인 tyrosinase, MITF, TRP-1 및 TRP-2 모두 농도 의존적으로 단백질 발현이 억제되는 것을 확인하였으며, 100 µg/ml의 농도에서 TRP-1 및 MITF는 40.1%, 64.2%의 발현량을 나타내었으며 tyrosinase 및 TRP-2 인자에서는 대조군인 arbutin보다 단백질 발현 저해가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정 결과

α -MSH는 MITF 생성을 촉진, tyrosinase의 활성 자극 및 멜라닌 생성에 관여하는 TRP-1, TRP-2에 작용해 eumelanin을 생성하도록 유도한다[34]. 따라서 차가버섯 추출물이 멜라닌 생성과 관련된 인자인 tyrosinase, MITF, TRP-1 및 TRP-2의 mRNA 발현과 연관성이 있는지 확인하기 위해 RT-PCR을 진행하였다. 양성 대조군은 세포의 다양한 조건에서도 발현량의 정도 차이가 미비한 house keeping gene인 GAPDH을 사용하였으며 차가버섯 추출물을 25, 50, 100 µg/ml로 처리하여 Fig. 5와 같이 나타내었다. Tyrosinase, MITF, TRP-1 및 TRP-2 모두 차가버섯 추출물의 농도가 증가함에 따라 mRNA 발현양이 감소하였으며 tyrosinase, TRP-2 및 MITF 인자는 대조군에 비하여 높은 mRNA 발현 억제율을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 호서대학교의 재원으로 학술연구비 지원을 받아 수행된 연구임(2022021000).

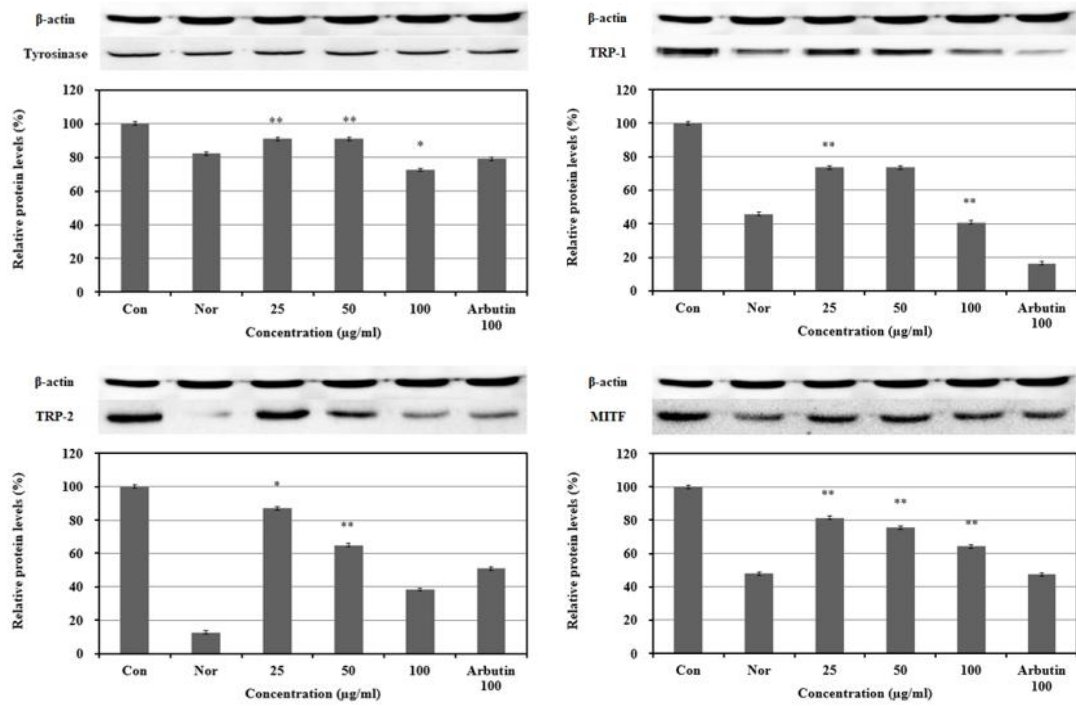


Fig. 4. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression rate of *Inonotus obliquus* extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells/dish) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Inonotus obliquus* extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Results are means \pm SD of three individual experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

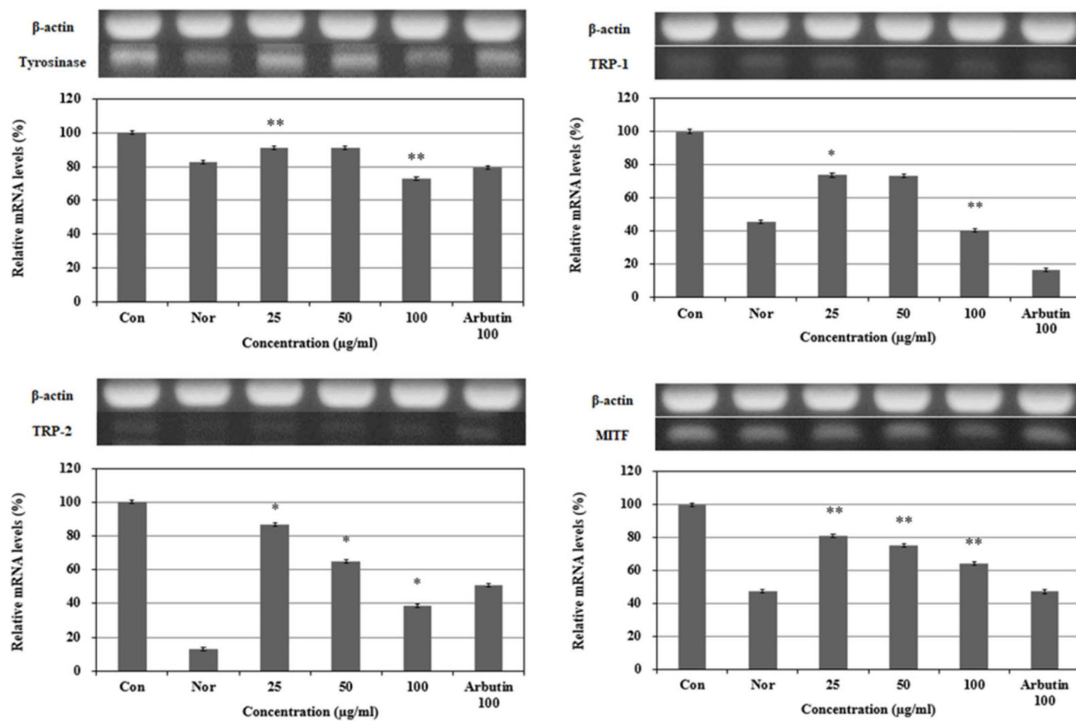


Fig. 5. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase mRNA expression rate of *Inonotus obliquus* extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells/dish) were incubated in DMEM for 24 hr, the cells were treated *Inonotus obliquus* extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Results are means \pm SD of three individual experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Ahn, H. Y., Heo, S. J., Kang, M. J., Lee, J. K., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. 2011. Antioxidative Activity and Chemical Characteristics of Leaf and Fruit Extracts from *Thuja orientalis*. *J. Life. Sci.* **21**. 746-752
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**. 1199-1120.
- 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.
- Chang, Y. H., Choo, J. H., Lee, S. Y., Kim, T. Y., Jin, M. H., Chang, M. Y., Lee, S. H., Lee, C. K. and Park, S. G. 2014. Inhibition of Melanogenesis by Cucurbitacin B from *Cucumis sativus* L. *J. Soc. Cosmet. Scientists. Korea.* **40**. 403-412.
- Cho, E. J. and Byun, E. H. 2019. Antimelanogenic effect and whitening of crude polysaccharide fraction extracted from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Korean. J. Food. Sci. Technol.* **51**. 58-62.
- Choi, D. H., Jeon, G. C., Yoon, J. H., Min, J. H., Park, S. J., Kim, J. S., Hwang, E. T. and Hwang, H. S. 2019. Study on the Whitening Efficacy and Skin Barrier by Lysosome-related Organelle Extract (LOE) from Egg White. *J. Soc. Cosmet. Scientists. Korea.* **25**. 389-397.
- Choi, E. Y. and Jang, Y. A. 2021. The Analysis of Whitening Effects on Extracts from Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) Seeds. *KOCS.* **38**. 1229-1240.
- 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. *JKSFSN.* **37**. 1679-1683.
- Im, D. Y and Lee, K. I. 2017. Antioxidative Activity and Tyrosinase Inhibition Effect of Fractions from the Extract of *Inonotus obliquus*. *KSP.* **48**. 46-50.
- Jeong, Y. J. 2012. Kinetic Analysis on Tyrosinase Inhibition Activity of Whitening Agents. *Soong Sil University, Korea.*
- Jin, K. S., Park, J. A., Lee, J. Y., Kang, J. S., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2014. Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activities of *Euptelea Pleiosperma* Ethanol Extract. *MBL.* **42**. 170-177.
- Jo, S. M., Kim, J. E. and Lee, N. H. 2022. Whitening and Anti-oxidative Constituents from the Extracts of *Hydrangea petiolaris* Leaves. *J. Soc. Cosmet. Scientists. Korea.* **48**. 123-134.
- Kang, D. W., Kim, P. G., Kim, S. W., Bang, K. H., Kim, C. H., Lee, S. W. and Gal, S. W. 2021. Biochemical Properties of a Whitening Bioactive Agent Derived from *Thrichoderma viridescens* SW-1. *J. Life. Sci.* **31**. 654- 661.
- Kim, H. M., Yoo, D. H. and Lee, I. C. 2022. Study on the Whitening Effect of *Mangifera indica* L. Peel Extracts through Inhibition of Melanin Synthesis Factor. *MBL.* **50**. 31-39.
- Kim, I. W., Lee, J. H., Kwon, Y. N., Kim, S. H., Yun, E. Y., Nam, S. H., Ahn, M. Y and Hwang, J. S. 2014. Inhibitory effect of melanin synthesis using organic solvent extracts from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *J. Seric. Entomol. Sci.* **52**. 1-5.
- Kim, J. H. and Hong, J. I. 2018. Effects of various lights, solvents, and zinc protoporphyrin on the chemical behavior of MTT formazan. *Korean. J. Food. Sci. Technol.* **50**. 1-7.
- Kim, J. W., Kim, E. S., Kim, J. and Lee, S. J. 2006. Evaluation of periodontal ligament cell viability in rat teeth after frozen preservation using *in-vivo* MTT assay. *Restor. Dent. Endod.* **31**. 192-202.
- Kim, Y. A. and You, S. H. 2017. Antioxidant Activity and Anti-inflammatory effects of *Sicyos angulatus* L. extract. *KOCS.* **34**. 536-544.
- Kwak, C. G. 2009. Analysis on the Contents and Tyrosinase Inhibitory Effect of *Calystegia japonica*. *Daegu Haany University. Korea.*
- Lee, H. S., Seok, J. H., Ting, C. W. and Kim, Y. J. 2018. A Study on the Whitening Activities of *Gentiana scabra* Extract. *J. Soc. Cosmet. Scientists. Korea.* **44**. 9-14.
- Lee, S. H., Kim, S. Y., Kim, J. J., Jang, T. S. and Chung, S. R. 1999. The Isolation of the Inhibitory Constituents on Melanin Polymer Formation from the Leaves of *Cercis chinensis*. *KSP.* **119**. 397-403.
- 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.
- Lee, Y. M., Kim, I. S., Ghosh, M., Hong, S. M., Lee, T. H., Lee, D. H. and Lim, B. O. 2017. Antioxidant Activity and NO Inhibitory Effect of Bioconverted Medicinal Material Using Germinated Green Rice and *Hericium erinaceus* Mycelium. *KJMCS.* **25**. 305-315.
- Oh, J. H., Kim, E. H., Kim, L. J., Moon, Y. I., Kang, Y. H. and Kang, J. S. 2004. Study on Antioxidant Potency of Green Tea by DPPH Method. *JKSFSN.* **33**. 1079-1084.
- Park, S. H., Kim, A. H., Park, B. J. and Kim, J. J. 2013. Whitening Effect of Biochanin A. *J. Soc. Cosmet. Scientists. Korea.* **39**. 289-294.
- Park, T. S., Kim, D. H. and Son, J. H. 2015. Whitening Effect of *Salvia miltorrhiza* Bunge Water Extract in Human Epidermal Melanocyte. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**. 333-338.
- Seo, S. K., Han, S. J., Ku, C. S., Kim, D. H., Ryu, J. H., Baek, J. H., Koh, J. S. and Jang, D. I. 2018. New Development of Natural Depigmentation Agent from *Anemarrhena asphodeloides* Root Extracts by In hibition of Melanin Biosynthesis. *Asian. J. Beauty. Cosmetol.* **16**. 1-9.

28. Suk, J. S., Oh, Y. N., Park, J. A., Lee, J. Y., Jin, S. J., Hyun, S. K., Hwang, H. J., Kwon, H. J. and Kim, B. W. 2012. Anti-Oxidant, Anti-Melanogenic, and Anti-Inflammatory Activities of *Zanthoxylum schinifolium* Extract and its Solvent Fractions. *MBL*. **40**. 371-380.
29. Sung, M. K., Kang, J. W., Jeong, Y. J., Kim, B. J., Cho, H. E. and Cho, H. D. 2020. New Approaches to Increase Skin Efficacy of Chaga Mushroom Extract using High Voltage Pulsed Electric Fields Technology. *J. Soc. Cosmet. Scientists. Korea*. **46**. 231-241.
30. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta. Med.* **53**. 515-517.
31. Yoo, D. H. and Lee, I. C. 2021. Whitening Effect of *Abelmoschus esculentus* on Melanoma Cells (B16F10). *MBL*. **49**. 485-492
32. Yoo, K. W., Lee, S. M., Jung, S. Y., Heo, H. J., Cha, B. S., Sofia, B., Lei, L., Lee, S. H., Chun, Y. Y., Jo, H. H., Kim, Y. J., Lee, M. G., Kwak, B. M. and Bin, B. H. 2023. Antioxidant and Whitening Effect of *Crocus chrysanthus* (Herb.) Herb. Bulb Extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists. Korea*. **49**. 36-46.
33. Yoon, J. H., Shim, J. S., Cho, Y., Baek, N. I., Lee, C. W., Kim, H. S. and Hwang, J. K. 2007. Depigmentation of Melanocytes by Isopanduratin A and 4-Hydroxypanduratin A Isolated from *Kaempferia pandurata* RoxB. *Biol. Pharm. Bull.* **30**. 2141-2145.
34. Yu, J. M., Kim, D. H. and Son, J. H. 2015. Whitening Effects of Solvent Fractions Isolated from *Vitex rotundifolia*. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**. 266-272.

초록 : 차가버섯(*Inonotus obliquus*) 추출물의 B16F10 멜라노마 세포에서의 미백활성 검증

최송윤 · 이제백 · 엄현지 · 오민정 · 이진영*
(호서대학교 화장품생명공학부)

본 연구에서는 차가버섯의 미백 활성 검증을 통하여 화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다. 차가버섯 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 전자공여능을 측정된 결과 농도가 증가할수록 활성도도 증가하였으며 1,000 µg/ml 농도에서 82.1%의 우수한 전자공여능을 나타내었다. 또한 미백 효과를 검증하기 위해 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 농도 의존적으로 저해활성이 증가함을 확인하였다. MTT assay를 통해 멜라노마 세포(B16F10)의 세포 생존율을 확인한 결과 100 µg/ml 이하 농도에서 80% 이상의 생존율을 나타내었다. 따라서 세포 관련 실험은 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 진행하였다. B16F10 cell에 차가버섯 추출물을 처리하여 멜라닌 합성과 관련된 단백질 발현을 측정된 결과 농도 의존성에 따라 모든 인자에서 단백질 발현이 억제됨을 확인할 수 있으며 100 µg/ml의 농도에서 TRP-1, MITF는 40.1%, 64.2%의 발현량을 나타내었고 tyrosinase 및 TRP-2는 arbutin 보다 단백질 발현 저해가 우수한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 멜라닌 합성 관련 mRNA 발현 측정을 위해 B16F10 세포에 차가버섯 추출물을 처리한 결과, 농도가 증가할수록 mRNA 발현이 억제되는 것을 검증하였다. 이에 따라 차가버섯 추출물이 미백 활성을 가지는 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.