

차가버섯 추출물의 MMPs 발현 저해 및 HAS-2 발현 증가효과

이 소 현 · 박 선 희 · 이 강 혁 · 박 수 진 · 김 영 희[†]

(주)바이올랜드 생명공학연구소
(2011년 9월 5일 접수, 2011년 9월 14일 수정, 2011년 9월 17일 채택)

Effect of *Inonotus obliquus* Extract on the Expression MMPs and HAS-2

So Hun Lee, Sun Hee Park, Kang Hyuk Lee, Soo Jin Park, and Young Heui Kim[†]

R&D Center, Bioland, 39-4, Songjeong, Byeongcheon, Cheonan, Chungnam 330-860, Korea
(Received September 5, 2011; Revised September 14, 2011; Accepted September 17, 2011)

요약: 본 연구에서는 차가버섯 추출물의 주름개선 화장품 원료로서의 가능성을 확인하기 위하여, 차가버섯의 70 % 에탄올 추출물을 제조하여, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거능, 엘라스타제 저해능, MMPs (matrix metalloproteinases) 발현 저해 및 HAS-2 (hyaluronan synthase-2) 발현 저해 효능을 측정하였다. 차가버섯 추출물 및 함유성분에 대한 DPPH radical 소거능과 엘라스타제 저해 효능을 측정한 결과, 차가버섯 추출물은 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능 및 엘라스타제 저해 효능을 보였으며(SC₅₀ = 91 µg/mL, IC₅₀ = 124 µg/mL), 함유성분 중 Gallic acid가 가장 우수한 결과를 나타내었다. MMPs 발현능 평가에서, 차가버섯 추출물은 5 ~ 25 µg/mL의 농도에서 50 ~ 79 % MMP-1 mRNA 발현을 저해하였으며 MMP-2의 발현량을 측정된 결과, 10 µg/mL에서 약 20 %를 감소시켰다. MMP-9의 발현에서도 5 ~ 25 µg/mL의 농도에서 54 ~ 70 %의 저해 효과를 나타내었다. 또한 HAS-2의 mRNA 발현량을 측정된 결과, 차가버섯 추출물이 전 농도에서 농도 의존적으로 HAS-2 발현량을 증가시켰다. 상기 결과를 종합해 볼 때 차가버섯 추출물은 주름개선 화장품 소재로서 개발이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: In order to investigate the possibility of *Inonotus obliquus* extract as an active ingredient for wrinkle-care cosmetics, we prepared 70 % ethanolic extract of *Inonotus obliquus* and measured its DPPH radical scavenging activity and elastase inhibitory activity. We also evaluated the effect of *Inonotus obliquus* extract on expression of MMPs and HAS-2 in fibroblast and HaCaT cell, respectively. *Inonotus Obliquus* extract showed DPPH radical scavenging activity and elastase inhibitory activity in a dose-dependant manner (SC₅₀ = 91 µg/mL, IC₅₀=124 µg/mL). *Inonotus obliquus* extract inhibited the expression of MMP-1 mRNA 50 ~ 79 % at concentrations of 5 ~ 25 µg/mL, and reduced the expression of MMP-2 around 20 % at a concentration of 10 µg/mL. And it also reduced the expression of MMP-9 54 ~ 70 % in tconcentrations of 5 to 25 µg/mL. Furthermore, *Inonotus obliquus* extract increased HAS-2 mRNA expression in a dose-dependent manner in concentrations of 5 to 25 µg/mL without cytotoxicity. These results suggested that *Inonotus Obliquus* extract could be useful as an active ingredient for wrinkle-care cosmetics.

Keywords: *Inonotus obliquus*, antioxidant, anti-wrinkle, MMPs, HAS-2

1. 서 론

피부는 외측으로부터 표피, 진피, 피하조직으로 구성

되어 있다. 표피는 케라틴으로 되어있는 케라티노사이트, 멜라닌을 형성 분비하는 멜라노사이트, 면역관련세포 및 지각관련세포 등의 여러 가지 세포로 이루어져 있어서 외부자극이나 병원균의 침입을 방지하고 체온조절, 수분과 지질 성분 유지 작용을 한다[1]. 진피는 표피의 아래

[†] 주 저자 (e-mail: yhkim1st@biolandkorea.com)

에 있는 결합조직으로 이루어지는 조직으로 표피 세포인 케라티노사이트처럼 치밀하게 채워져 있지 않고 세포외 공간이 많으며, 세포외기질(extracellular matrix)이라 불리는 거대분자의 망상 구조에 의해 채워져 있다. 세포외기질은 피부 탄력성, 신진대사 등에 직접적으로 관여하고 있다. 또한, 섬유상 단백질은 조직의 형태를 유지하거나, 피부에 탄성을 부여하는 등의 기능을 담당하고 있다. 따라서 세포외기질에 있어 섬유상 단백질의 생산이 촉진되면, 피부에 탄력을 주게 되어, 주름 또는 잔주름이 억제된다. 이러한 세포외기질을 생산하는 섬유아세포의 활성이 내적, 외적인 노화 요인, 특히, UV에 의해 저하되게 되면 콜라겐 생합성이 감소하고 변성된 엘라스틴이 증가하게 된다. 또한 세포외기질을 분해하는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 증가로 콜라겐, 엘라스틴 등의 기질의 분해가 증가되고 진피 내 solar scar가 발생하게 되며 표피-진피 경계부가 파괴되어 진피 분해가 가속화된다. 결국에는 피부의 탄력이 저하되고 주름, 잔주름, 피부의 거칠어짐이 발생하게 되어 피부 노화를 초래하는 하나의 원인이 된다[2-4]. 따라서 위에서 설명한 주름 생성 요인 중 가장 큰 부분을 차지하고 있는 콜라겐, 엘라스틴 등의 세포외기질의 합성량을 증가시키거나, 세포외기질을 분해하는 효소인 MMPs를 저해함으로써 주름 생성을 억제하는 방법이 연구되어지고 있다. 세포외기질에 있어 히알루론산은 수분 보유, 세포간 간격 유지, 세포성장인자 및 영양성분의 저장 및 확산 뿐만 아니라, 세포의 분열과 분화, 이동 등에도 관여하여, 히알루론산의 생산이 촉진되면 피부의 신진 대사가 촉진되고 피부 노화를 방지하는 것이 가능하게 된다. 히알루론산은 황산기가 부착되지 않은 글루코스아미노글리칸(nonsulfated glycosaminoglycan)의 일종으로, 글루쿠로닉산과 N-아세틸 글루코사민 잔기가 반복적으로 연결되어 있는 선형의 고분자물질이다. 주로 각질형성세포와 섬유아세포에 의해 합성되며, 표피의 세포간 간격과 진피의 결체 조직에 분포한다고 보고되었다. 인간의 피부에서 히알루론산의 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 보고되었는데, 이것이 노화에 따른 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨진다. 이러한 히알루론산의 합성은 히알루론산 합성효소(hyaluronan synthase, HAS)에 의해 진행되며 히알루론산 합성 효소의 양을 증가시킴으로써 히알루론산의 합성을 촉진하고자 하는 연구가 이루어지고 있다[5,6].

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 소나무 비늘버섯과(Hymenochaetaceae)에 속하는 약용 버섯으로, 주로 북

위 45도 이상의 러시아를 비롯한 한랭지역에서 자생하는 검은 자작나무, 오리나무, 물푸레나무 등에 기생하는 균핵이다. 표면은 검고 내부는 황갈색을 띠고 있으며, 대부분 직경이 10 ~ 20 cm 정도의 크기로 주로 약용으로 이용되고 있다. 주요 성분으로는 triterpene, polysaccharides, isoprenoid, polyphenol, lignin, magnesium, lanosterol, obliquol 등이 있고, 기타 chromium, iron, kalium, man-gan, zinc, natrium 등을 함유한다[7-9]. 차가버섯에서 분리한 페놀 화합물의 free radical 소거와 지질과산화 억제제를 통한 항산화효과에 대한 연구가 보고가 있었으며 [10] 염증반응을 일으키는 물질을 억제에 의한 소염효과 [11]와 지질대사 치료에 도움을 주는 것[공개특허 10-2005-0079869]으로 보고된 바 있다. 또한 항암, 혈당강하, 간보호 및 항균, 항바이러스 효과가 보고된 바 있다 [12-18]. 본 연구에서는 화장품 원료로서 사용 가능한 차가버섯 추출물을 제조하여 이들 추출물의 DPPH radical 소거능과 엘라스타제 활성 저해, MMPs의 발현 저해 및 HAS-2 발현 증가효과를 측정하여, 피부노화 방지 및 주름개선을 위한 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하고 그 결과를 보고하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 러시아의 접경지역인 몽골 오브스 아이막(UVS AIMAG)에서 수입하여 음건 후 사용하였으며 표본품은 (주)바이오랜드 연구소 표본실 내에 보관하였다. Gallic acid (398225, $\geq 97\%$), 3,4-dihydroxybenzoic acid (37580 $\geq 97\%$), vanillic acid (H36001, $\geq 97\%$), siringic acid (77h5234, $\geq 95\%$), 2,5-dihydroxyterephthalic acid (41796DM, 98%)은 Sigma-Aldrich (MO, USA)의 제품을 사용하였다.

사람 섬유아세포(CRL-2076)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입하였으며, 세포배양에 필요한 배지 및 시약은 Invitrogen (USA), Sigma (USA), Nunc (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

RT-PCR은 SuperBio (Korea)의 RT-PCR Kit (P7004)를 사용하였으며, image analysis system (Bio-rad, USA)으로 결과를 확인하였다. 항체는 Santa Cruz Biotech (USA)에서 구입하였다.

2.2. 추출물의 제조

건조한 차가버섯 100 g을 70 % EtOH 수용액 1 kg에

침적하여 상온에서 10 day 동안 추출하였다. 추출이 끝난 후 추출액을 0.3 μm 여과지로 여과하고, 농축하여 1.3 g을 획득하였다.

2.3. HPLC를 이용한 차가버섯 추출물의 분석

차가버섯 추출물의 성분을 분석하기 위해 HPLC (10A, SHIMADZU SCC, JAPAN)로 분석을 수행하였다. 분석조건으로 컬럼은 RP - C18 (Capcell pack, 4.6 \times 250 mm, 5 μm), 측정파장은 280 nm, 이동상의 속도는 1 mL/min로 이동상은 0.1 % aqueous formic acid에 100 % acetonitril을 5 ~ 15 %의 gradient로 35 min 동안 분석하였다.

2.4. DPPH Radical 소거능 측정

Hatano 등의 방법을 변형하여[18] 0.2 mM 의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 0.5 mL에 시료를 농도별로 1 mL을 첨가하고, Voltex mixer로 10 s 간 진탕 후 상온에서 10 min 간 반응시킨 다음, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 95 % (w/w) 에탄올 1 mL를 첨가하고 동일하게 실험하였다. 각 시료의 라디칼 소거능은 SC_{50} 로 나타내었다.

2.5. Elastase 활성 측정

123.2 mM Tris-Cl 완충용액(pH 8.0)에 n-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide 1,015 mM이 용해된 기질액 1,300 μL 에 시료를 일정 농도로 정제수로 희석한 액을 100 μL 첨가한다. 여기에 효소액(0.037 U/mL)을 100 μL 첨가하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 수욕상에서 10 min 간 반응시켜 UV-visible spectrum 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 억제 작용은 IC_{50} 로 나타내었다. 색보정은 n-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 123.2 mM Tris-Cl 완충용액 1,300 μL 를 첨가하고, 실험군과 동일한 농도의 시료를 첨가하였다.

2.6. 세포 독성 실험

살아있는 세포는 미토콘드리아에 존재하는 탈수소 효소에 의해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)가 MTT formazan으로 전환되는 원리를 이용한 실험법으로 세포 수 측정에 널리 사용되는 실험법이다[20]. 24-Multiwell plate에 1 \times 10⁵ cells/well 농도의 사람 섬유아세포와 2 \times 10⁵ cells/well 농도의 HaCaT 세포를 10 % fetal bovine serum (FBS) 이 첨가된 배지로 접종하여 24 h 배양하였다. 배양된 세

포의 배지를 serum-free 배지로 교체하고 시료를 농도별로 처리하여 24 h 배양하였다. 대조군으로 시료를 녹인 용매만을 처리하여 배양하였다. 배양이 끝난 세포에 MTT 용액 (2.5 mg/mL) 100 μL 를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 h 반응시켰다. 상등액을 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO) 500 μL 를 첨가하여 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해시킨 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 대조군과 비교하여 흡광도의 백분율로 나타내었다.

2.7. MMPs 발현량 측정

2.7.1. UVA 조사 및 시료 처리

사람 섬유아세포를 2 \times 10⁶ cells/dish의 농도로 100 mm cell culture dish에 24 h 배양하였다. 24 h 후 배지를 제거하고 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 3 mL을 넣고 2번 세척하여 배지의 serum 성분 제거 후 HBSS 2 mL을 넣고 UVA 6 J/cm²을 조사하였다. UVA 조사 후 serum-free IMDM배지로 교체하고 시료를 처리하여 24 h 배양하였다.

2.7.2. MMP-1 발현량 측정

RT-PCR을 사용하여 MMP-1 발현을 확인하기 위하여 UVA를 조사한 후 24 h 배양한 세포로부터 trizol reagent를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 정량 후 1 μg 의 total RNA를 RT-PCR kit를 사용하여 MMP-1과 β -actin의 RT-PCR를 수행하였으며, 반응 조건은 MMP-1은 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 25 cycles, β -actin은 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 62 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 25 cycles로 반응시켰다. RT-PCR product는 2 % (w/v) agarose gel에 전기 영동하여 image analysis system으로 정량하였다. 발현율은 UVA만을 조사한 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다.

Actin Primer

- sense : 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'
- antisense : 5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'

MMP-1 Primer

- sense : 5'-TGGGAGCAAACACATCTGA-3'
- antisense : 5'-ATCACTTCTCCCCGAATCGT-3'

2.7.3. MMP-2, 9 발현량 측정

단백질 정량한 시료와 sample buffer를 0.1 % gelatin 이 함유된 10 % polyacrylamide gel에 loading시켜 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동이 완료된 후, renaturing buffer (2.5 % Triton-X 100 pH 7.5)로 gel에 있는 SDS 성분을 제거하고 developing buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, 1 μM ZnCl₂, 0.02 % NaN₃)로 37 °C에서 16 h 동안 반응시켰다. 그 후 0.1 % coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)로 염색한 후 10 % acetic acid / 50 % methanol 혼합용액으로 탈색시켜 biorad image densitometer를 이용하여 MMP-2, 9 (gelatinase) 활성 저해능을 살펴보았다.

2.8. HAS-2 발현량 측정

HaCaT cell을 1 × 10⁶ cells/dish의 농도로 60 mm cell culture dish에 24 h 배양하였다. 24 h 후 배지를 제거하고 세포를 HBSS로 세척하고 serum-free DMEM 배지로 교체하면서 시료를 농도별로 처리하였다. 37 °C, 5 % CO₂ 배양기 (REVCO, USA)에서 24 h 배양한 후 trizol reagent를 이용한 phenol-chloroform 추출 방법으로 total RNA를 분리하였다. 정량 후 1 μg의 total RNA를 RT-PCR kit를 사용하여 HAS-2와 β-actin의 RT-PCR를 수행하였으며, 반응 조건은 HAS-2은 94 °C 1 min, 48 °C 2 min, 72 °C 1 min, 25 cycles, β-actin은 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 25 cycles로 반응시켰다. RT-PCR product는 1.5 % (w/v) agarose gel에 전기 영동하여 image analysis system으로 정량하였다. 발현량은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다.

Actin Primer

- sense : 5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'
- antisense : 5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'

HAS-2 Primer

- sense : 5'-ATGTACACAGCCTTCAG-3'
- antisense : 5'-TCGCTTCGTAGGTCATCCAC-3'

3. 결과 및 고찰

3.1. 차가버섯 추출물의 성분 분석

차가버섯 추출물의 성분을 HPLC로 분석하여 차가버섯의 성분으로 보고되어 있는[21] 페놀성 화합물 3,4-di-

Table 1. Phenolic Compounds Content of *Inonotus obliquus* Extract

Phenolic compounds	Content (%)
Gallic acid	0.24
3,4-Dihydroxybenzoic acid	0.15
Vanillic acid	0.06
Siringic acid	0.07
2,5-Dihydroxyterephthalic acid	0.03

hydroxybenzoic acid, vanillic acid, Gallic acid, siringic acid, 2,5-dihydroxyterephthalic acid를 확인하고 그 함량을 분석하였다(Table 1). 함량을 분석한 결과 Gallic acid가 0.24 %로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 위의 페놀성 화합물이 차가버섯 추출물의 항주름 효과를 나타낼 것으로 예상하였다.

3.2. DPPH Radical 소거능

Hatano 등의 방법을 이용하여 차가버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과, 70 % 에탄올 추출물은 91 μg/mL에서 50 % 소거 효과를 나타내었으며 차가버섯이 포함하고 있는 페놀성 화합물 중 Gallic acid가 1.78 μg/mL 농도에서 50 % 소거 효과를 나타내어 가장 우수한 소거활성을 보였다. 3,4-dihydroxybenzoic acid, vanillic acid는 각각 6.83 μg/mL, 450 μg/mL의 농도에서 50 % 소거 효과를 나타내었다(Table 2).

3.3. Elastase 활성 저해능

차가버섯 추출물의 엘라스타제 활성 저해능을 측정한 결과, 70 % 에탄올 추출물은 124 μg/mL의 농도에서 50 % 저해 활성을 보였다. 차가버섯이 포함하고 있는 페놀성 화합물인 3,4-dihydroxybenzoic acid, vanillic acid는 엘라스타제 억제 활성을 보이지 않았으며, Gallic acid는 비교적 우수한 저해 효능을 가지는 것을 확인하였다 (Table 3).

3.4. 세포독성

섬유아세포 및 HaCaT 세포에서 차가버섯 추출물의 세포 독성 시험을 실시하였다. 섬유아세포에서 70 % 에탄올 추출물은 시험농도인 25 μg/mL까지 독성이 없는 것으로 확인되었으며(Figure 1), HaCaT 세포에서는 50 μg/mL까지 독성이 없음을 확인하였다(Figure 2).

Table 2. DPPH Radical Scavenging Activity of *Inonotus obliquus* Extract

Sample	Concentration (μg/mL)	Activity (%)	SC ₅₀ (μg/mL)
70% EtOH extract	66.7	37.1	91.0
	133	69.7	
	200	77.7	
	267	81.1	
	4.00	34.6	
3,4-Dihydroxy benzoic acid	5.33	41.1	6.83
	6.67	49.6	
	8.67	53.6	
	1.00	26.7	
Gallic acid	1.33	37.1	1.78
	1.67	47.8	
	2.00	55.5	
	333	42.6	
Vanillic acid	467	50.9	450
	600	57.4	
	733	62.4	
	2.00	55.5	

Table 3. Elastase Inhibitory Activity of *Inonotus obliquus* Extract

Sample	Concentration (μg/mL)	Activity (%)	SC ₅₀ (μg/mL)
70% EtOH extract	33.3	12.2	124
	66.7	33.1	
	100	43.4	
	147	56.8	
	66.7	0.59	
3,4-Dihydroxy benzoic acid	133	1.95	N.D.*
	200	1.38	
	293	5.91	
	66.7	20.0	
Gallic acid	133	31.8	> 300
	200	34.3	
	293	38.2	
	66.7	-2.93	
Vanillic acid	133	-2.48	N.D.*
	200	-2.87	
	293	7.41	
	66.7	-2.93	

* N.D. stands for 'Not determined'.

3.5. MMPs 발현량 측정

3.5.1. MMP-1 발현량 측정

주름 관련 유전자인 MMP-1의 발현에 대한 차가버섯 추출물의 영향을 평가하기 위해 사람 섬유아세포를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. MMP-1 발현을 유도하기 위해 UVA 6 J/cm²를 조사하고 차가버섯 추출물을 처리하여 배양한 결과, 시료를 처리하지 않고 UVA만 조사한

대조군과 비교하여 MMP-1 mRNA 발현량을 유의성 있게 감소시켰다(Figure 3). 5 μg/mL 농도에서 대조군보다 약 50 %를 감소시켰으며 10 μg/mL의 농도에서 76 %를 감소시켜 EGCG (2.5 μg/mL)와 같은 발현 저해 효과를 보였다. 25 μg/mL의 농도에서 79 %를 감소시켜 농도의존적으로 MMP-1의 발현량이 감소함을 확인하였다.

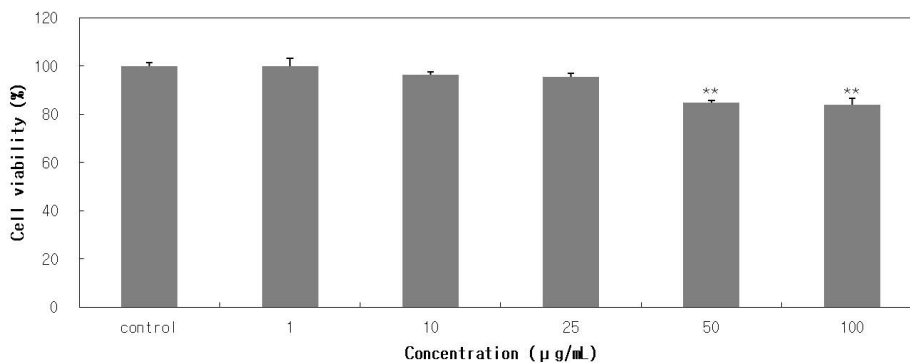


Figure 1. Cytotoxicity of *Inonotus obliquus* extract to fibroblast (CRL-2076) cells using MTT assay. The data were expressed as mean values (± standard deviations) of three experiments. The results were expressed as the mean ± S.D. (** p < 0.01).

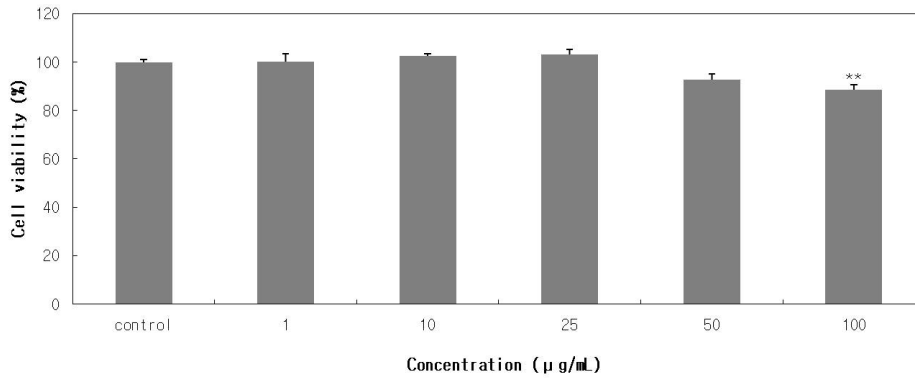


Figure 2. Cytotoxicity of *Inonotus obliquus* extract to HaCaT cells using MTT assay. The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of three experiments. The results were expressed as the mean \pm S.D. (** $p < 0.01$).

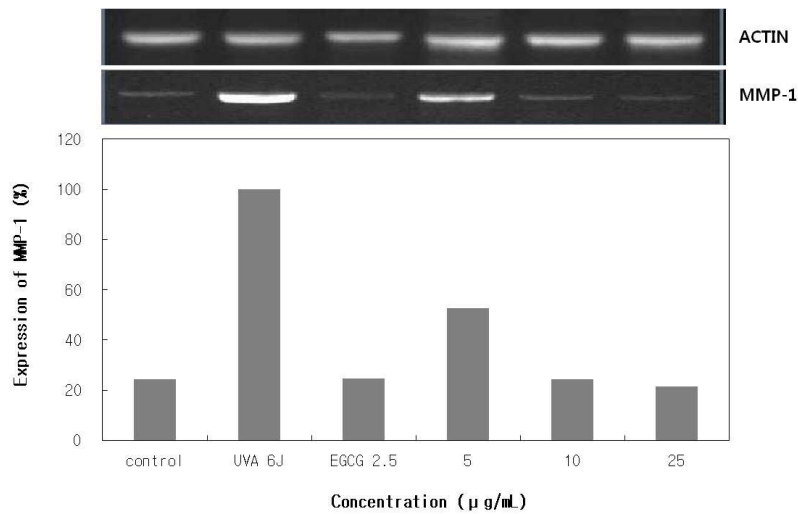


Figure 3. Effect of *Inonotus obliquus* extract on the expression of MMP-1 mRNA.

3.5.2. MMP-2, 9 발현량 측정

사람 섬유아세포에서 차가버섯 추출물의 MMP-2 및 MMP-9의 발현 저해효과를 확인하기 위해 gelatin zymography를 수행하였다. MMP-2의 발현은 UVA 6 J/cm²을 조사한 대조군과 비교하여 10 µg/mL의 농도에서 약 20 %의 저해효과를 보였으며 25 µg/mL의 농도에서 EGCG와 같은 저해 효과를 보였다. MMP-9의 발현은 5 µg/mL의 농도에서 54 %를 저해하여 EGCG (2.5 µg/mL)와 유사한 저해 효과를 보였다. 25 µg/mL에서는 70 %의 저해 효과를 보여 차가버섯 추출물이 MMP-2, 9의 활성을 농도 의존적으로 저해해, 주름 생성 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Figures 4, 5).

3.6. HAS-2 발현량 측정

HaCaT 세포에 차가버섯 추출물을 처리한 후 RT-

PCR을 사용하여 HAS-2 mRNA 발현량을 측정하였다. 차가버섯 추출물은 10 µg/mL의 농도에서 약 1.5배 증가시켜 retinoic acid (150 ng/mL)와 유사한 발현량을 나타내었으며 25 µg/mL의 농도에서 3배 이상 발현량을 증가시켰다. 50 µg/mL의 농도에서는 retinoic acid (150 ng/mL)의 2배의 발현량 증가를 보여 차가버섯 추출물이 전 농도에서 농도 의존적으로 HAS-2 발현량을 증가시킴을 확인하였다(Figure 6).

4. 결 론

본 연구에서는 차가버섯 추출물의 항주름 활성을 연구하기 위하여 주름관련 인자들에 대한 실험을 진행하였다. 차가버섯의 함유 성분으로 알려진 페놀성 화합물 중 Gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, vanillic acid, sir-

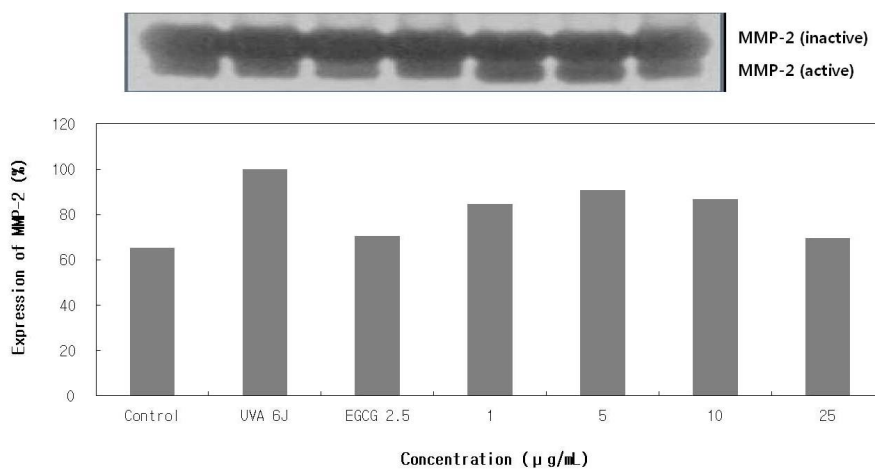


Figure 4. Effect of *Inonotus obliquus* extract on the expression of MMP-2.

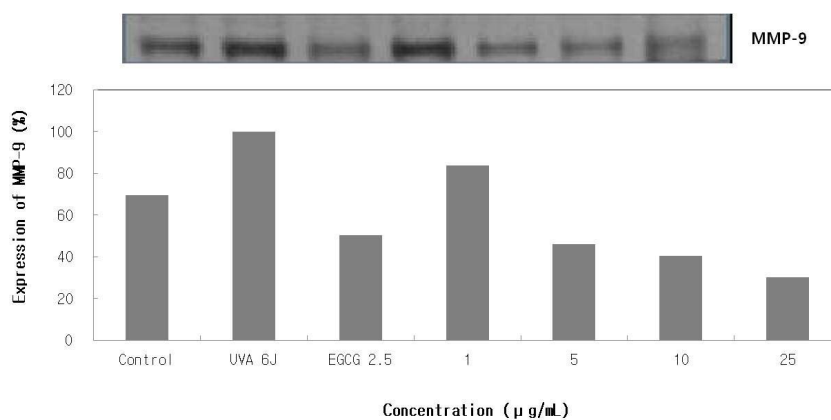


Figure 5. Effect of *Inonotus obliquus* extract on the expression of MMP-9.

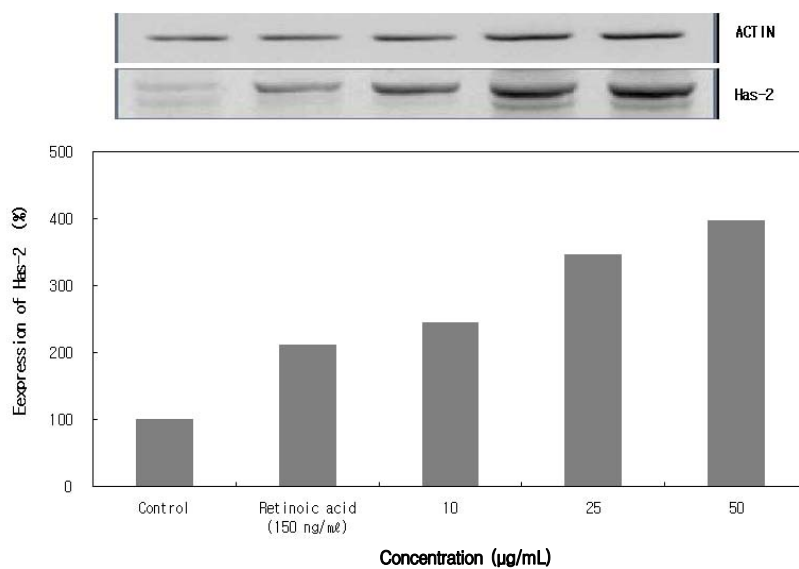


Figure 6. Effect of *Inonotus obliquus* extract on the expression of HAS-2 mRNA.

ingic acid, 2,5-dihydroxyterephthalic acid를 확인하였으며, 페놀성 화합물이 차가버섯 추출물의 항주름 효과를 나타낼 것으로 예상하였다. 차가버섯 70 % 에탄올 추출물 및 함유성분에 대한 DPPH radical 소거능과 엘라스타제 저해 효능을 측정된 결과, 차가버섯 추출물은 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능 및 엘라스타제 저해 효능을 보였다($SC_{50} = 91 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50} = 124 \mu\text{g/mL}$). 이를 통해 차가버섯 추출물이 활성산소로 인한 피부 노화를 저해하고 피부의 탄력과 관련 있는 엘라스틴의 분해효소인 엘라스타제의 활성을 저해함으로써 주름 개선에 관여하는 것을 확인 할 수 있었다. MMPs 발현능 평가에서, 차가버섯 추출물은 5 ~ 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 50 ~ 79 %의 MMP-1 mRNA 발현저해효과를 보였다. MMP-2의 발현량을 측정된 결과, 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 약 20 %의 저해효과를 보였으며 MMP-9의 발현은 5 ~ 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 54 ~ 70 %의 저해 효과를 나타내어 차가버섯 추출물이 주름생성 억제 효과가 있음을 확인하였다. 또한 차가버섯 추출물이 전 농도에서 농도 의존적으로 HAS-2 발현량을 증가시킴을 확인하여 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나인 히아루론산의 합성을 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다. 상기 결과를 통해 차가버섯 추출물은 주름개선 화장품 소재로서 개발이 가능할 것으로 사료되며, 추후 차가버섯에 함유된 페놀성 화합물에 대한 MMPs 및 HAS-2 발현량 측정을 수행 할 예정이다.

참 고 문 헌

1. J. H. Chung, Photoaging in asians, *Photodermatol. Phtoimmunol photomed.*, **19**, 109 (2003).
2. K. Takeda, S. Harada, and M. Ando, Funtional cosmetology, society of cosmetic chemists of japan, Yakuji Nippo Ltd., **1**, 163 (2004).
3. K. Fraizer, S. Williams, D. Kothapal, H. Klapper, and G. R. Grotendorst, Stimulation of fibroblast cell-growth, matrix production, and granulation-tissue formation by connective-tissue growth-factor, *Journal of Investigative Dermatology*, **107**(3), 404 (1996).
4. P. Brenneisen, and J. S. Oh, *et al.*, Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts, *Photochemistry & Photobiology*, **64**(5), 877 (1996).
5. M. O. Longas, C. S. Russell, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**, 127 (1987).
6. I. Gheretich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in custaneous intrinsic aging, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 119 (1994).
7. L. Kier, Triterpenes of *Poria obliqua*, *J. Pharm. Sci.*, **50**(6), 471 (1961).
8. A. N. Shibirina, Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*, *Chem. Abstr.*, **66**, 17271 (1967).
9. K. Kahlos and R. Hiltunen, Identification of some lanostane type triperpenes from *Inonotus obliquus*, *Acta Pharm Fenn.*, **92**, 220 (1983).
10. H. J. Kim, C. B. Jin, and Y. S. Lee, Antioxidative activities of phenolic compounds isolated from *Inonotus obliquus*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **38**(2), 164 (2007).
11. K. C. Park, H. S. Han, and Y. J. Lee, The Comparative study of the effects of *Fructificatio Inonoti obliqui* aqueous extract according to the extraction temperature(2)-anti-oxidative activity, anti inflammatory effect and cancer cell multiplication inhibition effect, *Kor. J. Herbology*, **22**(4), 187 (2007).
12. T. Mizuno, C. Zhuang, K. Abe, H. Okamoto, T. Kiho, S. Ukai, S. Leelere, and Meijer, Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Per:FR.) Pil. (Aplyllophoromycetidae), *Int. J. Med. Mushrooms*, **1**, 301 (1999).
13. Y. S. Shin, Y. Tamai, and M. Terazawa, Citation chemical constituents of *Inonotus obliquus* I. : A new triterpene, 3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone from sclerotium, *Eurasian Journal of Forest Research*, **1**, 43 (2000).
14. S. P. Wasser and A. L. Weis, Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective, *Crit. Rev. Immunol.*, **19**(1), 65 (1999).
15. K. Kahlos and V. H. Tikka, Antifungal activity of cysteine. Its effect on C-21 oxygenated lanosterol

- derivatives and other lipids in *Inonotus-obliquus*, *in-vitro*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**(2-3), 385 (1994).
16. T. Ichimura, T. Otake, H. Mori, and S. Maruyama, HIV-1 protease inhibition and anti-HIV effect of natural and synthetic water-soluble lignin-like substances, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(12), 2202 (1999).
 17. K. Kahlos, L. Kangas, and R. Hiltunen, Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane extract of *Inonotus obliquus in vitro*, *Acta Pharm Fennica*, **96**, 33 (1987).
 18. Y. O. Kim, H. W. Park, J. H. Kim, J. Y. Lee, S. H. Moon, and C. S. Shin, Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*, *Life Sci.*, **79**(1), 72 (2006).
 19. J. S. Choi, Screening on radical scavenging activity of marine microalgae, *Kor. J. Pharmacogn.*, **21**(2), 252 (2000).
 20. A. A. Van de Loosdrecht, E. Nennie, G. J. Ossenkoppele, R. H. Beelen, and M. M. Langenhuijsen, Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study, *J. Immunol. Methods*, **141**(1), 15 (1991).
 21. H. K. Ju, H. W. Chung, S. S. Hong, J. H. Park a, J. M. Lee, and S. W. Kwon, Effect of steam treatment on soluble phenolic content and antioxidant activity of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*), *Food Chemistry*, **119**(2), 619 (2010).