

## 잎새버섯이 생산하는 세포외 다당체의 사람 섬유아세포에서 Matrix Metalloproteinase-1 발현저해 효과

심관섭<sup>†</sup>·배준태·이동환·김진화·이범천·최태부\*·표형배

한불화장품 기술연구소, \*건국대학교 생물화학공학부  
(2005년 5월 4일 접수, 2005년 6월 9일 채택)

### Effect on Inhibition of Matrix Metalloproteinase-1 in Human Dermal Fibroblasts by Production of Exopolysaccharide from Mycelial Culture of *Grifola frondosa*

Gwan Sub Sim<sup>†</sup>, Jun Tae Bae, Dong Hwan Lee, Jin Hwa Kim, Bum Chun Lee, Tae Boo Choe\*,  
and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics, 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk, 369-834, Korea

\*Section of Chemical and Biological Engineering, Konkuk University

(Received May 4, 2005; Accepted June 9, 2005)

**요약:** 잎새버섯(*Grifola frondosa* HB0071)이 생산하는 세포외 다당체인 GF-glucan이 사람섬유아세포에서 자외선(UVA)조사 시 증가되는 MMP-1 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 자외선으로부터 조사된 섬유아세포에 GF-glucan을 처리한 농도에 따라 MMP-1 발현이 억제되었으며, RT-PCR를 이용해 세포내 MMP-1 mRNA 발현 또한 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 최대 GF-glucan 0.5%를 처리했을 때 54.4%의 MMP-1 발현을 억제하였다. 결과적으로, 잎새버섯 HB0071로부터 생산된 GF-glucan은 피부노화와 관련된 extracellular matrix (ECM) 조직에 손상을 주는 MMP-1의 활성을 억제하여 자외선으로부터 손상된 피부의 광노화로부터 보호해주는 것으로 밝혀졌다.

**Abstract:** We investigated the effect on inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) in human dermal fibroblast (HDF) by production of exopolysaccharide (GF-glucan) from mycelial culture of *Grifola frondosa* HB0071. The photoprotective potential of GF-glucan was tested in HDF exposed to ultraviolet-A (UVA) light. It was revealed that GF-glucan had an inhibitory effect on MMP-1 expression in UVA-irradiated HDF without any significant cytotoxicity. The treatment of UVA-irradiated HDF with GF-glucan resulted in a dose-dependent decrease in the expression level of MMP-1 protein and mRNA (by maximum 54.4% at an 0.5% GF-glucan). These results suggest that GF-glucan obtained from mycelial culture of *G. frondosa* HB0071 may contribute to inhibitory action in photoaging by reducing the MMP-1 related matrix degradation system.

**Keywords:** *Grifola frondosa*, exopolysaccharides, matrix metalloproteinase, skin aging, human dermal fibroblast

## 1. 서 론

피부노화를 일으키는 원인은 다양하며 이에 대한 이론도 다양하게 제시되고 있으나 그 요인에 따라 크게 두 가지로 구분할 수 있는데, 첫째는 나이가 들에 따라 나타나는 노화 즉, 피부의 구조적 변화와 생리적인 기능이 감소하는 자연노화(내인성노화, intrinsic aging)이며 둘째는

자외선, 주변 환경 등 누적된 외부자극에 의한 광노화(photoaging)로 구분된다[1-4]. 노화의 현상을 세포생물학적 관점에서 접근한 최근의 연구결과들을 보면, 자외선, 흡연 등에 의해 발생한 유해산소(oxygen free radical)와 콜라겐 분해효소(collagenase)가 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 유해산소는 세포막에 있는 지질을 공격하여 이를 산화시키게 되고 산화된 지질에 의해 세포막은 손상되어 정상적인 피부세포의 역할이 제한된다. 콜라겐 분해효소의 증가로 인한 콜라겐 섬유의 변성 및 파괴는 외

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: gssim@hanbul.co.kr)

적 노화에 의한 주름 발생에 매우 중요한 원인이다. 피부에 직접적으로 영향을 주는 자외선은 피부의 표피와 진피층에 깊숙하게 투과하며, 산화제로 작용하여 활성산소종을 생성한다. 이와 같이 자외선으로부터 생성된 활성산소종은 실질적으로 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어체계의 불균형을 초래하여 피부는 산화상태 쪽으로 유리하게 기울어지고 세포 성분들에 대한 손상을 야기시켜 결과적으로 주름을 생성시키는 원인물질로 알려져 있다 [5,6]. 생체내에서 콜라겐과 같은 세포외기질(extracellular matrix)의 합성과 분해는 적절하게 조절되나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하며 자외선 조사에 의해 다양한 기질 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinase, MMP)의 발현이 촉진된다[7]. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 세포간 collagenase (MMP-1)이다. 자외선 조사 후 MMP가 발현되면 세포는 항상성을 유지하기 위해 저해제도 발현되는데 이를 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)라고 한다[5,7]. 그러나 MMP와 TIMP 사이의 생물학적 평형상태는 UV조사나 호르몬 불균형, 염증반응과 정상적인 노화과정에 의해 파괴된다. 그러므로 노화방지 연구에 있어 MMP의 조절기작에 관한 연구가 많아지고 있으며 최근에는 retinoic acid, retinol 유도체, 녹차 추출물과 그 주성분인 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) 등이 광노화에 매우 효과적인 방어 소재라고 알려지고 있으며 그 메커니즘도 서서히 밝혀지고 있다[8-11].

잎새버섯(*Grifola frondosa*)은 분류학적으로 볼 때 민주름목(*Aphyllphorales*) 구멍장이버섯과(*Polyporaceae*)에 속하며 식용 담자균류의 일종으로 맛과 향이 뛰어난 식용 버섯이다. 잎새버섯의 생리활성에 관한 연구로는 잎새버섯으로부터 추출한 다당류 성분인  $\beta$ -1,3 결합을 갖는 글루코오스를 main chain으로 측쇄에  $\beta$ -1,6 결합을 갖는 분자량이  $1 \times 10^6$  Da의  $\beta$ -glucan (일명 D-fraction)이 면역시스템을 활성화시켜 항종양 활성을 갖는 것으로 보고 되었으며[12], Kodama 등의 연구결과에 의하면 *in vivo* 실험에서  $\beta$ -glucan이 natural killer (NK) cell을 활성화시켜 뚜렷한 종양억제효과를 나타낸다고 보고하였다[13,14]. 최근 화장품 산업에서 기능성 고부가가치의 소재개발 방법으로, 버섯 자실체 및 균사체를 이용한 화장품 소재개발이 활발히 진행되고 있다[15-17].

본 연구는 생물 공학적 기술을 이용하여 대량 생산된 잎새버섯 균사체 배양액으로부터 분리된 세포외 다당체인 GF-glucan을 이용하여 자외선을 조사한 사람섬유아세포에서 MMP-1 발현저해 효과를 검색하고 이를 항노화 소재로 응용하고자 하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 잎새버섯 다당체(GF-glucan)의 제조

본 실험에 사용한 잎새버섯 다당체(GF-glucan)는 5 L 발효조를 통해 제조한 잎새버섯 균주(*Grifola frondosa* HB0071)의 세포외 다당체를 실험에 이용하였다. 발효배양액은 메쉬와 원심분리기를 사용하여 균사체를 제거하고, 분리된 상등액은 4배량의 95% 에탄올을 가한 다음 4°C에서 24 h 침전시켰다. 침전물을 원심분리하여 동결건조한 후 crude한 GF-glucan을 얻어 실험에 사용하였다.

### 2.2. 세포 및 시약

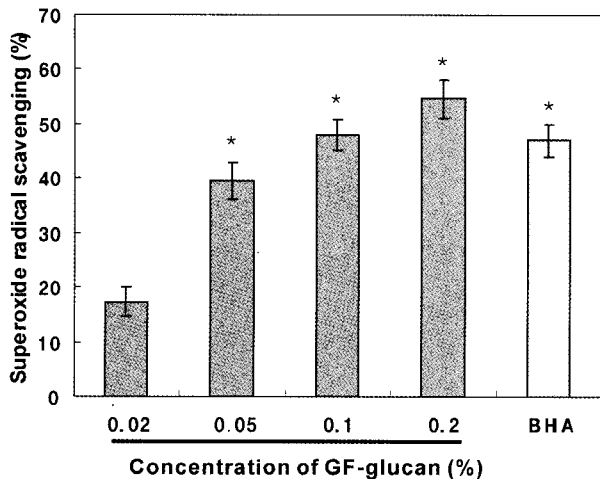
신생아의 표피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)는 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10 세대 세포를 실험에 이용하였다. Anti-MMP-1 antibody, anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase, phosphatase substrate는 Sigma (MO, USA)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

### 2.3. Superoxide Radical 소거효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법에 의해 측정하였다[18]. 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 GF-glucan을 가한 후 25°C에서 10 min간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25 min 동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.4. MMP-1 (Collagenase) 효소 활성저해 측정

MMP-1 효소 활성 저해 효과를 측정하기 위하여 형광 분석법을 이용하였다. 실험에 사용한 기질은 형광물질이 표지된 DQ-collagen, 효소(collagenase)는 Molecular Probe 사(Eugene, OR, USA)에서 시판중인 제품을 사용하였으며, 반응완충액(0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM sodium azide, pH 7.6) 100  $\mu$ L에 0.25 mg/mL DQ collagen 20  $\mu$ L와 시료 40  $\mu$ L를 첨가하고 0.5 unit collagenase 40  $\mu$ L를 첨가하였다. 암소, 실온에서 20 min 경과 후 형광 분광광도계(Perkin Elmer, CT, USA)를 이용하여 흡수파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하며, 대조군으로서 효소액 대신 반응완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였으며 시료 자체의 형광값도 측정하여 효소활성 계산시 보정하였다.



**Figure 1.** Superoxide radical scavenging activity of GF-glucan produced by submerged culture of *G. frondosa* HB0071 and comparison with BHA (50 µg/mL) as a positive control. The activity indicated by percentage of increase in comparison with that of control. The activity is significant ( $p < 0.05$ ) and the values are mean  $\pm$  S.E.

**2.5. 세포 생존률 측정**

MTT [3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 정량은 Mosmann [19]의 방법을 변형하여 실시하였다. 사람섬유아세포를  $2 \times 10^5$  cells/mL 농도로 96-well plate의 well에 GF-glucan을 세포에 처리하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 h 배양하였다. MTT 용액(5 µg/mL)을 첨가하고 4 h 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 µL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 570 nm에서 microplate reader (Model ELX 800, BIO-TEK instruments, USA)로 흡광도를 측정하였다.

**2.6. UVA 조사 및 시료의 처리**

사람섬유아세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 35 mm dish에 배양, 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. UV조사 전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum성분을 제거 후 6.3 J/cm<sup>2</sup> UVA (UVA F15T8BLB, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. UVA 조사 후 배양배지는 FBS를 첨가하지 않은 DMEM/F12 (3:1) 배지에 GF-glucan을 처리하여 24 h 배양하였다.

**2.7. MMP-1 발현저해 측정(ELISA법)**

섬유아세포에 UVA를 조사 후 시료를 처리하여 24 h 배양한 배지를 96 well plate에 분주하고 4°C에서 overnight하여 coating하였다. PBS-T (phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20)로 세척하고 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS로 37°C에서 90 min간 blocking한 후

primary antibody를 37°C에서 90 min간 처리한다. 다시 세척 후 secondary antibody인 anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate를 37°C에서 90 min간 처리한다. PBS-T로 세척 후 substrate solution을 넣고 반응시킨 후 microplate reader을 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**2.8. RNA 분리 및 RT-PCR**

Total RNA추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, Germany)을 이용하였다. cDNA합성은 1 µg의 total RNA를 oligo (dT)15 primer, dNTP (0.5 µM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)로 37°C에서 60 min, 93°C에서 5 min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 cDNA로부터 MMP-1,  $\beta$ -actin을 증폭하기 위하여 1 µL cDNA, 0.5 µM의 5'과 3'primer, 10  $\times$  buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 µM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 unit *Taq* polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25 µL로 맞추는 다음 PCR을 실시하였다. PCR증폭은 94°C 0.5 min, 50°C 0.5 min, 72°C 1 min, 28 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 MMP-1과  $\beta$ -actin 유전자의 발현을 image analyzer (BIS303PC, DNR Imaging Systems Ltd, UK)로 확인하였으며 각 band의 density는 densitometric program (NIH Image software, Maryland, USA)을 이용하였다. MMP-1의 oligonucleotide 서열은 sense oligonucleotide가 5'-AAAGGGAATAAGTACTGGGC-3', antisense oligonucleotide가 5'-AATTCAGGAAAGTCATGTG-3'이며,  $\beta$ -actin의 oligonucleotide 서열은 sense oligonucleotide가 5'-ATGCAGAAGGAGATCACTGC-3', antisense oligonucleotide가 5'-CTGCGCAAGTTAGGTTTTGT-3'이다.

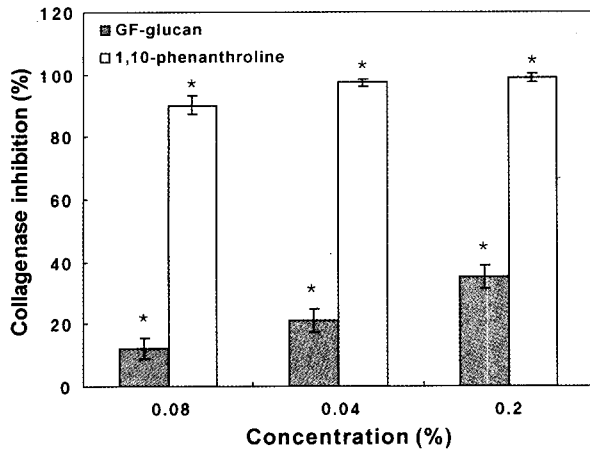
**2.9. 자료분석 및 통계처리**

모든 실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 항산화 효과**

앞새버섯 균사체를 배양하여 생산된 GF-glucan의 oxidative stress 소거 효과를 확인하기 위하여 세포내 산화과정 중 생성되는 라디칼 중 강력한 산화력을 가진 superoxide anion의 소거능을 측정하는 NBT시험을 하였다.

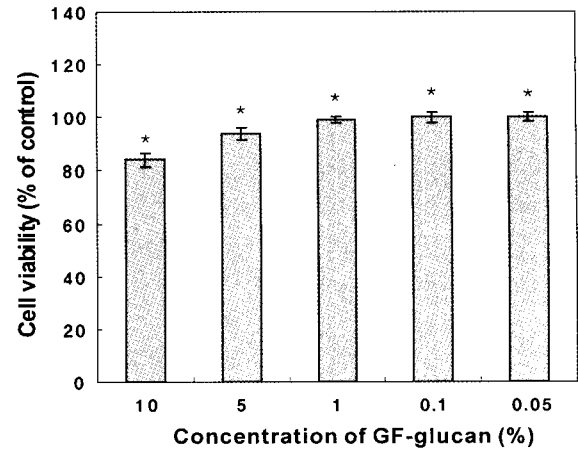


**Figure 2.** *In vitro* MMP-1 (collagenase) inhibition activity of GF-glucan produced by submerged culture of *G. frondosa* HB0071 and comparison with 1,10-phenanthroline as a positive control. The activity indicated by percentage of increase in comparison with that of control. The activity is significant ( $p < 0.05$ ) and the values are mean  $\pm$  S.E.

GF-glucan의 경우 약 0.2% 농도에서 생성된 superoxide anion radical을 약 55% 소거하는 것으로 나타나 양성대조군인 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)보다 우수한 항산화 활성을 가지는 것을 확인하였다(Figure 1). 버섯류의 항산화 활성에 대한 연구로는 큰비단 그물버섯, 느타리버섯, 표고버섯, 영지버섯, 까치버섯, 차가버섯에 대한 항산화 효과가 밝혀져 있으며, 이러한 버섯의 항산화 효과는 합성 항산화제인 BHA, dibutylhydroxytoluene (BHT)의 항산화력보다 우수하다고 보고되었다[20-22].

### 3.2. *In vitro* MMP-1 (Collagenase) 저해 효과

콜라겐은 결합조직의 탄력을 나타내며 진피를 구성하는 단백질의 70%를 차지한다. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하며 가장 많이 알려져 있는 것이 콜라겐 type I을 분해하는 MMP-1으로 이러한 MMP-1의 효소활성을 저해하거나 발현을 억제하는 활성을 가진 물질은 콜라겐을 보호하여 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 탄력과 피부가 늘어지는 것을 방지한다. 따라서 MMP 저해활성을 측정하여 저해효과를 가지고 있는 소재는 주름을 개선하고 탄력있는 피부를 위한 화장품 개발에 유용하게 사용될 수 있다. 균사체 배양을 통해 생산된 GF-glucan의 MMP-1 효소활성에 대한 저해 효과를 확인하였다. Figure 2에서 확인할 수 있듯이 양성 대조군인 1,10-phenanthroline의 경우 약 0.01%의 농도에서 효소활성의 90% 이상을 저해하는 것으로 나타난 것에 비해 GF-glucan의 경우 0.2%의 농도에서 효소활성을 35% 저해하는 것으로 나타나, MMP-1의 효소활성에 대한 직



**Figure 3.** The cytotoxicity of GF-glucan produced by submerged culture of *G. frondosa* HB0071. The cell viability indicated by percentage of increase in comparison with that of control. The cytotoxicity is significant ( $p < 0.05$ ) and the values are mean  $\pm$  S.E.

접적인 저해 효과가 미약하게 나타났다.

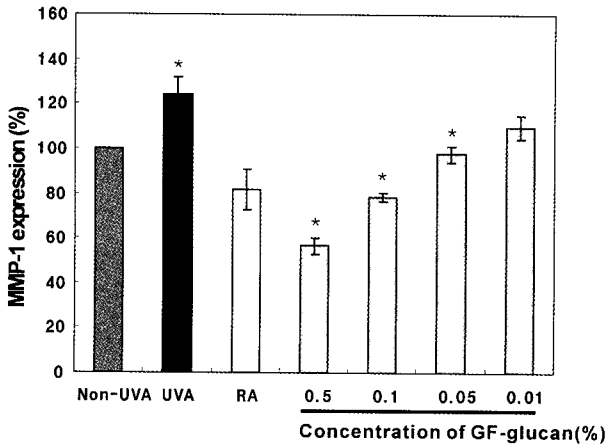
### 3.3. 세포독성(Cell Cytotoxicity)

균사체 배양을 통해 생산된 GF-glucan이 사람섬유아세포에서 나타나는 세포독성 농도 확인과 피부 자극 유발 가능성을 확인하기 위하여 세포독성 시험을 실시하였다. GF-glucan은 5% 이하의 농도에서 90% 이상의 세포생존율을 나타내어 이 농도 이하의 농도로 사용할 경우, 매우 안전한 것으로 확인되었다(Figure 3). GF-glucan을 5% 이하의 농도로 처리시 섬유아세포의 생존에 영향이 없는 것으로 확인되어 이후 실험에서는 5% 이하의 농도로 실험을 진행하였다.

### 3.4. UVA조사에 의한 MMP-1 단백질 발현 억제 효과 (ELISA)

피부의 광노화에 있어 MMP-1의 발현은 자외선, mitogenic growth factor, proinflammatory cytokine 등이 발현을 촉진한다고 알려져 있으며 세포내 신호전달 경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다[23,24]. 이러한 UV 및 활성산소에 의해 유도되는 MMP-1 발현 억제 효과 실험은 MMP-1의 효소활성에 대한 직접적인 저해작용만 관찰하는 평가방법과는 달리 자외선에 의해 유도되는 사람 섬유아세포의 MMP 발현조절 기능을 평가할수 있어 생체 내에서 콜라겐과 같은 세포외기질의 합성과 분해를 적절하게 조절할수 있는 유용한 방법으로 알려져 있다.

균사체 배양을 통해 생산된 GF-glucan에 대한 MMP-1 발현 억제 효과를 실험한 결과, UVA를 6.3 J/cm<sup>2</sup> 조사

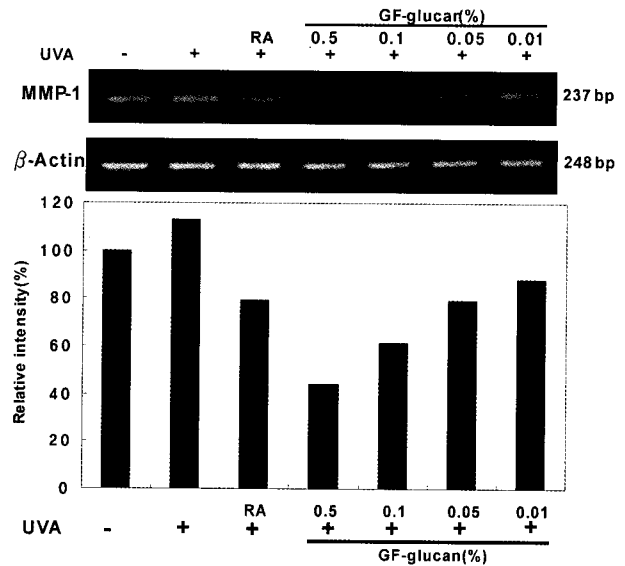


**Figure 4.** The effect of GF-glucan produced by submerged culture of *G. frondosa* HB0071 on the production of MMP-1 by the UV irradiated human dermal fibroblast. The cells were treated with GF-glucan for 24 h. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D.  $p < 0.05$  compared with control (RA: 3.5  $\mu$ M retinoic acid).

하는 경우 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 약 24%의 MMP-1 발현을 촉진하는 것을 확인하였으며, 효소 활성저해 평가법에서 상대적으로 낮은 효소활성 저해효과를 나타내었던 GF-glucan은 0.5%의 농도에서 자외선에 의한 MMP-1 발현 촉진을 완전히 억제할 뿐만 아니라, UVA를 조사하지 않은 대조군에 비해서도 약 54.4%의 MMP-1 발현을 억제하는 것으로 나타났다(Figure 4). 이는 UV에 의한 c-Jun 단백질의 발현증가를 억제하여 MMP-1 발현저해 효과가 보고된[25] retinoic acid (3.5  $\mu$ M)보다 우수한 MMP-1 발현 억제효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 결과는 *in vitro* MMP-1 저해 활성 평가 결과에서 GF-glucan이 직접적으로 우수한 저해활성을 가지는 것으로 나타나지 않았지만, GF-glucan은 자외선에 의해 유도된 MMP-1 생합성 과정의 다양한 경로를 통해 MMP-1의 생합성을 억제하는 것으로 생각된다.

### 3.5. UVA조사에 의한 MMP-1 mRNA 발현 억제 효과(RT-PCR)

피부의 광노화에 있어 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가되고 전사인자인 AP-1의 활성도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다. 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 대하여 단백질 수준에서 우수한 효과를 나타낸 GF-glucan의 MMP-1 mRNA 발현량에 대한 저해 효과를



**Figure 5.** Effect of GF-glucan produced by submerged culture of *G. frondosa* HB0071 on MMP-1 mRNA expression in human dermal fibroblast irradiated with UVA. Fibroblast cultures were treated with varying doses of GF-glucan 24 h and compared with culture alone (control). Total RNA extracted from human dermal fibroblast was analyzed by RT-PCR (RA: 3.5  $\mu$ M retinoic acid).

RT-PCR을 이용하여 평가하였다.

그 결과 잎새버섯을 배양하여 얻은 GF-glucan을 0.01%부터 0.5%로 처리할 경우 MMP-1 mRNA 발현 저해효과는 최대 60%로, 농도의존적으로 MMP-1 mRNA 발현이 감소하였으며(Figure 5), UV에 의한 c-Jun 단백질의 발현증가를 억제하여 MMP-1 발현저해 효과가 보고된[25] retinoic acid의 경우에도 3.5  $\mu$ M에서 UVA를 처리하지 않은 것보다 MMP-1 mRNA 양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로 GF-glucan은 자외선에 의해 유도된 MMP-1의 발현을 단백질 및 mRNA 수준에서 억제하여, 자외선 조사에 의해 분해가 촉진되는 콜라겐을 보호하여 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 탄력과 피부가 늘어지는 것을 방지하는 효과를 가질 것으로 판단된다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 잎새버섯(*G. frondosa* HB0071)균주에서 생산되는 세포의 다당체(GF-glucan)가 사람섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 사람섬유아세포에서 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1의 발현저해효과는 0.5% GF-glucan에서 54.4%로 단백질 수준에서 우수한 발현저

해효과를 나타내었으며, mRNA수준에서도 GF-glucan은 농도 의존적으로 발현 저해효과가 나타났다. 결론적으로 GF-glucan은 UVA에 의한 MMP-1의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 보아 우수한 광방어 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. A. Oikarinen, The aging of skin: chronoaging versus photoaging, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **7**, 3 (1990).
2. B. A. Gilchrest, Skin aging and photoaging: an overview, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, 610 (1989).
3. J. Uitto, M. J. Fazio, and D. R. Olsen, Molecular mechanism of cutaneous aging, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, 614 (1989).
4. A. M. Klingman and R. M. Laver, Cutaneous aging: the differences between intrinsic aging and photoaging, *J. Cutan. Aging. Cosmet. Dermatol.*, **1**, 5 (1988).
5. S. K. Karin, B. Peter, W. Jutta, H. Gernot, M. Weijan, K. Lale, M. Christian, and W. Meinhard, Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms, *Experimen. Gerontool*, **35**, 307 (2000).
6. J. Y. Seo, H. R. Choi, G. E. Rhie, C. S. Youn, W. W. Choi, J. A. Kim, J. H. Chung, K. H. Kim, K. H. Cho, and H. C. Eun, The effect of retinoic acid and vitamin C on the expression of the procollagen  $\alpha$  1(I), tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **8**, 23 (2001).
7. W. Meinhard, T. B. Iliana, N. Lale, M. Wenjian, A. S. Lars, R. W. Ziba, S. Jutta, and S. K. Karin, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem. Photobio. B.*, **63**, 41 (2001).
8. G. J. Fisher, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1432 (1998).
9. G. J. Fisher and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid, *Photochem. Photobiol.*, **69**, 154 (1999).
10. M. Barthelman, W. B. Bair, K. K. Stickland, W. Chen, B. N. Timmermann, S. Valcic, Z. Dong, and G. T. Bowden, (-)epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity, *Carcinogenesis*, **19**, 2201 (1998).
11. G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, **379**, 335 (1996).
12. S. Konno, Maitake D-fraction. *Alternative & Complementary Therapies*, **7**, 102 (2001).
13. N. Kodama, K. Komuta, N. Sakai, and H. Nanba, Effects of D-fraction, a polysaccharide from *Grifola frondosa* on tumor growth involve activation of NK cells, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1647 (2002).
14. N. Kodama, Y. Murata, and H. Nanba, Administration of a polysaccharide from *Grifola frondosa* stimulates immune function of normal mice, *J. Med. Food*, **7**, 141 (2004).
15. R. L. Katzman and R. W. Jeanloz, Are acidic polysaccharides involved in collagen fibril formation or stabilization? *Biochim. Biophys. Acta.*, **229**, 516 (1971).
16. P. Koungias, D. Wei, P. J. Rice, H. E. Ensley, J. Kalbfleisch, D. L. Williams, and I. W. Browder, Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1 $\beta$ )-D-glucans, *Infect. Immun.*, **69**, 3933 (2001).
17. B. C. Lee, J. T. Bae, H. B. Pyoa, T. B. Cho, S. W. Kim, H. J. Hwang, and J. W. Yun, Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible *Basidiomycete Grifola frondosa*, *Enzyme Microb. Tech.*, **32**, 574 (2003).
18. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 19 (2002).
19. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
20. S. J. Ma, Effects of the substances extracted from dried mushroom (*Lentinus edodes*) by several organic solvents on the stability of fat, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **15**, 150 (1983).
21. J. Han and I. S. Lee, Antioxidation and anticancer

- effects of *Polyozellus multiplex*, *Korean J. Mycol.*, **28**, 55 (2000).
22. Y. Cui, D. S. Kim, and K. C. Park, Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*, *J. Ethnopharmacol.*, **96**, 79 (2005).
  23. S. J. Kondo, The roles of cytokines in photoaging, *J. Dermatol. Sci.*, **23**, S30 (2000).
  24. S. E. Fligiel, J. Varani, S. C. Datta, S. W. Kang, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Collagen degradation of in aged/photodamaged skin *in vivo* and after exposure to matrix metalloproteinase-1 *in vitro*, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 842 (2003).
  25. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, P. McPhillips, Z. Q. Wang, X. Li, Y. Wan, S. W. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1432 (1998).