

붉은싸리버섯 추출물의 항산화 및 Human Neutrophil Elastase 저해활성

김관철·권용범*·장해동*·김재화**·정재철**·이익수***·하병조****·유익동**†

이노스킨(주) 피부과학연구소, *한남대학교 식품영양학과,
한국생명공학연구원, *한국한의학연구원, ****을지대학교 보건학과
(2016년 8월 4일 접수, 2016년 8월 3일 수정, 2016년 9월 26일 채택)

Study on the Antioxidant and Human Neutrophil Elastase Inhibitory Activities of Mushroom *Ramaria formosa* Extracts

Kwan-Chul Kim, Yong-Beom Kwon*, Hae-Dong Jang*, Jae Wha Kim**,
Jae Cheol Jeong**, Ik-Soo Lee***, Byung-Jo Ha****, and Ick-Dong Yoo**†

Innoskin Co., Ltd. 125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34141, Korea

*Department of Food and Nutrition, Hanman University, Daejeon 34054, Korea

**Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 34141, Korea

***Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 34054, Korea

****Department of Public Health, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

(Received August 4, 2016; Revised August 3, 2016; Accepted September 26, 2016)

요약: 천연자원에서부터 항노화 화장품 신소재를 탐색하던 중, 국내 자생버섯의 일종인 붉은싸리버섯 자실체 추출물이 항산화 활성과 인체 호중구 엘라스타제 저해활성이 우수함을 확인하고 일련의 연구를 수행하였다. 붉은싸리버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 붉은싸리버섯 추출물 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 117.0 mg/mL (ascorbic acid 환산값)의 매우 우수한 소거활성을 나타냈다. Peroxy 라디칼 소거활성을 oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay 를 통하여 측정된 결과 붉은싸리버섯 추출물 1, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시, 각각 0.8, 5.2, 7.8 ORAC_{ROO} (trolox equivalents, 1 μM)로 농도 의존적으로 높은 소거활성을 나타냈다. 뿐만 아니라 cellular antioxidant capacity를 DCF fluorescence intensity (% of control)로 조사한 결과에서도 붉은싸리버섯 추출물 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 약 30% 이상 높은 항산화 활성을 나타냈다. Human neutrophil elastase 저해활성은 농도 의존적으로 저해활성을 나타냈으며 특히 에탄올 추출분획에서 ED₅₀ 값은 42.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 붉은싸리버섯 추출물은 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) 균주 모두에서 항균활성은 나타나지 않았다. 또한 염증성 cytokine인 interleukin-10 및 interferon- γ (IFN- γ)의 생산 또는 분비 조절에는 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과로 붉은싸리버섯 추출물은 항산화활성과 elastase 저해활성을 우수하여 피부에 자극이 없는 항노화 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

Abstract: In searching for novel agents for skin anti-aging from natural resources, we found that the extract of the fruiting bodies of *Ramaria formosa* (*R. formosa*) had significant antioxidant and human neutrophil elastase (HNE) inhibitory activities. *R. formosa* extract exhibited a considerable DPPH radical scavenging activity with an antioxidant content of 117.0 mg/mL (ascorbic acid equivalents) at the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The capacity of *R. formosa* extract to scavenge peroxy radicals measured by ORAC assay also showed dose-dependent antioxidant effect with ORAC_{ROO} (trolox equivalents, 1 μM) values of 0.8, 5.2, and 7.8 at the concentrations of 1, 10, and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The cellular antioxidant

† 주 저자 (e-mail: idyoo@kribb.re.kr)
call: 042)860-4330

capacity of *R. formosa* extract was investigated by assaying the cellular fluorescence intensity using dichlorodihydrofluorescein (DCF). The cellular oxidative stress induced by AAPH, Cu^{2+} or H_2O_2 in HepG2 cells was significantly attenuated by more than 30% at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *R. formosa* extract. HNE activity was reduced by treatment with *R. formosa* extract in a dose-dependent manner, and the ED_{50} value for the ethanol extract of *R. formosa* was 42.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *R. formosa* extract did not exhibit antimicrobial activity against four microorganisms including *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*). Furthermore, the extract did not affect the inflammatory cytokine production of interleukin-10 and interferon- γ in NK92 cells. From the above results, we found that *R. formosa* extract has considerable antioxidant and elastase inhibitory effects, and does not stimulate immune cells. These findings suggest that *R. formosa* extract may be used as a bioactive component in cosmetic composition.

Keywords: urea, anti-oxidants, glutathion, shaving, facial hair weakening

1. 서 론

우리가 호흡하는 산소의 일부는 태양광선에 노출된 피부에서 자외선의 작용으로 생체조직을 공격하고 세포를 손상시키는 불안정한 상태의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변환된다.

이들 ROS의 종류에는 singlet oxygen radical ($^1\text{O}_2$), superoxide anion radical ($\text{O}_2 \cdot^-$), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), peroxy radical (RO_2) 그리고 hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 포함된다[1,2]. 이들은 광반응 및 효소반응을 포함하는 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 생성된다. 이렇게 생성된 산소종은 살균 효과 등 유용하게 쓰이기도 하지만 과잉 생산된 활성산소는 사람 몸속에서 산화작용을 일으켜 세포막, DNA, 그 외의 모든 세포 구조를 손상시키고 손상의 범위에 따라 세포가 기능을 잃거나 변질되고 더 나아가서는 핵산을 손상시켜 염기의 변형과 유리, 결합의 절단, 당의 산화분해 등을 일으켜 노화를 가속시키며 돌연변이나 암의 원인이 되기도 한다[3,4]. 특히 활성산소는 자외선, 환경오염과 고강도의 운동뿐만 아니라 과식, 음주, 혈액순환장애, 스트레스 등으로 과잉 생산된다. 특히 peroxy 라디칼은 hydroxyl 라디칼과 함께 ROS 중에서 반응성이 큰 활성 산소종으로 알려져 있으며, 사람 피부 세포에 있어서 지질 과산화물의 생성, 단백질 산화 및 DNA 손상 뿐만 아니라 UVA 의존성 세포 사멸이나 유전자 변이의 활성화에 중요한 원인이 되고 있다.

한편, interleukin-10 (IL-10)은 대표적인 anti-inflammatory cytokine으로 면역기능을 억제하는 효능을 가지고 있으며 IL-10의 활성화는 면역억제현상을 나타내게 된다. Interferon- γ (IFN- γ)는 면역세포를 자극하는 cytokine으로 다양한 자가염증성 질환 및 자가면역 질환

을 일으키는 원인이 된다[5,6]. 특히 serin protease의 일종인 human neutrophil elastase (HNE)는 elastin을 감소시키고 동시에 activator protein 1 (AP-1), pro matrix metalloproteinases (MMP)-1, active MMP-1 등을 활성화 시킴으로 세포외기질이 변형되어 피부노화에 직접적으로 영향을 주고 있다[7].

붉은싸리버섯(*Ramaria formosa*, *R. formosa*)은 민주름버섯목(*Aphylllophorales*), 싸리버섯과(*Ramariaceae*)에 속하는 버섯으로 국내에서는 붉은싸리버섯을 포함하여 총 7종이 보고되었다[8]. 그중 붉은싸리버섯은 자실체가 제일 큰 버섯으로 전국에 자생하고 있어 확보하기가 쉬우며 채취 후 물에 침윤시키면 독이 빠져나가 식용으로 활용할 수 있기 때문에 예로부터 식용으로 애용되어 온 버섯이다. 붉은싸리버섯은 한방에서는 성미귀경(性味歸經)하여 맛이 평하고 달다고 알려져 있다. 생물활성으로는 항산화 활성[9-11], 다당체에 의한 항종양 활성[12], 뉴클레아제의 HIV-1 역전사효소 억제활성[13] 등이 알려져 있다. 성분에 관한 연구로는 Kim 등에 의한 sesquiterpene계 화합물인 ramarins A ~ B[14] 및 Lee 등에 의한 labdane diterpene계 화합물 ramarins C ~ D[15]가 보고되었다.

본 연구에서는 천연물로부터 항산화 활성이 우수한 새로운 화장품 소재를 탐색하던 중, 국내 자생버섯의 일종인 붉은싸리버섯 자실체 추출물이 항산화 활성이 우수함을 확인하고 일련의 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 붉은싸리버섯(*Ramaria formosa* (Pers.) Quel.)은 2014년 8 ~ 9월경 충청북도 속리산 일

대에서 채취한 후 국립농업과학원 농업유전자원센터 버섯분류연구실(Mushroom Taxonomy Laboratory, National Institute of Agricultural Science and Technology)로부터 동정을 받은 후 풍건하여 사용하였다. 표준시료는 국립농업과학원 농업유전자원센터 버섯분류연구실에 기탁 보관하였다. 붉은싸리버섯의 추출과정 및 분획에 사용된 용매는 SK케미칼(Korea)제품을 사용하였다. 실험에 사용한 시약 중 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), epigallocatechin gallate (EGCG), *N*-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-nitroanilide, soybean trypsin 저해제는 Sigma (USA), human neutrophil elastase (HNE, EC 3.4.21.37)는 Calbiochem-Novabiochem (Germany)에서 구입하여 사용하였다. Natural killer cell line (NK92) 및 liver cancer cell line (Hep G2)은 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며 세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle media (DMEM), fetal bovine serum (FBS)은 Gibco (USA) 제품을 사용하였다. 실험에 사용한 ELISA reader는 SpectraMax[®] (Molecular Devices, Austria)를 사용하였다.

2.2. 붉은싸리버섯 추출물의 조제

그늘에서 풍건한 붉은싸리버섯 1 kg을 에탄올(8 L)로 상온에서 3회 반복 추출한 후 여과 농축하였다. 에탄올 추출물은 증류수 1 L에 현탁 시킨 후 각각 3 L의 *n*-헥산, 4 L의 에틸아세테이트로 순차적으로 3회 반복하여 용매 분획을 실시하여 최종적으로 에틸아세테이트 분획물 3.3 g을 확보하여 붉은싸리버섯 추출물로 공시하였다.

2.3. DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼 소거 활성은 Brand-Williams의 방법을 변형[16]하여 측정하였으며 대표적인 항산화제인 ascorbic acid (AsA)와 비교하였다. 즉 96-well plate에 에탄올로 녹인 150 μM DPPH 용액 198 μL와 DMSO에 녹인 각 시료를 농도별로 2 μL 첨가하였으며, 이때 대조군에는 시료 대신 DMSO를 2 μL 첨가하였다. 25 °C에서 10 min 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH 라디칼 소거 활성(AsA 환산값, mg/mL)을 나타내었다.

2.4. Peroxyl 라디칼 소거활성

Peroxyl 라디칼 소거활성은 Kurihara 등[17]의 방법을 변형한 oxygen 라디칼 absorbance capacity (ORAC) 분석법을 이용하였다. 즉, 75 mM potassium phosphate buffer (PBS, pH 7.4)에 녹인 100 μL의 40 nM fluorescein을 96-well plate (black, flat bottom)에 넣은 뒤 5 mM PBS (pH 7.4)에 희석한 각각의 농도별 샘플을 50 μL의 시료를 넣었다. 그 후 75 mM PBS (pH 7.4)에 녹인 50 μL의 20 mM AAPH를 plate에 첨가하였다. 측정은 SpectraMax[®] (Molecular Devices, Austria)를 사용하였으며, 형광 분석기는 측정 전 10 s 간 shaking한 후 5 s 동안 안정화되도록 설정하였다. 96-well plate는 37 °C에서 2 min 간격으로 총 200 min 동안 형광을 측정하도록 설정하였다. Fluorescein은 excitation wavelength 485 nm, emission wavelength 535 nm에서 측정하였다. 최종 결과는 측정시료의 형광 값과 blank의 형광 값간의 넓이 차이로 계산하였으며 standard curve는 1, 5 그리고 10 μM의 trolox를 이용하여 측정하였고, 모든 결과는 trolox equivalents (TE, μM)로 환산하여 표기하였다.

2.5. Reducing Capacity

시료의 reducing capacity는 Kanter 등[18]의 방법을 이용하여 분석하였다. 즉 10 mM PBS (pH 7.4)에 용해 시킨 100 μM CuCl₂용액 20 μL와 동일한 buffer에 용해 시킨 250 μM neocuproine용액 80 μL를 혼합한 다음 측정시료 40 μL를 첨가하고 실온에서 1 h 동안 반응시킨 뒤 반응액 200 μL를 96-well plate로 옮겨 454 nm에서 ELISA reader를 이용해 흡광도를 측정하였다. Sample blank로 CuCl₂ 용액 대신에 10 mM PBS를 사용하였으며, 시료의 reducing capacity는 Cu¹⁺/neocuproine의 extinction coefficient (7.95 × 10³ M⁻¹cm⁻¹)를 사용하여 흡광도로부터 계산된 Cu¹⁺의 농도로서 표시하였다.

2.6. 세포 내 항산화 활성(Cellular Antioxidant Capacity)

AAPH 또는 Cu²⁺로 유도시킨 ROS에 대한 시료의 세포내 항산화 활성은 DCFH-DA를 이용하여 측정하였다. DCFH-DA는 세포막을 통해 세포로 유입되면 세포질에 존재하는 esterase에 의해 DCFH로 가수분해 되고, 세포 내에 ROS가 존재하게 되면 DCF로 산화되어 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 green색의 형광강

도를 나타낸다. 측정시료를 세포에 처리한 뒤 AAPH, Cu^{2+} , 또는 H_2O_2 로 산화적 스트레스를 유발하면 항산화 능력의 정도에 따라 DCF 형광강도를 나타내므로 이를 이용하여 측정시료의 세포 내 항산화 활성을 측정하였다.

2.7. Anti-microbial 활성

공시균주로는 그람양성균 *B. subtilis* KCTC 1022, 그람음성균 *E. coli* KCTC 1924, 효모 *C. albicans* KCTC 7965, 곰팡이 *A. oryzae* KCTC 6983 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였으며 항균활성은 paper disc diffusion법을 이용하였다[19]. 즉 gram 양성균주, gram 음성균주, 효모 균주는 액체배지에 접종하고 30 °C에서 24 h 배양한 후 1.5% nutrient agar 배지에 접종하여 O.D. 값이 0.8이 되도록 조정하여 bacterial lawn을 만든 후 농도별 시료를 30 μL 씩 접종하여 30 °C 배양기에서 24 h 배양한 후 투명환이 형성되는 것을 항균활성 양성으로 판정하였다. 곰팡이 균주는 고체배지에 접종하고 28 °C에서 48 h 동안 배양한 후 곰팡이 균체가 자란 가장자리를 멸균된 칼로 0.5 mm 크기로 자른 후 새로운 PDA 배지에 접종하고 배지의 가장자리에 샘플 30 μL 씩 접종한 후 28 °C에서 7일간 배양하며 곰팡이 균사체가 확장되지 못하는 것을 곰팡이에 대한 항균활성 양성으로 판정하였다. 처리농도는 붉은싸리버섯 추출물을 1, 10, 15, 20, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였다.

2.8. Interferon- γ (IFN- γ) 활성

인간 IFN- γ 의 정량은 상업적으로 이용 가능한 mAb pairs (Endogen, Woburn, MA, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실시하였다. 즉, 37 °C에서 18 h 동안 염증을 유발하기 위해 500 ng의 P-10과 함께 붉은싸리버섯 추출물을 NK92 세포에 처리한 후, 세포를 제외한 상층액을 수득하여, 효소면역분석(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 키트를 사용하여 IFN- γ 를 검출하였다. 결과는 3회 반복 well \pm s.e.m의 평균값으로 나타냈다[20].

2.9. Interleukin-10 (IL-10) 활성

인간 IL-10의 정량은 상업적으로 이용 가능한 mAb pairs (Endogen, Woburn, MA, USA)를 사용하여 제조사

의 프로토콜에 따라 실시하였다. 즉, 37 °C에서 18 h 동안 붉은싸리버섯 추출물을 NK92 세포에 처리한 후, 세포를 제외한 상층액을 수득하여, 효소면역분석(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 키트를 사용하여 IL-10을 검출하였다. 결과는 3회 반복 well \pm s.e.m의 평균값으로 나타냈다[20].

2.10. Human Neutrophil Elastase (HNE) 저해활성

Elastase 저해활성은 Lee 등[21]이 사용한 방법에 따라서 HNE를 이용하여 측정하였다. 즉, 기질로써 Tris-HCl (pH 7.5)에 녹인 1.4 mM *N*-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-*p*-nitro-anilide 용액 40 μL 와 각 시료가 농도별로 포함된 Tris-HCl 용액(pH 7.5) 50 μL 을 잘 혼합한 후, 0.18 U elastase 용액 10 μL 을 첨가하여 37 °C 항온기에서 1 h 동안 배양하였다. 이때 대조군에는 시료 대신 DMSO 1 μL 를 첨가하였다. 0.2 mg/mL soybean trypsin inhibitor 용액 100 μL 를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식에 의하여 elastase 저해활성(%)을 계산하였다. 양성 대조군으로 EGCG를 사용하였다.

$$\text{Elastase Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{treatment}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

2.11. 통계처리

모든 수치는 mean \pm S.D.로 제시되었고 통계프로그램(Statistical Package for Social Science; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 분석하였다. 통계적 유의성은 일원배치 분산분석(one way ANOVA)과 $p < 0.05$ 수준에서 던컨시험(Duncan's multiple range test)을 사용하여 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성은 시료의 자유 라디칼 소거 능력이나 수소공여 능력을 평가하는 방법으로 항산화 활성을 평가하는데 널리 이용되고 있다. 대부분의 라디칼은 반응성이 커서 매우 불안정하지만 DPPH 라디칼은 안정한 자유 라디칼로서 517 nm에서 강한 흡수를 가지는 진한 보라색의 화합물이다. 그러나 자유 라

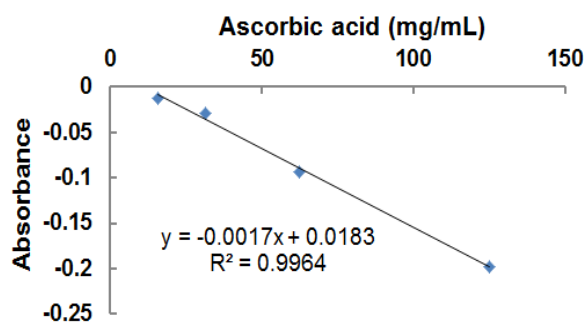


Figure 1. Standard curve ascorbic acid (mg/mL) DPPH radical scavenging activity.

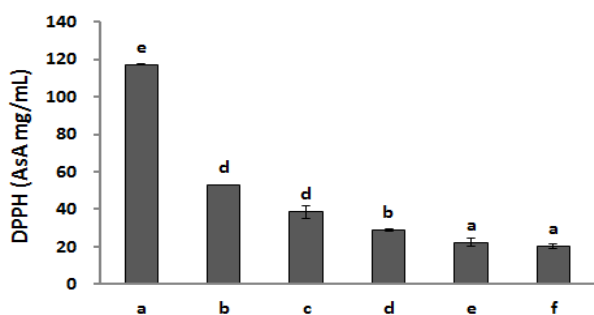


Figure 2. DPPH radical scavenging activity of *R. fodmosa* extract. *R. formosa* fruiting bodies extracts were reacted with DPPH for 30 min. The inhibitions were expressed as AsA/mg/mL. a: 500 μg/mL, b: 200 μg/mL, c: 100 μg/mL, d: 50 μg/mL, e: 10 μg/mL, f: 1 μg/mL. The data shown represent mean ± S.D. (n = 3). Different corresponding letters indicate significant differences at $p < 0.05$ based on Duncan's test.

디칼을 소거할 수 있는 항산화제로부터 수소 또는 전자를 공여 받아 1,1-diphenyl-picrylhydrazin이 되면 노란색으로 변화되어 517 nm에서 흡광도가 감소됨으로 간단하게 항산화 활성을 측정할 수 있는 방법이다[16].

따라서 먼저 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 표준 검량 곡선을 확인하여 Figure 1에 나타냈다. 그 결과, 검량곡선은 $y = -0.017x + 0.0183$ ($R^2 = 0.9964$)로 매우 안정적인 상관관계를 나타냈다. 한편, 붉은싸리버섯 추출물의 DPPH 라디칼 저해활성을 조사한 결과를 Figure 2에 나타냈다. 즉, 붉은싸리버섯 추출물을 500, 200, 100, 50, 10, 1 μg/mL 농도로 처리하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과, DPPH 라디칼 소거활성은 각각 117.0, 52.9, 38.6, 28.8, 22.3, 20.3 (AsA mg/mL)의 환산값을 얻을 수 있었으며 농도 의존적으로 DPPH 라디칼

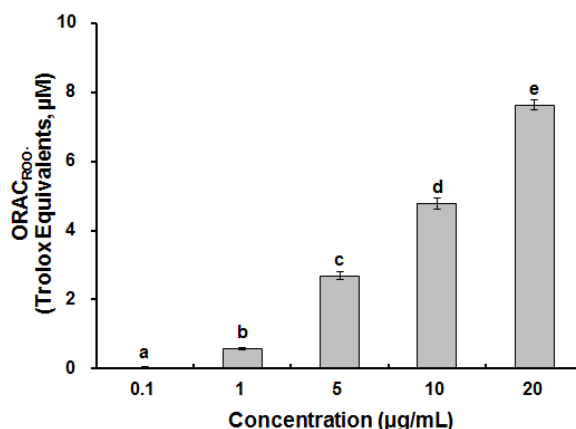


Figure 3. Peroxyl radical scavenging activity of *R. formosa* extract. The inhibitions were expressed as TE (trolox equivalents, μM). The data shown represent mean ± S.D. (n = 3). Different corresponding letters indicate significant differences at $p < 0.05$ based on Duncan's test.

을 소거함을 확인하였다.

3.2. Peroxyl 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성 측정법이 수소 또는 전자를 공여할 수 있는가를 분석하는 일반적인 항산화 활성 측정법이라면 ORAC법에 의한 peroxyl 라디칼 소거활성 측정법은 수소 공여능력을 측정하는 분석법으로 항산화 활성 측정 방법 중에서 세포나 동물 또는 인체 실험결과와 상관성이 높은 것으로 알려져 있다[17].

ORAC법에 의해 측정된 붉은싸리버섯 추출물의 peroxyl (AAPH) 라디칼에 대한 소거활성은 Figure 3과 같다. 즉, 붉은싸리버섯 1.0, 10.0, 20.0 μg/mL 처리 시 각각 0.8 ORAC₀₀₀, 5.2 ORAC₀₀₀, 7.8 ORAC₀₀₀ (trolox equivalents, 1 μM)로 농도 의존적으로 높은 활성을 나타냈다. 이 같은 결과는 DPPH 라디칼 소거활성과 유사한 결과임을 의미하며, 붉은싸리버섯 추출물은 AAPH 라디칼에 수소를 공여함으로써 생성된 AAPH 라디칼을 소거한다고 할 수 있다.

3.3. Reducing Capacity 활성

붉은싸리버섯 추출물의 peroxyl 라디칼에 대한 소거활성이 라디칼에 전자를 공여함으로써 나타난 것인가를 확인하기 위하여 Cu²⁺로부터 Cu⁺로의 reducing capacity를 측정하였다. 그 결과, Figure 4와 같이 붉은싸리버섯 추출물은 1 μg/mL 처리 시 0.5 copper ions μM,

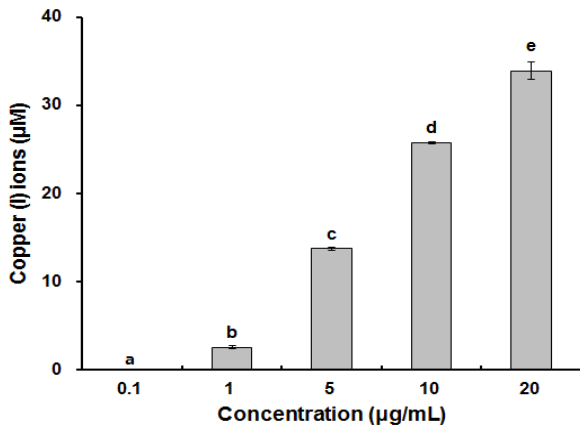


Figure 4. Reducing capacity of *R. formosa* extracts. The inhibitions were expressed as percentage. The data shown represent mean \pm S.D. ($n = 3$). Different corresponding letters indicate significant differences at $p < 0.05$ based on Duncan's test.

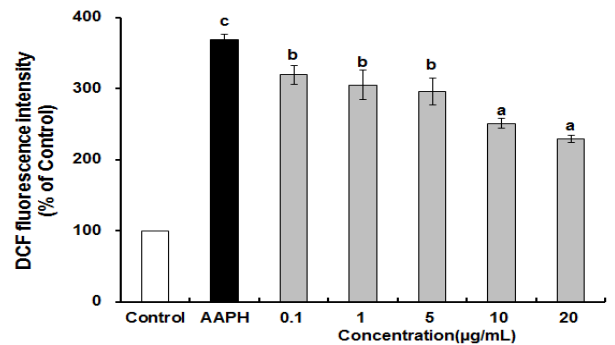
10 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 27 copper ions μM , 20 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 36 copper ions μM 로 농도 의존적으로 높은 reducing capacity를 나타냈다. 이와 같은 결과는 붉은싸리버섯 추출물의 DPPH 라디칼에 대한 소거활성의 일정 부분은 전자를 공여할 수 있는 붉은싸리버섯 추출물에 함유된 활성성분에 의한 것임을 의미한다. 즉, 붉은싸리버섯 추출물의 peroxy 라디칼 소거활성은 붉은싸리버섯 추출물에 함유된 전자와 수소를 공여할 수 있는 활성물질에 의한 것임을 알 수 있다.

3.4. Cellular Antioxidant Capacity 활성

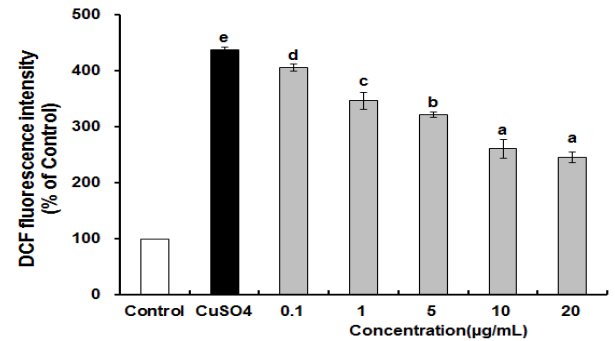
붉은싸리버섯 추출물의 cellular antioxidant capacity를 HepG2 세포에서 DCF fluorescence intensity (% of control)로 측정하여 얻은 결과를 Figure 5에 나타냈다. Figure 5의 결과는 HepG2 세포에서 AAPH, CuSO_4 및 H_2O_2 에 의해서 증가되는 산화적 스트레스를 0.1 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적으로 우수하게 감소시킴을 확인하였다.

3.5. Anti-microbial 활성

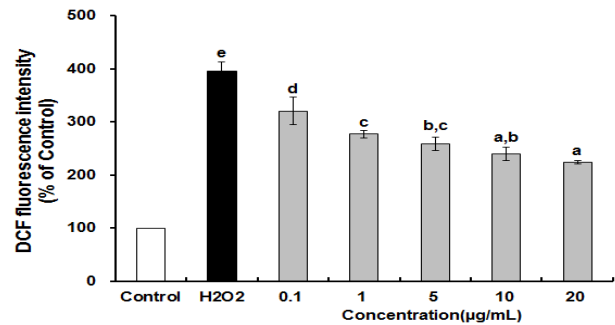
붉은싸리버섯 추출물의 항균활성을 확인하기 위하여 *B. subtilis* KCTC 1022, *E. coli* KCTC 1924, *C. albicans* KCTC 7965, *A. oryzae* KCTC 6983 균주를 공시하여 항균활성을 조사하였다. 그 결과 공시균주 모두에서 항균활성은 보이지 않았다(data not shown). Lui 등



A



B



C

Figure 5. Cellular antioxidant capacity of *R. formosa* extract against oxidative stress induced by AAPH. (A) AAPH-induced oxidative stress, (B) Cu^{2+} -induced oxidative stress, (C) H_2O_2 -induced oxidative stress. Different corresponding letters indicate significant differences at $p < 0.05$ based on Duncan's test.

은 *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC6538, *B. subtilis* ATCC6633 등 3종의 세균과 *Fusarium graminearum*, *Gibberella zeae*, *Cercospora albomaculans* 3종의 곰팡이 균주에 *Ramaria flava* 추출물을 처리하였을 경우 모든 균주에서 moderate한 항균활성이 있음을 보고하였다[10]. Lui 등의 연구결과와 본 연구 결과가 상이한

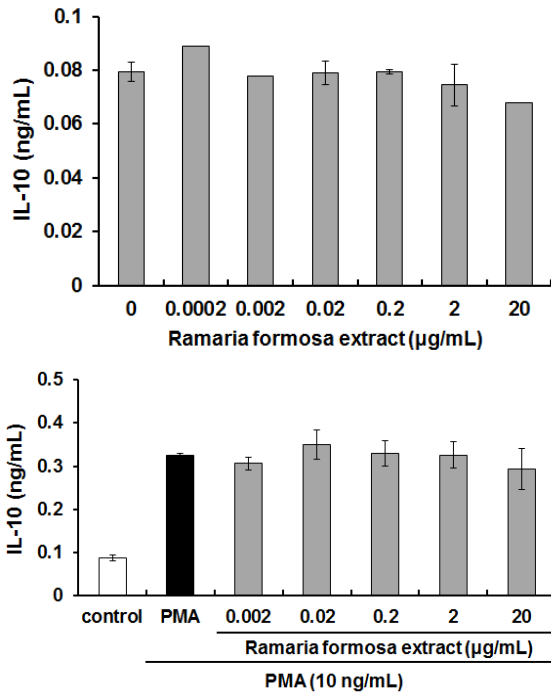


Figure 6. IL-10 evaluation in *R. formosa* extract treated NK92 cells. Concentrations of control was used with 0 mg/cm². The data shown represent mean ± S.D. (n = 3) (p < 0.05).

것은 동일한 *Ramaria* 속이지만 spices가 다르기 때문인 것으로 판단된다.

3.6. Interleukin-10 (IL-10) 활성

인간 IL-10의 정량은 상업적으로 이용 가능한 mAb pairs (Endogen, Woburn, MA, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실시하였다. 즉, 37 °C에서 18 h 동안 붉은싸리버섯 추출물을 상기 NK92 세포에 처리한 후, 세포를 제외한 상층액을 수득하여, 효소면역분석 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 키트를 사용하여 IL-10을 검출하였다. 결과는 3회 반복 well ± s.e.m의 평균값으로서 나타내었다.

그 결과, Figure 6에 나타난 바와 같이, 붉은싸리버섯 추출물을 처리한 NK92 세포에서는 IL-10의 생성을 유도하는 능력(upper pannel)을 보이지 않았고, IL-10이 PMA에 의하여 활성화 된 조건에서도 본 추출물에 의한 억제현상은 볼 수가 없었다. 이상의 결과로부터 붉은싸리버섯 추출물은 IL-10 등의 생성과 발현 등 면역 반응을 유도하지 않아 피부세포에 자극을 주지 않을 것으로 판단되었다.

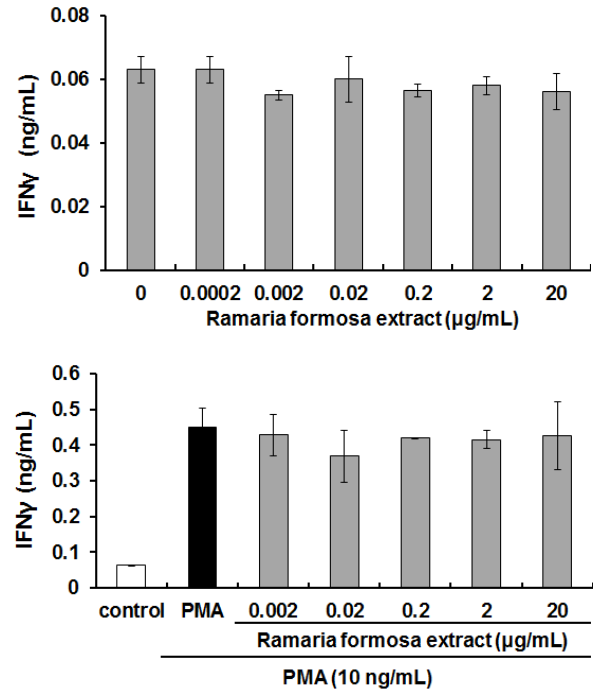


Figure 7. IFN-γ evaluation in *R. formosa* extract treated NK92 cells. Concentrations of control was used with 0 mg/cm². The data shown represent mean ± S.D. (n = 3) (p < 0.05).

3.7. Interferon-γ (IFN-γ) 활성

인간 IFN-γ의 정량은 상업적으로 이용 가능한 mAb pairs (Endogen, Woburn, MA, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 실시하였다. 37 °C에서 18 h 동안 염증을 유발하기 위해 500 µg의 P-10과 함께 붉은싸리버섯 추출물을 상기 NK92 세포에 처리한 후, 세포를 제외한 상층액을 수득하여, 효소면역분석(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 키트를 사용하여 IFN-γ를 검출하였다. 결과는 3회 반복 well ± s.e.m의 평균값으로서 나타내었다.

그 결과, Figure 7에 나타난 바와 같이, 붉은싸리버섯 추출물을 처리한 NK92 세포에서는 IFN-γ의 생성을 유도하는 능력(upper pannel)은 보이지 않았고, IFN-γ가 PMA에 의하여 활성화된 조건에서도 본 추출물에 의한 억제현상은 볼 수가 없었다. 이상의 결과로부터 붉은싸리버섯 추출물은 IFN-γ의 생성과 발현 등 면역 반응을 유도하지 않아 피부세포에 자극을 주지 않을 것으로 판단되었다.

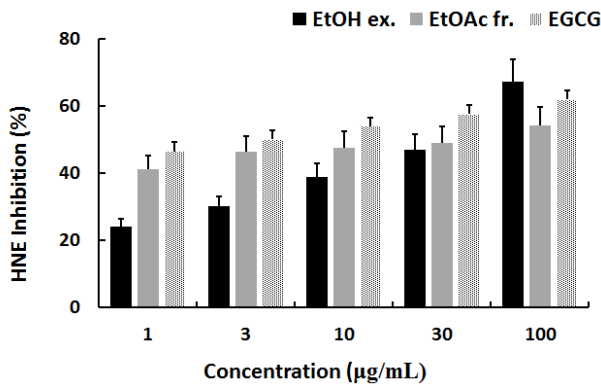


Figure 8. Human neutrophil elastase inhibitory activity of *R. formosa* extract.

3.8. Human Neutrophil Elastase (HNE) 저해활성

Elastase는 동물결합 조직의 불용성 탄성섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피조직의 그물망 구조 결합을 끊어 주는 역할을 하는 주름생성의 주원인이 되는 효소로 알려져 있다[22-23]. 따라서 붉은싸리버섯 추출물과 이의 분획물이 HNE 저해활성에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. 즉, 붉은싸리버섯 자실체의 ethanol 추출물과 이것의 에틸아세테이트 용매 분획물에 대한 HNE 저해활성을 측정된 결과, Figure 8과 같이 두 시료 모두에서 농도 의존적인 HNE 저해활성을 나타냈다. 특히 에탄올 추출물이 에틸아세테이트 용매 분획물 보다 우수한 HNE 저해활성을 나타냈으며 에탄올 추출물의 ED₅₀ 값은 42.9 µg/mL이었다. Lee 등은 식용버섯의 일종인 *Pleurotus eryngii* 추출물로부터 lactone계 화합물인 pleurone을 분리하고 HNE 저해활성을 조사한 결과 ED₅₀ 값은 61.5 µM임을 보고하였다. 이때 EGCG를 대조구로 사용하였는데 EGCG는 강력한 HNE 저해활성을 나타내는 우수한 천연 유래의 소재이다[21].

4. 결론 및 고찰

최근 화장품 산업의 활성화에 따른 기능성 화장품 신소재 개발이 크게 주목을 받고 있으며 그에 따라 다양한 천연 자원으로부터 주름개선이나 미백 효능을 나타내는 신소재의 탐색이 활발히 진행되고 있다. 특히 항노화 화장품 소재의 개발동향을 보면 항산화제를 중

심으로 한 주름발생 방어소재와 vitamin A 유도체 및 AHA 등을 중심으로 이미 생성된 주름의 개선소재로 나눌 수 있다. 그러나 실제 천연 항산화제는 활성이 미미한 단점이 있으며 vitamin A 유도체인 retinol, retinol palmitate 등은 효능은 우수하나 불안정하고 피부자극이 심하여 사용하는데 한계가 있는 단점이 있다. 그밖에도 세포 활성화제로 polypeptide계 화합물, hormone 제로 estrogen계 화합물이 활용되고 있으며 ECM turnover 조절제, basement membrane 조절제, cytokine 조절제 등이 연구의 소재로 각광을 받고 있다.

본 연구에서는 국내 자생버섯의 일종인 붉은싸리버섯 추출물의 항노화 소재로서의 활용 가능성을 확인하기 위하여 일련의 연구를 수행하였다. 먼저 붉은싸리버섯 추출물의 항산화 활성을 조사한 결과, 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 peroxy 라디칼 소거활성과 reducing capacity를 각각 ORAC법과 reducing capacity assay법을 통하여 측정된 결과, 붉은싸리버섯 추출물 0.1, 1.0, 10.0, 20.0 µg/ml 처리 시 농도 의존적으로 높은 활성을 나타냈다. 뿐만 아니라 cellular antioxidant capacity를 DCF fluorescence intensity (% of control)로 조사한 결과에서도 붉은싸리버섯 추출물 20.0 µg/mL 처리시 약 30% 이상 높은 항산화 활성을 나타내고 있음을 확인하였다. 식물에서 유래한 대부분의 항산화 물질은 시험관 시험상에서는 높은 항산화 활성을 나타내지만 세포나 생체 내에서는 낮은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 같은 항산화 물질은 화장품 개발에서 기능성 물질의 소재로 사용하는데 있어서 제한적일 수밖에 없다. 본 연구에 사용된 붉은싸리버섯 추출물은 세포 내 수준에서 높은 항산화 활성을 갖고 있는 것으로 확인되어 기능성 화장품 개발에 있어서 항산화 기능물질로서 중요하게 사용될 수 있음을 의미한다고 할 수 있다.

붉은싸리버섯 추출물의 항균활성을 확인하기 위하여 *B. subtilis* KCTC 1022, *E. coli* KCTC 1924, *C. albicans* KCTC 7965, *A. oryzae* KCTC 6983 균주 모두에서 항균활성은 나타나지 않았다. 붉은싸리버섯 추출물의 염증성 cytokine 조절활성을 조사한 결과에서 IL-10과 IFN-γ의 생산과 발현에 관여하지 않아 붉은싸리버섯 추출물은 피부세포에 자극을 주지 않을 것으로 판단되었다.

한편, 피부의 진피 속에는 콜라겐과 엘라스틴이 형성되어 있어 피부의 탄력을 유지시켜 주는데 나이, 자외선, 스트레스 등에 의해서 피부의 탄력과 윤택이 감소하고 과다한 elastase의 발현에 의해서 엘라스틴의 그물망이 파괴됨으로 주름생성의 요인이 되고 있다. 특히 serin protease는 인체 피부 elastin을 분해함과 동시에 active MMP-1 전환효소로 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 인체의 노화가 진행되거나 혹은 강한 광에 노출되었을 경우 TNF- α 나 IL-1같은 사이토카인이 관여하게 되고 이들은 mast cell이나 neutrophil을 증가시키며 mast cell이나 neutrophil은 serine protease를 증가시켜 elastin을 감소시킴과 동시에 AP-1, pro MMP-1, active MMP-1을 활성화시킴으로 세포외기질이 변형되어 주름이나 피부노화에 직접적으로 영향을 주게 된다. 본 연구에서 붉은싸리버섯 추출물은 HNE를 농도 의존적으로 저해함을 확인하였다. 이상의 결과로부터 붉은싸리버섯 추출물은 면역세포에 자극이 없을 뿐만 아니라 항산화 활성과 elastase 저해활성이 우수하여 피부에 안전한 화장품 소재로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

Acknowledgement

본 연구는 2015년 중소기업청 창업성장기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사를 드립니다(과제번호 SMBA-2014-S2211621).

Reference

1. A. Singh, Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine, eds. J. Miquel, A. T. Quintanilha, and H. Weber, 17, CRC Press, Boca Raton, Florida (2000).
2. C. Pierlot, J. Aubry, K. Briviba, H. Sies, and P. Mascio, Singlet oxygen, UV-A, and ozone, eds. L. Packer and H. Sies, 319, 3, Academic Press, San diego, California (2000).
3. X. Ren, Y. Shi, D. Zhao, M. Xu, Y. Dang, and X. Ye, Naringin protects ultraviolet B-induced skin damage by regulating p38 MAPK signal pathway, *J. Dermatol. Sci.*, **82**(2), 106 (2016).
4. J. Patwardhan and P. Bhatt, UV-B protective effect of flavonoids from *Euhenia caryophyllata* on human dermal fibroblast cells, *Pharmacogn. Mag.*, **11**(Suppl), S397 (2015).
5. M. Hochberd and C. D. Enk, Partial protection against epidermal IL-10 transcription and langerhans cell depletion by sunscreens after exposure of human skin to UVB, *Photochem. Photobiol.*, **70**(5), 766 (1999).
6. J. H. Yang, Y. H. Hwang, M. J. Gu, W. K. Cho, and J. Y. Ma, Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- α /IFN- γ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells, *Phytomedicine*, **22**(14), 1262 (2015)
7. N. K. Nema, N. Maity, B. K. Sarkar, and P. K. Mukherjee, Matrix metalloproteinase, hyaluronidase and elastase inhibitory potential of standardized extract of *Centella asiatica*, *Pharm. Biol.*, **51**(9), 1182 (2013).
8. S. K. Han, J. W. Cho, H. J. Cho, H. J. Kim, and Y. M. Lee, A field guide to mushroom, 386, Korea national arboretum, Hwang TS, Geobook, Seoul (2013).
9. C. H. Ramesh and M. G. Patter, Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India, *Pharmacognosy Res.*, **2**(2), 107 (2010).
10. K. Lui, J. Wang, L. Zhao, and Q. Wang, Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*, *Food Chem. Toxicol.*, **58**, 375 (2013).
11. G. Sadi, A. Kaya, H. A. Yalcin, B. Emsen, A. Kocabas, D. I. Kartal, and A. Altay, Wild edible mushroom from turkey as possible anticancer agents on HepG2 cells together with their antioxidant and antimicrobial properties, *Int. J. Med. Mushrooms*, **18**(1), 83 (2016).
12. I. S. Yoo, M. S. Woo, E. C. Choi, and B. K. Kim, Studies on constituents of higher fungi of Korea (XXXIV), antitumor components of *Ramaria formosa*, *Kor. J. Mycol.*, **10**(4), 165 (1982).
13. R. Zhang, G. Tian, L. Zhao, H. Wang, and T. B. Ng,

- A novel ribonuclease with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity purified from the fungus *Ramaria formosa*, *J. Basic Microbiol.*, **55**(2), 269 (2015).
14. K. C. Kim, I. C. Lee, I. D. Yoo, and B. J. Ha, Sesquiterpenes from the fruiting bodies of *Ramaria formosa* and their human neutrophil elastase inhibitory activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **63**(7), 554 (2015).
 15. I. C. Lee, K. C. Kim, I. D. Yoo, and B. J. Ha, Inhibition of human neutrophil elastase by labdane diterpenes from the fruiting bodies of *Ramaria formosa*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **79**(12), 1921 (2015).
 16. I. D. Yoo, J. P. Kim, W. G. Kim, B. S. Yun, and I. J. Ryoo, Development of new natural anti-oxidants for cosmeceuticals, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **31**(4), 349 (2005).
 17. H. Kurihara, H. Fukami, S. Asami, Y. Toyoda, and M. Nakai, Effects of oolong tea on plasma anti-oxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(7), 1093 (2004).
 18. H. Kanter, Free radicals, exercises and antioxidant supplementation, *Proc. Nutr. Soc.*, **75**(3), 9 (1998).
 19. J. Y. Bae, H. N. Jang, J. H. Ha, J. H. Park, J. Park, and S. M. Park, Antimicrobial activities of *Licorice* extracts from various countries of origin according to extraction conditions, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **42**(4), 361 (2014).
 20. G. H. Xu, J. W. Kim, I. J. Ryoo, S. J. Choo, and I. D. Yoo, Lactariolines a and b: new guaiane sesquiterpenes with a modulatory effect on interferon-gamma production from the fruiting bodies of *Lactarius hatsudake*, *J. Antibiotics*, **63**(6), 335 (2010).
 21. I. S. Lee, I. J. Ryoo, K. Y. Kwon, J. S. Ahn, and I. D. Yoo, Pleurone, a novel human neutrophil elastase inhibitor from the fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*, *J. Antibiotics*, **64**(8), 587 (2011).
 22. Y. Li, W. Xia, Y. Liy, H. A. Remmer, and G. I. Fisher, Solar ultraviolet irradiation induces decorin degradation in human skin likely via neutrophil elastase, *PLoS One*, **8**(8), e72563 (2013).
 23. D. L. Sachs, L. Rittié, H. A. Chubb, J. Orringer, and J. J. Voorhees, Hypo-collagenesis in photoaged skin predicts response to anti-aging cosmeceuticals, *J. Cosmet. Dermatol.*, **12**(2), 108 (2013).
 24. Y. R. Helfrich, D. L. Sachs, and J. J. Voorhees, Overview of skin aging and photoaging, *Dermatol. Nurs.*, **20**(3), 177 (2008).