ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2020** Vol. 30. No. 10. 877~885 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2020.30.10.877

UV-induced Photodamage-attenuating Properties of Water Extract from *Lentinuls edodes*

Jung Im Lee[1], Jung Hwan Oh[1], So Young Park[2], Hye Ran Kim[2], Kyung Im Jung[2], Byung-Jin Jeon[3], Dongmin Kim[3] and Chang-Suk Kong[1,2*]

[1]*Marine Biotechnology Center for Pharmaceuticals and Foods, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 46958, Korea*
[2]*Department of Food and Nutrition, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 46958, Korea*
[3]*Busan Technopark, Busan 46048, Korea*

Received July 28, 2020 /Revised September 28, 2020 /Accepted September 28, 2020

Lentinuls edodes has been used for traditional food and medicine around Asia, and a variety of biological effects have been reported. In this study, *L. edodes* water extract (LWE) was investigated for its anti-photodamage effect in HaCaT keratinocytes. To perform the necessary assays, *L. edodes* was extracted with distilled water for 8 hr at 40℃ in an extract tank. Anti-photodamage activity was assessed using a scratch wound healing assay, cell proliferation, and a reactive oxygen species (ROS) scavenging test and by measuring the mRNA and protein expression levels of matrix metalloproteinases (MMPs) and type I procollagen. MMPs and collagen expression are major markers of UV-induced photodamage in skin. Prior to photodamage analysis, the total polyphenol and β-glucan contents of the LWE were evaluated and found to be 4.64 mg GAE/g DW and 165.96 mg/g, respectively. Treatment with LWE induced cell migration and cell proliferation in UV-irradiated HaCaT cells, and LWE effectively scavenged the ROS induced by H_2O_2 and UVB irradiation in HaCaT cells. UVB irradiation induced ROS generation and led to increased production of MMP-1 and MMP-9 and to decreased collagen production in human keratinocytes. Treatment with LWE upregulated the expression levels of MMP-1, MMP-9, and type I procollagen in UVB-irradiated HaCaT cells. This study suggests that LWE could be used to develop cosmetic materials with anti-photodamage effects.

Key words : β-glucan, HaCaT, *Lentinuls edodes*, MMPs, UV

서 론

자외선은 자외선의 파장길이에 따라 UVA (320~400 nm), UVB (280~320 nm), UVC (200-280 nm)로 나눌 수 있으며 그 중 UVC는 가장 유해하나 대부분 오존층 대부분 흡수 되어 인체에 미치는 영향이 미미한 것으로 보고되어 있다[1, 6]. 또한 UVB는 오존층에서 1~10% 차단되는 것으로 알려져 있으며, 급성 노출시 피부 표피층에 흡수되어 피부홍반 및 일광화상을 일으키고 만성 노출시 피부암을 유발한다[6, 21]. 반면, UVA는 UVB의 1/1,000에 해당하는 에너지 강도를 갖지만 지표면에 도달하는 빛의 양은 UVB의 약 100배로 UVB에 비해 피부 독성이 강한 것으로 보고되어 있다[6, 21].

인체의 표면에 위치하는 피부는 외부로부터 다양한 유해물질이나 자극으로부터 인체를 보호하고 체온 조절, 체내의 노폐물을 분리 및 배출하는 등 다양한 역할을 한다[34]. 이러한 피부는 나이가 들어감에 따라 생리적 기능의 저하로 잔주름 생성, 피부 건조, 탄력 감소 등의 내인성 노화현상이 나타난다[35]. 반면에 자외선 및 유해물질의 노출, 스트레스에 의해 피부세포들이 직접적으로 손상을 입게 되면 굵고 깊은 주름과 피부건조증, 색소성 질환 등을 일으키며 심지어 양성 종양 및 피부암을 일으키는 외인성 노화(광노화)현상이 나타난다[19]. 특히 광노화는 자외선 노출로 인하여 세포 내 활성산소종이 생성되고 과도하게 생성된 ROS는 피부조직을 구성하고 있는 collagen과 elastin 단백질을 산화시켜 피부의 구조를 변화시키고 피부의 손상을 일으키게 된다[4, 16, 17]. 또한 ROS는 다양한 염증성 cytokine의 분비를 촉진시켜 여러 가지 신호전달 체계를 활성화시킨다[26].

자외선에 노출되면 신호전달 체계를 통해서 기질금속단백질 분해효소(matrix metalloproteinase, MMPs)가 활성화되는데 이는 세포 외 기질을 분해하여 피부의 구조를 변형시키게 된다. MMPs는 기능에 따라 collagenase, gelatinase, stromelysin, matrilysin, membrane-type으로 나눌 수 있다. 그 중, MMP-1은 interstitial collagenase로서 피부세포에 가장 많이 존재하는 구조 단백질인 type I collagen과 type III collagen을 분해한다. 이렇게 분해된 collagen과 type IV collagen은 gelat-

***Corresponding author**
Tel : +82-51-999-5429, Fax : +82-51-999-5657
E-mail : cskong@silla.ac.kr
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.

inase B인 MMP-9에 의해서 더 작은 분자로 분해된다[26]. 이러한 collagen의 분해는 피부의 구조적 변화를 일으켜 주름을 생성하고 피부의 탄력을 잃는 등의 피부노화 현상을 가져오게 된다[17].

버섯은 식이섬유, 미네랄, 비타민이 풍부하고 지방함량이 낮고 단백질 함량이 높아 건강기능성 식품으로 잘 알려져 있다[5]. 특히 표고버섯은 세계적으로 버섯 중 2번째로 다소비되고 있는 식품으로 lentinan, β-glucan, eriadenine, ergosterol, polyphenol, flavonoids 등과 같은 다양한 생리활성 물질을 포함하고 있으며, 항산화, 항균, 항바이러스, 항암 활성을 가지며 면역증강, 간호보 기능 등 다양한 생리활성이 보고되고 있다[6, 9, 32, 33]. Polyphenol은 항산화 효과를 가지는 대표적인 성분으로 자외선 조사에 따른 MMP-1과 MMP-9의 활성을 억제하는 것으로 보고되고 있으며, β-glucan 또한 피부 재생 및 주름 개선 효과를 가지는 것으로 보고되고 있다[14, 25].

본 연구에서는 다양한 생리활성 성분을 가지고 있는 표고버섯 물 추출물의 UV로부터 피부세포 보호 효능 효과를 확인하기 위하여 피부세포의 활성에 따른 세포의 이동 및 증식 효과를 측정하고 자외선 노출에 의한 ROS 소거능 및 MMPs의 억제 효능을 탐색하였다.

재료 및 방법

실험재료

표고버섯은 부산시 연제구에 소재한 스마트팜(OLCHI, Busan, Korea)에서 재배한 시료를 제공받아 사용하였다.

표고버섯 추출농축분말 제조방법

생표고버섯(50 kg)을 슬라이스하여 65℃의 열풍건조기(Jeil Machine Co.,Ltd., Icheon, Korea)에서 15시간 건조하였으며[8], 건조된 표고버섯(8.82 kg)의 10배량의 증류수를 첨가하여 40℃의 추출탱크(Jeil Machine Co.,Ltd., Icheon, Korea)에서 8시간 동안 추출하고 회수하였다. 회수한 표고버섯 추출액과 동량의 증류수를 첨가하여 동일 조건에서 재추출 하였다. 얻어진 추출물은 60℃의 농축기(Thicking tank, Jeil Machine Co., Ltd., Icheon, Korea)에서 농축한 후, 동결건조기(PVTFD30R, IlShinBioBase, Dongducheon, Korea)를 이용하여 완전히 건조시켜 표고버섯 추출농축분말(3.10 kg)을 획득하였다.

표고버섯의 총 폴리페놀 함량 측정

표고버섯 추출농축분말의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Dennis 법[28]을 이용하여 측정하였다. 표고버섯 추출농축분말 10 mg을 정확히 칭량하여 1 ml 증류수에 희석하고 그 중 100 µl를 취하여 500 µl의 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent와 혼합하여 3분간 반응시킨 후, 400 µl의 Na_2CO_3 (2.5%)를 첨가하였다. 어두운 실온에서 1시간 30분 동안 정치한 후, 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 사용하여 작성한 표준곡선으로 계산하였으며, mg gallic acid-equivalents (GAE)/100 g extract weight (DW)로 나타내었다.

$y = 0.0033x + 0.0778,\ R^2 = 0.9988$

y: absorbance; x: concentration (0.000-1,000 mg/ml)

표고버섯 추출농축분말의 β-glucan 함량 측정

표고버섯 추출농축분말의 β-glucan 함량은 Yeast & Mushroom β-Glucan Assay Kit (Megazyme Ltd., Bray, Wicklow County, Ireland)를 이용하여 측정하였다. 총 glucan에서 α-glucan을 감하여 β-glucan의 함량을 구하는 방법으로 산분해와 효소처리를 통하여 glucose 형태로 분해한 후 발색시켜 흡광도를 측정하여 정량하였다. 총 glucan함량을 측정하기 위하여 100 µl시료 (100 mg/ml)에 1.5 ml의 37% HCl을 첨가하여 vortexing하였다. 40℃ 항온조에서 45분간 반응시킨 후 10 ml의 증류수를 첨가하여 vortexing 하였다. 100℃ 항온수조에서 2시간 동안 반응시킨 후, 냉각시켜 2 M KOH를 10 ml 첨가하고, 200 mM의 sodium acetate buffer (pH 5)를 첨가하여 100 ml가 되도록 정용하였다. 정용한 시험용액 0.1 ml를 β-glucan 효소혼합액 0.1 ml과 혼합하여 40℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, 3 ml의 발색시약(glucose oxidase/peroxidase reagent, GOPOD reagent)을 가하여 실온에서 10분간 반응시키고 510 nm에서 흡광도를 측정하여 총 glucan 함량을 계산하였다. α-Glucan함량은 100 µl시료 (100 mg/ml)에 2 ml의 2 M KOH을 첨가하여 교반한 후, 8 ml의1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8)를 첨가하였다. α-glucan효소혼합액의 0.2 ml를 가하여 40℃ 항온수조에서 30분간 반응시킨 후, 원심분리(1,500× g, 10분)하였으며, 상층액 0.1 ml와 발색시약(GOPOD) 3 ml을 혼합하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 증류수를 대조액으로 분광광도계 파장 510 nm에서 흡광도를 측정하고 α-glucan 함량을 계산하였다. β-glucan함량은 총 glucan 함량에서 α-glucan 함량을 감하여 계산하였다.

세포배양

인간각질형성세포주(human keratinocyte cell)인 HaCaT 세포는 CLS-Cell Line Service (200493, Eppelheim, Germany)에서 구입하였다. HaCaT 세포는 10% 우태아혈청과 100 units/ml의 penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene, South Korea)로 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였으며, 2~3일 한번씩 새로운 배지로 교체하였다.

세포독성

표고버섯 추출농축분말이 HaCaT 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다[16]. HaCaT세

포는 96 well plate에 3×10^4 cells/well으로 분주하여 24시간 동안 배양하였으며, 추출물을 0~5 mg/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후에 100 µl의 MTT solution (1 mg/ml)을 첨가하여 4시간 동안 배양한 후, 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 GENios FL microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 백분율로 나타내었다.

Scratch wound healing assay

Scratch에 의한 표고버섯 추출물의 재생효과를 확인하기 위하여 HaCaT 세포를 12 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주하여 배양하여 confluent한 상태가 되면 200 µl의 yellow tip으로 종단하여 세포의 창상을 유도하였다. 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 현미경을 이용하여 세포의 이동 정도를 관찰하였다.

UVA/UVB 조사

HaCaT 세포의 자외선(UV)조사는 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후, PBS를 첨가한 상태에서 이루어졌다. Bio-Sun UV irradiation system (Vilber Lourmat, Marine, France)을 사용하여 UVA는 10 J/cm^{2}으로 UVB는 20 mJ/cm^{2}으로 각각 조사하여 실험에 사용하였다.

자외선조사에 따른 세포보호효과

자외선(UVA/UVB) 조사에 따른 표고버섯 추출물의 세포보호효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다[20]. HaCaT 세포는 24 well plate에 3×10^4 cells/well으로 분주하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 PBS로 씻어 준 후에 100 µl PBS를 첨가하여 UVA (10 J/cm^2)/UVB (20 mJ/cm^2)를 조사하였다. PBS로 세척한 후, 무혈청 배지로 교체하고 농도 별로 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. MTT solution (1 mg/ml)를 첨가하여 4시간 동안 배양한 후에 formazan crystal을 DMSO에 녹여 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 백분율로 나타내었다.

세포 내 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 소거 효과

표고버섯 추출농축분말의 세포 내 ROS 소거 효과를 확인하고자 DCF-DA 법[16]을 사용하였으며, 세포 내 ROS 생성은 H_2O_2 처리 및 UVA/UVB를 조사하여 유도하였다. HaCaT 세포는 96 well black plate에 3×10^4 cells/well으로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. H_2O_2-induced ROS소거 효과를 측정하기 위하여 배양 후, PBS로 2회 세척하고, 20 µM DCF-DA (100 mM Hank's buffered salt solution, HBSS)을 100 µl 첨가하여 20분간 배양하였다. 시료를 농도 별로 첨가하여 1시간 동안 배양한 후 PBS로 2~3회 세척하고 200 µM의 H_2O_2 (in HBSS)를 첨가하여 120분 후 형광광도계를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광의 세기를 측정하였으며, 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다. UVA와 UVB 조사에 따른 세포 내 ROS 소거효과를 측정하기 위하여 위와 동일한 방법으로 실험을 수행하였으며, H_2O_2 solution 대신 UVA (10 J/cm^2)와 UVB (20 mJ/cm^2)를 조사하여 120분 후 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 형광의 세기를 측정하여 세포 내 ROS 소거 효과를 확인하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성, 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

HaCaT 세포는 6 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, UVB를 조사하고 무혈청 배지와 함께 시료를 농도 별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 total RNA를 추출하기 위하여 AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit (Bioneer Corp. Daejeon, Republic of Korea)를 사용하였다. cDNA는 Cell Script™ cDNA master Mix (Cellsafe, Gyeonggi-do, Republic of Korea)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 합성하였다. Target cDNA는 다음 primer들을 사용하였다. MMP-1에 대해서는 forward 5′-TCT GAC GTT GAT CCC AGA GAG CAG-3′와 reverse 5′-CAG GGT GAC ACC AGT GAC TGC AC-3′; MMP-9의 경우 forward 5′-CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC-3′와 reverse 5′-CAC TTG TCG GCG ATA AGG-3′; Type 1α procollagen의 경우 forward 5′-CTC GAG GTG GAC ACC ACC CT-3′와 reverse 5′-CAG CTG GAT GGC CAC ATC GG-3′; β-actin의 경우 forward 5′-AGA TCA AGA TCA TTG CTC CTC CTG-3′와 reverse 5′-CAA GAA AGG GTG TAA CGC AAC TAA G-3′. 합성된 cDNA는 AccuPrep® PCR PreMix & Master Mix (Bioneer Corp. Daejeon, Republic of Korea)를 이용하여 RT-PCR를 수행하였으며, 반응생성물은 Davinch-Chemi imager™ (CAS-400SM, Seoul, Korea)을 이용하여 관찰하였다. 대조 유전자로는 β-actin으로 사용하여 상대정량하였다.

Western blotting

HaCaT 세포를 6 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, UVB를 조사하고 무혈청 배지와 함께 시료를 농도 별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 단백질을 추출하였으며, BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 각각의 단백질은 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer를 첨가하여 100℃에서 5분간 끓이고 10% SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 전기

영동하였으며, 전기영동 후에 PVDF membrane (Amersham GE Healthcare Life Sci., Germany)에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk blocking solution (0.1% Tween-20, tris-buffered saline, pH 8.0)으로 blocking 시켰으며, 1:1,000로 희석한 1차 항체를 첨가하여 4℃에서 overnight 하였으며, Horseradish peroxidase (HRP) 효소가 결합되어 있는2차 항체를 1:5,000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질 밴드는 ECL solution을 이용하여 CAS-400SM Davinch-Chemi imager™ (Davinch-K)로 관찰하였다. 이때 사용된 1차 항체와 2차 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, Ma, USA)와 Santa Cruz Biotechnology (TX, USA)에서 구입하였으며 대조 유전자로는 β-actin으로 사용하여 상대정량하였다.

통계분석

각각의 실험결과는 3회 이상 반복하여 평균(Mean)±표준편차(Standard deviation)로 나타내었으며, SPSS/WIN 12.0 (Statistical Package for social Science, IBM, Armonk, NY, USA) 통계 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석을 실시한 후 Duncan multiple range test를 실시하여 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 β-glucan 함량 측정

표고버섯의 물 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 β-glucan의 함량을 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 4.64±0.03 mg GAE/g으로 나타났으며, β-glucan의 함량은 165.96±9.62 mg/g으로 나타났다. Seo 등[28, 30]의 연구에 따르면 우리나라에서 재배되는 표고버섯의 총 폴리페놀 함량은 2.37~10.88 mg GAE/g으로 나타나며 톱밥재배보다 원목재배에서 폴리페놀 함량이 더 높은 것을 확인하였다. 표고버섯의 총 폴리페놀 함량의 차이는 균주, 재배방법, 수확시기, 건조방법, 추출방법 등에 따라 차이가 나타날 수 있으며, 이러한 환경적 조건을 감안할 때 본 연구에 사용된 표고버섯의 총 폴리페놀 함량이 기존 연구[28, 30]의 폴리페놀 함량과 유사함을 확인하였다.

표고버섯에는 면역강화 및 항암효능을 가지는 렌티난(lentinan)을 함유하고 있으며 이는 대표적인 β-glucan 중 하나이다[21]. β-glucan과 같은 다당체들은 면역강화 및 항암 효과 외에도 항바이러스, 항균, 항염 등의 활성을 가지며 세포를 활성화시켜 피부 화상 및 상처 치유 효능을 가진다고 알려져 있다[15, 20]. 또한 피부의 보습작용 및 콜라겐합성 등을 통해 피부의 노화를 억제하는 효과가 보고되고 있다[2]. 표고버섯 추출물의 β-glucan의 함량을 측정한 결과, 165.96 mg/g(166%)으로 나타났으며 이는 기존의 보고되는 표고버섯의 β-glucan 함량 155~550%와 유사한 값을 나타내었다[2].

표고버섯 물 추출물의 세포 독성

표고버섯 물 추출물이HaCaT 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 0~5 mg/ml의 농도로 처리하여 세포 독성을 관찰하였다. 시료를 처리하고 24시간 후에 MTT assay를 이용하여 세포 생존을 관찰하였으며, 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 계산하였다. 그 결과, 표고버섯 물 추출물을 5 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, HaCaT 세포가 83.6% 생존하였으며, 2 mg/ml 이하의 농도에서는 97.2% 이상 세포가 생존함을 확인하였다(Fig. 1). 따라서 피부 노화 개선 효과를 측정하기 위하여 사용된 표고버섯 물 추출물은 2 mg/ml 이하의 농도에서 확인하였다.

표고버섯 물 추출물의 피부 재생 효과

HaCaT 세포에 창상을 가하게 되면 주변세포들이 세포의 증식과 이동을 통해 손상된 부위를 복구하며 이러한 과정은 피부 재생 및 치유과정에서 중요하다[12, 13]. 표고버섯 물 추출물의 피부재생 유도 효과를 관찰하기 위하여 피부 각질형성세포인 HaCaT에서 scratch wound healing assay를 실시하였다. 창상을 유발한HaCaT 세포에 표고버섯 물 추출물을 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 처리하였으며, 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 관찰하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 표고버섯 물 추출물의 처리 농도가 높아짐에 따라 HaCaT 세포가 창상 부위로 이동하여 창상간격이 좁혀진 것을 확인하였다. Seo 등[29]에서 보고한 논문에 따르면 버섯으로부터 추출한 β-glucan이 keratinocyte세포에서 scratch wound healing assay에서 상당한 세포이동 효과를 나타내고 있으며, 또한 Polnnusamy 등 논문에서 폴리페놀이 다량 함유된 분획물에서 cell migration 효과 및 cell proliferation 증식 효과를 확인하였다[27].

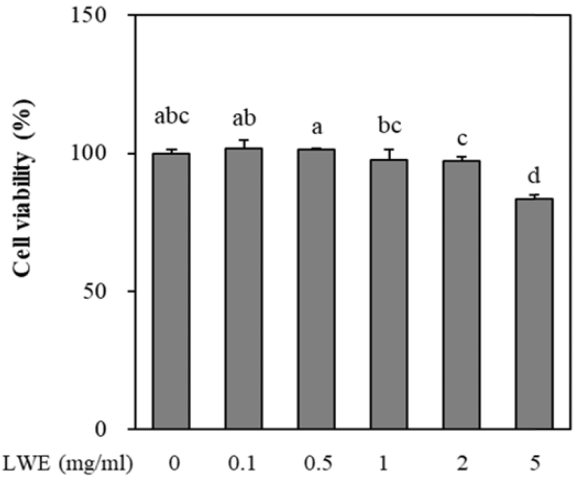

Fig. 1. Cytotoxic effects of LEE on HaCaT keratinocyte using the MTT assay. [a-d]Means with different letters are significantly different at $p<0.05$ level. LWE: *L. edodes* water extract.

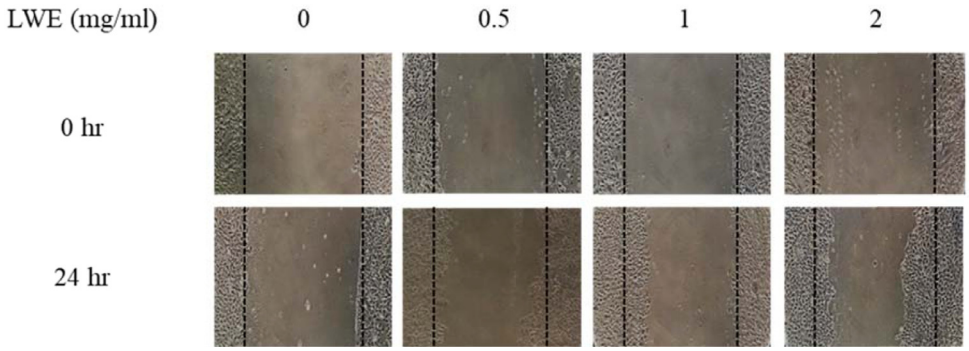

Fig. 2. Skin regeneration effects of LWE in HaCaT keratinocytes using the cell scratch wound healing assay. Wound was scratched at 100% confluence. Pictures of cell migration towards the injury line were taken at the start and at 24 hr incubation with LWE.

표고버섯 물 추출물의 자외선(UVA/UVB)조사에 따른 세포 증식 효과

자외선은 피부 노화를 일으키는 대표적인 외적 요인으로 깊은 주름을 생성하고 색소를 침착시킨다[34]. 또한 세포 내 ROS를 과도하게 생성하여 다양한 염증성 사이토카인을 유발하게 되고 이에 따라 다양한 피부 조직 및 구조를 파괴하고 변화시킨다[19]. 더 나아가 세포 내 단백질, 지질 등을 산화시키고 DNA를 파괴하여 세포가 손상되고 사멸에 이르게 한다[19, 34, 35]. 이러한 면에서 자외선 조사로 손상된 세포의 증식 효과를 측정하는 것은 피부재생 효과를 나타내는 중요한 지표로서 사용된다[12]. 표고버섯 물 추출물의 자외선 조사에 따른 세포증식 효과를 확인하기 위하여 UVA (10 J/cm^2) 및 UVB (20 mJ/cm^2)를 조사하였으며, 24시간 동안 시료를 처리한 후, MTT assay를 이용하여 세포증식 정도를 확인하였다(Fig. 3). HaCaT 세포에 UVA (10 J/cm^2) 조사한 경우, UVA를 조사하지 않은 음성 대조군에 비하여 19% 가량 세포가 사멸하였으며, 표고버섯 물 추출물을 처리에 따른 세포의 증식 효과는 유효적으로 나타나지 않았다. 시료를 처리하지 않고 UVB (20 mJ/cm^2) 조사한 대조군은 UVB를 조사하지 않은 음성대조군에 비하여 30%이상 세포가 사멸하였으며, UVB 조사 후에 표고버섯 물 추출물을 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 처리한 경우, 각각 14.4%, 18.7%, 22.8%로 세포가 농도의존적으로 증식하였다.

표고버섯 물 추출물의 세포 내 활성산소종(ROS) 소거 효과

표고버섯 물 추출물의 세포 내 활성산소종(ROS) 소거 효과를 확인하기 위하여 HaCaT 세포에서 과산화수소(H_2O_2)에 의해 생성된 ROS와 자외선(UVA/UVB) 조사에 의해 유도된 ROS의 소거 효과를 DCF-DA법을 사용하여 관찰하였다. Fig. 4A의 결과는 과산화수소에 의해 생성된 ROS 소거능을 관찰한 것으로 시료를 첨가하지 않은 대조군에 비해 농도의존적으

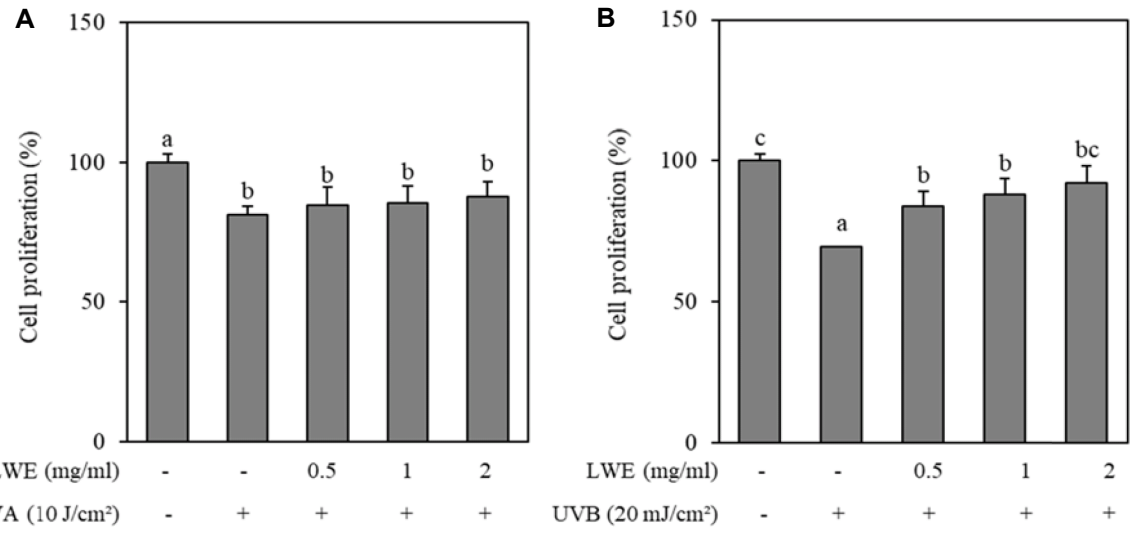

Fig. 3. Cell proliferative effects of LWE on UVA and UVB-irradiated HaCaT keratinocytes, respectively, using the MTT assay. HaCaT keratinocytes were exposed to 10 J/cm^2 and 20 mJ/cm^2 of UVA (A) and UVB (B) irradiation, respectively. $^{a-c}$Means with different letters are significantly different at $p<0.05$ level.

로 생성된 ROS를 소거하였으며, 각각의 ROS 소거율은 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도에서 각각45.3%, 54.5%, 64.5%를 나타냈다. UVB 조사에 따라 생성된 ROS를 농도의존적으로 소거하였으며, 각각의 소거율은 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도에서 각각16.9, 22.7, 32.9%로 나타났다(Fig. 4B). 또한 UVA 조사에 따른 표고버섯 물 추출물의 ROS 소거 효과는 농도의존적으로 증가하였으며 각각17.0%, 21.1%, 24.6%로 나타났다(Fig. 4C). 이들 결과로부터 표고버섯 물 추출물은 UVB조사에 따른 세포의 손상 및 과도한 ROS 생성을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 이는 다른 연구 결과에서 표고버섯 추출물의 DPPH radical와 ABTS 등의 항산화 효능을 보고하고 있으며 또한 효능 성분으로 폴리페놀과 β-glucan 성분을 포함하고 있음을 확인하였다[14, 25].

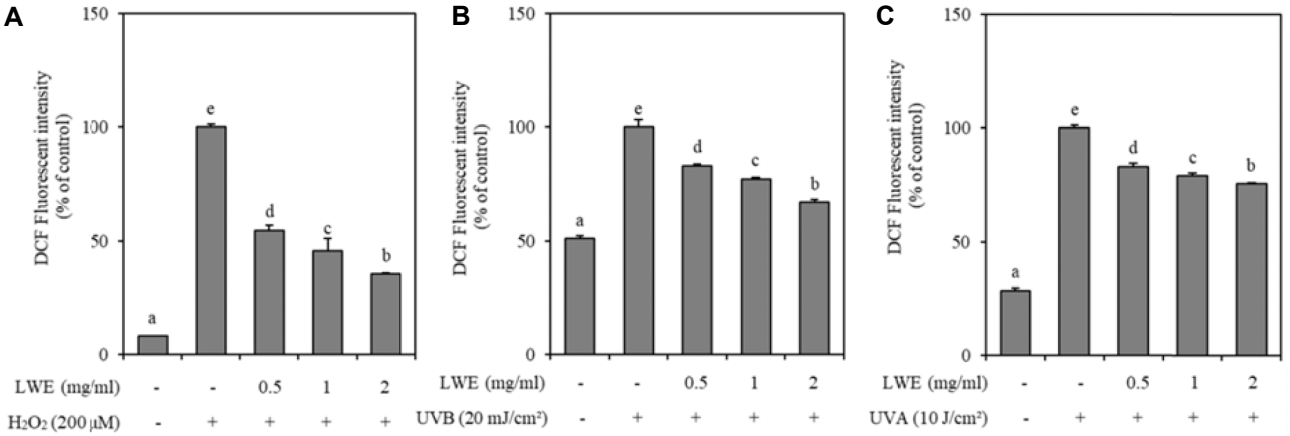

Fig. 4. Effect of LWE on intracellular ROS generation induced by H_2O_2 treatment (A) and UVB (B) and UVA (C) irradiation in HaCaT keratinocytes. The HaCaT cells were exposed to 10 J/cm^2 and 20 mJ/cm^2 of UVA and UVB irradiation after pre-treatment with/without LWE for 1 hr, respectively. The intracellular ROS levels were measured by fluorescence intensity of DCF. $^{a-e}$Means with different letters are significantly different at $p<0.05$ level.

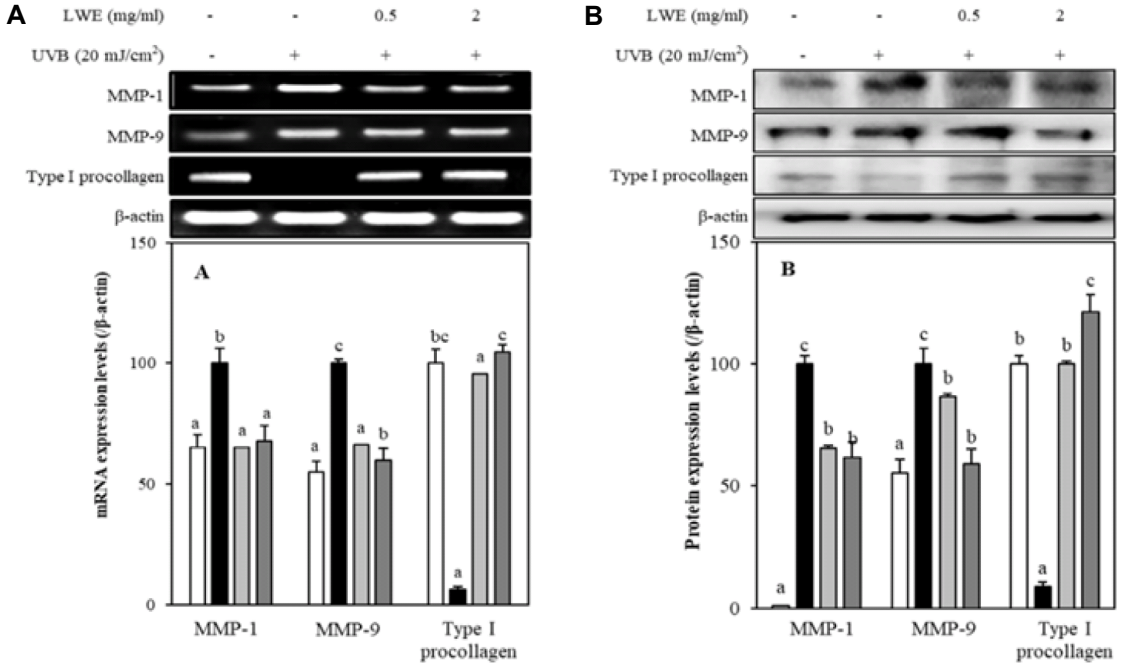

Fig. 5. Effect of LWE on the expression of MMP-1, MMP-9 and type I procollagen in UVB-irradiated HaCaT keratinocytes. The HaCaT cells were exposed to 20 mJ/cm^2 of UVB and treated with/without LWE. After incubation for 24 hr, the levels of mRNA and protein expression were determined by RT-PCR (A) and Western blotting (B), respectively. β-actin was used as internal control. $^{a-c}$Means with different letters are significantly different at $p<0.05$ level.

표고버섯 물 추출물의 UVB 조사에 따른 MMPs와 type I procollagen의 발현

피부의 자외선 노출은 피부 세포 내 ROS를 생성하게 되고 이는 다양한 염증성 사이토카인을 촉진시켜 여러 가지 신호전달 체계를 활성화시키고 세포 외 기질 단백질 분해 효소인 MMPs 또한 활성화 된다[26]. MMPs는 collagenase, gelatinase, stromelysins, matrlysins, membrane-type으로 나눌 수 있으며 광노화, 상처치유, 세포 재형성, 염증, 암 등의 병리학적 과정에서 중요한 역할을 한다[26]. MMP-1은 대표적인 collagenase로서 type I collagen과 type III collagen을 분해하고 gelatinase인 MMP-9은 type IV collagen을 분해한다고 알려져 있다[26]. 표고버섯 물 추출물이 자외선 조사에 따른 세포 내 MMP-1과 MMP-9의 발현 억제 효과와 type I procollagen의 생성 촉진 효과를 관찰하기 위하여 HaCaT 세포에 UVB를 조사하였으며 RT-PCR과 Western Blotting을 이용하여 확인하였다. 그 결과(Fig. 5), 시료를 처리하지 않고UVB를 조사한 대조군의 경우, MMP-1과 MMP-9의 발현이 증가되었으며 표고버섯 물 추출물 처리 시, MMP-1과 MMP-9의 발현이 감소되었다. Type I procollagen의 경우, 대조군에서 발현이 거의 되지 않았으며 표고버섯 물 추출물 처리에 따라 발현이 증가되었다. 표고버섯 물 추출물은 UVB 조사로 증가된 MMP-1과 MMP-9의 발현을 감소시켰으며, type I procollagen의 합성을 증가시켰다. 여러 연구에서 polyphenol과 β-glucan이 MMPs의 발현을 억제한다고 보고하고 있으며 항산화 성분이 또한 자외선 조사에 따라 유도된 MMPs의 활성을 억제시키는 것으로 알려져 있다[3, 8, 11, 17, 24]. 이러한 표고버섯 물 추출물의 MMPs의 억제 활성은 폴리페놀과 β-glucan에 의한 것이라고 생각되며 또한 다양한 효능 성분을 포함하고 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 커뮤니티비즈니스 활성화 사업으로 수행된 결과입니다(P0008724).

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Alexandra, A. O., Betty, Y. and John, A. D. 2014. Ultraviolet radiation, aging and skin: prevention of damage by tropical cAMP manipulation. *Molecules* **19**, 6202-6219.
2. Bak, W. C., Park, J. H., Park, Y. A. and Ka, K. H. 2014. Determination of glucan contents in the fruiting bodies and mycelia of *Lentinula edodes* cultivars. *Mycobiology* **42**, 301-304.
3. Chaiparasongsuk, A., Lohkul, J., Soontrapa, K., Sampattavanich, S., Akarasereenont, P. and Panich, U. 2017. Activation of Nrf2 reduces UVA-mediated MMP-1 preregulation via MAPK/AP-1 signaling cascades: The photoprotective effects of sulforaphane and hispidulins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **360**, 388-398.
4. Choi, S. J., Lee, S. N., Kim, K., Joo, D. H., Shin, S., Lee, J., Lee, H. K., Kim, J., Kwon, S. B., Kim, M. J., Ahn, K. J., An, I. S., An, S. and Cha, J. C. 2016. Biological effects of rutin on skin aging. *Int. J. Mol. Med.* **38**, 357-363.
5. Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B. and Lee, J. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem.* **99**, 381-387.
6. Edwin, D. L. 2016. Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* **31**, 36-54.
7. Fujii, T., Aeda, H., Suzuki, F. and Shida, N. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2 extract from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiot.* **11**, 1079-1090.
8. Huh, W. B., Kim, J. E., Kang, Y. G., Park, G., Lim, T. G., Kwon, J. Y., Song, D. S., Jeong, E. H., Lee, C. C., Son, J. E., Seo, S. G., Lee, E., Kim, J. R., Lee, C. Y., Park, J. S. and Lee, K. W. 2015. Brown pine leaf extract and its active component trans-communic acid inhibit UVB-induced MMP-1 expression by targeting PI3K. *PLoS One* **10**, e0128365.
9. Jong, S. C. and Birmingham, J. M. 1993. Medicinal and therapeutic value of the shiitake mushroom. *Adv. Appl. Microbiol.* **39**, 153-184.
10. Jung, K. I., Choi, Y. J., Oh, J. H., Lee, J. I., Park, S. Y., Kim, H. R., Jeon, B. J., Kim, D. and Kong, C. S. 2019. Quality characteristics of cookies added with *Lentinus edodes* water extract. *J. Life Sci.* **29**, 955-963.
11. Kang, K. A., Zhang, R., Piao, M. J., Ko, D. O., Wang, Z. H., Lee, K. and Hyun, J. W. 2008. Inhibitory effects of triphlorethol-A on MMP-1 induced by oxidative stress in human keratinocytes via ERK and AP-1 inhibition. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **71**, 992-999.
12. Kim, G. Y., Lee, S. J., Jeon, M. J., Kim, B. M., Kim, G. T., Kang, S. M., Lee, K. Y., Shin, E. J., Kim, S. Y. and Kim, Y. M. 2018. Anti-wrinkle and skin turnover improvement effects of niacinamide-dipeptide convergence. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **16**, 243-254.
13. Kim, J. and Lee, C. M. 2018. Anti-inflammatory effects and influence on fibroblast growth of astaxanthin-cyclodextrin namoparticles. *J. Chitin Chitosan* **23**, 170-175.
14. Kim, J. W., Ahn, J. M., Kwon, O. J. and Kim, S. H. 2016. β-Glucan contents and anti-wrinkling effects of brown rice *Phellinus linteus* mycelium extracts fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **14**, 127-137.
15. Kim, M. K. and Hong, E. K. 2006. Effect of polysaccharide from *Schizophyllum commune* on burn and wound healing. *Kor. Chm. Eng. Res.* **44**, 87-91.
16. Krutmann, J. and Schroeder, P. 2009. Role of mitochondria

in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **14**, 44-49.
17. Lee, H., Hong, S., Heo, H., Choe, H., Jeong, H. S. and Lee, J. 2019. Protective effects of methanol extract from *Acanthopanacis cortex* shoots against photoaging in human skin fibroblast. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **8**, 385-389.
18. Lee, J. I., Kong, C. S., Jung, M. E., Hong, J. W., Lim, S. Y. and Seo, Y. 2011. Antioxidant activity of the halophyte *Limonium tetragonum* and its major active components. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**, 992-999.
19. Lee, K. O., Kim, S. N. and Kim, Y. C. 2014. Anti-wrinkle effects of water extracts of teas in hairless mouse. *Toxicol. Res.* **30**, 283-289.
20. Lehtovaara, B. C. and Frank, X. G. 2011. Pharmacological, structural, and drug delivery properties and applications of 1,3-β-glucans. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 6813-6828.
21. Masamitusu, I., Hideya, A., Masaki, Y., Toko, N. and Mary, M. 2009. Photoaging of the skin. *J. Anti. Aging Med.* **6**, 46-59.
22. Oba, K., Kobayashi, M., Matsui, T., Kodera, Y. and Sakamoto, J. 2009. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. *Anticancer Res.* **29**, 2739-2746.
23. Oh, J. H., Karadeniz, F., Lee, J. I., Park, S. Y., Seo, Y. and Kong, C. S. 2020. Anticatabolic and anti-inflammatory effects of myricetin 3-O-β-D-galactopyranoside in UVA-irradiated dermal cells via repression of MAPK/AP-1 and activation of TGFβ/Smad. *Molecules* **25**, 1331-1348.
24. Pacheco-Palencia, L. A., Noratto, G., Hingorani, L., Talcott, S. T. and Mertens-Talcott, S. U. 2008. Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenolic extract in Ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8434-8441.
25. Pervin, M., Unno, K., Nakamura, Y. and Imai, S. 2016. Luteolin suppresses ultraviolet A- and B-induced matrix metalloproteinase 1 and 9 expression in human dermal fibroblast cells. *J. Nutr. Food Sci.* **6**, 1-6.
26. Pittayapruek, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M. and Ohtsuki, M. 2016. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 868-888.
27. Ponnusamy, Y., Chear, N. J. Y., Ramanathan, S. and Lai, C. S. 2015. Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.* **168**, 305-314.
28. Seo, S., Park, Y. Jang, Y. and Ka, K. H. 2017. Antioxidant properties of *Lentinula edodes* after sawdust bag cultivation with different oak substrates. *Kor. J. Mycol.* **45**, 121-131.
29. Seo, G., Hyun, C., Choi, S., Kim, Y. M. and Cho, M. 2019. The wound healing effect of four types of beta-glucan. *Appl. Biol. Chem.* **62**, 20-28.
30. Seo, S., Jang, Y., Ryoo, R. and Ka, K. H. 2018. Antioxidant properties of water extracts from *Lentinula edodes* cultivars grown on oak log. *Kor. J. Mycol.* **46**, 51-57.
31. Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
32. Suzuki, S. and Ohshima, S. 1976. Influence of *L. edodes* (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom Sci.* **9**, 463-467.
33. Yang, B. K., Kim, D. H., Jeong, S. C., Das, S., Choi, Y. S., Shin, J. S., Lee, S. C. and Song, C. H. 2002. Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exopolymer produced from a submerged mycelial culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 937-942.
34. Yang, W. S., Kim, Y. M., Kim, E. H., Seu, Y. B., Yang, Y. J., Kim, H. W. and Kang, S. C. 2010. Anti-wrinkle effect of cosmetics containing *Duchesnea indica* extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **36**, 281-288.
35. Yoo, J. M., Kang, Y. J., Pyo, H. B., Choung, E. S., Park, S. Y., Choi, J. H., Han, G. J., Lee, C. H. and Kim, T. J. 2010. Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast. *J. Life Sci.* **20**, 1838-1843.

초록 : 피부각질형성세포에서 표고버섯 물 추출물의 피부노화 억제 효과

이정임[1] · 오정환[1] · 박소영[2] · 김혜란[2] · 정경임[2] · 전병진[3] · 김동민[3] · 공창숙[1,2]*
([1]신라대학교 해양식의약소재융합기술연구소, [2]신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, [3]부산 테크노파크)

표고버섯에는 다양한 효능성분들이 존재하며 특히, β-glucan과 polyphenol 성분들은 항산화, 광노화, 주름개선 등의 피부개선 효능이 알려져 있다. 본 연구에서는 표고버섯 물 추출물에서 polyphenol과 β-glucan 함량을 확인하였으며 이러한 연구결과를 바탕으로 피부노화 억제효능을 조사하였다. Scratch wound healing assay를 통해 표고버섯 물 추출물 처리시 자외선 조사에 의해 손상된 HaCaT cell의 증식 유도 효과를 확인하였다. 또한 세포 내 생성된 ROS를 효과적으로 소거함으로써 세포 내 과도한 산화 스트레스를 줄여 다양한 염증성 사이토카인의 유발을 억제하고 피부노화 인자의 발현을 억제하는 것으로 생각된다. 세포 외 기질과 단백질을 분해하는 MMPs의 발현양상을 확인한 결과 표고버섯 물추출물은 MMP-1과 MMP-9의 발현을 억제하였으며, type I collagen의 생합성을 증가시켰다. 이를 통해 표고버섯 물 추출물은 세포를 활성화시켜 세포의 이동 및 증식을 유도함으로써 피부를 재생 및 collagen 합성을 촉진하고 collagen 분해 인자를 억제시킴으로써 피부의 주름억제 활성에 효능을 가지는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구를 통해 표고버섯 물 추출물은 화장품 분야에서 피부 노화 예방 및 개선 소재로서의 개발 가능성을 확인하였다.