

Inhibitory Effect of β -Glucan Extracted from Cauliflower Mushroom *Sparassis crispa* on Tyrosinase Activity and Melanin Synthesis

Chul Hyun Oh^{1,2}, Mi Jung Ku^{1,2} and Yong Hwan Lee^{1,2*}

¹Institute of Natural Products for Health Promotion, Kosin University, Busan 49267, Korea

²Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan 49267, Korea

Received October 12, 2021 / Revised November 16, 2021 / Accepted November 17, 2021

There are a lot of efforts to develop new compounds having skin whitening effect from natural products. *Sparassis crispa* is a medicinal mushroom containing more than 40% β -glucan, which exhibits anticancer and immunostimulating effects. The aim of this study was to assess the availability of β -glucan extracted from cauliflower mushroom *S. crispa* as a skin whitener through the evaluation of inhibitory effects of melanin synthesis and tyrosinase activity and their mechanisms. B16F1 cells were treated with *S. crispa* β -glucan (10, 100, and 1,000 μ g/ml, respectively) and α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), simultaneously. Content of melanin synthesis and tyrosinase activity were determined. The expressions levels of tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2 and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) were also measured by western blotting. Treatment with 10, 100 and 1,000 μ g/ml *S. crispa* β -glucan and 200 nM α -MSH significantly decreased melanin synthesis by 13.9%, 18.7% and 39.5%, respectively, and tyrosinase activity by 15.6%, 26.9% and 43.2%, respectively, compared to the α -MSH alone group. In addition, *S. crispa* β -glucan inhibited expressions of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF induced by α -MSH. These results indicated that *S. crispa* β -glucan inhibited MITF expression, thereby reducing tyrosinase expression and inhibiting melanin production in B16F1 melanoma cells. Therefore, *S. crispa* β -glucan might be available as a skin whitener.

Key words : β -Glucan, melanin, *Sparassis crispa*, tyrosinase

서 론

표피의 기저층에 존재하는 멜라닌은 인간의 피부색을 결정 짓는데 가장 중요한 역할을 하며, 멜라닌 세포(melanocyte) 내의 특수한 형태의 갈색 세포내 소기관인 멜라닌 소체(melanosome)에서 합성된다. 합성된 멜라닌은 수지상돌기(dendrite)를 통하여 각질형성세포(keratinocyte)로 이동하여 피부 각질층에 침착되어 흑화를 야기한다[28].

멜라닌 세포에는 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적 효소인 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 TRP-2 등이 함유되어 있다[3]. 이 중에서 가장 핵심적인 효소는 속도 결정단계를 조절하는 중합효소의 일종인 tyrosinase이다. 아미노산의 하나인 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)과 DOPA quinone으로 산화되어 주로 적·노란색을 나타내는 pheomelanin을 합성하며[7], DOPA quinone이 DOPA chrome으로 자동산화 되어

TRP-2에 의해 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 변환되고, TRP-1에 의해 DHICA가 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화되어 흑·갈색을 띠는 eumelanin을 생성한다[34]. 따라서 pheomelanin과 eumelanin의 합성에 절대적으로 필요한 tyrosinase의 작용을 억제한다면 효과적으로 멜라닌 합성을 억제할 수 있다.

멜라닌 생성은 tyrosinase에 의한 산화반응 뿐만 아니라, 여러 종류의 사이토카인, 성장 인자와 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), 부신피질자극호르몬, β -endorphin 등의 호르몬과 여러 종류의 세포신호전달 경로가 관여하는 복잡한 연쇄반응을 거쳐서 생성된다고 알려져 있다[4]. 멜라닌 생성을 유도하는 물질 가운데 가장 강력한 것으로 알려진 α -MSH는 피부가 자외선에 노출되었을 때 표피에서 생산이 증가되고, 각질형성세포와 멜라닌 세포에서는 멜라닌 자극 호르몬 수용체가 증가하게 된다. 증가된 α -MSH는 멜라닌 세포 특이 수용체인 melanocortin-1 (MC1R)과 결합하여 하위 신호를 전달하는데, adenylate cyclase를 활성화시켜, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 수준이 증가하게 되면, cAMP-dependent protein kinase (PKA)가 cAMP response element binding protein (CREB)을 인산화시켜 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 증가시킨다. Tyrosinase와 TRP의 강력한 전사 조절인자인 MITF는 핵으로 이동하여 DNA의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 promoter에 결합하여 각

*Corresponding author

Tel : +82-51-990-6459, Fax : +82-51-246-7201

E-mail : yhlee@kosin.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.

각의 유전자 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 유발한다[1].

최근 천연물에서 tyrosinase 억제 활성을 가진 화합물을 개발하기 위한 노력이 많이 이루어지고 있다. 잘 알려진 tyrosinase 억제 물질인 누룩곰팡이로부터 분리된 kojic acid, hydroquinone, oxyresveratrol, 그리고 p-hydroxybenzyl alcohol은 멜라닌 합성을 억제한다고 보고되고 있다[21, 22, 26, 30]. 그러나 이러한 물질들은 불안정하여 분해, 착색, 이취(異臭), 효과의 불분명, 안전성 등의 문제로 인하여 사용이 제한되고 있다. 따라서 세포에 영향을 미치지 않으면서 안정적이고도 효과적으로 멜라닌 합성을 감소시키기 위한 미백 소재를 천연물로부터 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 민주름버섯목(*Aphylllophorales*), 꽃송이버섯과(*Sparassidaceae*)에 속하는 버섯으로 한국, 일본, 중국, 유럽, 북아메리카, 호주 등에 분포되어 있으며, 8-9월에 침엽수의 뿌리근처나 그루터기에서 자생한다[10]. 자실체는 높이 10-25 cm로 육질이고 밑 부분은 굽은 줄기로 공통의 자루가 있고 윗부분은 편평하며 가장자리는 물결 모양으로 흰색의 꽃양배추 모양으로 형성하며, 은은한 향과 씹는 질감이 좋아 식용으로서 가치가 있다[24]. 또한, β -1,3-D-glucan의 함량이 다른 버섯에 비해 월등히 높아 다양한 생리 활성 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다[20]. β -glucan이란 면역력을 높여주는 핵심 성분으로써 신체의 면역체계를 바로잡아 암 및 고혈압, 당뇨병 등을 다스리는 것으로 높이 평가받아 관심이 집중되고 있다. 즉, 항암과 항혈관 신생효과, 항종양효과, 항균과 항진균 효과, 그리고 항알러지 효과와 당뇨에 대해서도 효과가 있는 것으로 알려져 있다[5, 11, 13, 14, 25, 31]. 또한 마우스의 사이토카인 생성에도 관여하며, 급성 간손상에도 효과가 있다고 한다[6, 32]. 그러나 아직 미백 활성과 관련한 연구 보고는 미흡한 실정이다.

이에 이 연구에서는 *S. crispa* β -glucan을 B16F1 mouse melanoma 세포에 처리하여 멜라닌 생합성 및 tyrosinase 활성 억제 효능을 확인함으로써 피부 미백제로서의 활용 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)과 tyrosine, Triton X-100, mushroom tyrosinase, α -MSH, DOPA는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 또한 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, actin은 Santa cruz (Santa cruz, CA, USA) 제품을 사용하였고, anti-mouse IgG는 Gene Tex (Irvine, CA, USA) 제품을 사용하였다. 세포 배양을 위한 배양액 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지와 fetal bovine serum (FBS)은 Hyclones사(Logan, Utah, USA) 제품을 사용하였으며, 항생제

penicillin-streptomycin은 GIBCO사(Grand Island, NY, USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외 시약은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

S. crispa β -glucan의 추출

*S. crispa*에서 수용성 β -glucan을 추출하기 위하여 Park et al. [27]의 방법을 사용하였다. 인공적으로 배양한 *S. crispa* (Hanabiotech, Gyeonggi-do, Korea)의 버섯 자실체를 수분함량 4%로 건조시킨 후 분쇄기(FM 680T, Hanil, Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 100 mesh (직경 3.0-5.0 mm) 크기로 분쇄하였다. 분쇄된 버섯 분말 100 g을 증류수 2 l에 현탁시키고 1 N NaOH로 pH를 10으로 조정 후 2시간 동안 팽창시켰다. 추출탱크(Il-Shin Co., Seoul, Korea)에서 이 현탁액에 불용성 텅스텐 카바이드 나노입자(직경 10-500 nm, Inframat, Manchester, CT, USA)를 20% (w/v) 비율로 가한 후에 고속유화기(Misung Co., Seoul, Korea)로 20,000 g에서 40분간 유화시켰다. 이때 불용성 텅스텐 카바이드 나노입자는 현탁액의 blending을 향상시켜 주는 nanoknife로서의 역할을 하게 되며, *S. crispa*로부터 β -glucan을 추출할 때 효율을 높일 수 있고 비교적 균질한 크기의 입자를 얻을 수 있게 해 준다. 유화 작업 후에 증류수 20 ml을 추가하여 95°C에서 30시간동안 교반시킨 후, 6,500 g에서 20분간 원심 분리하였다. 원심분리된 상등액에 상등액 3배의 에탄올(95%, v/v)을 첨가한 후 4°C에서 overnight 시켰다. 냉침 후 6,500 g에서 20분간 원심분리하고 상등액은 4°C에서 24시간 보관한 후에 다시 6,500 g에서 20분간 원심분리하여 수용성의 상등액은 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 동결 건조된 크림색의 분말 형태인 β -glucan의 함량은 Megazyme β -glucan assay kit (K-YBGL, Megazyme Int., Wicklow, Ireland)를 사용하여 측정하였으며, 수용성 β -glucan의 함량은 70.2% 이었다. 그리고 β -glucan의 입도는 입자 크기분석기(Granulometer 1064, CILAS, Orleans, France)를 사용하여 측정하였으며 크기는 150 ± 14.1 nm이었다. 실험에서는 동결 건조된 β -glucan을 증류수에 용해시켜 사용하였다.

세포배양

B16F1 melanoma 세포는 미국세포주은행(ATCC: American Type Culture Collection, USA)으로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포 생존능 측정

B16F1 melanoma 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 안정화를 시킨 후 *S. crispa* β -glucan을 0, 10, 100, 1,000 μ g/ml 농도로 처리를 한 후 72시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well의

배지들을 제거하고 MTT solution (5 mg/ml in PBS)을 100 μ l씩 첨가하고, 37°C에서 4시간 반응시킨 후 MTT solution을 제거하고, 각 well에 100 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 MTT formazan을 완전히 용해시키기 위하여 15~20 분간 plate shaker로 흔들어 준 다음 microplate reader (Bio Tek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[33].

Mushroom tyrosinase inhibition assay

자외선 또는 주변 환경에 의해 tyrosinase가 활성을 갖게 되면 tyrosine (또는 DOPA)이 중간생성 단계인 DOPA chrome의 생성경로를 거쳐 자동 산화반응에 의해 멜라닌 고분자로 변화한다. L-tyrosine을 기질로 하여 중간 단계인 DOPA chrome의 생성여부를 측정하였다. 즉, 다양한 농도별로 희석한 *S. crispa* β -glucan을 10 μ l와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)에 녹인 1 mM L-tyrosine 170 μ l을 96 well plate에 넣고 mushroom tyrosinase (1,000 unit/ml) 20 μ l를 혼합한 후 상온에서 30분 배양한 후 490 nm에서 microplate reader (BioTek Instruments)를 이용하여 흡광도를 구하였다[12].

α -MSH에 의한 과생성 멜라닌 생성량 측정

B16F1 melanoma 세포를 60 mm culture dish에 5×10^5 cells/dish로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 배양을 하였다. 배지를 제거하고 200 nM의 α -MSH와 *S. crispa* β -glucan을 0, 10, 100, 1,000 μ g/ml 농도로 희석한 배지로 교체한 후 72시간을 더 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 세포를 PBS로 2번 세척하고, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 pellet을 멜라닌 정량에 사용하였다. 물에 불용성을 나타내는 멜라닌의 액화를 일으키기 위하여 10% DMSO가 함유된 1 N NaOH를 적정량 넣고 65°C 1시간 동안 반응을 시킨 후 microplate reader (BioTek Instruments)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[9].

α -MSH에 의한 과생성 tyrosinase 활성도 측정

B16F1 melanoma 세포를 60 mm culture dish에 5×10^5 cells/dish로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 배양을 하였다. 배지를 제거하고 200 nM의 α -MSH와 *S. crispa* β -glucan을 0, 10, 100, 1,000 μ g/ml 농도로 희석한 배지로 교체한 후 72시간을 더 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 세포를 PBS로 2번 세척하고, cell lysis buffer을 가하고 -80°C에서 30분 동안 세포를 용해시킨 후 12,000rpm에서 30분 동안 원심분리 하였다. 그리고 얻어진 상등액 40 μ l와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 2 mg/ml의 L-DOPA 160 μ l를 첨가하여 1시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 반응이 끝난 후 tyrosinase에 의해 DOPA로부터 형성되는 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하여 상대적 tyrosin-

ase 활성으로 나타내었다[16].

Western blot 분석

60 mm culture dish에 5×10^5 cells/dish로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 배양을 하였다. 배지를 제거하고 *S. crispa* β -glucan을 0, 10, 100, 1,000 μ g/ml 농도로 희석한 배지로 교체한 후 각 실험에 조건에 맞추어 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 세포를 PBS로 2번 세척하고, lysis buffer를 첨가하여 균질화 시킨 후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액에 포함된 단백질을 얻었다. 단백질의 정량은 bicinchoninic acid (BCA) 방법으로 실시하였으며, 동량의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 전이한 다음 5% skim milk in TBST (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 1시간 배양한 후 TBST로 15분씩 3회 반복하여 세척하였다. 세척된 membrane에 각 primary antibody를 24시간 반응시킨 후 TBST에서 15분간 3회 세척 후 secondary antibody를 2시간 반응 후 enhanced chemiluminescence (ECL) system으로 발색반응을 유도하여 발현 정도를 측정하였다[8].

통계분석

실험결과는 평균 \pm 표준오차로 표기하였으며, 자료는 SPSS 통계프로그램(version 24.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치분산분석으로 검정하였고 Scheffe 다중비교로 사후검정 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

S. crispa β -glucan의 투여량에 따른 세포 생존능의 변화

S. crispa β -glucan이 B16F1 melanoma 세포의 세포 생존능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행하였다 (Fig. 1). β -glucan을 0, 10, 100, 1,000 μ g/ml의 각 농도별로 투여한 후 72시간동안 배양하여 세포의 생존능을 관찰하였다. *S. crispa* β -glucan 투여 농도에 따른 B16F1 세포의 생존능은 유의한 변화를 확인할 수 없었다.

Mushroom tyrosinase inhibition assay

Tyrosinase에 대한 *S. crispa* β -glucan의 직접적인 영향을 알아보기 위하여 0, 40, 200, 500, 1,000 μ g/ml의 다양한 농도로 조제한 후 기질인 L-tyrosine을 이용하여 tyrosinase 활성 억제율을 알아보았다(Fig. 2). 양성 대조군으로 사용한 kojic 산의 경우 농도가 200, 500, 1,000 μ g/ml로 증가할수록 tyrosinase 활성을 각각 55.6%, 79.1%, 78.8% 감소시켰다(*p*<0.05). *S. crispa* β -glucan의 경우 40, 200, 500 μ g/ml 농도에서는 각각 tyrosin-

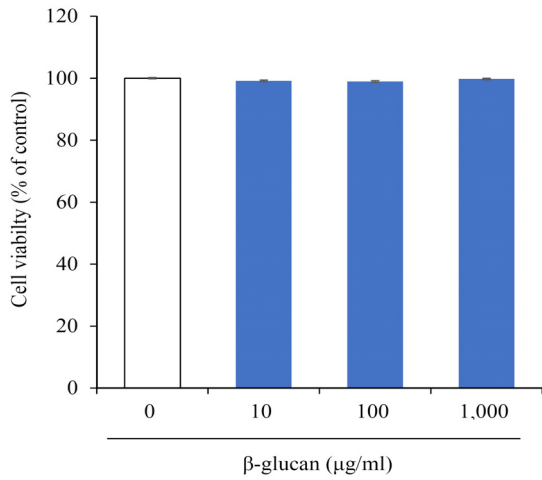


Fig. 1. Cell viability of B16F1 melanoma cells after treatment with *S. crispa* β-glucan. The cells were cultured in the presence of various concentrations of β-glucan for 72 hr. The viability of the cells was measured by MTT assay. Values are presented as means ± standard error of 5 independent experiments.

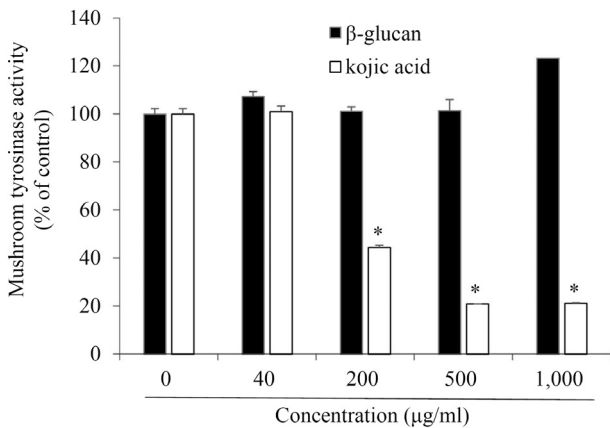


Fig. 2. Inhibitory effect of *S. crispa* β-glucan on mushroom tyrosinase activity. Assay solution contains different concentrations of β-glucan, 1,000 units/ml mushroom tyrosinase and 1 mM tyrosine. The assay mixture was incubated 25°C for 30 min. Then tyrosinase activity was measured at 490 nm. Values are presented as means ± standard error of 5 independent experiments. **p*<0.05 compared to control.

ase 활성이 107.3%, 101.2%, 101.4%로서 유의한 변화가 없었으며, 1,000 µg/ml 농도에서는 tyrosinase 활성이 123.2%로 증가하였다.

α-MSH에 의한 멜라닌 생성 유도 후 *S. crispa* β-glucan의 멜라닌 생성 억제효과

S. crispa β-glucan이 멜라닌을 생성하는 세포 수준에서 효과가 있는지를 확인하기 위하여 α-MSH로 자극한 B16F1 mel-

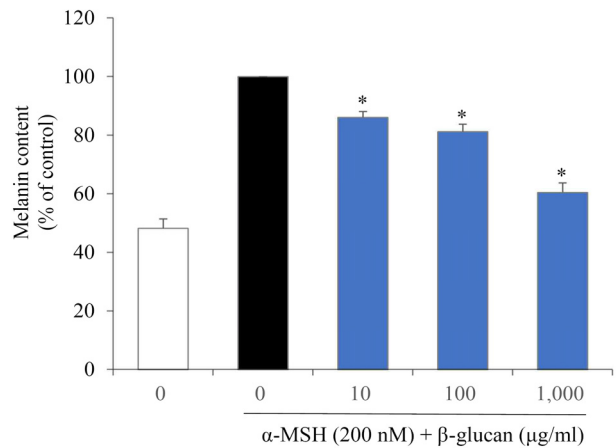


Fig. 3. Inhibitory effect of *S. crispa* β-glucan on melanin synthesis in B16F1 melanoma cells stimulated by 200 nM α-MSH. Cells were seeded at 5×10⁵ cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentration of β-glucan and α-MSH for 72 hr. Then melanin contents were measured at 405 nm. Values are presented as means ± standard error of 5 independent experiments. **p*<0.05 compared to α-MSH alone group.

anoma 세포에서 멜라닌 생성을 관찰하였다(Fig. 3). B16F1 melanoma 세포에서 200 nM의 α-MSH로 유도된 군은 대조군에 비하여 멜라닌 생성량이 207.5% 증가하였다. 여기에 β-glucan을 10, 100, 1,000 µg/ml의 농도로 투여하였을 때 α-MSH 유도군에 비하여 멜라닌 생성량은 각각 13.9%, 18.7%, 39.5% 감소하여 통계적으로 유의하였다(*p*<0.05).

α-MSH 투여 후 과발현된 tyrosinase의 활성도에 미치는 *S. crispa* β-glucan의 효과

B16F1 melanoma 세포에 α-MSH를 처리한 후 tyrosinase 활성도에 미치는 *S. crispa* β-glucan의 효과를 확인하였다(Fig. 4). *S. crispa* β-glucan을 10 µg/ml 투여 시 β-glucan을 투여하지 않은 α-MSH 유도군에 비하여 tyrosinase 활성도가 15.6% 감소하였으며, 100 µg/ml로 처리 시 26.9%, 최종 농도인 1,000 µg/ml에서는 43.2% 감소하여, tyrosinase의 활성을 통계적으로 유의하게 억제하였다(*p*<0.05).

α-MSH 투여 후 *S. crispa* β-glucan이 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 효과

S. crispa β-glucan이 세포수준에서 멜라닌 합성과 tyrosinase의 활성 감소에 영향을 주었으므로, α-MSH에 의해 과발현된 tyrosinase의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 5). *S. crispa* β-glucan을 100 µg/ml와 1,000 µg/ml로 처리하였을 때 α-MSH를 투여하여 과발현된 tyrosinase는 각각 37.5%와 46.3% 감소하였다(*p*<0.05). 즉, *S. crispa* β-glucan의 농도가 증가할수록 tyrosinase 단백질 발현이 감소하였다.

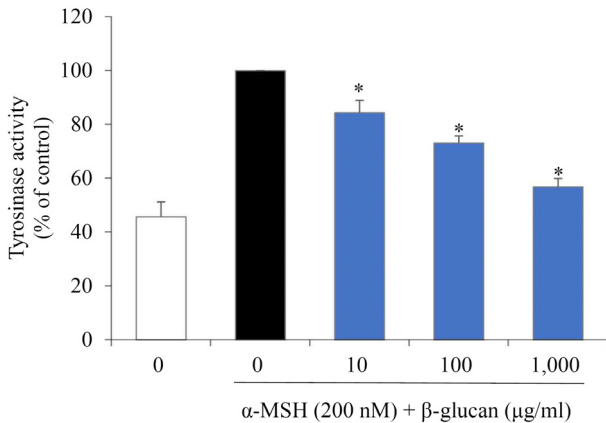


Fig. 4. Inhibitory effect of *S. crispa* β-glucan on tyrosinase activity in B16F1 melanoma cells stimulated by 200 nM α-MSH. Cells were seeded at 5×10⁵ cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentration of β-glucan and α-MSH for 72 hr. Then tyrosinase activity was measured at 490 nm. Values are presented as means ± standard error of 5 independent experiments. *p<0.05 compared to α-MSH alone group.

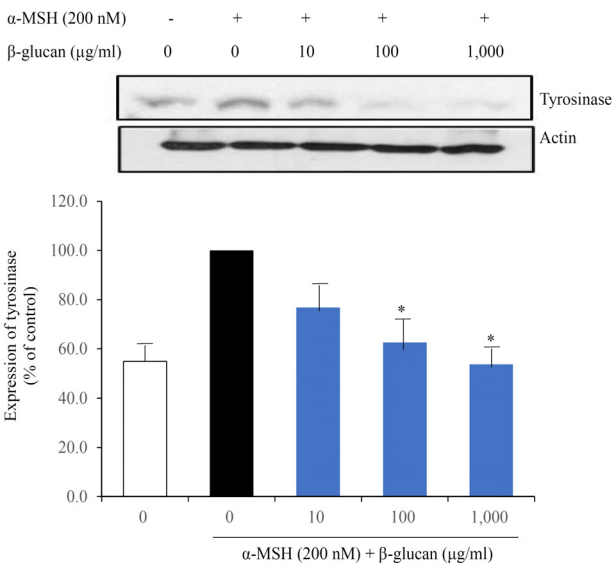


Fig. 5. Effect of *S. crispa* β-glucan on tyrosinase protein expression in B16F1 melanoma cells stimulated by 200 nM α-MSH. Cells were incubated with β-glucan and α-MSH for 3 days. The expression levels of tyrosinase protein were examined by western blot. Equal protein loadings were confirmed by actin expression. Values are presented as means ± standard error of 5 independent experiments. *p<0.05 compared to α-MSH alone group.

α-MSH 투여 후 *S. crispa* β-glucan이 TRP-1과 TRP-2 단백질 발현에 미치는 효과

S. crispa β-glucan의 TRP-1 (Fig. 6A)과 TRP-2 (Fig. 6B) 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다. β-glucan을 100 µg/ml와

1,000 µg/ml로 처리하였을 때 α-MSH를 투여하여 과발현된 TRP-1은 각각 24.4%와 46.1% 감소하였다(p<0.05). TRP-2의 경우에도 β-glucan을 100 µg/ml와 1,000 µg/ml로 처리하였을 때 α-MSH만 투여했을 때보다 각각 42.3%와 57.1% 감소하였다(p<0.05) 즉, *S. crispa* β-glucan의 농도가 증가할수록 TRP-1과 TRP-2 단백질 발현이 감소하였다.

***S. crispa* β-glucan의 MITF 활성화에 대한 효과**

S. crispa β-glucan이 tyrosinase, TRP의 강력한 전사 조절인자인 MITF 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 7). 200 nM로 처리된 α-MSH 유도된 군은 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 MITF 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, *S. crispa* β-glucan의 농도가 증가함에 따라 MITF 단백질 발현이 현저하게 감소하였다(100 µg/ml: 44.6% 감소, 1,000 µg/ml: 63.1% 감소, p<0.05).

고 찰

천연물 중에서도 각종 영양소를 함유하고 있는 기능성 버섯은 다양한 질병을 위한 약용과 식용의 경계에 있다. *S. crispa*은식이섬유가 풍부하고, β-glucan이 40% 이상 함유되어 있다고 알려지면서 재배량도 증가하고 있다[15, 20]. 또한 *S. crispa*은 필수아미노산과 비타민 E, 비타민 C가 다른 버섯에 비하여 높게 함유하고 있음이 확인되었다[29]. *S. crispa*은 다양한 생리활성 효과를 가진 것으로 알려지면서 환, 액상 등 건강기능식품과, 꽃송이버섯 추출물을 부 원료로 함유한 홍삼과 발효유 등의 가공식품도 시판되고 있다. 그러나 국내의 *S. crispa* 이용 기술은 제약이나 식품 분야에서만 활용되고 있으며, 화장품 분야에서는 활용이 저조한 실정이므로 이 연구에서는 *S. crispa*에서 추출한 β-glucan의 새로운 미백 물질로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

S. crispa β-glucan의 직접적인 미백활성 정도를 알아보기 위하여 mushroom tyrosinase assay를 수행하였다. Mushroom tyrosinase의 저해는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태변화에 관여함으로써 tyrosinase의 산화, 환원 과정을 조절할 수 있으므로, mushroom tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase 활성 억제 실험은 미백제 개발에 있어 유용한 일차적 평가법으로 인정받고 있다. Tyrosinase의 활성을 저해하는 것으로 이미 규명된 양성대조군인 kojic acid의 경우 농도 의존적으로 mushroom tyrosinase의 활성을 억제시켰으나, *S. crispa* β-glucan의 경우 농도가 증가하여도 mushroom tyrosinase의 활성에는 변화가 없었다, 즉, 시험관 내 실험에서는 *S. crispa* β-glucan이 tyrosinase 활성을 억제하지 못하고 있었다. 이는 꽃송이버섯, 상황버섯, 차가버섯 메탄올 추출물이 세포내에서 생성되는 멜라닌 합량 및 tyrosinase 활성에 효과적으로 나타났으나, 이들 중 상황버섯만이 mushroom tyrosin-

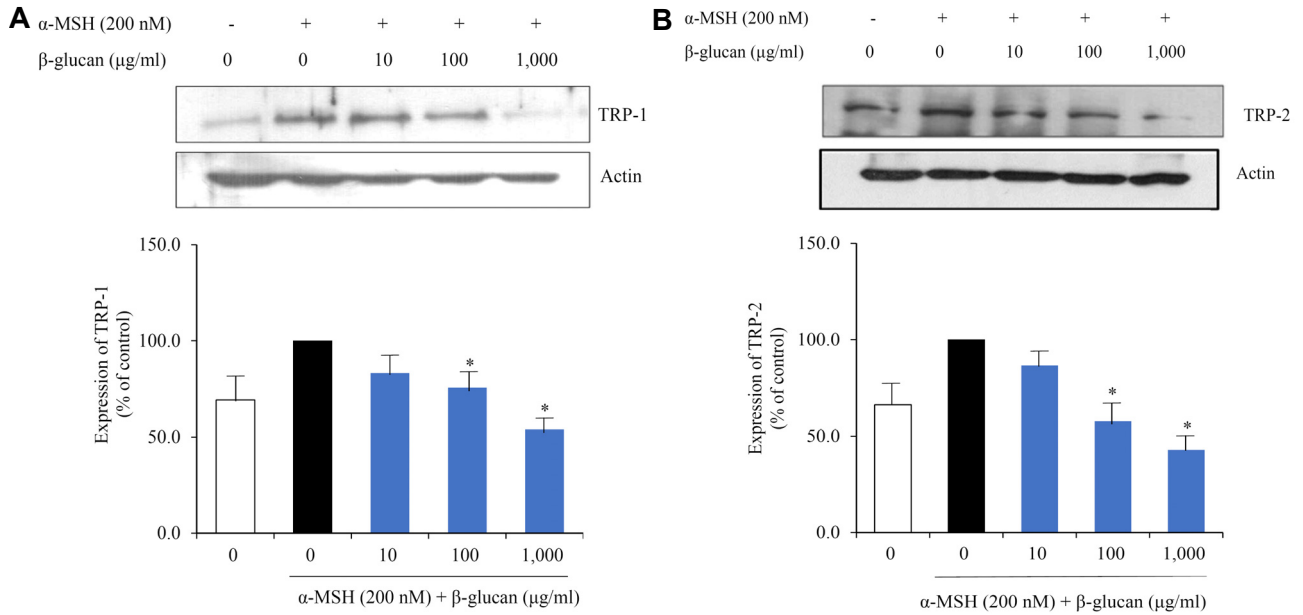


Fig. 6. Effect of *S. crista* β-glucan on TRP-1 (A) and TRP-2 (B) protein expression in B16F1 melanoma cells stimulated by 200 nM α-MSH. Cells were incubated with β-glucan and α-MSH for 3 days. The expression levels of TRP-1 and TRP-2 proteins were examined by Western blot. Equal protein loadings were confirmed by actin expression. Values are presented as means ± standard error of 5 independent experiments. **p*<0.05 compared to α-MSH alone group.

ase 활성에 가장 효과적이었으며, 꽃송이 버섯추출물은 mushroom tyrosinase 활성에는 영향이 없었다는 연구 결과와 일치

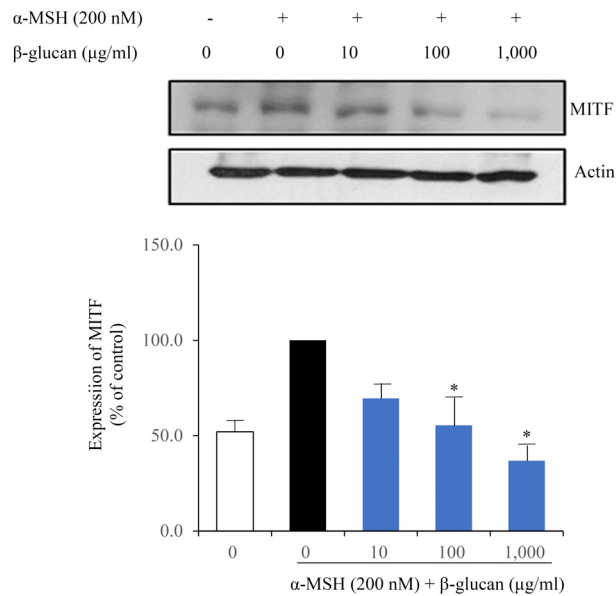


Fig. 7. Effect of *S. crista* β-glucan on MITF protein expression in B16F1 melanoma cells stimulated by 200 nM α-MSH. Cells were incubated with β-glucan and α-MSH for 3 days. The expression levels of MITF protein were examined by Western blot. Equal protein loadings were confirmed by actin expression. Values are presented as means ± standard error of 5 independent experiments. **p*<0.05 compared to α-MSH alone group.

하고 있었다[17]. 따라서 β-glucan이 직접적으로 멜라닌 합성 초기단계에 관여하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 효과는 낮았지만 세포의 대사과정에 영향을 끼쳐 멜라닌 색소를 억제할 가능성을 확인하기 위하여 B16F1 melanoma 세포수준에서 미치는 영향을 알아보았다.

S. crista β-glucan이 B16F1 melanoma 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *S. crista* β-glucan의 세포생존능을 확인한 결과 대조군에 비하여 유의할 만한 변화를 나타내지 않았다. 따라서 *S. crista* β-glucan은 세포사멸과 같은 세포독성이 아닌 세포 내 tyrosinase 활성을 억제할 것으로 판단되어 B16F1 melanoma 세포수준에 미치는 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성에 대한 효능을 측정하였다.

멜라닌 생성을 유도하는 것으로 알려진 α-MSH는 멜라닌생성 유발 물질 중에서 가장 강력한 것으로 알려져 있다. α-MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비되는 pleiotropic molecule로서 포피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절 및 흑색종 세포와 실험동물의 멜라닌 세포의 멜라닌 생성을 자극한다[19]. 또한 세포내에 α-MSH를 처리시 세포 구조를 이루는 actin filament들이 재구성되면서 세포 형태가 수지상돌기가 많은 수지상 세포(dendritic cell)로 변하여 α-MSH 자극에 의해 생성된 멜라닌 방출을 용이하게 한다[18]. *S. crista* β-glucan이 α-MSH로 유도된 과생성 tyrosinase의 활성과 melanin 합성에 미치는 영향을 확인한 결과 *S. crista* β-glucan의 농도가 증가할수록 α-MSH로 유도된 과생성 tyrosinase의 활성이 억제되었으며, 과생성 melanin 합성도

감소하였다. 이는 *S. crispa* β -glucan이 멜라닌 생성을 자극하는 α -MSH에 의해 유도되어진 세포내 tyrosinase 활성을 저해함으로써 멜라닌 합성량도 감소됨을 의미하는 것으로 보인다. 생체 내에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 DOPA를 생성시키고 다시 DOPA quinone으로 산화시키는 과정으로서 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해서 멜라닌이 생성되며, 이 과정에서 tyrosinase가 주요 효소로 작용한다[7, 34]. 따라서 멜라닌 생성과정의 주 효소로 여겨지고 있는 tyrosinase의 작용을 억제한다면 효과적으로 멜라닌 합성을 억제할 수 있을 것이다.

멜라닌 합성에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 단백 발현을 조절하는 기전은 크게 전사 이전과 그 이후의 단계로 구분할 수 있는데, 전사 이전 단계 중의 하나인 cAMP 경로는 멜라닌 합성과정 조절과 세포분화에 중요한 역할을 하며, cAMP 경로의 활성이 지속되면 많은 양의 멜라닌이 축적되고 멜라닌 세포의 말단에 분화가 일어나게 된다[2, 23]. 자외선 등의 자극에 의해 α -MSH와 MC1R이 결합하여 세포내 cAMP 농도를 증가시켜, cAMP 의존적인 protein kinase인 PKA를 활성화시킨다. PKA는 전사조절 인자로 알려진 CREB을 인산화시킬 수 있고, 인산화된 CREB은 멜라닌 생성 주효소의 전사를 증가시키는 tyrosinase promoter 영역에 결합하는 MITF 발현을 증가시킨다. MITF는 tyrosinase와 TRP의 강력한 전사 조절인자로서, MITF는 핵으로 이동하여 DNA의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 promoter에 결합하여 각각의 유전자 발현을 증가시켜 멜라닌생성을 유발한다[1].

이 연구에서 멜라닌 합성에 관계된 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 단백질 발현에 미치는 β -glucan의 영향을 확인한 결과, *S. crispa* β -glucan은 α -MSH로 유도되어진 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 단백질 발현을 효과적으로 감소시켰다. 따라서 *S. crispa* β -glucan이 세포내 α -MSH로 유도된 멜라닌 생성을 유의적으로 감소시키는 것이 세포내 tyrosinase가 작용하는 단계의 전이나, 후 어떠한 과정에 영향을 미쳐 활성을 억제하는 것이라고 추정할 수 있다. 또한 *S. crispa* β -glucan이 α -MSH로 유도되어진 MITF 단백질 발현에 대한 영향을 측정한 결과에서도 효과적으로 MITF 발현을 감소시켰다. 즉, *S. crispa* β -glucan은 MITF 발현을 억제하여 tyrosinase 등의 단백질의 발현도 감소시킴으로써 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 보면 *S. crispa* β -glucan은 외부자극제인 α -MSH를 처리하여 과생성된 멜라닌 합성을 억제하였다. 또한 멜라닌 합성에 관여하는 key enzyme인 tyrosinase의 발현을 효과적으로 억제하였으므로 미백제로서 유용하게 활용할 가치가 있는 것으로 판단한다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest

with the contents of this article.

References

- Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T. J., Bille, K., Fisher, D. E., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. 1998. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* **142**, 827-835.
- Buscà, R. and Ballotti, R. 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 60-69.
- del Marmol, V. and Beermann, F. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS. Lett.* **381**, 165-168.
- Gaggioli, C., Buscà, R., Abbe, P., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. 2003. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Res.* **16**, 374-382.
- Harada, T., Masuda, S., Arai, M., Adachi, Y., Nakajima, M., Yadomae, T. and Ohno, N. 2005. Soy isoflavone aglycone modulates a hematopoietic response in combination with soluble beta-glucan: SCG. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 2342-2345.
- Hida, T. H., Kawaminami, H., Ishibashi, K., Miura, N. N., Adachi, Y. and Ohno, N. 2013. Oral administration of soluble beta-glucan preparation from the cauliflower mushroom, *Sparassis crispa* (Higher Basidiomycetes) modulated cytokine production in mice. *Int. J. Med. Mushrooms* **15**, 525-538.
- Hearing, V. J. and Jiménez, M. 1987. Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **19**, 1141-1147.
- Hirata, N., Naruto, S., Ohguchi, K., Akao, Y., Nozawa, Y., Iinuma, M. and Matsuda, H. 2007. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 4897-4902.
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474-1478.
- Jang, Y. A., Kim, H. N., Yang, J. C., Lee, J. W., Kim, B. A. and Lee, J. T. 2015. A study on the possibility of extracts from *Sparassis crispa* for cosmetic ingredients. *J. Kor. Oil Chemists' Soc.* **32**, 731-739.
- Kim, H. H., Lee, S., Singh, T. S., Choi, J. K., Shin, T. Y. and Kim, S. H. 2012. *Sparassis crispa* suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: Role of calcium, mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B. *Int. J. Mol. Med.* **30**, 344-350.
- Kim, Y. J., No, J. K., Lee, J. H. and Chung, H. Y. 2005. 4,4'-Dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 323-327.
- Kimura, T. 2013. Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa*. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 982317.
- Kodani, S., Hayashi, K., Hashimoto, M., Kimura, T., Dombo,

- M. and Kawagishi, H. 2009. New sesquiterpenoid from the mushroom *Sparassis crispa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 228-229.
15. Kwon, A. H., Qiu, Z., Hashimoto, M., Yamamoto, K. and Kimura, T. 2009. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Surg.* **197**, 503-509.
 16. Laskin, J. D. and Piccinini, L. A. 1986. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261**, 16626-16635.
 17. Lee, J. S. 2011. Antioxidant and skin-whitening activities of mushrooms and seaweeds extracts. M. S. Dissertation, Incheon University, Incheon, Korea.
 18. Lee, S., Jung, H., Oh, C. and Choe, T. 2004. Mechanism of melanogenesis inhibition by melanoston isolated from yeast. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 118-124.
 19. Lerner, A. B. and McGuire, J. S. 1961. Effect of alpha- and betamelanocyte stimulating hormones on the skin colour of man. *Nature* **189**, 176-179.
 20. Lim, C. W., Kang, K. K. Yoo, Y. B., Kim, B. H. and Bae, S. H. 2012. Dietary fiber and β -glucan contents of *Sparassis crispa* fruit fermented with *Lactobacillus brevis* and *Monascus pilosus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1740-1746.
 21. Lim, J. T. 1999. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. *Dermatol. Surg.* **25**, 282-284.
 22. Liu, S. J., Pan, I. H. and Chu, I. M. 2007. Inhibitory effect of p-hydroxybenzyl alcohol on tyrosinase activity and melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1135-1139.
 23. Medrano, E. E., Yang, F., Boissy, R., Farooqui, J., Shah, V., Matsumoto, K., Nordlund, J. J. and Park, H. Y. 1994. Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. *Mol. Biol. Cell* **5**, 497-509.
 24. Oh, D. S. Park, J. M., Park, H., Ka, K. H. and Chun, W. J. 2009. Site characteristics and vegetation structure of the habitat of Cauliflower Mushroom (*Sparassis crispa*). *Kor. J. Mycol.* **37**, 33-40.
 25. Ohno, N., Miura, N. N., Nakajima, M. and Yadomae, T. 2000. Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 866-872.
 26. Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G. and Prota, G. 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 85-90.
 27. Park, H. G., Shim Y. Y., Choi, S. O. and Park, W. M. 2009. New method development for nanoparticle extraction of water-soluble beta-(1 \rightarrow 3)-D-glucan from edible mushrooms, *Sparassis crispa* and *Phellinus linteus*. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 2147-2154.
 28. Seiberg, M. 2001. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* **14**, 236-242.
 29. Shin, H. J., Oh, D. S., Lee, H. D., Kang, H. B., Lee, C. W. and Cha, W. S. 2007. Analysis of mineral, amino acid and vitamin contents of fruiting body of *Sparassis crispa*. *J. Life Sci.* **17**, 1290-1293.
 30. Shin, N. H., Ryu, S. Y., Choi, E. J., Kang, S. H., Chang, I. M., Min, K. R. and Kim, Y. 1998. Oxysesveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 801-803.
 31. Yamamoto, K., Kimura, T., Sugitachi, A. and Matsuura, N. 2009. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of beta-1,3-D-glucan purified from Hanabiratake, *Sparassis crispa*. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 259-263.
 32. Yan, G. H. and Choi, Y. H. 2014. *Sparassis crispa* attenuates carbon tetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Kor. J. Phys. Anthropol.* **27**, 113-122.
 33. Yang, Y., Chen, Q. and Zhang, J. T. 2002. Structural and functional consequences of mutating cysteine residues in the amino terminus of human multidrug resistance-associated protein 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 44268-44277.
 34. Yokoyama, K., Yasumoto, K., Suzuki, H. and Shibahara, S. 1994. Cloning of the human DOPochrome tautomerase/tyrosinase-related protein 2 gene and identification of two regulatory regions required for its pigment cell-specific expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 27080-27087.

초록 : 꽃송이버섯에서 추출한 β -glucan의 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성 억제 효능

오철현^{1,2} · 구미정^{1,2} · 이윤희^{1,2*}

(¹고신대학교 건강증진천연물연구소, ²고신대학교 의과대학 예방의학교실)

천연물에서 피부 미백 효능을 가진 화합물을 개발하기 위한 노력이 많이 이루어지고 있다. 꽃송이버섯 (*Sparassis crispa*)은 β -glucan의 함량이 건조중량의 40% 이상으로서 항암과 면역증강 효과가 있는 것으로 입증되어 약용으로도 인정받고 있다. 이 연구에서는 *S. crispa* β -glucan의 멜라닌 생합성 및 tyrosinase 활성억제 효능을 확인함으로써 피부 미백제로서의 활용 가능성을 평가하고자 하였다. 외부 자극제인 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)와 *S. crispa* β -glucan (10, 100, 1,000 μ g/ml)을 B16F1 melanoma 세포에 투여하여 멜라닌 생성량과 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2, microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현 정도에 대해서는 western blot으로 분석하였다. *S. crispa* β -glucan을 10, 100, 1,000 μ g/ml의 농도로 투여하였을 때 α -MSH 만 투여군에 비하여 멜라닌 생성이 각각 13.9%, 18.7%, 39.5% 감소하였다. *S. crispa* β -glucan을 10, 100, 1,000 μ g/ml의 농도로 투여하였을 때 β -glucan을 투여하지 않은 α -MSH 유도군에 비하여 tyrosinase 활성도는 각각 15.6%, 26.9%, 43.2% 억제되었다. 또한 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2, MITF 단백질 발현도 효과적으로 감소시켰다. 본 연구 결과에 따르면 *S. crispa* β -glucan은 MITF 발현을 억제함으로써 tyrosinase 발현을 감소시켜 멜라닌 생성을 억제시킨 것으로 판단된다. 따라서 *S. crispa* β -glucan은 미백제로서 유용하게 활용할 수 있을 것으로 생각한다.