

흰목이버섯 추출물의 미백 및 주름개선 효과

이광호* · 박현수* · 윤일주* · 신용봉* · 백영찬* · 구대호*
김성규* · 정호경** · 심미옥** · 조현우** · 정원석** · 김명석*

*(주)하원제약, **전남한방산업진흥원

Whitening and Anti-Wrinkle Effects of *Tremella Fuciformis* Extracts

Kwang Ho Lee*, Hyun Soo Park*, Il Joo Yoon*, Young Bong Shin*, Young Chan Baik*, Dae Ho Kooh*,
Sung Kew Kim*, Ho Kyung Jung**, Mi Ok Sim**, Hyun Woo Cho**, Won Seok Jung** and Myoung Seok Kim*

*Central Research Institute of Hawon Pharmaceutical, Jangheung 59338, Korea.

**Jeollanamdo Development Institute of Korean Traditional Medicine, Jangheung 59338, Korea.

ABSTRACT

Background : The white jelly mushroom (*Tremella fuciformis*), one of the most popular edible fungi, has medicinal properties. However, the effects of *T. fuciformis* in skin whitening or anti-wrinkle efficacy has not been defined to date. The aim of the present study was to investigate the effects of *T. fuciformis* extracts on whitening and anti-wrinkle efficacy in skin cells.

Methods and Results : We prepared *T. fuciformis* extracts with water. The extracts (80°C) contained 12.11 mg/g polyphenol and 8.54 mg/g flavonoid concentration. *T. fuciformis* extracts markedly decreased melanin contents and tyrosinase activity in α -MSH-stimulated melanocytes (B16F10 cells). In addition, the mRNA expression of melanin formation factors, such as microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) were significantly down-regulated in α -MSH-stimulated melanocyte. Furthermore, *T. fuciformis* extracts increased the synthesis of type I procollagen and reduced mRNA expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) in the human dermal fibroblast (HDFn cells). These data indicated that *T. fuciformis* extracts induce repression of cellular melanogenesis and protect against wrinkles caused by UVB-stimulated damage.

Conclusions : Thus *T. fuciformis* extracts could be a cosmetic candidate for skin whitening and anti-wrinkle effects.

Key Words : *Tremella fuciformis*, Anti-Wrinkle, Collagen, Melanin, Natural Product, Whitening

서 언

흰목이버섯 (*Tremella fuciformis*)은 이담자균강 (*Heterobasidiomycetes*) 흰목이목 (*Tremellales*) 흰목이과 (*Tremellaceae*)에 속하며 봄부터 가을에 걸쳐 활엽수의 고목, 마른 가지 및 줄기 위에 발생하는 목재부후성 버섯으로 한국, 일본, 중국, 유럽 및 아메리카 등 전 세계에 걸쳐 분포하고 있다 (Oh *et al.*, 2006). 일반명은 흰 젤리버섯 (white jelly fungus) 혹은 은이 (silver ear)로 불리고 있으며, 일본에서는 '로키쿠라게'로 불린다 (Ko, 2012). 또한 중국에서는 예로부터 목이버섯을 꾸준히

먹으면 면역체계가 활성화되어 암과 노화를 막고, 고혈압과 동맥경화를 예방할 수 있다고 알려져 있다 (Chen and Cai, 2008). 흰목이버섯의 생리활성에 대한 연구에서는 흰목이버섯에서 분리한 산성다당류를 이용하여 동물모델에서 sarcoma-180에 대해 37 - 64% 정도의 항 종양활성을 보이는 것으로 나타났다 (Ukai *et al.*, 1972). 또한 흰목이버섯 추출물이 체지방 개선 및 콜레스테롤 증가를 억제하는 효능이 있다는 결과도 보고되고 있으며, 장·단기적 항스트레스 효과가 있다고 알려져 있다 (Cheng *et al.*, 2002; Cheung, 1996; Ko *et al.*, 2009). 추가적으로 흰목이버섯이 항산화 효과가 매우 뛰어나

†Corresponding author: (Phone) +82-70-8260-6607 (E-mail) mskim1210@naver.com

Received 2015 December 21 / 1st Revised 2015 December 28 / 2nd Revised 2016 January 11 / 3rd Revised 2016 January 18 / Accepted 2016 January 18
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.

나며, 면역작용에 중요한 역할을 하는 T세포를 활성화 시킨다는 연구도 보고되었다 (Li *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014). 이와 같이 다양한 효능이 밝혀지고 있지만 아직까지 미백 및 주름 개선과 연관되어 피부에 관한 연구는 알려진바 없다.

건강한 피부를 만들기 위한 현대인의 노력이 많아지면서 여러 가지 미백 및 주름개선 화장품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다양한 방법으로 피부질환과 노화를 예방하려는 관심이 높아지고 있다 (Jung *et al.*, 2014; Kim and Lee, 2015a; Urabe *et al.*, 1994). 색소침착은 자외선 흡수에 의한 피부 세포의 손상을 억제할 목적으로 melanin 생성이 증가하여 진행되며 melanin 합성은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2, DCT)에 의해 생성된다. 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환되고 eumelanin과 pheomelanin으로 합성되게 된다 (Kim and Lee, 2015a; Parvze *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2000). Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 melanin 합성을 조절하는 인자로 알려져 있으며, 이를 통하여 melanin 합성에 중요한 역할을 하는 TRP-1, TRP-2의 발현을 조절하게 된다 (Liu and Fisher, 2010; Olivares and Solano, 2009). 피부가 노화가 진행됨에 따라 주름이 발생하게 되는데 노화가 진행될수록 피부를 구성하는 물질인 collagen, elastin 등 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소되며, collagenase의 생합성이 증가하여 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현이 증가되면 진피 내 기질 단백질 분해를 유도하여 피부탄력을 저하시키고 주름을 형성한다 (Brenneisen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). 결국 collagen의 생성을 촉진하게 만들거나 collagen을 분해하는 collagenase 및 MMPs의 발현이나 활성을 저해할 수 있다면 주름을 억제할 수 있다고 알려지고 있다 (Jung *et al.*, 2014).

현재 arbutin, kojic acid, linoleic acid를 포함하는 tyrosinase 저해제가 주로 미백 개선 효능을 가지는 원료로 사용중이며, 피부 주름 개선 효과가 있는 다양한 소재로는 retinol, epigallocatechin gallate, retinyl palmitate, adenosine 등이 있다 (Chun *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2003). 하지만 피부 안정성 등의 문제가 알려지게 되면서 비교적 안전성이 높은 천연물 소재의 기능성 제품 개발이 요구되고 있으며, 천연물 및 한방 추출물을 이용한 화장품은 꾸준히 인기를 끌고 있다. 따라서 본 연구는 천연 작물 소재인 흰목이버섯 추출물에 대한 미백 및 주름개선 효능을 평가하여 향후에 기존보다 안전성 높고 효과적인 제품화 소재로 이용하기 위해 진행하였다.

재료 및 방법

1. 시료 추출물 제작

흰목이버섯 시료를 200 g씩 정량하여 열수추출물은 각각

80℃와 100℃ 환류추출기를 이용하여 추출하였다. 모든 추출물들은 Rotary evaporator (NE-1001V, Eyela, Tokyo, Japan)를 이용 수조 온도 70℃로 감압 농축하고 동결건조기 (PVTFD20A, Ilshin, Dongducheon, Korea)를 이용하여 쿨드 트랩 온도를 -70℃ 기본설정으로 하여 동결건조를 실시하였다. 수득률은 80℃와 100℃ 각각 13%, 23%로 나타났다.

2. 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol (F9252, Sigma, St. Louis, MO, USA) 시약을 각각 160 μ l를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 10,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하였으며 상등액을 이용하여 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질의 검량선 작성을 위해 gallic acid (G7384, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다.

3. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 96 well plate에 농도별 시료 10 μ l에 10% aluminum nitrate (237973, Sigma, St. Louis MO, USA)와 1M potassium acetate (236497, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각각 4 μ l, methanol을 82 μ l를 첨가한 뒤 40분간 암실에서 반응 한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질의 검량선 작성을 위해 rutin (R5143, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하였다.

4. 세포배양

B16F10 과 HDFn 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양 받았으며, penicillin/streptomycin 100 unit/ml (10378, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 과 10% FBS (16000, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)가 함유된 DMEM 배지 (11995, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator (MCO-17A1, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

5. MTS 시험법을 이용한 세포 생장률 평가

96 well plate에 5×10^4 cells/ml 로 분주하였고 Media-FBS 10% 조건에서 각 시료 추출물을 농도별로 72시간 처리하였다. 그 후의 각각 세포 배양액 용량의 1/10 배의 MTS 용해액을 첨가한 후 37℃에서 2시간 배양한 후 ELISA reader (Spectrostar-nano, BMG Labtech, Offenburg, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Tyrosinase 효소의 활성 측정 및 melanin 함량측정

6 well plate에 1×10^5 cells/ml 의 B16F10 cell suspension을 가하여 CO₂ incubator에서 안정화 시켰다. 그 후 시료의 추출물을 농도별로 처리하고 1시간 후에 100 nM의 α -MSH

를 각 세포에 처리하였다. 72시간 후 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척한 후 lysis buffer를 이용하여 세포를 용해하였다. 4°C, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성측정 용액으로 사용하였고, Bradford 법으로 (Bradford, 1976) 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산 하였다. 시료 50 μ l 와 10 mM L-DOPA 50 μ l 를 분주하여 혼합한 후 37°C에서 30분 반응시킨 뒤 ELISA reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany)를 이용하여 490 nm 의 파장으로 흡광도를 측정하였다. Melanin 함량은 lysis buffer를 이용하여 세포를 용해한 뒤 4°C, 15,000 rpm에서 30 분간 원심분리를 한 후 세포 침전물을 이용하였다. 세포 침전물에 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 첨가하여 80°C에서 1시간 동안 melanin을 용해시킨 뒤 475 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

7. Real-time PCR을 이용한 미백 및 주름 관련 유전자 발현분석

미백관련 인자 발현에 미치는 영향을 검증하기 위해 B16F10 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 안정화 시킨 후 다양한 농도의 시료를 1시간 처리한 후 α -MSH (100 nM)로 melanin 생성을 유도하여 24시간 뒤에 세포를 수확하였다. 주름 관련 인자 발현을 확인하기 위해 HDFn 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well 세포로 분주하여 안정화 시킨 후 다양한 농도의 시료를 1시간 처리한 후 UV (300 mJ/cm²)를 처리하여 주름 형성 관련 유전자를 유도하여 24시간 후에 세포를 수확하였다.

각각 처리된 세포를 TRIzol (15596018, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 1 ml 를 가하여 실온에서 교반하였다. 클로로포름 200 μ l 를 넣고 다시 교반하여 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상층액 500 μ l에 이소프로판올을 가하여 다시 원심 분리하여 RNA pellet을 얻었다. 5 μ g 의 mRNA를 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystem, Foster city, CA, USA)를 이용하여 cDNA로 합성을 하였다. 합성된 cDNA 1 μ l, taqman primer 1 μ l, Taqman Universal Master Mix II (Applied biosystem, Foster city, CA, USA) 10 μ l, 3차 증류수 8 μ l 를 넣고 real-time PCR 기기 (ABI7500, Applied biosystem, Foster city, CA, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 TaqMan gene은 Applied biosystem 에서 검색하여 주문 후 사용하였다. 또한 real-time PCR 반응 조건은 50°C에서 2분 95°C에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 15초, annealing 온도 60°C에서 15초인 사이클을 40회 반복 수행하였다.

8. Western blot을 통한 tyrosinase 단백질의 발현 측정

B16F10 melanoma 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/ml로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 교환하고 72시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 200 μ l 를 첨가하여 세포를 용해시키고 15,000 rpm으로 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 세포막 성분들을 제거하였다. 원심분리하여 얻은 단백질을 Bradford 법으로 (Bradford, 1976) 정량하였으며, 30 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동한 후 PVDF membrane에 transfer 하였다. Transfer가 끝나면 TBST buffer로 2회 이상 씻은 후 꺼내서 5% skin milk로 blocking 하였다. 그 뒤 1차 antibody (1 : 1000)를 overnight 하여 붙인 뒤 다시 2차 antibody를 붙이고 ECL detection reagents (Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 단백질 발현을 현상하였다.

9. Collagen 합성 촉진효과 측정

피부의 주름개선 효과를 검증하는 collagen 합성효과를 보기 위해 HDFn 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/well씩 24시간 배양시킨 다음 새로운 무혈청 배지로 단계적으로 희석한 시료를 분주하여 가하고 다시 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양액을 얻은 후 procollagen type I C-peptid EIA kit (MK101, Takara Bio inc, Shiga, Japan)을 이용하여 매뉴얼에 따라 진행하였다. 1차 collagen 항체가 있는 96 well plate에 세포 배양액 20 μ l 와 2차 항체 100 μ l 를 혼합하여 넣은 후 37°C에서 3시간 반응 시킨 후 PBS로 4회 세척한 다음 ELISA reader (BMG Labtech)를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

10. 통계분석

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS (18.0, Statistical Package for Social Sciences, Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 일원변량분석 (One way ANOVA)을 시행하였다. 또한 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 유의성이 있는 경우 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 흰목이버섯 추출물의 총 페놀함량 및 플라보노이드 함량 측정

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서, phenolic hydroxyl (OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며, 항산화, 항암

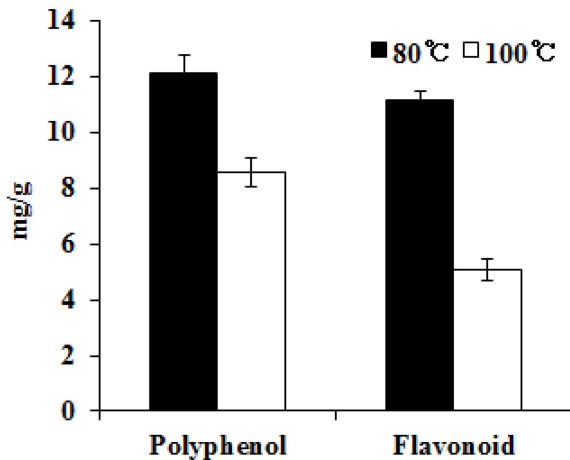


Fig. 1. Contents of total polyphenol and flavonoid in *Tremella fuciformis* extracts. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown.

등의 다양한 생리활성을 가진다 (Kim *et al.*, 2011). 폴리페놀 함량을 gallic acid, 총 플라보노이드 함량은 rutin을 기준물질로 하여 측정하였다. 80°C와 100°C 추출물에서의 각 폴리페놀 함량은 12.11 mg/g, 8.54 mg/g으로 나타났으며 플라보노이드 함량은 11.12 mg/g, 5.05 mg/g으로 확인되었다. 즉, 80°C 추출물이 100°C 추출물에 비해 더 많은 양의 폴리페놀 및 플라보노이드를 함유하고 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 최근 연구에 식물 추출물에서 페놀함량에 비례하게 항산화 효능을 나타내어 (Suh *et al.*, 2014), 흰목이버섯에서도 함유된 페놀 및 플라보노이드로 인해 항산화 효능 및 다양한 생리활성 효능을 나타낼 것으로 예상된다.

2. 흰목이버섯 추출물의 세포독성 평가

각 흰목이버섯 추출물이 세포 생존율에 영향을 주는지 검사하기 위해서 B16F10 및 HDFn 세포에 각 추출물을 처리하고 MTS assay 방법으로 생존율을 측정하였다. 각 흰목이버섯 추출물의 농도는 31.2 - 1,000 μ g/mL 범위에서 처리하였다. 100°C 추출물에서는 독성이 없었으나 80°C 추출물에서는 500 μ g/mL 농도부터 세포 생존율에 영향이 있으므로, 모든 실험은 높은 생존율을 보이는 500 μ g/mL 이하 농도에서 진행하였다 (Fig. 2).

3. 흰목이버섯 추출물에 의한 B16F10 melanoma 세포에서의 melanin 함량 및 tyrosinase 저해 활성

Melanin은 세포 내 소기관인 리보솜에서 tyrosinase 효소의 생합성에서 합성되기 시작한다. 이 효소의 작용으로 아미노산의 일종인 티로신에서 몇 단계의 합성을 통해 기저층의 세포 흑색소 표면에 검고 갈색의 작은 melanin 입자가 만들어지게 된다. 또한 이 tyrosinase 효소는 전사 인자인 MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 와도

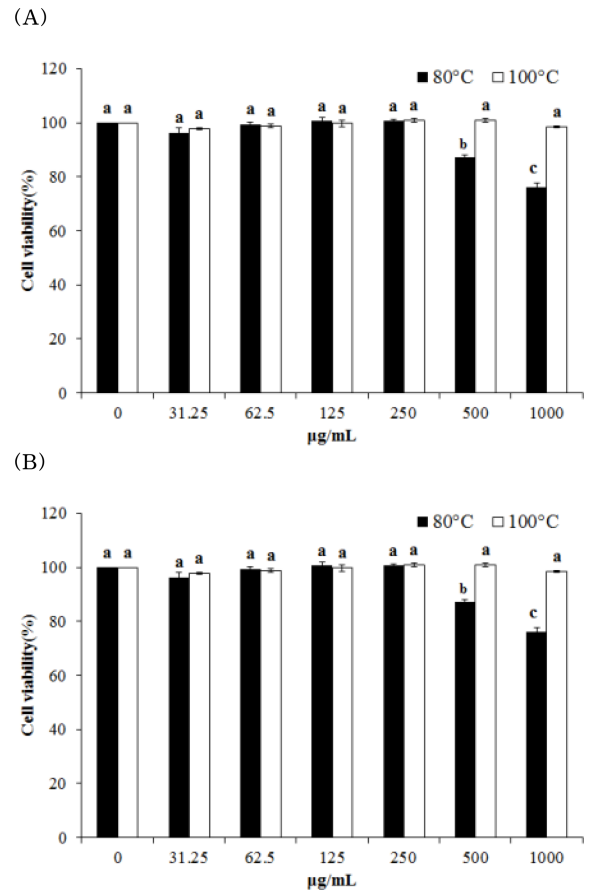
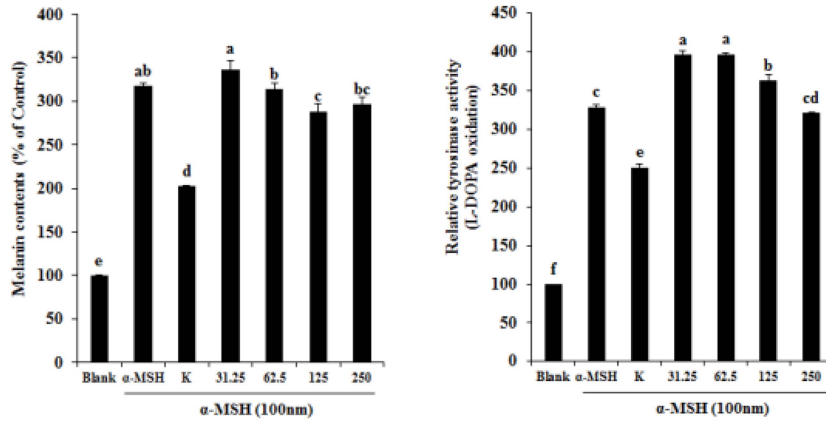


Fig. 2. Cytotoxicity of *Tremella fuciformis* extracts on the (A); B16F10 melanocyte and (B); HDFn cells. Cell cytotoxicity was evaluated with the MTS assay. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. Different letters (a - c) are significantly difference between groups based on one-way ANOVA with Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at $p < 0.05$ post hoc.

밀접한 관계가 있다 (Kim and Lee, 2015a; Parvze *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2000). 흰목이버섯 추출물이 melanin 형성 과정 중 억제효과를 나타내는지 규명하기 위해 tyrosinase의 활성을 확인하였다. B16F10 melanoma cell에서 각 시료를 농도별로 처리하여 72시간 후 측정하였으며, 대조군으로는 kojic acid (100 μ g/mL)를 사용하였고 모든 결과는 blank 대비 백분율로 나타내었다. 80°C 추출물에서 melanin 함량은 농도 의존적으로 감소했으나, 100°C 추출물에서는 효능을 보이지 않았다. tyrosinase 저해활성을 확인할 결과에서도 80°C 추출물에서 62.5 μ g/mL 농도부터 농도 의존적으로 감소하였고 100°C 추출물에서는 저해효과를 보이지 않았다 (Fig. 3). 기존의 천연물 중의 하나인 미선나무 추출물의 결과 (Kim and Lee, 2015b)에서 최대 25% 정도 저해효과를 보인 것에 비해 흰목이버섯 추출물이 월등한 저해효과를 나타내고 있기 때문에 다른 천연

(A) 80°C extracts



(B) 100°C extracts

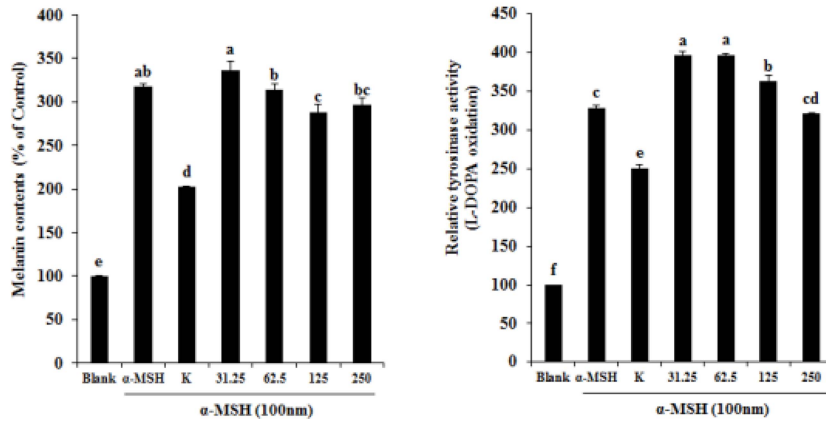


Fig. 3. Melanin contents and relative tyrosinase activity of B16F10 melanocyte after treatment with *Tremella fuciformis* extracts. B16F10 melanocyte were pretreated with *Tremella fuciformis* extracts, kojic acid (25 μM) and α-MSH (100 nM) cultured for 72 hours. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Different letters (a - f) are significantly difference between groups based on one-way ANOVA with Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at $p < 0.05$ post hoc.

물 이상의 효과가 있음을 시사한다.

4. 흰목이버섯 추출물에 의한 B16F10 melanoma 세포에서의 tyrosinase 단백질 발현 확인

Western blot을 통하여 tyrosinase 단백질 발현을 확인한 결과 앞선 결과와 동일하게 80°C 추출물에서는 농도 의존적으로 tyrosinase 발현이 감소하였고 100°C 추출물에서는 큰 영향을 미치지 못하였다. 또한 tyrosinase 발현이 감소함에 따라 B16F10 melanoma 세포의 색도 점차 검은색에서 투명한 색으로 바뀜을 확인하였다 (Fig. 4). 결과를 종합해 보면 흰목이버섯 80°C 추출물에 의해 tyrosinase 활성이 감소함을 확인하였으며, 이로 인해 melanin 합성이 저해되어 총 melanin 함량이 감소하는 효과를 나타내는 것으로 예상할 수 있다. 특히

그 농도가 높아짐에 따라 더 좋은 효능을 보이는 것으로 확인되었다. 또한 최근에 대추 및 포도 발효물에 대한 미백관련연구 (Park *et al.*, 2014)와 비교하여 흰목이버섯 추출물이 더 좋은 효과를 나타내었다.

5. 흰목이버섯 추출물에 의한 MITF, TRP-1, Dct의 mRNA 발현 변화

Melanin 생합성 신호전달 체계에는 매우 다양한 신호전달 물질이 관여하고 있다. 이 중 MITF는 melanin 합성과정에 중요한 전사 조절 인자로 TRP-1과 Dct의 전사과정을 촉진한다고 알려져 있다 (Liu and Fisher, 2010; Olivares and Solano, 2009). 앞선 결과에서 더 좋은 효능을 보인 80°C 추출물을 이용하여 melanin 합성관련 인자인 MITF, TRP-1, Dct의 발현

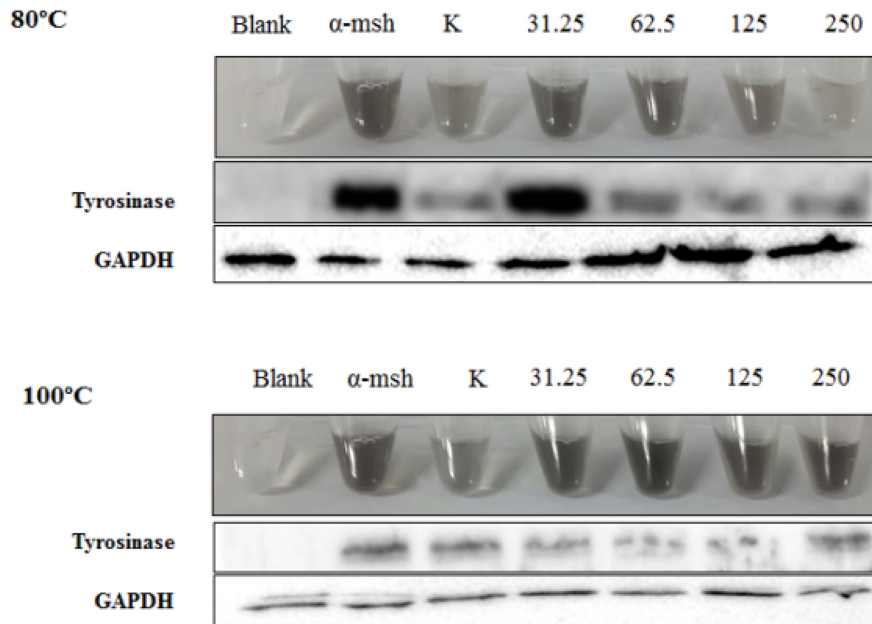


Fig. 4. Effect of *Tremella fuciformis* extracts on cellular tyrosinase expression in α -MSH stimulated B16F10 melanocyte. Cells were pretreated with the indicated concentrations of *Tremella fuciformis* extracts for 72 hours and then protein expression of tyrosinase was determined by western blotting.

정도를 측정하였다. 흰목이버섯 80°C 추출물이 melanin 합성 관련 인자인 MITF, TRP-1, Dct 발현을 모두 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 5). 이는 환초석곡 메탄올 추출물에 대한 연구 결과 (Jung *et al.*, 2015)와 유사한 결과로 melanin 합성관련 인자들을 감소시켜 미백효과를 지니고 있음을 예상할 수 있다.

6. 흰목이버섯 추출물에 의한 HDFn 세포에서의 procollagen 합성 증가

세포외기질 주요 구성 성분인 collagen은 피부의 섬유아세포에서 발현되는 단백질로 피부, 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성하고 피부의 견고성, 결합조직의 저항력, 조직의 결합력, 세포 증식과 분화 유도, 세포의 지탱 등 다양한 기능을 가진다 (Brenneisen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2015). Collagen은 피부에서 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있고 collagen이 부족할 경우 주름을 유발할 수 있다. Collagen은 전구물질인 procollagen의 형태로 합성되며, collagen 중합반응 시 collagen 분자로부터 절단 및 분리되어진다고 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2015). 즉 프로펩타이드의 양을 측정하여 세포내에서의 collagen 생합성정도를 파악할 수 있다. 흰목이버섯을 이용하여 collagen 합성 실험을 진행하였고, 100°C 추출물에서는 큰 변화는 보이지 않았지만 80°C 추출물에서는 125 μ g/ml 농도에서부터 유의적으로 procollagen 합성이 증가하였다 (Fig. 6). 이는 노간주나무의 주름개선 효과를 증명한 연구논문 (Jun *et al.*, 2013)처럼 흰목이버섯 추출물이

procollagen 합성을 촉진하여 탄력 있는 피부를 만들어주는 주름개선 효능을 나타냄을 알 수 있다.

7. 흰목이버섯 추출물에 의한 HDFn 세포에서의 MMP-1 mRNA 발현

Collagen은 결합조직의 탄력을 유지시켜주는데 이 collagen을 분해하는 효소는 결국 피부조직에 손상을 가져오게 만드는 역할을 한다. Collagen을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하지만 그 중 MMP-1 (matrix metalloproteinase 1)이 가장 많이 알려져 있으며, MMP-1 효소의 활성을 저해하는 역할을 할 수 있다면 collagen을 보호하여 피부조직의 탄력을 유지하고 지속시킨다고 알려져 있다 (Jung *et al.*, 2015). 흰목이버섯 추출물이 MMP-1을 저해하여 이러한 효능이 있는지 알아보기 위해 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 100°C 추출물에서는 가장 높은 농도에서 유의적인 감소를 보였으며, 80°C 추출물에서는 농도의존적으로 모든 농도에서 유의적으로 MMP-1을 감소시켰다 (Fig. 7). 우산고로쇠의 화장품효능에 대한 연구논문에서도 MMP-1 발현을 억제함을 증명하였다 (Sohn *et al.*, 2013). 이와 같은 결과로 흰목이버섯의 80°C 추출물은 유의적으로 MMP-1 발현을 억제하여 collagen 활성을 유지 및 증가시켜 피부에 도움을 줄 것으로 예상할 수 있다.

본 연구는 흰목이버섯 추출물의 미백 및 주름개선 효능을 증명하기 위해 melanin 생성 억제 및 tyrosinase 활성 및 미백 관련유전자 발현을 분석하였고, collagen 합성 증가 및 collagen

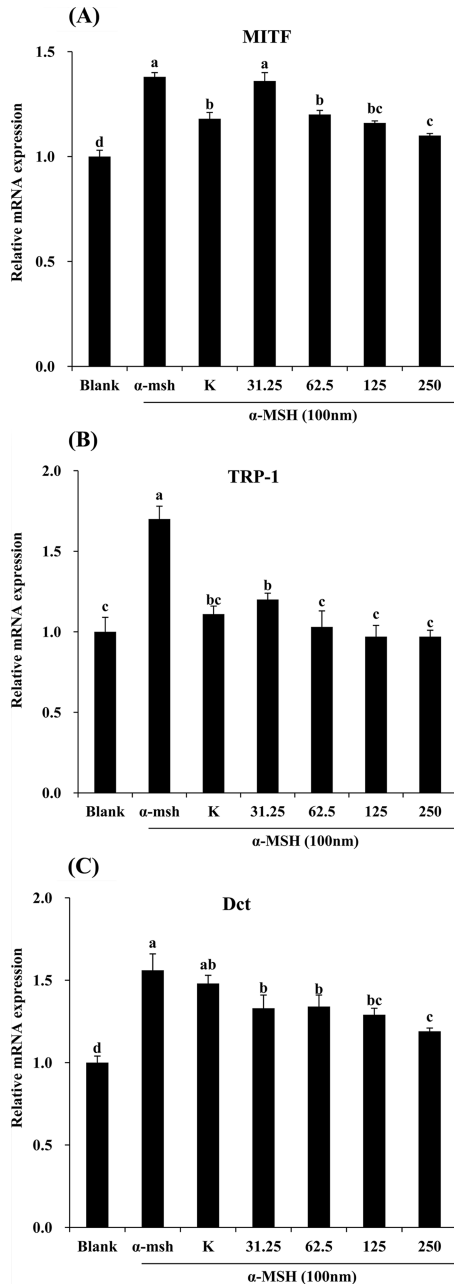


Fig. 5. Effect of *Tremella fuciformis* extracts on mRNA expression of MITF, TRP-1 and Dct in α-MSH stimulated B16F10 melanocyte. Expression of mRNA was estimated by real-time PCR. Findings were normalized to the expression of GAPDH mRNA. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Different letters (a - d) are significantly difference between groups based on one-way ANOVA with Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at $p < 0.05$ post hoc. MITF; Microphthalmia-associated transcription factor, TRP-1; Tyrosinase related protein-1, Dct; Dopachrome tautomerase.

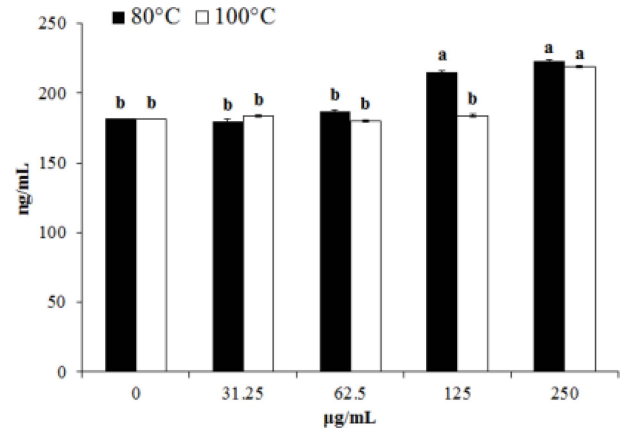


Fig. 6. Effect of *Tremella fuciformis* extracts on procollagen synthesis in HDFn cells. HDFn cells were incubated overnight. Cells were pretreated with the indicated concentrations of *Tremella fuciformis* extracts. Procollagen synthesis were performed as described in materials and methods. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Different letters (a - b) are significantly difference between groups based on one-way ANOVA with Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at $p < 0.05$ post hoc.

분해효소 억제제를 확인하였다. Melanin 세포는 자외선 (UV)에 일정 이상 노출되면 melanocortin peptide 인 α-MSH (melanocyte stimulating hormone) 및 ACTH (adrenocorticotrophic hormone)를 분비하게 된다 (Thody and Graham, 1998). 또한 melanin 세포는 자외선이나 다양한 cytokine과 같은 외부자극에 의해 MSH를 생성하고, melanocortin 1 receptors (MC1R)과 결합하여 표피에서 세포의 증식, 면역조절, melanin 생합성 등 다양한 생리적 기능을 하게 된다 (Slominski *et al.*, 2004). 흰목이버섯 추출물은 α-MSH를 처리하여 melanin 생성이 유도된 상태에서 농도 의존적으로 melanin 생성을 억제하였으며, 기존 효과가 알려진 양성대조군으로 kojic acid 100 μg/ml를 처리했을 때보다 유사하거나 월등한 melanin 억제 효능을 나타내었다. 이어서 melanin 생성에 관여하는 tyrosinase 활성을 측정했을 때도 흰목이버섯 추출물은 양성대조군인 kojic acid와 유사하거나 뛰어난 tyrosinase 활성 억제 및 단백질 발현 억제 효과를 보였다.

앞서 언급되었듯이 tyrosinase 활성에 관여하는 중요한 전사인자인 MITF는 melanin 합성을 위해 관련된 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등 유전자 발현을 증가시킨다 (Liu and Fisher, 2010; Olivares and Solano, 2009). 흰목이버섯 추출물에 의한 tyrosinase 억제효능과 관련하여 그 이전에 관련된 인자들인 MITF, TRP-1, DCT 유전자 발현을 확인하였다. 그 결과 melanin 형성에 관련된 전사인자들의 유전자 발현을 흰목이버섯 추출물에 의해 감소시킴을 확인할 수 있었다. Collagen은 피부를 구성하는 주요단백질로 피부노화와 주름생

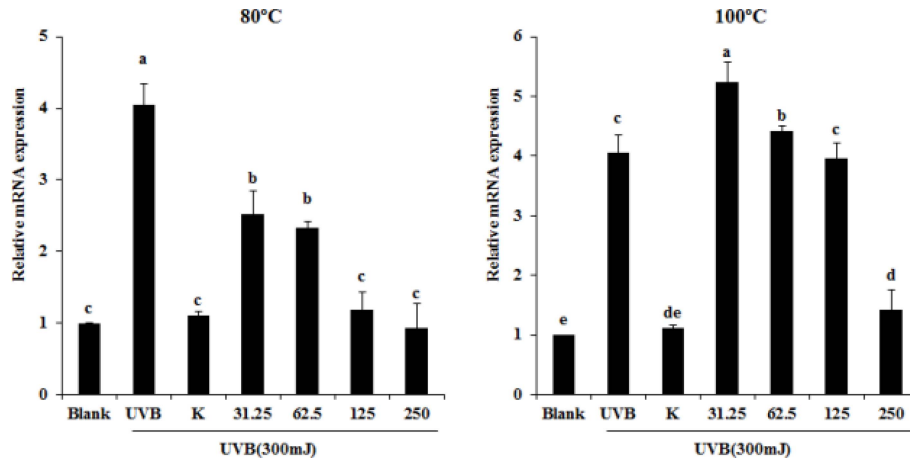


Fig. 7. Effect of *Tremella fuciformis* extracts on mRNA expression of MMP-1 in UVB stimulated HDFn cells. Expression of mRNA was estimated by real-time PCR. Findings were normalized to the expression of GAPDH mRNA. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. Different letters (a - e) are significantly difference between groups based on one-way ANOVA with Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at $p < 0.05$ post hoc.

성에 밀접한 관계이므로 collagen 생성 및 유지는 피부건강에 중요하다고 알려져 있으며 MMP-1은 collagenase 역할을 하는 피부주름 생성의 큰 원인임이 밝혀져 있다 (Brenneisen *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). 이와 관련하여 흰목이버섯 추출물이 주름개선 효능이 있는지 알아보기 위해 procollagen 및 MMP-1의 변화를 측정하였다. 그 결과 흰목이버섯 추출물은 procollagen 합성을 촉진하는 것으로 나타났으며, MMP-1 유전자를 효과적으로 감소시킴을 확인하였다.

결과를 요약하면, 흰목이버섯 추출물이 B16F10 세포에서 tyrosinase 효소 활성을 저해하였고 melanin 합성 인자들을 조절함을 통하여 melanin 함량을 감소시킴을 확인할 수 있었으며, 추가적으로 HDFn 세포에서 procollagen 합성을 증가 시켰고 이를 분해하는 효소는 반대로 억제함을 나타내었다. 또한 추출온도와 처리농도를 다르게 설정하여 가장 효능이 좋은 방법을 모색하고자 하였고 결과적으로 80°C 추출물에서 250 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 가장 뛰어난 미백 및 주름개선 효과를 보였다.

이러한 연구결과를 통하여 흰목이버섯 추출물은 미백 기능을 보이며 효과적으로 주름을 개선할 수 있는 화장품 및 다양한 소재로 사용할 수 있을 것으로 예상되며, 식용이 가능한 천연작물소재를 이용하기 때문에 현대인들이 신뢰하는 안전한 제품이 될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72:248-254.

Brenneisen P, Sies H and Scharffetter-Kochanek K. (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: From induction via signaling to initial events. Annals of the New York Academy of Sciences. 973:31-43.

Chen FF and Cai DL. (2008). Research advances in primary biological effects of *Tremella* polysaccharides. Chinese Journal of Integrative Medicine. 6:862-866.

Cheng HH, Hou WC and Lu ML. (2002). Interactions of lipid metabolism and intestinal physiology with *Tremella fuciformis* Berk edible mushroom in rats fed a high-cholesterol diet with or without nebacin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:7438-7443.

Cheung PCK. (1996). The hypocholesterolemic effects of two edible mushrooms: *Auricularia auricula*(tree-ear) and *Tremella fuciformis*(white jelly-leaf) in hypocholesterolemic rats. Nutrition Research. 16:1721-1725.

Chun HJ, Choi WH, Baek SH and Woo WH. (2002). Effect of quercetin on melanogenesis in mela- α melanocyte cells. Korean Journal of Pharmacognosy. 33:245-251.

Jun HJ, Lee SY, Kim JH, An BJ and Lee JY. (2013). Anti-wrinkling effects of *Juniperus rigida* Sied. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. 41:449-455.

Jung HK, Jang JH, Ko JH, Kang BM, Yeo JH, Cho JH, Cho HW, Bean CG, Kim SC and Jung WS. (2014). Whitening and anti-wrinkle effects of Korean native *Dendrobium moniliforme* methanol extract. Korean Journal of Medicinal Crop Sciences. 22:331-338.

Jung HK, Jang JH, Sim MO, Lee KH, Yeo JH, Kang BM, Cho JH, Bean CG, Kim SC and Jung WS. (2015). Effect of *Dendrobium loddigesii* Rolfe methanol extract on melanogenesis in α -MSH stimulated B16F10 cells. Korean Journal of Medicinal Crop Sciences. 23:298-304.

- Kim BY, Kim TG, Kang WY, Baek H, Cheon HY and Kim D.** (2010). Functional cosmetic effect of porcine placenta. *Korean Chemical Engineering Research*. 48:327-331.
- Kim HM, Hur W and Lee SY.** (2011). Polysaccharide extraction and comparison of free radical scavenging activities from *Tremella fuciformis* and *Auricularia auricula* fruit body. *Food Engineering Progress*. 15:6-14.
- Kim NY and Lee HY.** (2015a). Effect of antioxidant and skin whitening of ethanol extracts from ultrasonic pretreated *Abeliophyllum distichum* Nakai. *Korean Journal of Medicinal Crop Sciences*. 23:155-160.
- Kim NY and Lee HY.** (2015b). Enhancement of anti-wrinkle activities of *Abeliophyllum distichum* Nakai through low temperature extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Sciences*. 23:231-236.
- Kim NY, Park DS and Lee HY.** (2015). Effect of anti-skin wrinkle and antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through fermentation process of the lactic acid. *Korean Journal of Medicinal Crop Sciences*. 23:37-42.
- Ko MS, Lee SJ and Kang SM.** (2009). Effect of *Tremella fuciformis* Berk on anti stress activities during long-term and short-term in mice. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*. 24:131-139.
- Ko MS.** (2012). The growth level of hair follicles and hairs about stress-induced mice of *Tremella fuciformis* Berk. *Journal of the Korean Society of Cosmetology*. 18:1158-1165.
- Lee MK, Kim DH, Park TS and Son JH.** (2015). Antioxidant and anti-wrinkling effects of extracts from *Vitex trifolia* L. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 58:125-129.
- Li H, Lee HS, Kim SH, Moon BK and Lee C.** (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extracts of *Tremella fuciformis* and its major phenolic acids. *Journal of Food Science*. 79:C460-C468.
- Liu JJ and Fisher DE.** (2010). Lighting a path to pigmentation: Mechanisms of MITF induction by UV. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 23:741-745.
- Oh YH, Kim SB, Lee GW, Kim HY, Shim MJ, Rho HS, Lee HS, Lee MW, Lee UY and Lee TS.** (2006). The immunomodulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis*. *The Korean Journal of Mycology*. 34:105-111.
- Olivares C and Solano F.** (2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 22:750-760.
- Park TS, Kim DH, Kwon OJ and Son JH.** (2014). A study on biological activities of fermented jujube and grape. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 42:106-113.
- Parvze S, Kang MK, Chung WS, Cho CW, Hong MC, Shin MK and Bae HS.** (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research*. 20:921-934.
- Seo SY, Sharma VK and Sharma N.** (2003). Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:2837-2853.
- Shi ZW, Liu Y, Xu Y, Hong YR, Liu Q, Li XL and Wang ZG.** (2014). *Tremella* polysaccharides attenuated sepsis through inhibiting abnormal CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in mice. *Cellular Immunology*. 288:60-65.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S and Wortsman J.** (2004). Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*. 84:1155-1228.
- Sohn SH, Lee SW, Shin YS, Kim HD, Yang SO, Kim SY and Kim YO.** (2013). The effect of cosmetic on anti-wrinkle of *acer mono* Sap. *Korean Journal of Medicinal Crop Sciences*. 21:262-267.
- Suh SS, Hwang J, Park M, Park HS and Lee TK.** (2014). Phenol content, antioxidant and tyrosinase inhibitory activity of mangrove plants in micronesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7:531-535.
- Thody AJ and Graham A.** (1998). Does α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Research*. 11:265-274.
- Ukai S, Hirose K, Kiho T, Hara C and Irikura T.** (1972). Antitumor activity on sarcoma 180 of the polysaccharides from *Tremella fuciformis* Berk. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 20:2293-2294.
- Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prota G and Hearing VJ.** (1994). The inherent cytotoxicity of melanin precursors: A revision. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1221:272-278.
- Wu M, Hemesath TJ, Takemoto CM, Horstmann MA, Wells AG, Price ER, Fisher DZ and Fisher DE.** (2000). c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes and Development*. 14:301-312.