

## 수종의 버섯 추출물이 티로시나아제 프로모터에 미치는 효과

진종언\*·이혜성\*·김관천

\*동강대학 피부미용과, 광주보건대학 환경행정과

### Effect of Mushroom Extracts on Tyrosinase Promoter

Jong-Eon Chin\*·Hye-Sung Lee\*·Kwan-Chun Kim

\*Dept. of Cosmetology, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea.

Dept. of Environmental Administration, Gwangju Health College, Gwangju 506-701, Korea.

#### Abstract

To estimate the inhibitory effect of some mushroom extract on melanin biosynthesis, we tested its inhibitory effects of five mushroom extracts on tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells. In five mushroom extracts, *Cordyceps militaris* and *Poria cocos* exhibited low repression effect on tyrosinase promoter. However, *Ganoderma lucidum*, *Paecilomyces japonicus*, *Phellinus linteus* showed high repression effect. Especially, *Paecilomyces japonicus* and *Phellinus linteus* extracts had very higher repression effect approximately 81~83% at 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . In the MTT assay, *Paecilomyces japonicus* and *Phellinus linteus* extracts exhibited high cytotoxicity. Therefore, repression effect of the extracts were closely connected with cytotoxicity.

Key words : Mushroom, tyrosinase promoter, B16 mouse melanoma cell

---

\*Corresponding author E-mail : kimkc@kjhc.ac.kr

## I. 서론

버섯은 독특한 맛과 향기를 지니고 있는 동시에 각종 영양소가 골고루 함유되어 있어 그의 식품학적 가치는 매우 크다고 할 수 있다. 요즈음 들어 사람들이 건강과 well-being을 추구하는 식생활 문화가 급속도로 확산되면서 자연식품, 저칼로리 식품, 무공해 식품 등을 선호하게 됨으로서 버섯의 수요는 날로 증가하고 있는 추세이다. 오늘날 수 많은 버섯들이 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있지만 그 중에서 특히, 동충하초, 복령, 상황, 영지 등의 버섯들은 다양한 유용성 성분들을 함유하고 있어 항산화, 세포독성, 항돌연변이, 면역력증강, 아질산염 소거작용 등의 효능·효과가 우수한 것으로 알려져 성인병 및 암 예방 목적으로 널리 이용하고 있다<sup>1-6)</sup>.

멜라닌은 동물, 식물, 미생물 등에 널리 분포하는 색소로서 사람의 경우 피부색을 결정하는 동시에 유해한 자외선이나 유리기(free radical)로부터 인체를 보호하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 이 색소는 피부의 표피층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte cell)가 자외선, 활성산소, 스트레스 등의 각종 자극에 의해 활성화되어 만들어져 케라티노사이트(keratinocyte cell)에 의해 만들어진 케라틴과 함께 위로 이행하여 피부의 가장 바깥층인 각질층에 존재하여 피부를 검게 보이게 한다. 그러나 오늘날 사람들은 여가생활 및 사회활동의 증가, 그리고 환경오염에 따른 오존층의 파괴 등으로 인하여 유해한 자외선에 피부가 과다 노출됨으로서 기미·주근깨와 같은 색소침착의 원인이 되고 있어 피부 건강 및 미용 측면에서 문제를 호소하고 있다. 따라서 멜라닌 색소에 대한 관심도 날로 증가하고 있는 추세이다.

멜라닌 색소의 생합성 기작에는 여러 효소들이 관여하고 있는데<sup>7-9)</sup>, 그중에서 티로시나아제 효소는 멜라닌 색소 생합성의 초기 반응을 조절하는 주요 효소로서 널리 알려져 있다. 따라서 지금까지 멜라닌 색소의 생합성을 억제하기 위한 방법으로 티로시나아제 효소를 중심으로 한 연구가 가장 활발하게 이루어져 왔다. 그 결과 많은 식물들이 티로시나아제 활성 저해효과가 있는 것으로 보고 되었으며<sup>10-12)</sup>, 또한 여러 식물들로부터 티로시나아제 활성 저해효과가 있는 성분들이 분리되었다<sup>13-17)</sup>. 그러나 이러한 물질들은 효소의 활성을 저해하는 수준에서 이루어져 멜라닌 색소의 생합성 억제효과가 낮고 지속성이 짧은 단점을 지니고 있다. 최근, 이러한 단점을 보완하기 위하여 멜라닌 색소 생성 관련 유전자 발현 억제 기작, 멜라닌 생성 활성을 제어하는 사이토카인 네트워크, 멜라닌 색소 생합성 효소의 유전자 발현억제 물질 탐색 및 분리 등과 같은 근본적인 수준에서 연구들이 이루어지고 있으나 아직까지 그 연구결과는 매우 미미하다. 특히, 천연물질로부터 멜라닌 생합성 효소의 관련 유전자 발현 억제 물질에 대한 탐색이나 분리에 관한 연구결과는 아직까지 Chin 등<sup>18-22)</sup>과 Cho 등<sup>23)</sup>을 제외하고는 거의 없다.

본 연구에서는 유전자 발현 조절 수준에서 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 효소로 알려진 티로시나아제의 생합성 억제 물질을 탐색하고자 생리활성효과가 우수하여 약용으로 널리 이용되고 있는 수종의 버섯으로부터 물질을 추출·분획하여 티로시나아제 프로모터가 삽입되어 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell에 처리하여 그 프로모터의 발현 유무 및 세포독성에 미치는 효과를 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 눈꽃 동충하초 (*Paecilomyces japonicus*), 밀리타리스 동충하초 (*Cordyceps militaris*), 복령 (*Poria cocos*), 상항 (*Phellinus linteus*), 영지 (*Ganoderma lucidum*) 등의 5 종류의 버섯들은 광주시내 한약 건재상에서 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표준품은 동강대학 향장 연구실에 보관하였다.

### 2. 추출 및 분획

시료의 추출은 건조된 생약 0.1 kg을 취한 다음 메탄올을 가하여 실온에서 1 주일 동안 정치시킨 후 3 회 추출·여과 하였다. 여과액은 감압·농축하여 동결·건조시킨 후 분말 형태로 제조하였다.

### 3. 시료 제조

분말로 된 추출물 및 분획물 100 mg에 에탄올과 디메틸설포옥사이드(dimethyl sulfoxide)가 1:1로 혼합된 용매 1 mL씩을 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 티로시나아제 프로모터의 발현 억제 유무와 세포독성을 측정하는데 이용하였다.

### 4. 세포배양

B16 mouse melanoma cell(ATCC CRL 6323)은 10%(w/v)의 Fetal Bovine Serum(FBS, GibcoBRL), 1%(w/v) Antibiotic(Gibco BRL), 그리고 2 mM의 L-Glutamine이 포함된 RPMI Medium 1640(Gibco BRL)에서 CO<sub>2</sub> 분압을 5%로 조절하여 37°C에서 배양하였으며, 세포는 36-48 시간 주기로 계대배양하여 유지하였다.

티로시나아제 프로모터를 도입하여 형질 전환 된 B16 mouse melanoma cell은 위의 RPMI Medium 1640 완전배지에 neomycin analogue인 Geneticin 418(200 µg/mL)을 가한 선택배지를 이용하여 유지하였다.

### 5. 세포내 유전자 도입(Stable Transfection)

B16 mouse melanoma cell 내에 tyrosinase 프로모터가 삽입된 유전자를 도입하기 위해 LipofectAMINE(Life Technologies Inc.)을 이용한 다음과 같은 방법으로 stable transfection을 실시하였다.

#### (1) 세포내 유전자 도입

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 평판배지에 세포수가 3-4 × 10<sup>5</sup>이 되도록 접종한 후 24 시간 배양한 다음, 배양액 1 mL에 6 µL LipofectAMINE과 2 µg의 total plasmid DNA를 5 시간 처리함으로써 형질전환을 실시하였다.

Plasmid DNA는 luciferase gene을 지닌 pGL2-basic vector(Promega)의 SamI site에 1.5 Kb의 neomycin 저항성 유전자를 삽입한 다음 1 Kb의 사람 티로시나아제 프로모터를 EcoRI/KpnI site에 클로닝을 하였다.

#### (2) 형질전환 된 세포의 선별

Stable transfection 처리 5시간 후 B16 mouse melanoma cell로부터 LipofectAMINE 시약과 제조된 DNA가 함유된 배지를 제거한 후 콜로니가 형성될 때까지 neomycin analogue인 Geneticin 418(600 µg/mL)이 들어있는 선택배지에서 배양한 후 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 선별하였다.

### 6. Luciferase 활성도 측정

세포내 유전자 도입을 통해 얻은 B16 mouse melanoma cell의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 luciferase 활성도를 측정하였다. 형질전환을 통하여 얻은 콜로니들을 Trypsin-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 24 well plate에 세포수가 well당 6×10<sup>4</sup>되게 분주하여 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 세포들은 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 그리고 2 mM Dithiothreitol이 함유되어 있는 pH 7.8의 25 mM

Tris-Phosphate 완충용액으로 용해하였다.

용해된 세포들을 취하여 원심분리한 다음 얻어진 상등액에 대해 Luminometer(Lumat LB 9507, Berthold)를 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였으며 luciferase 활성도가 가장 높게 나타난 B16 mouse melanoma cell을 선별하여 이용하였다.

#### 7. 티로시나아제 프로모터 억제효과 측정

형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 24 well plate에 세포수가 well당  $6 \times 10^4$  되게 접종한 다음 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 5종류의 버섯 추출물들을 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 티로시나아제 프로모터의 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

#### 8. 세포독성 측정

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 96 well plate에 세포수가 well당  $1-1.2 \times 10^4$  되게 접종한 다음 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 티로시나아제 프로모터 억제효과가 가장 우수한 눈꽃 동충하초와 상황버섯의 추출물을 각각의 well에 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 그리고 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 Mosmann<sup>24)</sup>의 방법에 따라

ELISA(Bio-Tek Inc.) 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 평가하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 버섯 추출물의 티로시나아제 프로모터 억제효과

현재 약용으로 널리 이용되고 있는 눈꽃 동충하초, 밀리타리스 동충하초, 복령, 상황, 영지 등 5종류의 버섯으로부터 메탄올을 이용하여 생리활성이 우수한 유용성 성분들을 추출·농축하여 세포내 유전자 도입을 통하여 제조된 B16 mouse melanoma cell에 처리하여 티로시나아제 프로모터의 발현유무를 조사한 결과 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 효과를 보여 주었지만 추출물들은 농도에 따라 그의 경향은 다르게 나타났다(Fig. 1). 5종류의 추출물 중에서 눈꽃 동충하초, 상황버섯, 영지버섯 등 3종류의 추출물들은 다른 추출물에 비해 티로시나아제 프로모터의 발현 억제에 미치는 효과가 우수한 것으로 나타났다. 이 추출물들을 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도로 세포에 처리하였을 때에는 티로시나아제 프로모터의 발현에 영향을 주지 못했지만 그 이상의 농도로 처리하였을 때에는 티로시나아제 프로모터의 발현 억제에 영향을 주었으며, 그 효과는 처리농도에 비례하였다.

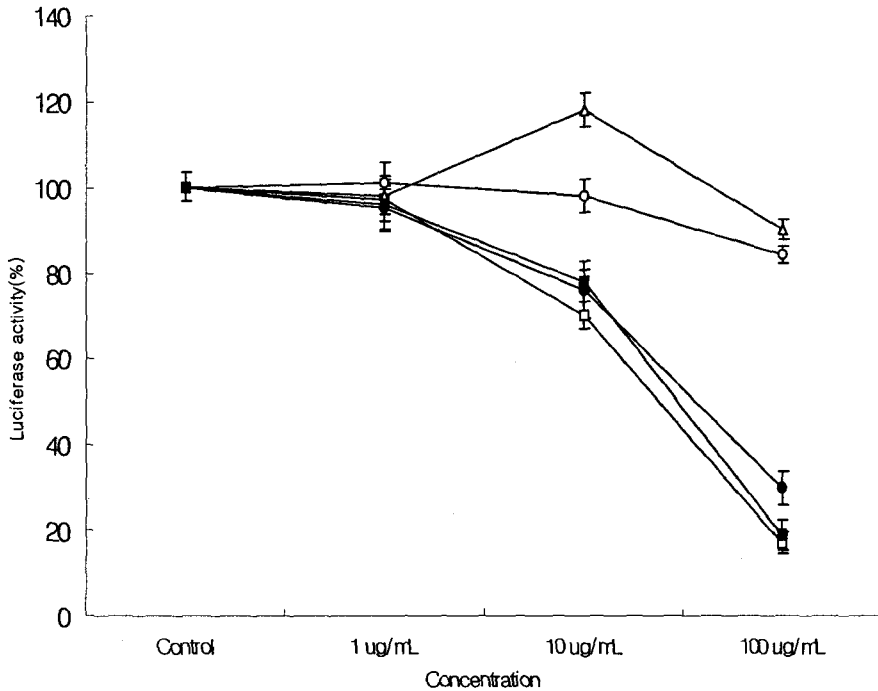


Fig. 1. Effects of some mushroom extracts on the tyrosinase promoter in B16 mouse melanoma cells. ○ : *Cordyceps militaris*, ● : *Ganoderma lucidum*, □ : *Paecilomyces japonicus*, ■ : *Phellinus linteus*, △ : *Poria cocos*. Transfected B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hours and treated some mushroom extract for 6 hours. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000 xg for 2~3 minutes. The supernatants were used for luciferase assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

즉, 눈꽃 동충하초, 상황버섯, 영지버섯 추출물들은 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 티로시나아제 프로모터의 발현 억제효과가 22~28%로서 약간 낮게 나타났다. 그러나 이들을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도로 처리하였을 때에는 보다 높은 억제효과를 나타내었으며, 특히 눈꽃 동충하초와 상황버섯은 81~83%의 매우 높은 억제효과를 보여주었다. 밀리타리스 동충하초 추출물의 경우에는 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하였지만 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서만 억제효과를 나타내었다. 그리고 그의 억제효과는 눈꽃 동충하초,

상황버섯, 영지버섯 등의 추출물들에 비해 매우 낮았다. 한편 북령 추출물은 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 눈꽃 동충하초, 상황버섯, 영지버섯 등의 추출물들처럼 티로시나아제 프로모터의 발현에 거의 영향을 주지 않았으나, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 눈꽃 동충하초, 상황버섯, 영지버섯 등의 추출물들과는 달리 대조군에 비해 발현율이 약 118%로서 티로시나아제 프로모터의 발현을 증진시키는 결과를 보여주었다. 그러나 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서는 다른 추출물들과 마찬가지로 티로시나아제 프로모터의 발현을

억제하는 효과를 나타내었지만 그의 효과는 매우 미미하였다. 본 연구 결과를 통해서 5종류의 버섯 추출물들 중에서 티로시나아제 프로모터의 발현 억제효과는 눈꽃 동충하초와 상황버섯 추출물이 가장 우수하였으며, 그 다음으로는 영지 추출물, 밀리타리스 동충하초 추출물, 복령 추출물의 순서로 나타났다.

## 2. 버섯 추출물의 세포독성

B16 mouse melanoma cell에 눈꽃 동충하초와 상황버섯 추출물을 처리한 결과 세포독성은 추출물의 처리 농도에 비례하였다(Table 1). 두 종류의 버섯 추출물을 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 세포의 생존율은 높게 나타났으나, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때에는 세포 생존율 감소가 일어나 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도로 처리하였을 때에는 세포가 고사되어 세포의 활성을 측정이 불가능하였다.

Table 1. Cytotoxicity of some mushroom extracts on B16 mouse melanoma cells.

Extract	MTT assay(%)		
	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>Paecilomyces japonicus</i>	103 $\pm$ 4.3	65 $\pm$ 5.6	ND*
<i>Phellinus linteus</i>	98 $\pm$ 3.7	76 $\pm$ 7.1	ND

\* ND : Not determined.

1. B16 melanoma cells were incubated with  $1\sim 1.2 \times 10^4$  in RPMI 1640 medium for 24 hours and treated with mushroom extract for 6 hours. Then, the cells were used for MTT assay.

2. Values are the means of results from triplicate experiments.

이 결과를 통해서 볼 때 이들 추출물들의 티로시나아제 프로모터 발현 억제효과는 세포독성과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되어진다. 즉, 이 두 종류의 버섯 추출물들의 티로시나아제 프로모터 발현 억제효과는 B16 mouse melanoma cell이 추출물의 세포독성에 의해 고사되어 그의 세포수가 감소됨으로서 나타나는 현상으로 여겨진다. 따라서 눈꽃 동충하초와 상황버섯 추출물을 멜라닌 색소의 생합성 억제제로서 산업적으로 이용하기 위해서는 매우 세심한 주의가 필요하며 보다 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## IV. 결론

유전자 발현 조절수준에서 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 티로시나아제 프로모터의 발현을 억제하는 물질을 탐색하고자 티로시

나아제 프로모터를 지닌 B16 mouse melanoma cell에 눈꽃 동충하초, 밀리타리스 동충하초, 복령, 상황, 영지 등 5종류의 버섯 추출물을 처리하였다. 그 결과 눈꽃 동충하초, 밀리타리스 동충하초, 복령, 상황, 영지 등 추출물들 모두 티로시나아제 프로모터의 발현 억제효과를 나타내었지만 특히 눈꽃 동충하초와 상황버섯 추출물은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약 81~83%의 매우 높은 억제효과를 보여주었다. 그리고, 티로시나아제 프로모터의 발현 억제효과가 가장 우수한 눈꽃 동충하초와 상황버섯 추출물의 세포독성을 조사한 결과 세포의 생존율은 추출물의 처리농도 증가에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 눈꽃 동충하초와 상황버섯 추출물의 티로시나아제 프로모터 발현 억제효과는 세포독성과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. Ji J. H., Kim M. N., Chung C. K. and Ham S. S. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(2): 322-328. 2000.
2. Lee J. W and Bang K. W. Biological activity of *Phellinus* spp. *Food Industry and Nutrition.* 6(1). 25-33. 2001.
3. Park C. S., Kwon C. J., Choi M. A., Park G. S. and Choi K. H. Antioxidative and nitrite scavenging activities of *Cordyceps militaris* extracts. *Korean J. Food Preservation.* 9(1). 109-113. 2002.
4. Kim D. G., Son D. H., Choi U. K., Cho Y. S. and Kim S. M. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of *Poria cocos*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31(6). 1097-1101. 2002.
5. Bae W. C., Kim Y. S. and Lee J. W. Bioactive substances from *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33(2). 75-83. 2005
6. Oh S. I. and Lee M. S. Antioxidative antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* krast extracts. *Korean J. Food & Nutr.* 18(1). 54-62. 2005
7. Aroca, P., Urabe, K., Kobayashi, K., Taskamoto, K., and Hearing V. J. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem* 268. 25650-25655. 1993.
8. Paval, S. Dynamics of melanogenesis intermediates. *J. Invest. Dermatology* 100. 162S-165S. 1993.
9. Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J., and Garcia-Borrón, C. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J. Biol. Chem* 269. 17993-18001. 1994.
10. Jung S. W., Lee N. K., Kim S. J. and Han D. S. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol.* 27. 891-896. 1995.
11. Choi B. W., Lee B. H., Kang K. J., Lee E. S. and Lee N. H. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J Pharm.* 29. 237-242. 1998.
12. Baurin N, Arnoult E, Scior T., Do Q. T. and Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacol* 82. 155-158. 2002.
13. Tomohiro Yokota, Hiroyuki Nishino, Yasuo Kubota and Masako Mizoguchi. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Research* 11. 355-361. 1998
14. Shin N. H., Ryu S. Y., Choi E. J., Kang, S. H., Chang I. M., Min K. R. and Kim Y. S. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on the dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243. 801-803. 1998.
15. Lee S. H., Choi S. Y., Kim H. C., Hwang J. S., Lee B. G., Gao J. J. and Kim S. Y. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 25(8). 1045-1048. 2002.
16. Lee K. T., Lee K. S., Jeong J. H., Jo B. K. Heo M. Y. and Kim H. P. Inhibitory effects of ramulus mori extracts on melanogenesis. *J Cosmet Sci* 54(2). 133-142. 2003.
17. Isao Kubo and Ikuyo Kinst-Hori. 2-Hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Medica* 65. 19-22. 1999.
18. Chin J. E., Sun H. S., Lee K. J., Choi T. J., Ko Y. S., Sohn H. J., Kim J. J., Jeon B. H. and Lee B. H. Inhibitory

- effects of some medicinal plant extracts on the tyrosinase promoter activity on B16 mouse melanoma cells. *International J. Oriental Medicine* 1. 6-13. 2000.
19. Chin J. E. and Cho N. C. Effects of *Artemisia capillaris* herba extracts on of Dongkang College 2the tyrosinase gene activity. *Thesis Collection*3. 293-307. 2000.
20. Chin J. E. and Kim G. S Effect of chestnut bark extracts on tyrosinase gene expression. *Korean J. Sanitation* 20(3). 10-16. 2005.
21. Chin J. E. and Cho N. C. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on tyrosinase gene expression. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34(8) 1284-1288. 2005
22. Lee B. H., Bai S. and Chin J. E. Inhibitory efect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34(9) 1325-1329. 2005.
23. Cho, N. C., Yoon, Y. H., Lee, H. J., Shon, H. J., Kim, Y. K., Choi, K. H., Ra, M. S., Cho, Y. K., Lee, B. H., and Chin, J. E. Effect of onion(*Allium cepa* L.) extract on tyrosinase gene expression. *Kor. J. Food & Nutr.* 14(3). 228~232. 2001.
24. Mossman, T. J. Rapid colormetric assay for cellular growth and survival Application to proiferation and cytotoxicity assay. *Immunol. Methods* 63. 55~63. 1983.