

영지버섯추출물 및 에르고스테롤의 냉감 수용체 TRPM8 (Transient Receptor Potential Cation Channel Melastatin Subtype 8) 발현 유도 효과

유 화 선[†] · 정 지 연 · 전 원 옥* · 이 춘 몽** · 이 정 노 · 박 성 민

(주)코씨드바이오팜 바이오융합연구소, *(주)뉴메디온, **(주)코리아나화장품
(2018년 1월 22일 접수, 2018년 2월 20일 수정, 2018년 3월 6일 채택)

Inductive Effects of the Cold Receptor TRPM8 Expression in *Ganoderma lucidum* Extracts and Ergosterol

Hwa Sun Ryu[†], JiYeon Jeong, Weon-Ok Jeon*, Chun Mong Lee**, Jung-No Lee, and Sung-Min Park

Bio Convergence R&D Center, Coseedbiopharm Corporation, 68, Osongsangmyeong 2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungbuk-do 28161, Korea

* NewMedion, Chungbuk-do 28116, Korea

**Future Science Research Center, Coreana Cosmetics Corporation, Chungnam-do 31041, Korea

(Received January 22, 2018; Revised February 20, 2018; Accepted March 6, 2018)

요약: UV 뿐 아니라 가시광선, 적외선에 의해 발생된 열로 인해 피부 온도 상승, MMP-1의 증가에 따른 피부 노화가 진행된다. 따라서 열에 의한 노화에서 피부 온도 조절은 노화 억제에 중요한 핵심 요소이다. 일시적인 수용체 전위 통로인 TRPM8은 멘솔 수용체(CMR1)로써 25 °C 이하의 온도에서 활성화되고 시원한 감각을 발생시키는 냉 수용체로 보고되어 있다. TRPM8 조절을 통해 시원한 감각과 피부 온도를 조절하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 천연물인 영지버섯을 이용하여 냉 수용체인 TRPM8 발현에 어떠한 영향을 주는지 확인하였다. 영지버섯추출물 및 용매 분획물의 TRPM8 발현에 대한 영향을 측정된 결과, 영지버섯추출물, *n*-hexane 분획물 및 water 분획물에서 농도의존적으로 TRPM8 발현이 증가함을 확인하였다. Hex 분획물에서 유효성분을 찾고자 크로마토그래피를 실시하여 1개의 화합물을 분리하였으며 ¹H 및 ¹³C NMR spectrum 분석을 통하여 화학구조를 동정하였다. 분리된 화합물은 에르고스테롤로 TRPM8 발현 증가에 효과가 있음을 확인하였다. 결과를 토대로, 영지버섯추출물 및 에르고스테롤은 화장품 분야에서 새로운 쿨링 소재로서 개발가능성이 있다고 사료된다.

Abstract: Skin-aging is accelerated by the increased expression of MMP-1 caused by the increased skin temperature induced by IR/visible light as well as UV. Thus, the control of skin temperature is important to inhibit heat-induced aging. Many studies have been conducted to lower the skin temperature through the controlling transient receptor potential melastatin 8 channel (TRPM8), which is known as the cold and menthol receptor 1 (CMR1) and is activated at temperature below 25 °C. In this study, we first investigated the effect of *Ganoderma lucidum* extract (GLE) on the TRPM8 expression. Results showed that GLE, hexane (Hex) fractions and water fractions increased the TRPM8 expression in a dose dependent manner. Active compound in Hex fractions were separated by chromatography and analyzed by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. The isolated compounds were identified as ergosterol and it also significantly increased the TRPM8 expression. Taken together, these results strongly suggest that *G. lucidum* extract and ergosterol have the potential as a new cooling ingredient in the cosmetics.

† 주 저자 (e-mail: rmd@coseed.co.kr)
call: 070)5003-2228

Keywords: *Ganoderma lucidum extract, ergosterol, keratinocyte, cold and menthol receptor, TRPM8*

1. 서 론

피부노화는 크게 내인성 노화와 외인성 노화로 나누어진다[1]. 내인성 피부노화는 연령이 증가함에 따라, 생체의 생리적인 기능이 저하되어 자연적으로 유발되는 노화현상이다. 외인성 피부노화는 광노화, 즉 햇빛에 의한 피부노화 현상을 주요 요인으로 간주하고 그 외 기후, 환경오염, 흡연, 스트레스 등의 외적 요인에 의해 노화가 진행되는 것을 말한다[2,3]. 피부 노화를 유발하는 가장 큰 요인인 UV에 지속적으로 노출되면 피부 염증, 홍반, DNA 손상 및 반응성이 큰 활성산소가 증가하고 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 발현이 증가되어 피부를 구성하는 중요한 요소인 콜라겐, 엘라스틴과 같은 세포외기질 단백질들이 분해되어 주름과 같은 피부노화가 유발된다[4,5].

최근 연구에 따르면 UV 뿐만 아니라 적외선, 즉 열에 의한 피부노화가 촉진된다는 연구 결과가 발표되고 있다[6]. 15-20분 정도 직사광선을 받으면 피부의 온도가 40 °C 이상으로 올라가게 되고, MMP-1의 발현이 증가하고 콜라겐 분해가 촉진되어 피부 노화 및 피부 손상이 촉진된다[7-10]. 열에 의한 피부 온도 상승은 진피층의 섬유아세포의 extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 c-jun N-terminal kinase (JNK)가 활성화되어 MMP-1과 MMP-3의 발현이 유도된다[6]. 또한 c-fos, c-jun 및 egr-1의 발현이 유도되어 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성화를 촉진하여 노화가 유도된다[10-12]. 여러 논문을 통해 열이 또 다른 피부 노화의 주요한 요인임이 입증되었고, 열에 의한 노화를 억제하려는 다양한 연구가 진행되고 있다.

일시적 수용체 전위 통로(transient receptor potential channel, TRP channel)는 다양한 세포 및 조직에서 발현되는 양이온 통로로 주로 칼슘이온에 대한 세포 내 통로로 작용한다[13]. 광 수용체로 처음 발견된 이후 TRP 통로는 기계적 자극, 삼투압의 변화, 온도자극, 화학자극 등 다양한 자극에 의해 활성화가 유도된다[14]. TRP 통로는 30여 종류로, 크게 TRPC, TRPV, TRPM, TRPP, TRPML, TRPA으로 분류되고 있다[15]. 많은 TRP 통로 중 지금까지 알려진 냉 자극과 관련된 TRP 이온통로

는 TRPM8과 TRPA1으로 알려져 있다. TRPM8은 25 °C 이하의 온도에 의해 활성화되며 멘솔, eucalyptol, icilin 등의 화학물질에 의해서도 활성화된다고 보고되어 있다[16]. 박하에서 발견되는 멘솔에 의해 TRPM8이 활성화되어 멘솔 수용체(CMT1)로도 불리고 있으며 감각신경세포에 분포하고 있는 TRPM8은 시원한 온도 감각에는 관여하지만 냉 통증과는 관계가 없는 것으로 밝혀졌다[17-20]. TRPM8 knockout 쥐에서 시원한 온도 자극에 대한 반응은 사라졌지만 냉 통증에 대한 반응은 유지됨이 확인되었다[21,22]. 또 다른 냉 수용체인 TRPA1은 17 °C 이하의 온도인 냉 통증 유발 온도에서 활성화되는 이온통로로 시원한 감각에 관여하는 TRPM8과 달리, TRPA1은 통증을 담당하는 세포에서 발현되거나 아직 정확한 기전에 대해서는 알려지지 않았다[23,24]. 이러한 이유로 인해 감각을 조절하는 TRP 통로들의 조절 및 활성화 기전 규명을 위하여 많은 연구들이 활발히 이루어지고 있다.

한편, 지구 온난화 현상 등으로 인해 지구 온도가 상승하고 기후의 변화로 인해 피부온도 조절에 대한 연구가 화장품 분야에서 널리 연구 중에 있다. 따라서 천연물을 이용하여 시원한 감각을 조절하는 TRPM8 통로를 조절하고자 연구를 진행하였다. 영지버섯은 오래 전부터 귀중한 약재로 사용되어 왔으며 진정, 진통, 동맥경화, 만성관절염 및 항종양 효과가 알려져 있다[25]. 본 연구에서는 영지버섯 추출물 및 분획물에서 TRPM8 발현에 대한 영향을 확인하였다. 또한 활성을 갖는 물질을 분리하여 구조를 규명하고 TRPM8 발현에 대한 영향을 확인함으로써 쿨링 소재로서의 가능성을 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

영지버섯은 제천한방약초에서 구입하여 에탄올 추출 후 농축과 분획하여 실험에 사용하였다. 인간 각질형성세포(HaCaT)는 American Type Cell Culture (ATCC, USA)에서 분양 받은 세포를 사용하였으며, 세포 배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-

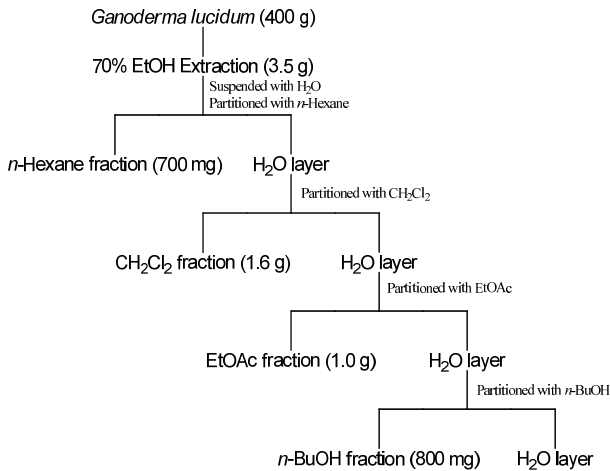


Figure 1. The flowchart of *G. lucidum* extracts liquid-liquid separation.

streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco (USA)에서 구매하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), β -actin 항체 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 sigma (USA) 제품을 사용하였으며 96-well plate, 6-well plate는 SPL (Korea) 제품을 사용하였다. TRPM8 항체는 alomone labs (Israel) 제품을 사용하였으며, 흡광도 측정을 위해 ELISA plate reader (SpectraMax i3x, Molecular Devices, UK)를 이용하였다.

2.2. 영지 버섯의 추출 및 용매 분획

영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 400 g을 70% 에탄올에 침적하여 실온에서 24 h 동안 침출시켰다. 침출시킨 시료를 여과하여 얻어진 여액을 감압 농축하여 농축물 3.5 g을 얻었다. 얻어진 농축물을 극성에 따라 분획하기 위해 유기용매를 이용한 계통적 분획을 실시하였다. 얻어진 농축물(3.5 g)을 정제수에 현탁하여 헥산으로 분획하였다. 헥산층을 제거하고 남은 정제수층을 용매 극성 순서에 따라 순차적으로 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올로 분획하여 총 5개의 분획을 얻었다. 각 층은 감압 농축하여 헥산(Hex) 분획, 메틸렌클로라이드(MC) 분획, 에틸아세테이트(EA) 분획, 부탄올(BuOH) 분획, 물(DW) 분획으로 나누었다.

2.3. 활성 성분의 분리 및 동정

헥산 분획물을 silica (C60) 레진을 이용하여 크로마

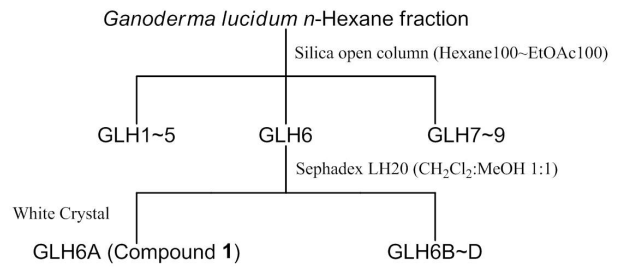


Figure 2. Isolation of ergosterol from *G. lucidum* hexane fraction.

토그래피를 실시하였다. 이때 용매로는 헥산 100%에서 시작하여 에틸아세테이트 비율을 늘려가며 에틸아세테이트 100%가 될 때까지 흘려주었다. 크로마토그래피를 통해 9개 분획을 수득하였고, 9개 분획 중 6번 분획을 메틸렌클로라이드와 메탄올이 1:1로 혼합된 용매를 사용하여 LH-20 레진 크로마토그래피를 수행하였다. 실시된 크로마토그래피를 통해 4개의 분획을 얻었고 이 중 1번 분획을 메탄올을 이용해 재결정하였고, 55 °C에서 건조하여 하얀색 결정 형태의 화합물 1을 수득하였다. 수득한 화합물은 NMR 분석을 통해 구조를 규명하였다.

2.4. 세포 배양

HaCaT 세포는 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin 및 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 2-3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

2.5. 세포 생존율 측정

HaCaT 세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 180 μ L 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24 h 안정화시켰다. 각각의 시료를 계열 희석하여 농도별로 20 μ L 처리하고 24 h 배양하였다. 각 well에 500 μ g/mL의 농도로 MTT 용액을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 2-3 h 동안 반응시킨 후, 상층액을 제거하였다. DMSO 100 μ L를 각 well에 첨가하여 생성된 formazan을 용해시킨 후, ELISA plate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 계산하였다.

2.6. Western Blot를 통한 TRPM8의 발현 측정

HaCaT 세포를 6-well plate에 4×10^5 cells/well이 되도록 1.8 mL 분주하고 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24 h 안정화시켰다. 각각의 시료를 희석하여 0.2 mL 처리하고 6 h 배양하였다. 배지를 제거한 후 $1 \times$ phosphate buffered saline으로 세척하고 scraper를 이용하여 세포를 수득하였다. 수득한 세포에 radioimmunoprecipitation assay buffer (Cell Signaling Technology, USA)를 100 μ L를 첨가하여 30 min 동안 반응시킨 후, 12,000 rpm, 4 °C에서 15 min 동안 원심 분리하여 상층액을 수득하였다. 수득한 상층액은 bicinchoninic acid assay kit (BioRad, USA)로 정량하여 20 μ g의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, BioRad, USA)에서 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 이동시킨 후, 5% skim milk (in tris-buffered saline and tween 20, TBST)를 이용하여 1 h 동안 상온에서 blocking 하였다. TBST를 이용하여 10 min 간격으로 3회 세척하고 TRPM8, β -actin의 1차 항체를 4 °C에서 24 h 동안 반응시켰다. 그 후, TBST를 이용하여 10 min 간격으로 3회 세척하고 2차 항체(in 5% skim milk)를 상온에서 2 h 동안 반응 시킨 후 다시 TBST를 이용하여 3회 세척하였다. Enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 사용해 밴드를 관찰하고 ImageJ 1.47 software를 이용하여 밴드를 수치화하였다.

2.7. 통계처리

본 연구의 실험은 3회 반복하여 수행하였으며, 실험 결과는 mean \pm standard deviation (S.D.)로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 분석하였으며, 유의성 수준은 **p* < 0.05로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 영지버섯추출물의 hexan 분획으로부터 에르고스테롤의 분리 및 동정

영지버섯추출물은 70% 에탄올을 이용하여 추출하였으며 얻어진 추출물을 용매의 극성에 따라 순차적으로 분리하여 hexan, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 수득하였다. 또한, hexan 분획물

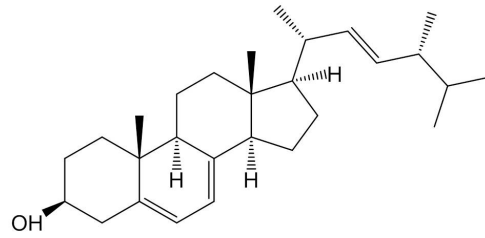


Figure 3. The structure of ergosterol.

로부터 silica 레진, LH-20 레진을 이용하여 크로마토그래피를 실시하여 화합물 1 (GLH6A)을 분리하였다. ¹H-NMR 결과, δ_H 5.57 (1H, dd, *J* = 5.4, 2.8, H-6), 5.38 (1H, q, *J* = 3.0, H-7)로부터 6번 탄소와 7번 탄소의 olefin proton을 확인할 수 있었다. 또한 δ_H 5.19 (1H, m, H-23), 5.16 (1H, m, H-22)로부터 22번 탄소와 23번 탄소의 olefin proton을 확인할 수 있었다. 그리고 ¹³C-NMR 확인 결과, 5, 6, 7, 8, 22, 23번의 olefin carbon을 확인하여 화합물 1은 에르고스테롤(ergosterol)로 동정하였다(Figure 3)[26].

UV (CH₃OH): λ_{max} nm 201, 272, 281

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 5.57 (1H, dd, *J* = 5.4, 2.8, H-6), 5.38 (1H, q, *J* = 3.0, H-7), 5.19 (1H, m, H-23), 5.16 (1H, m, H-22), 1.03 (3H, d, *J* = 6.5, H-21), 0.93 (3H, s, H-19), 0.91 (3H, d, *J* = 7.0, H-28), 0.83 (3H, d, *J* = 7.0, H-27), 0.81 (3H, d, *J* = 7.0, H-26), 0.62 (3H, s, H-18)

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ : 38.37 (C-1), 31.96 (C-2), 70.45 (C-3), 40.77 (C-4), 139.80 (C-5), 119.57 (C-6), 116.28 (C-7), 141.37 (C-8), 46.25 (C-9), 37.03 (C-10), 21.54 (C-11) 39.08 (C-12), 42.83 (C-13), 54.83 (C-14), 22.99 (C-15), 28.29 (C-16), 55.73 (C-17), 12.04 (C-18), 16.27 (C-19), 40.42 (C-20), 21.11 (C-21), 135.57 (C-22), 131.97 (C-23), 42.83 (C-24), 33.09 (C-25), 19.63 (C-26), 19.94 (C-27), 17.59 (C-28)

3.2. 영지버섯추출물, 분획물 및 에르고스테롤의 세포 생존율 확인

인간 유래 각질 형성 세포인 HaCaT cell에서 영지버섯추출물, 분획물 5종 및 에르고스테롤을 각각 농도별

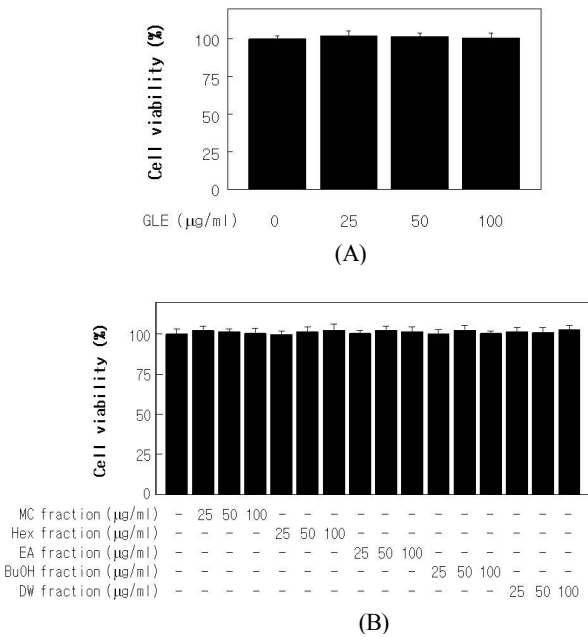


Figure 4. Cell viability of *G. lucidum* extract (GLE) and fractions. Cells were treated with various concentrations of GLE (A), and fractions (B) for 24 h. Viability was determined in the MTT assay by measuring the absorbance at 540 nm. Significance was determined compared to untreated cells (**p* < 0.05). All data are expressed as mean ± S.D. of three separate experiments performed in triplicate.

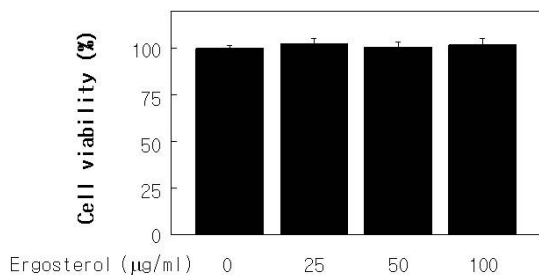


Figure 5. Cell viability of ergosterol. Cells were treated with various concentrations of ergosterol for 24 h. Viability was determined in the MTT assay by measuring the absorbance at 540 nm. Significance was determined compared to untreated cells (**p* < 0.05). All data are expressed as mean ± S.D. of three separate experiments performed in triplicate.

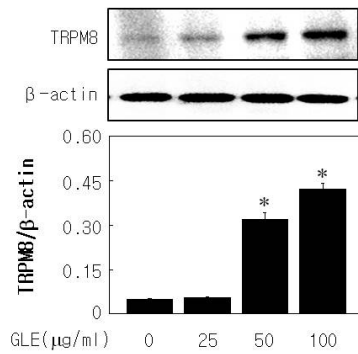


Figure 6. The effect of *G. lucidum* extract on TRPM8 expression. HaCaT cells were treated with various concentrations of GLE for 6 h. Total cell extracts were blotted with TRPM8 and β-actin antibodies. Band intensities were quantified using ImageJ 1.47 software and normalized to β-actin.

로 처리하여 MTT assay를 수행하고 세포에 대한 시료의 세포 독성을 평가하였다. 25-100 µg/mL의 농도로 세포에 처리한 결과, 영지버섯추출물 및 분획물 5종이 100 µg/mL의 농도까지 독성을 보이지 않음을 확인하였다(Figure 4). 영지버섯추출물에서 분리한 유효 성분인 에르고스테롤 또한 100 µg/mL의 농도까지 통계적으로 유의한 세포 독성이 보이지 않음을 확인하였다(Figure 5).

3.3. 영지버섯추출물, 분획물 5종 및 에르고스테롤의 TRPM8 발현에 미치는 영향

피부 자극 기전 중에서 cold and menthol receptor로 알려져 있는 일시적인 수용체 전위 통로인 TRPM8의 발현에 대한 영지버섯추출물, 분획물 5종 및 에르고스테롤의 효과를 알아보았다. 각각의 시료를 세포 독성이 없는 농도인 25-100 µg/mL로 처리한 결과, 영지버섯추출물이 50 µg/mL 농도부터 유의적으로 TRPM8의 발현을 증가시켰고 DW 분획물과 Hex 분획물 또한 TRPM8의 발현을 유의적으로 증가시킴을 확인하였다(Figure 6, 7). 영지버섯추출물의 유효 성분인 에르고스테롤 또한 TRPM8의 발현을 25 µg/mL 농도부터 유의적으로 증가시킴을 확인하였다(Figure 8).

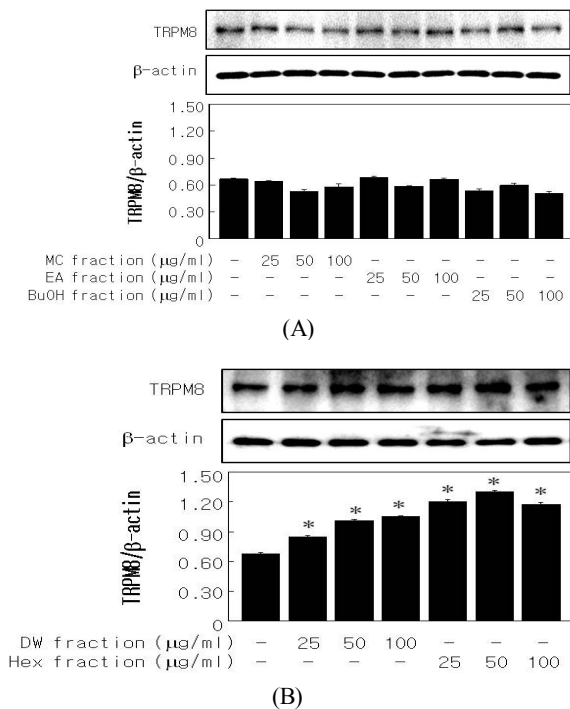


Figure 7. The effect of *G. lucidum* extract fraction on TRPM8 expression. HaCaT cells were treated with various concentrations of fraction (Hex, MC, EA, BuOH, DW) for 6 h. Total cell extracts were blotted with TRPM8 and β -actin antibodies. Band intensities were quantified using ImageJ 1.47 software and normalized to β -actin.

4. 결 론

열에 의한 노화는 피부의 온도가 올라감에 따라 MMP-1의 활성이 증가하고 콜라겐의 분해가 일어나 피부주름을 형성시켜 노화를 야기한다[4]. TRPM8은 감각신경세포 및 피부 세포에서 발현되는 수용체로 냉통증에 관여하는 TRPA1과 다르게 냉 감각을 담당하는 채널로 알려져 있다[17-20]. 본 연구에서는 열에 의해 높아진 피부에 TRPM8 조절을 통해 시원한 감각을 전달하기 위한 실험을 진행하였다. 천연물인 영지버섯을 이용하여 추출물 및 극성에 따라 순차적으로 분획하여 분획물을 수득하였다. TRPM8의 발현에 대한 영지버섯추출물과 분획물의 영향을 확인한 결과 영지추출물이 50 μ g/mL 농도부터 유의적으로 TRPM8의 발현을 증가시켰고 Hex 분획물 및 DW 분획물에서 TRPM8 발현이 농도의존적으로 증가함을 확인하였다. TRPM8 발현 증가 활성이 가장 높은 Hex 분획물에서 유효 성분을

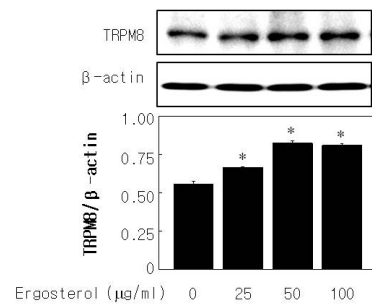


Figure 8. The effect of ergosterol on TRPM8 expression. HaCaT cells were treated with various concentrations of ergosterol for 6 h. Total cell extracts were blotted with TRPM8 and β -actin antibodies. Band intensities were quantified using ImageJ 1.47 software and normalized to β -actin.

분리하고 ^1H 및 ^{13}C NMR 데이터를 통해 구조를 규명하였다. 유효 성분인 에르고스테롤 역시 농도의존적으로 TRPM8의 발현을 효과적으로 증가시킴을 확인하였다. 이상의 연구결과를 바탕으로 천연 소재인 영지버섯을 에탄올로 추출한 추출물, Hex 분획물, DW 분획물 및 활성성분인 에르고스테롤이 효과적으로 TRPM8의 발현을 증가시켜 쿨링 감각을 나타낼 것으로 추정되었다. 한편, TRPM8의 발현 증가를 통해 피부의 온도 변화가 실질적으로 유도되는지 임상 실험이 추가로 진행되어야 한다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통산자원부에서 지원하는 경제협력권 산업육성사업 비즈니스 협력형 R&D과제(과제번호: R0004134)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

Reference

1. B. A. Gilchrest, Skin aging aging and photoaging:an overview, *K. Am. Acad. Dermatol.*, **21**(3), 610 (1989).
2. M. A. Farage, K. W. Miller, P. Elsner, and H. I. Maibach, Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review, *Int. J. Cosmetic Sci.*, **30**(2), 87 (2008).
3. H. Lee, Inhibitory effects of Hesperidin on the ultraviolet B-induced photo-aging, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**(5), 631 (2015).

4. G. J. Fisher, S. Kang, J. Varani, A. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees, Mechanisms of photoaging and chronological aging, *Arch. Dermatol.*, **138**(11), 1462 (2002).
5. G. J. Fisher, Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.*, **337**(20), 1419 (1997).
6. C. H. Park, M. J. Lee, J. Ahn, S. Kim, H. H. Kim, K. H. Kim, H. C. Eun, and J. H. Chung, Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through erk and jnk activation and via an autocrine interleukin-6 loop, *J. Invest. Dermatol.*, **123**(6), 1012 (2004).
7. A. V. Benedetto, The environment and skin aging, *Clin. Dermatol.*, **16**(1), 129 (1998).
8. P. Shahrad and R. Marks, The wages of warmth: changes in erythema ab igne, *Br. J. Dermatol.*, **97**(2), 179 (1977).
9. W. C. Johnson and T. Butterworth, Erythema ab igne elastosis, *Arch. Dermatol.*, **104**(2), 128 (1971).
10. Y. M. Lee, S. M. Kang, and J. H. Chung, The role of TRPV1 channel in aged human skin, *J. Dermatol. Sci.*, **65**(2), 81 (2012).
11. N. Kato, T. Kobayashi, and H. Honda, Screening of stress enhancer based on analysis of gene expression profiles: enhancement of hyperthermia-induced tumor necrosis by an MMP-3 inhibitor, *Cancer. Sci.*, **94**(7), 644 (2003).
12. A. Gorostizaga, L. Brion, P. Maloberti, F. C. Maciel, E. J. Podesta, and C. Paz, Heat shock triggers MAPK activation and MKP-1 induction in leydig testicular cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**(1), 23 (2005).
13. S. W. Park, Transient receptor potential (TRP) channels, *Korean J. Otorhinolaryngol.-Head Neck Surg.*, **53**(2), 65 (2010).
14. K. Venkatachalam and C. Montell, TRP channels, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 387 (2007).
15. M. J. Caterina, Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **292**(1), R64 (2007).
16. D. A. Andersson, H. W. Chase, and S. Bevan, TRPM8 activation by menthol, idilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH, *J. Neurosci.*, **24**(23), 5364 (2004).
17. J. D. Levine and N. Alessandri-Haber, TRP channels: targets for the relief of pain, *Biochim. Biophys. Acta*, **1772**(8), 989 (2007).
18. T. Foulkes and J. N. Wood, Mechanisms of cold pain, *Channels (Austin)*, **1**(3), 154 (2007).
19. D. D. Mckemy, How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation, *Mol. Pain.*, **1**, 16 (2005).
20. S. J. Jung, The role of transient receptor potential channel in pain, *Hanyang Med. Rev.*, **31**(2), 116 (2011).
21. D. M. Bautista, J. Siemens, J. M. Glazer, P. R. Tsuruda, A. I. Basbaum, C. L. Stucky, S. E. Jordt, and D. Julius, The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold, *Nature*, **448**(7150), 204 (2007).
22. A. Dhaka, A. N. Murray, J. Mathur, T. J. Earley, and M. J. Petrus, A. Patapoutian, TRPM8 is required for cold sensation in mice, *Neuron*, **54**(3), 371 (2007).
23. G. M. Story, A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, and A. Patapoutian, ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures, *cell*, **112**(6), 819 (2003).
24. M. Tominaga and M. J. Caterina, Thermosensation and pain, *J. Neurobiol.*, **61**(1), 3 (2004).
25. S. H. Kwon, C. N. Kim, C. Y. Kim, S. T. Kwon, K. M. Park, and S. Hwangbo, Antitumor activities of protein-bound polysaccharide extracted from mycelia of mushroom, *Korean J. Food&Nutr.*, **16**(1), 15 (2003).
26. I. Rubinstein, L. J. Goad, A. D. H. Clague, and L. J. Mulheim, The 220 MHz NMR spectrum of phytosterols, *Phytochemistry*, **15**(1), 195 (1976).