콜라겐 합성과 MMP-1 발현에 대한 생물전환 지실 추출물의 효과

이계원^a, 박성민^{1,a}, 유영춘², 조영호*

Effect of Ponciri Fructus Extracts Fermented with *Ganoderma lucidum* on the Collagen Synthesis and Expression of Matrix Metalloproteinase-1

Gye Won Lee^a, Sung Min Park^{1,a}, Yung Choon Yoo², and Young Ho Cho*

접수: 2013년 2월 13일 / 게재승인: 2013년 4월 21일

© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Ponciri fructus, the unripe fruits of *Poncirus trifoliata*, are widely used in oriental traditional medicine as a remedy for inflammation, gastritis, emesis, digestive ulcers, allergy, and dysentery. To study the anti-wrinkle effects of Ponciri fructus extract (PFE) containing flavanone glycosides, PFE was fermented with *Ganoderma lucidum* mycelia and its biological activities were investigated. In Ponciri fructus extracts fermented with *G. lucidum* (G-PFE), polyphenol content was $1,021.00 \pm 0.50$ $\mu\text{g/mL}$ and flavonoid content was 589.41 ± 0.21 $\mu\text{g/mL}$. G-PFE was found to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and superoxide anion radical by a dose dependent manner, respectively. G-PFE showed higher antioxidant activity than that of PFE. In addition, the photoprotective properties of G-PFE was tested in human dermal fibroblasts (HDF) exposed to UVA radiation. G-PFE inhibited the activity of matrix metalloproteinase-1

(MMP-1) and showed a dose dependent decrease in the expression level of MMP-1. G-PFE also increased collagen biosynthesis in HDF. These results demonstrate that G-PFE could be useful as a potential cosmetic ingredient for anti-wrinkle.

Keywords: Ponciri Fructus, *Ganoderma lucidum*, Collagen Biosynthesis, Matrix Metalloproteinase-1, Anti-wrinkle

1. 서론

피부 노화는 나이가 들어감에 따라 발생하는 내인성 노화와 자외선과 같은 외부 인자에 의해 발생하는 외인성 노화로 구분되며, 특히, 자외선에 의한 노화를 광노화 (photoaging)라고 한다 [1]. 자외선 (ultraviolet)은 피부세포 내에 유해한 활성 산소종 (reactive oxygen species)을 생성시켜 여러 가지 신호전달 체계를 활성화함으로써 피부세포를 구성하는 불포화 지방산, 단백질, DNA 등의 고분자 물질과 반응하여 피부 결합조직인 콜라겐, 엘라스틴 등과 같은 세포외 기질 단백질의 합성을 줄이고, 구조를 변형시켜 탄력을 감소시키는 것으로 알려져 있다 [2,3].

콜라겐은 섬유아세포에서 합성되어 진피의 대부분을 차지하는 세포외 기질의 주요성분으로 금속 단백질 분해효소 (matrix metalloproteinases, MMPs)에 의해 분해되는 주요 기질 단백질이다 [4]. MMPs는 피부의 각질형성세포, 섬유아세포를 비롯한 많은 세포들로부터 분비되며, 현재까지 약 20여 종 이상의 종류가 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, 콜라겐 type I과 III를 기질

건양대학교 제약생명공학과
Department of Pharmaceutics & Biotechnology, College of Medical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea
Tel: +82-41-730-5695, Fax: +82-41-730-5695
e-mail: micrael@konyang.ac.kr

¹(주)코씨드바이오팜 기술연구소
R&D Center, CoSeedBioPharm Co., Chungbuk 363-792, Korea

²건양대학교 의학과
²Department of Microbiology, College of Medicine, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

*These authors contributed equally to this work as the first author.

로 하고 있다 [5]. Brenneisen 등 [6]의 연구에 의하면 자외선 조사와 활성 산소종에 의해 피부내의 MMPs 활성이 증가되어 진피층 내의 콜라겐 등과 같은 세포외 기질들의 붕괴에 영향을 미치며, MMPs가 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다.

지실 (*Ponciri fructus*)은 운향과 (Rutaceae)에 속하는 상록 소고목인 탕자나무 (*Poncirus trifoliata* Rafinesque)의 미숙과로 5~6월에 1~2 cm의 어린 열매를 채취하여 쪼개서 음건한 것을 사용하며, 우리나라 중부 이남의 각지에서 재배된다 [7]. 한의학에서 지실은 가슴과 복부 팽만, 수종, 소화불량, 변비 등의 증상을 완화시켜주는 목적으로 사용되었다 [8]. 최근 연구보고에 따르면 지실은 항알러지 작용 [9], 항균작용 [10], 항암작용 [11] 및 멜라닌 생성 억제작용 [12] 등이 있는 것으로 알려져 있다.

지실에는 flavonoids 성분으로 poncirin, naringin, hesperidin, 정유성분으로 limonen, linalool, camphene, alkaloid 성분으로 skimmianine 등이 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다 [13-15]. Poncirin은 Citrus 속 식물에서 흔히 발견되는 주요 성분으로 flavanone류에 속하며 주로 페놀성 수산기와 함께 배당체 (glycosides) 형태로 존재한다. 유사물질로는 naringin, hesperidin 등이 있고 그들의 비배당체 (aglycone) 형태로 isosakuranetin, naringenin, hesperetin 등이 가능하다. Marotti 등의 연구에 따르면 생물전환을 통해 배당체를 비배당체로 전환하면 생물활성이 증가되는 것으로 알려져 있다 [16-18].

따라서 본 연구에서는 항암작용, 항산화작용, 면역조절작용 등이 뛰어난 민주름버섯목 불로초과에 속하는 식용버섯인 영지버섯 (*Ganoderma lucidum*) 균사체 [19]를 발효균주로 사용하여 생물전환 지실 추출물을 제조하였다. 제조된 생물전환 지실 추출물로부터 유효성분의 확인, 항산화 활성, 콜라겐 생합성 촉진효과, MMP-1 활성 저해효과 및 MMP-1 발현 저해효과를 측정하여 주름개선 소재로서의 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시 균주, 세포 배양 및 시약

본 실험에 사용된 공시균주는 영지버섯 (*Ganoderma lucidum* KCTC 6729) 균사체로 한국생명공학연구원 생명자원센터 (Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 신생아의 포피 조직에서 분리한 사람 피부 섬유아세포는 Modern Tissue Technology사 (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 사람 피부 섬유아세포를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하고 계대 배양한 뒤 6~10 세대 세포를 실험에 이용하였다. 콜라겐 정량을 위해 Procollagen Type I C-Peptide EIA kit (MK101, Takara Biomedical Inc., Shiga, Japan)를 구입하여 사용하였다. MMP-1 정량을 위해 MMP-1 Biotrak™ ELISA system (Amersham, Buckingham-

shire, UK)을 구입하여 사용하였다. *In vitro* MMP-1 활성 저해효과 측정을 위해 사용된 형광물질이 표지된 DQ collagen, collagenase, 1,10-phenanthroline (1,10-PT)는 Life Technologies 사 (CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), DMSO, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), bovine serum albumin (BSA) 및 nitroblue tetrazolium (NBT)는 Sigma-Aldrich사 (MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약들은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

2.2. 지실 추출물 제조

본 실험에 사용한 지실은 서울 경동시장 내 한약 건재상에서 구입하여 사용하였다. 세절하여 음건한 지실 100 g을 증류수 1 L로 3시간씩 3회 환류추출 후 냉침하여 와트만 (Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50°C 이하에서 감압농축 및 동결건조한 후, 18.1 g (수율 18.1%)의 추출물을 얻었다. 동결 건조물 10 g을 증류수 1 L에 용해하여 지실 추출물 (*Ponciri fructus* extract, PFE)을 제조하였다.

2.3. 생물전환 지실 추출물 제조

영지버섯 균사체를 potato dextrose agar (PDA)가 든 시험관에 사면배양하여 4°C에 보관하여 1개월마다 계대배양하여 사용하였다. 상기 사면배지에서 계대배양된 균사체를 무균적으로 균질화하여 탄소원으로 지실 추출물과 질소원으로 효모-맥아즙 (0.3~1.0% (w/v))이 혼합된 배지에 영지버섯 균사체가 5% (v/v) 되도록 접종한 후 발효조 내에서 온도 28°C, 회전수 150 rpm의 조건으로 6일간 배양하였다. 배양 후 배양액으로부터 영지버섯 균사체를 제거한 다음 생물전환 지실 추출물 (*Ponciri fructus* extract fermented with *G. lucidum*, G-PFE)을 제조하였다.

2.4. β -glucosidase 활성 측정

배양된 영지버섯 균사체의 β -glucosidase의 활성을 24시간 간격으로 배양액을 회수하여 측정하였다. 시험관에 배양 상등액 0.5 mL, 100 mM acetate buffer (pH 5.0) 1 mL 및 5 mM *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside 0.5 mL를 각각 넣고 혼합한 다음, 37°C에서 30분간 반응하였다. 0.2 M Na₂CO₃ 용액 2 mL를 넣어 반응을 종결한 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. β -glucosidase의 활성 1 unit는 분당 1 μ mol의 *p*-nitrophenol을 분해하는 효소량으로 정의하였다.

2.5. 생물전환 지실 추출물의 유효성분 확인

2.5.1. 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis 방법 [20]을 변형하여 측정하였다. 즉, 적당하게 희석된 시료 1 mL에 95% ethanol 1 mL와 증류수 5 mL를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu's reagent 0.5 mL를 넣어 잘 섞어 주었다. 5분간 방치한 후, 10% Na₂CO₃ 1 mL를 가한 후, 725 nm에서 1시간 이내에 흡

광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 미리 작성한 표준검량곡선으로부터 환산하여 정량하였다.

2.5.2. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Moreno 등 [21]의 방법에 의해 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 에탄올 4.3 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 40분 동안 정치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 총 플라보노이드 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준검량곡선으로부터 환산하여 정량하였다.

2.5.3. HPLC를 이용한 flavanone aglycone 함량 변화 분석

PFE에 존재하는 flavanone glycoside인 poncirin과 G-PFE에 존재하는 flavanone aglycone인 isosakuranetin의 변화를 확인하기 위하여 HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 실시하였다. HPLC 분석조건은 다음과 같다. 검출기 PDA detector, 검출 파장 289 nm, 분석 칼럼 Atlantis dC₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm, Waters, USA), 시료 주입량 20 µL, 유속 1.0 mL/min, 이동상 용매로는 poncirin의 경우 메탄올:0.3% 인산용액:아세트니트릴 (20:60:20, v/v%), isosakuranetin의 경우 메탄올:0.3% 인산용액:아세트니트릴 (25:45:30, v/v%)로 분석하였다.

2.6. 항산화 활성

2.6.1. DPPH 라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼에 대한 소거활성은 Blois [22]의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 20 µL에 0.1 mM DPPH 180 µL를 넣고 혼합한 후, 30분 동안 방치한 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 [(시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 - 시료를 첨가한 반응군의 흡광도) / 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 × 100] 식으로부터 구하였다.

2.6.2. Superoxide 음이온 라디칼 소거 활성

Superoxide 음이온 라디칼 소거활성은 Okamura 등 [23]의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 20 µL, 2 mM xanthine과 0.1 mM NBT 혼합액 160 µL를 넣고, 0.05 mM EDTA가 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹인 xanthine oxidase (0.5 unit/mL) 20 µL를 가하여 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 여기에 2.5 N HCl 80 µL를 첨가하여 반응을 중지시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide 음이온 라디칼 소거능은 [(시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 - 시료를 첨가한 반응군의 흡광도) / 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 × 100] 식으로부터 구하였다.

2.7. 세포독성 측정

세포 독성은 MTT 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann [24]의 방법을 변형하여 실시하였다. HDF를 2×10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를

투여하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액 (5 µg/mL)을 첨가하고 4시간 후 원심 분리하여 상등액을 제거하고, 100 µL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후, 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader (BioTek Instruments, VT, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. 콜라겐 생합성 촉진 효과 측정

HDF 배양액 내에서 생성되는 콜라겐 생합성 정도는 Pro-collagen Type I C-Peptide EIA kit (Japan)를 사용하여 측정하였다. 즉, 세포를 2×10⁶ cells/well 농도로 6-well plate에 접종하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료를 혈청 무첨가 배지로 적정 농도로 희석하여 첨가한 후, 24시간 추가 배양하였다. 양성 대조군으로 사용한 비타민 C는 17.62 µg/mL의 농도로 첨가하였다. 단클론 항체 (mouse monoclonal anti-PIP)가 coating된 microplate의 각 well에 antibody-peroxidase (POD) 용액 100 µL와 배양 상등액 또는 표준액 20 µL씩 넣고 잘 혼합한 다음 37°C에서 3시간 반응하였다. 세척용 완충제 (wash buffer)로 4회 세척한 다음, 기질 용액 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)/H₂O₂)을 각 well에 100 µL씩 넣고 실온 (20~25°C)에서 15분간 반응하였다. 1 M H₂SO₄로 반응을 완전히 중지시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 표준액에 대한 표준곡선으로부터 시료의 농도를 산출하였다.

2.9. MMP-1 활성 저해 효과 측정

시료의 MMP-1 활성 저해 효과 측정은 Wang 등 [5]이 사용한 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 즉, 반응완충액 100 µL에 DQ collagen (0.25 mg/mL) 20 µL, 시료 40 µL와 0.5 unit collagenase 40 µL를 첨가하였다. 암소, 실온에서 20분경과 후, 형광분광광도계(PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 흡수파장 495 nm, 방출파장 515 nm로 형광값을 측정하였고, 대조군으로 효소액 대신 반응 완충액을 효소와 동량 첨가하여 형광값을 측정하였다. 양성 대조군으로는 1,10-PT를 사용하였다.

2.10. MMP-1 발현 저해 효과 측정

UVA 조사에 의해 유도되는 MMP-1 발현 저해효과 측정은 MMP-1 Biotrak™ ELISA system (UK)를 이용한 enzyme linked immunosorbent assay 방법으로 실시하였다. 먼저 HDF에 UVA를 조사한 후, 시료를 처리하여 24시간 배양한 배양 상등액 또는 표준액을 MMP-1에 대한 단클론 항체 (mouse monoclonal anti-MMP-1)로 coating된 microplate의 각 well에 100 µL씩 분주한 후, 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 세척용 완충제로 4회 세척한 다음, 각 well에 MMP-1에 대한 다클론 항체 (rabbit anti-MMP-1)를 100 µL씩 분주한 후, 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 세척용 완충제로 4회 세척한 다음 각 well에 peroxidase conjugate (donkey anti-rabbit Horseradish Peroxidase)를 100 µL씩 분주한 후, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 후, 세척과정을 4회 반복하였으

며, 희석된 기질 용액을 각 well에 100 μ L씩 분주한 후, 실온에서 30분간 반응하였다. 반응 정지 용액 (1 M H_2SO_4)을 각 well에 100 μ L씩 넣고 30분 내에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 표준액에 대한 표준곡선으로부터 시료의 농도를 산출하였다.

2.11. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표기하였으며, 각 군간의 통계적 유의성 검증은 SPSS 18.0 (SPSS Inc., IL, USA)을 이용한 one-way ANOVA로 하였으며, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀 함량 및 플라보노이드 함량 측정 결과

폴리페놀이란 녹색식물이 광합성 작용을 할 때 생성된 탄수화물의 일부가 변환한 2차 대사산물로 식물체에 8,000여 개의 구조를 가진 성분으로 존재하며 페놀성 화합물이라고도 한다. 분자 내 페놀성 수산기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질이 있기 때문에 항산화 작용, 항암 및 콜레스테롤 저하작용 등의 다양한 생리활성을 가진다 [25]. 또한, 플라보이드는 항균, 항암, 항바이러스, 항알러지 및 항염증 활성 등이 보고되어 있다 [26].

G-PFE와 PFE 내 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량 변화를 측정하기 위해 표준물질로 각각 tannic acid와 quercetin을 사용하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 G-PFE는 $1,021.00 \pm 0.50$ μ g/mL의 폴리페놀 화합물과 589.41 ± 0.21 μ g/mL의 플라보노이드를 함유하는 것으로 나타난 반면에 PFE는 각각 585.02 ± 0.31 μ g/mL과 107.71 ± 0.41 μ g/mL를 함유하는 것으로 나타났다. 생물전환을 통해 폴리페놀 함량은 생물전환 전

Fig. 1. Changes in β -glucosidase activity and pH in the culture of *Ganoderma lucidum* mycelia. *G. lucidum* mycelia were cultured at 28°C on a shaking incubator at 150 rpm for 7 days and the β -glucosidase activity and pH of the media were measured spectrophotometrically.

Table 1. Changes of the content of total polyphenol and flavonoid in Ponciri fructus extract fermented with *G. lucidum* (G-PFE) and Ponciri fructus extract (PFE) (μ g/mL)

Sample	Total polyphenol ¹⁾	Total flavonoid ²⁾
PFE	585.02 $\pm$ 0.31	107.71 $\pm$ 0.41
G-PFE	1,021.00 $\pm$ 0.50	589.41 $\pm$ 0.21

Each value represents of three determinations $\pm$ the standard deviations.

¹⁾A standard compound was tannic acid for total polyphenol assay.

²⁾A standard compound was quercetin for total flavonoid assay.

에 비해 약 1.75배, 플라보노이드 함량은 약 5.5배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Jeong 등 [27]이 보고한 원료 인삼보다 균사체로 배양된 인삼의 폴리페놀 함량이 높다는 결과와 일치하며, 이는 발효 균주로 사용된 영지버섯 균사체가 배양되는 과정에서 결합된 고분자 페놀 화합물이 저분자로 분해 또는 파괴되거나 새로운 페놀 화합물들이 생성되었기 때문이라 사료된다.

3.2. HPLC를 이용한 flavanone aglycone 함량 변화 분석 결과

영지버섯 균사체 배양액의 β -glucosidase 활성을 측정한 결과 배양 6일째에 75.2 mU/mL로 가장 높게 나타났다 (Fig. 1).

G-PFE 내의 flavanone aglycone인 isosakuranetin의 변화를 확인하기 위하여 HPLC로 분석하였다. Poncirin과 isosakuranetin을 메탄올과 디메틸설폭사이드에 용해 후, 표준 원액으로 하여 이를 메탄올로 적당히 희석하여 표준액으로 하였다. 검체는 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 물로 50배 희석하여 검액으로 하였다. 표준액 및 검액을 HPLC로 분석한 후, 각각의 피크 면적을 미리 작성한 검량선식에 대입하여 검액 중 poncirin과 isosakuranetin의 양을 구하였다. Poncirin과 isosakuranetin의 검량선은 모두 3.125~200 μ g/mL의 범위에서 상관계수 (R^2)가 0.999 이상으로 양호한 직선성을 보였다 (data not shown). 또한 poncirin과 isosakuranetin은 각각의 이동상 조건에서 16.8분과 17.0분에 각각 검출되었다 (Fig. 2).

영지버섯 균사체로 PFE를 생물전환시킨 결과, 생물전환 전에 비해 배당체인 poncirin의 함량은 $1,937.91 \pm 24.35$ μ g/mL에서 96.07 ± 11.20 μ g/mL 감소하였고 (Fig. 2A, B), 반면에 flavanone aglycone인 isosakuranetin의 함량은 0.17 ± 0.01 μ g/mL에서 322.09 ± 25.12 μ g/mL로 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 2C, D). 대두 추출물을 영지버섯 균사체로 생물전환한 이전의 연구결과에 따르면, 대두 추출물을 영지버섯 균사체로 배양할 경우 배당체인 isoflavone glycoside가 배양 9일 후에는 isoflavone aglycone으로 전환되는 것으로 보고되었다 [28]. 따라서 본 연구에서 나타난 G-PFE 내 flavanone aglycone이 생성되는 것은 생물전환 공정 중 flavanone glycoside가 분해되어 영지버섯 균사체의 탄소원으로 이용되고 남은 대사산물로 사료된다.

3.3. DPPH 라디칼 소거 효과

DPPH는 자유 라디칼의 안정된 모델로서 반응 중 DPPH 라디칼의 감소는 자유 라디칼의 소거반응이 진행됨을 알 수 있

Fig. 2. HPLC profile of poncirin and isosakuranetin in Ponciri fructus extract fermented with *G. lucidum* (G-PFE) and Ponciri fructus extract (PFE). The chromatogram of (A) and (B) showed change of poncirin in PFE and G-PFE, respectively. The chromatogram of (C) and (D) showed change of isosakuranetin in PFE and G-PFE, respectively.

고, 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측할 수 있기 때문에 시료의 항산화 작용을 측정할 때 DPPH 라디칼 소거능 측정법이 많이 이용된다 [29]. G-PFE의 항산화 효과를 측정한 결과, G-PFE와 PFE는 투여 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거작용을 나타내었다 (Fig. 3). 즉, G-PFE를 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 경우 각각의 DPPH 라디칼 소거능은 $30.5 \pm 1.5\%$, $50.0 \pm 3.3\%$, $80.5 \pm 2.5\%$, $95.5 \pm 5.1\%$ 로 나타난 반면에, PFE의 경우 $20.3 \pm 2.3\%$, $40.5 \pm 5.0\%$, $60.4 \pm 3.7\%$, $80.5 \pm 6.5\%$ 로 나타나 PFE를 생물전환할 경우 상대적으로 소

거능이 증가한 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 양성 대조군인 비타민 C는 11 $\mu\text{g/mL}$ 에서, G-PFE는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 것으로 나타났다. 따라서 G-PFE는 DPPH 라디칼 소거능이 단일 성분인 비타민 C에 뒤지지 않은 매우 우수한 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다.

3.4. Superoxide 음이온 라디칼 소거 효과

Superoxide 음이온 라디칼의 저해작용은 xanthine oxidase에 의해 발생한 superoxide 음이온 라디칼이 사용된 시료에 의해 제거된 비율을 측정하여 항산화 효능을 평가하는 방법으로 알려져 있다 [30]. 양성 대조군으로 3-t-butyl-4-hydroxy-anisole (BHA)를 이용하여 G-PFE의 superoxide 음이온 라디칼 소거효과를 비교한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과 G-PFE는 투여 농도 의존적으로 superoxide 음이온 라디칼 소거작용을 나타내 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 $50.0 \pm 5.0\%$, $70.5 \pm 3.2\%$, $85.7 \pm 4.7\%$, $95.5 \pm 5.5\%$ 의 소거능을 나타내었고, PFE의 경우 $40.7 \pm 3.5\%$, $60.7 \pm 5.1\%$, $70.3 \pm 5.4\%$, $80.5 \pm 4.5\%$ 의 소거능을 나타내 PFE를 영지버섯 균사체로 생물전환한 경우 상대적으로 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 양성 대조군인 BHA는 32 $\mu\text{g/mL}$ 에서, G-PFE는 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 superoxide 음이온 라디칼을 50% 소거하였다. Kim 등 [31]은 버섯 균사체로 발효하는 과정에서 항산화 활성이 낮은 화합물이 항산화 활성이 높은 물질로 생물전환 되거나 항산화 활성과 관련된 화합물이 버섯 균사체 배양 시 배지 속으로 유출되어 항산화 활성이 높아진다고 보고하였는데, 본 연구에서도 영지버섯 균사체가 PFE를 탄소원으로 하여 배양되는 과정에서 페놀성 화합물과 같은 항산화 물질들이 증가되어 항산화 활성이 높아진 것으로 사료

Fig. 3. Scavenging activity of Ponciri fructus extract fermented with *G. lucidum* (G-PFE) and Ponciri fructus extract (PFE) on DPPH radicals. All values were expressed as the average of triplicate samples with SD. The SC_{50} of vitamin C (positive control) showed 11 $\mu\text{g/mL}$. * $p < 0.05$ compared with control (negative control).

Fig. 4. Scavenging activity of Ponciri fructus extract fermented with *G. lucidum* (G-PFE) and Ponciri fructus extract (PFE) on superoxide anion radicals. All values were expressed as the average of triplicate samples with SD. The SC₅₀ of BHA (positive control) showed 32 µg/mL. * $p < 0.05$ compared with control (negative control).

된다.

3.5. 세포 독성

G-PFE와 PFE의 사람 피부 섬유아세포에 대한 독성여부를 알아보기 위하여 다양한 농도로 처리하고 세포의 생존율을 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다. G-PFE와 PFE는 최고 1,000 µg/mL 농도에서도 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 세포 독성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 1,000 µg/mL 농도 이하 범위를 기준으로 세포 실험을 실시하였다.

3.6. 콜라겐 생합성 촉진 효과

콜라겐은 진피 결합조직을 구성하는 세포외 기질의 주성분

Fig. 5. Effect of Ponciri fructus extract fermented with *G. lucidum* (G-PFE) and Ponciri fructus extract (PFE) on a cell viability in human dermal fibroblasts. All values were expressed as the average of triplicate samples with SD.

으로 프로콜라겐이라는 전구물질 형태로 합성된다. 프로콜라겐은 아미노 말단과 카르복실 말단에 프로펩티드라는 펩티드 염기서열을 포함하는데, 이들은 콜라겐 중합반응이 일어날 때 콜라겐 분자로부터 분리된다고 알려져 있다 [4]. 따라서 프로펩티드의 양을 측정함으로써 세포내 콜라겐 생합성 정도를 예측할 수 있다. G-PFE의 콜라겐 생합성 정도를 Procollagen Type I C-Peptide EIA kit (Japan)를 이용하여 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 양성 대조군으로 콜라겐 생합성 촉진 효과가 있다고 알려진 비타민 C를 이용하여 G-PFE와 비교하였다. 그 결과 G-PFE를 100, 200, 400 µg/mL 농도로 처리한 경우 음성 대조군 대비 콜라겐 생합성을 각각 $125.0 \pm 7.8\%$, $135.3 \pm 11.5\%$, $178.3 \pm 20.8\%$ 증가시키는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 양성 대조군인 비타민 C는 17.62 µg/mL 농도에서 $152.0 \pm 26.6\%$ 의 콜라겐 생합성을 촉진하였고, PFE의 경우 콜라겐 생성에 별다른 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Kim 등 [32]이 보고한 일반 우방자 추출물보다 잎새버섯 균사체로 배양된 우방자 추출물의 콜라겐 생합성 촉진효과가 우수한 결과와 일치하며, 이는 버섯 균사체가 배양되는 과정에서 생성되는 flavanone aglycone과 세포외 다당체 (exo-polysaccharide)에 의한 작용으로 사료된다.

3.7. MMP-1 활성 저해 효과

피부 건조증량의 약 90%에 달하는 콜라겐은 진피 결합조직의 주요 구성 단백질로 콜라겐의 분해는 곧 결합조직의 탄력 저하와 피부의 주름 및 처짐에 직접적인 영향을 미친다. 체내에서 생성되는 수십 종의 MMPs 가운데 MMP-1은 콜라겐에 특이적으로 작용하는 단백질 분해효소 (proteinase)로서 MMP-1의 활성을 억제하여 콜라겐을 보호하면 피부조직의 탄력을 유지하고 주름의 생성을 예방할 수 있는 것으로 알려

Fig. 6. Effect of Ponciri fructus extract fermented with *G. lucidum* (G-PFE) and Ponciri fructus extract (PFE) on a procollagen biosynthesis in human dermal fibroblasts. All values were expressed as the average of triplicate samples with SD. Vitamin C (positive control) was showed $152.0 \pm 26.6\%$ of collagen biosynthesis at 17.62 µg/mL. * $p < 0.05$ compared with control (negative control).

Fig. 7. Inhibitory effect of Ponciri fructus extract fermented with *G. lucidum* (G-PFE) and Ponciri fructus extract (PFE) on a MMP-1 activity. All values were expressed as the average of triplicate samples with SD. The IC₅₀ of 1,10-PT (positive control) showed 24 μg/mL. **p*<0.05 compared with control (negative control).

저 있다 [33]. 따라서 형광물질이 표지된 DQ collagen을 이용하여 G-PFE의 MMP-1 활성 저해 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로 MMP-1 활성 저해 작용이 있는 것으로 알려진 1, 10-PT를 이용하여 G-PFE와 비교하였다. 그 결과 Fig. 7과 같이 G-PFE는 투여 농도 의존적으로 MMP-1의 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 즉, G-PFE와 PFE를 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리한 경우, G-PFE는 MMP-1의 활성을 각각 56.7±10.4%, 82.7±6.5%, 97.3±5.5% 저해하였고, PFE는 각각 25.5±8.9%, 45.6±7.8%, 60.5±10.5% 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 PFE를 영지버섯 균사체로 배양한 경우 일반 PFE보다 MMP-1 저해 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 양성 대조군인 1,10-PT는 24 μg/mL에서 MMP-1의 활성을 50% 저해하는 것으로 나타났다. Kim 등 [34]은 인삼을 증기로 찌서 숙성시키는 과정에서 2차적인 성분 변화를 초래하여 인삼에 존재하지 않는 특유의 새로운 약효 성분들이 생성되어 MMP-1 저해 활성과 같은 새로운 생리활성이 증가된다고 보고하였는데, 본 연구에서 G-PFE가 일반 PFE보다 MMP-1 저해 활성이 증가된 것도 버섯 균사체 배양시 증가되는 β-glucosidase의 활성에 의해 flavanone aglycone을 비롯한 새로운 유효 성분들이 증가되어 생리활성이 증가된 것으로 사료된다.

3.8. MMP-1 발현 저해 효과

자외선은 피부에서 활성 산소종을 생성시켜 다수의 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 전사인자인 activator protein-1 (AP-1)과 nuclear factor-κB (NF-κB)를 활성화시켜 염증반응과 함께 콜라겐 분해를 촉진하는 MMP-1의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다 [35]. 따라서 UVA 조사에 의해 유도되는 MMP-1 발현에 미치는 G-PFE의 영향을 MMP-1 Bio-trak™ ELISA system (UK)을 이용하여 측정하였다. 양성 대

Fig. 8. Inhibitory effect of Ponciri fructus extract fermented with *G. lucidum* (G-PFE) and Ponciri fructus extract (PFE) on the expression of MMP-1 in UVA-irradiated human dermal fibroblasts. All values were expressed as the average of triplicate samples with SD. The IC₅₀ of RA (positive control) showed 1.1 μg/mL. **p*<0.05 compared with control (negative control, UVA).

조군으로 MMP-1의 발현을 저해하는 것으로 알려진 all-trans retinoic acid (RA)를 이용하여 G-PFE와 비교한 결과 Fig. 8에 나타난 바와 같이 G-PFE는 농도 의존적으로 MMP-1의 발현을 저해하였다. 즉, G-PFE를 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리한 경우, MMP-1의 발현을 각각 60.9±3.3%, 72.6±2.7%, 84.4±5.2% 저해하는 것으로 나타났으며, PFE의 경우 14.8±3.5%, 24.5±4.5%, 35.5±5.3% 저해하는 것으로 나타났다 (*p*<0.05). 양성 대조군인 RA는 1.1 μg/mL의 농도에서 52.0±2.4% 저해하는 것으로 나타났다. PFE를 영지버섯 균사체로 배양한 경우 일반 PFE보다 UVA에 의한 MMP-1의 발현 저해 활성이 증가하는 것으로 나타났다. Bae 등 [36]은 잎새버섯 균사체가 생성하는 세포의 다당체가 UVA에 의해 증가되는 MMP-1의 발현을 저해한다고 보고하였다. 따라서 G-PFE가 일반 PFE보다 MMP-1 발현 저해 효과가 우수한 것은 영지버섯 균사체의 배양에 의해 flavanone aglycone과 세포의 다당체의 생성이 증가되었기 때문인 것으로 사료된다. 향후 G-PFE의 MMP-1 발현 저해 메커니즘과 콜라겐 생합성 촉진 메커니즘에 관한 연구는 추가적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 영지버섯 균사체를 발효균주로 사용하여 제조된 G-PFE로부터 유효성분의 확인, 항산화 활성, 콜라겐 생합성 촉진 효과, MMP-1의 활성 저해 효과 및 UVA가 조사된 사람 피부 섬유아세포에서 MMP-1 발현 저해 효과를 측정하여 주름개선 소재로서의 가능성을 검토하였다.

일반 PFE를 탄소원으로 하여 영지버섯 균사체를 배양한

경우 flavanone glycoside (poncirin)가 flavanone aglycone (isosakuranetin)으로 전환되어 여러 가지 생물학적 활성이 증가됨을 확인하였다. G-PFE의 항산화 활성을 측정한 결과 농도의존적으로 DPPH 라디칼과 superoxide 음이온 라디칼을 소거하였다. G-PFE를 100, 200, 400 µg/mL 농도로 처리한 경우 콜라겐 생합성을 음성 대조군 대비 각각 125.0±7.8%, 135.3±11.5%, 178.3±20.8% 증가시키는 것으로 나타났다. MMP-1의 활성은 각각 56.7±10.4%, 82.7±6.5%, 97.3±5.5% 저해하는 것으로 나타났으며, MMP-1의 발현은 각각 60.9±3.3%, 72.6±2.7%, 84.4±5.2% 저해하는 것으로 나타났다. 이상의 실험 결과를 종합해 볼 때 G-PFE는 사람의 섬유아세포에 대하여 콜라겐 생합성을 증가시키고 MMP-1의 활성과 발현을 억제하였으며 항산화 효과가 우수한 것으로 보아 주름개선 소재로써 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2010년도 산학연공동기술개발사업(No. 00042149)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

REFERENCES

- Jenkins, G. (2002) Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* 123: 801-810.
- Fisher, G. J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, J. J. Voorhees (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* 138: 1462-1470.
- Kim, E. J., M. K. Kim, X. J. Jin, J. H. Oh, J. E. Kim, and J. H. Chung (2010) Skin aging and photoaging alter fatty acids composition, including 11, 14, 17- eicosatrienoic acid, in the epidermis of human skin. *J. Korean Med. Sci.* 25: 980-983.
- Kim, N. M., B. S. Koo, S. K. Lee, E. I. Hwang, S. H. So, and J. H. Do (2007) Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-1 activity in human dermal fibroblast. *J. Ginseng Res.* 31: 86-92.
- Wang, Y., A. R. Johnson, Q. Z. Ye, and R. D. Dyer (1999) Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 274: 33043-33049.
- Brenneisen, P., H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek (2002) Ultra-violet-B irradiation and matrix metalloproteinases from induction via signaling to initial events. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 973: 31-43.
- Park, J. H. and S. H. Sung (2007) *The Key Medicinal Plants*, pp. 415-417. Shinilbooks, Seoul, Korea.
- KAPE (2008) *Handbook of the Korea Pharmacopoeia*. 9th ed., pp. 1176-1177. Shinilbooks, Seoul, Korea.
- Kim, H. M., H. J. Kim, and S. T. Park (1999) Inhibition of immunoglobulin E production by *Poncirus trifoliata* fruit extract. *J. Ethnopharmacol.* 66: 283-288.
- Jeon, R. H., H. J. Choi, S. J. Moon, and M. S. Na (2010) The effects of antioxidant and antimicrobial activity with *Poncirus trifoliata* ethanol extracts during growth. *J. Korean Soc. Cosmetol.* 16: 1225-1230.
- Cha, M. R., M. Y. Yoon, E. S. Son, and H. R. Park (2009) Selective cytotoxicity of Poncirus fructus against glucose-deprived PANC-1 human pancreatic cancer cells via blocking activation of GRP78. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 2167-2171.
- Son, A. R., J. Y. Choi, J. A. Kim, S. H. Cho, X. G. Hua, S. H. Park, S. R. Chung, T. C. Chung, Y. D. Jahng, J. K. Son, and S. H. Lee (2005) Isolation of melanogenesis inhibitors from *Poncirus fructus*. *Kor. J. Pharmacogn.* 36: 1-8.
- Shoji, N., A. Umeyama, T. Takemoto, and Y. Ohizumi (1984) Isolation of a cardiogenic principle from *Alpinia ocyphylla*. *Planta Med.* 50: 186-187.
- Kiuchi, F. M. Shibuya, and U. Sankawa (1982) Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from *Aipinia officinarum*. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 2279-2282.
- Shoji, N., A. Umeyama, Y. Asakawa, T. Takemoto, K. Nomoto, and Y. Ohizumi (1984) Structural determination of nootkatol, a new sesquiterpene isolated from *Alpinia oxyphylla* miquel possessing calcium-antagonistic activity. *J. Pharm. Sci.* 73: 843-844.
- Marotti, I., A. Bonetti, B. Biavati, P. Catizone, and G. Dinelli (2007) Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flavonoid glycosides by bifidobacterium species from human intestinal origin. *J. Agric. Food Chem.* 55: 3913-3919.
- Nielsen, I. L., W. S. Chee, L. Poulsen, E. Offord-Cavin, S. E. Tasmussen, H. Grederiksen, M. Enslin, D. Barron, M. N. Horcajada, and G. Williamson (2006) Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J. Nutr.* 136: 404-408.
- Otieno, D. O. and N. P. Shah (2007) A comparison of changes in the transformation of isoflavones in soymilk using varying concentrations of exogenous and probiotic derived endogenous β-glucosidases. *J. Appl. Microbiol.* 103: 601-612.
- Joung, E. M., H. Y. Kim, I. G. Hwang, J. H. Jeong, K. W. Yu, J. S. Lee, and H. S. Jeong (2010) Changes of antioxidant activities on cultured ginseng with mushroom mycelia during cultivation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1346-1352.
- Follin, A. D. and W. Denis (1915) A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *J. Biol. Chem.* 22: 305-308.
- Moreno, M. I., M. I. Isla, A. R. Sampeietto, and M. A. Vatuone (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 199-200.
- Okamura, H., A. Mimura, Y. Yakou, M. Niwano, and Y. Takahara (1993) Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*. 33: 557-561.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods*. 65: 55-59.
- Jeong, H. J., S. B. Park, S. Kim, and H. K. Kim (2007) Total

- polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 1491-1496.
26. Cha, J. Y., S. Y. Kim, S. J. Jeong, and Y. S. Cho (1999) Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *Korean J. Life Science.* 9: 389-394.
27. Jeong, J. H., K. E. Lee, and S. Y. Lee (2006) Optimization of submerged cultivation of *Hericium erinaceum*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21: 96-102.
28. Miura, T., L. Yuan, B. Sun, H. Fujii, M. Yoshida, K. Wakame, and K. Kosuna (200) Isoflavone aglycone produced by culture of soybean extracts with basidiomycetes and its antiangiogenic activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 2626-2631.
29. Ramarathnam, N., T. Osawa, H. Ochi, and S. Kawakishi (1995) The contribution of plant food antioxidants to human health trends. *Food Sci. Technol.* 6: 75-82.
30. Kuppusamy, P. and J. L. Zweier (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 264: 9880-9884.
31. Kim, S. J., D. K. Lim, S. W. Hyung, M. S. Kim, M. N. Kim, K. K. Lee, and Y. K. Ha (2004) Inhibition of lipid autoxidation by the extract of the submerged-liquid culture of mushroom in the medium containing mulberry tree power. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 249-254.
32. Kim, J. H., J. T. Bae, M. H. Song, G. S. Lee, S. Y. Choe, and H. B. Pyo (2010) Biological activities of *Fuctus arctii* fermented with the basidiomycete *Grifola frondosa*. *Arch. Pharm. Res.* 33: 1943-1951.
33. Nagase, H. and J. F. Woessner (1999) Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274: 21491-21494.
34. Kim, M. J., R. H. Kwon, M. W. Jang, and B. J. Ha (2012) Antioxidant and anti-wrinkle effects of steamed three ginseng extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* 38: 155-162.
35. Kang, S. W., J. H. Chung, C. Hammerberg, G. J. Fisher, and J. J. Voorhes (2005) Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor- κ B and activator protein-1 in inflammatory acne lesion *in vivo*. *Am. J. Pathol.* 166: 1691-1699.
36. Bae, J. T., G. S. Sim, D. H. Lee, B. H. Lee, H. B. Pyo, T. B. Choe, and W. J. Yun (2005) Production of exopolysaccharide from mycelia culture of *Grifola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in ultraviolet A-irradiated human dermal fibroblasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 347-354.