

꽃송이버섯 열수추출물이 HaCaT의 세포 연결 관련 유전자의 발현에 대한 영향

한 효 상[†]

중부대학교 보건행정학과 교수

Effect of a Hot Water Extract of Sparasis Crispa on the Expression of Tight Junction-Associated Genes in HaCaT Cells

Hyo-Sang Han, Ph.D[†]

Dept. of Health Administration, Joongbu University, Professor

Abstract

Purpose : Keratinocytes are the main cellular components involved in wound healing during re-epithelization and inflammation. Dysfunction of tight junction (TJ) adhesions is a major feature in the pathogenesis of various diseases. The purpose of this study was to identify the various effects of a Sparassis crispa water extract (SC) on HaCaT cells and to investigate whether these effects might be applicable to human skin.

Methods : We investigated the effectiveness of SC on cell HaCaT viability using MTS. The antioxidant effect of SC was analyzed by comparing the effectiveness of ABTS to that of the well-known antioxidant resveratrol. Reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) is the most widely applied method. Quantitative RT-PCR analysis has shown that SC in HaCaT cells affects mRNA expression of tight-junction genes associated with skin moisturization. In addition, Wound healing is one of the most complex processes in the human body. It involves the spatial and temporal synchronization of a variety of cell types with distinct roles in the phases of hemostasis, inflammation, growth, re-epithelialization, and remodeling. Wound healing analysis demonstrated altered cell migration in SC-treated HaCaT cells.

Results : MTS analysis in HaCaT cells was found to be more cytotoxic in SC at a concentration of 0.5 mg/ml. Compared to 100 μ M resveratrol, 4 mg/ml SC exhibited similar or superior antioxidant effects. SC treatment in HaCaT cells reduced levels of claudin 1, claudin 3, claudin 4, claudin 6, claudin 7, claudin 8, ZO-1, ZO-2, JAM-A, occludin, and Tricellulin mRNA expression by about 1.13 times. Wound healing analysis demonstrated altered cell migration in SC-treated HaCaT cells and HaCaT cell migration was also reduced to 73.2 % by SC treatment.

Conclusion : SC, which acts as an antioxidant, reduces oxidative stress and prevents aging of the skin. Further research is needed to address the effects of SC on human skin given the observed alteration of mRNA expression of tight-junction genes and the decreased the cell migration of HaCaT cells.

Key Words : anti-oxidation, cell migration, cell viability, sparasis crispa, tight-junction

[†]교신저자 : 한효상, hanhs@joongbu.ac.kr

논문접수일 : 2021년 4월 7일 | 수정일 : 2021년 4월 30일 | 게재승인일 : 2021년 5월 14일

I. 서론

꽃송이버섯은 우리나라에서 예부터 식용하였을 것으로 추정되나, 이 버섯에 대한 기록은 선만실용임업편람(鮮滿實用林業便覽)에 경기도 광릉에서 9월에 채집된 기록이 있고, 한국산균류목록(I)에 경기도 광릉에서 1956년 8월 16일날 채집된 기록이 있다(Ga 등, 2007).

꽃송이버섯(*Sparasis crispa*)은 담자균문, 구멍장이버섯목, 꽃송이버섯과, 꽃송이버섯속에 속하는 버섯으로 우리나라 뿐만 아니라 일본, 중국, 유럽, 북아메리카 등에 분포되어 있다. 자실체는 작은 갓의 바깥쪽 또는 아랫면에 있고 평활하며, 처음에는 옅은 노랑으로 성장하면 밝은 황갈색을 띠고 최종적으로 갈색으로 된다. 또 조직은 탄력성이 있으면서 얇으며 씹는 식감과 은은한 향이 좋아 식용으로서 가치가 있고, 자실체는 높이 10~25 cm이고 줄기가 공통의 자루를 가지고 위쪽으로 갈라져서 짧은 분지가 있으며 가장자리는 꽃양배추 모양으로 흰색을 띠고 있다(Cho, 2012).

버섯은 균류(菌類) 중에서 자실체(子實體)를 형성하여 살아 있는 나무의 줄기나 뿌리에 기생하여 영양분을 얻어 생육한다. 오래전부터 식용으로 사용되어 왔으며, 최근 들어 여러 가지 약리적 효능이 밝혀지며 건강증진식품으로 각광받고 있다(Lee 등, 2016).

버섯은 독특한 향과 맛을 가지며 다양한 영양소를 가지고 있을 뿐만 아니라 항산화, 항염, 항암, 면역증강 등 다양한 효능이 있는 것으로 알려져 있다(An 등, 2019).

꽃송이버섯은 주로 프로테오글루칸(*proteoglycan*)이나 베타글루칸(β -glucan)으로 클레스틴(*polysaccharides-Krestin*), 소니필란(*schizophyllan*), 렌티난(*lentinan*), 다당체-P(*polysaccharide-P*), 활성화된 6탄당 관련 화합물(*Active hexose correlated compound; AHCC*) 등이 성분을 이루고 있다(Kwak, 2019). 이 물질들은 수지상세포(*Dendritic cell; DC*)이나 대식세포의 식세포작용(*phagocytosis*) 활동에 작용하여 우리 몸의 면역 기능을 증진시켜 준다. DC는 모든 조직에 고루 분포되어 있으면서 세포성 면역의 초기에 작용하는 세포들이고, 이 DC의 한 부류인 랑게르한스세포(*Langerhans cell*)와 쿠퍼세포(*Kuffer cell*)는 각각 피부와 간에 분포되어 그 조직

의 면역 기능을 담당한다(Han, 2020).

상피세포에서, 간극연접(*gap junction*), 밀착연접(*tight junction*), 부착연접(*adhering junction*) 및 데스모솜(*desmosome*)을 포함한 몇 가지 전문적이고 뚜렷한 세포간 구조가 인접 세포 간의 연접 설정을 담당한다. 그중에서 가장 일반적인 것은 밀착연접(*tight junction; TJ*)인데, 밀착연접(TJ)은 세포와 세포간 공간 사이에 단단히 밀봉되어 있다. 세포 내에서 밀착연접(TJ)는 울타리 역할을 하며, 정점과 기저측면 사이의 막 단백질의 이동을 차단하여, 세포의 정점-기저 극성을 유지한다(Boivin & Schmidt-Ott, 2017). 또한 피부 중에 수분의 증발을 막아 피부 보습을 유지하는 데도 중요한 역할을 한다(Tokudome, 2019). 그리고 쥐에서 피부 밀착연접과 관련된 Claudin 1을 결핍시켰을 때 표피층에서의 심각한 수분의 손실이 발생한 연구 결과가 보고되어 있다(Volksdorf 등, 2017).

꽃송이버섯 열수추출물이 HaCaT 세포의 밀착연접에 대한 영향은 보고되지 않았기에 본 연구는 꽃송이버섯을 열수추출하여 얻은 시료로 항산화능 과 HaCaT 세포에 미치는 독성과 밀착연접에 대한 영향을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 연구방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 꽃송이버섯(*Sparasis crispa*)은 화순군에 있는 백아산 꽃송이버섯 농장에서 2020년 5월에 구입(No; 2020-0520)하여 초음파 세척기를 이용하여 불순물을 제거한 후 실험에 사용하였다.

2) 세포주(Cell line)

실험에는 인간 유래 각질형성 세포인 HaCaT 세포를 고려대학교 생명공학과에서 분양 받아 사용하였다.

3) 시약 및 기기

본 실험에 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL Dulbecco's modified Eagle medium (WELGENE, Korea), fetal bovine serum (WELGENE, Korea), filter paper (Advantec No.2, Japan), 2X Prime Q-mater Mix (GENET BIO, Korea), DPBS (Corning, USA), potassium persulfate (Sigma, USA), Trypsin-EDTA (WELGENE, Korea), MTS solution (Promega, USA), RNase inhibitor (Enzynomics, Korea), streptomycin (WELGENE, Korea), 5X M-MLV RT reaction buffer (Promega, USA), ABTS (Sigma, USA), M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA), eCube Tissue RNA Mini Kit (PhileKorea, Korea) 등이 사용되었다. 사용된 기기는 ultrasonic cleaner (Branson, USA), CO2 incubator (Thermo, USA), rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), water bath (HAAKE, Germany), AriaMx (Agilent, USA), The Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, USA), microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, USA) 등이다.

2. 방법

1) 실험방법

본 연구에 기본적으로 사용된 실험방법은 HaCaT 세포를 포함하여, 염증세포(RAW 264.7), 모유두세포의 선행 실험방법을 통하여 보편적으로 사용되고 있는 세포 효능 분석 기술을 적용하였다(Cho 등, 2017; Han 등, 2017; Jeon 등, 2018).

2) 꽃송이버섯 열수추출물 제조

꽃송이버섯 50 g과 1차 증류수 2,000 ml를 환류추출기

에 함께 넣은 후 끓는 시점으로부터 2 시간 가열하여 추출한 뒤 추출액을 여과지(filter paper)를 이용하여 감압 여과한 뒤 여과액을 회전진공농축기(rotary vacuum evaporator)를 사용하여 농축액을 얻었고, 이 농축액을 동결건조기를 사용하여 시료(건조한 분말)로 사용하였다. 동결건조 추출물은 꽃송이버섯 16.2 g였다.

3) 세포 배양

HaCaT 세포의 배양은 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO2 표준 세포 배양법 조건으로 1 % 100 U/mL 페니실린(penicillin), 100 μ g/mL 스트렙토마이신(streptomycin)과 10 % 소태아혈청(fetal bovine serum)이 첨가가 된 DMEM을 이용하여 배양하였다.

4) 항산화능 평가

ABTS assay를 이용하여 꽃송이버섯 열수추출물의 항산화능을 측정하였다. ABTS 7 mM과 과황산칼슘(potassium persulfate) 2.4 mM을 1:1로 맞추어 혼합한 후 24시간 실온에서 차광이 된 상태에서 반응시킨 후 ABTS 자유라디칼을 만들었다. ABTS 자유라디칼을 650 nm 흡광도가 0.7이 되도록 D.W로 희석하여 ABTS 사용액(working solution)을 만들어 사용하였다. 96 well 의 plate 각 well에 sample 20 μ l와 ABTS 사용액(working solution) 80 μ l를 혼합한 후 4 분 동안 차광된 상태로 반응시킨 뒤 650 nm의 흡광도를 microplate reader로 측정하였다. 항산화능 측정은 각각 0.5, 1, 2, 4 mg/ml 농도하여 측정하였으며, 다음 공식을 이용해 계산되었다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Sampleblank}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

5) 세포활성도 평가

꽃송이버섯 열수추출물을 HaCaT 세포에 처리한 뒤 MTS assay를 진행하여 세포활성도를 확인하였다. HaCaT 세포를 5,000 cells/well씩 96 well plate에 분주한 후 24 시간 배양하였다. 각각의 well에 꽃송이버섯 열수

추출물을 농도별로 첨가한 뒤 24 시간 배양하였다. MTS 시약을 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 492 nm의 흡광도를 측정하였다. 세포활성도를 산출하기 위해 꽃송이버섯 열수추출물을 처리한 실험군 측정값을 시료를 첨가하지 않은 대조군 측정값과 비교하여 백분율로 나타내었다.

세포활성도 (%) = (시료를 첨가한 군의 흡광도 - 시료자체 흡광도 / 대조군 흡광도) × 100

6) 정량 RT-PCR

세포배양을 위한 6 well culture dish(6개 구멍이 있는 배양접시, 127.5 mm X 85.5 mm X 15.7 mm)에 HaCaT 세포를 1 X 10⁵ cells/well씩 분주한 후 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 꽃송이버섯 열수추출물을 농도를 0.5 mg/ml로 측정하여 세포에 처리 후 36 시간 배양하였다. 각각의 시료가 첨가된 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 eCube Tissue RNA Mini Kit를 사용해 RNA를 추출하였다. RNA를 The Qubit 2.0 Fluorometer를 사용하여 정량한 후 total RNA 1 μg을 DEPC-처리수에 첨가하여 총 부피를 8 μl로 조정된 뒤 dNTP mix (10 mM) 1 μl와 Random Hexamer (100 pmol/μl) 1 μl를 넣고 5 분간 65 °C에서 반응시켰다. 그 후 얼음에 냉각시킨 후, DEPC-처리수 4

μl와 RNase inhibitor 1 μl, 5X M-MLV RT reaction buffer 4 μl 그리고, M-MLV reverse transcriptase 1 μl를 각각 첨가하였다. 실온에서 10 분간 반응 후에 50 °C에서 1 시간 cDNA를 합성하였다. cDNA를 D.W 1/10 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. qRT-PCR(quantitative RT-PCR)을 AriaMx를 이용해서 밀착연접과 관련된 유전자의 mRNA 발현량을 비교하였다. cDNA 5 μl에 10 pmol/μl reverse primer와 1.5 μl nuclease free water 2 μl 그리고 2X Prime Q-mater Mix 10 μl, 를 넣고 첫 번째는 95 °C에서 20 초, 두 번째는 58 °C에서 20 초, 세 번째는 72 °C에서 20 초 그리고 qRT-PCR를 40 cycle로 실시하였다. 실험에 사용하도록 고안된 Primer는 타겟 유전자의 exon 부분에 결합하며 forward primer와 reverse primer를 각각 다른 exon 부위를 증폭하도록 디자인하여 genomic DNA contamination이 없도록 cDNA만 특이적으로 증폭되도록 하였다.

Table 1. Primer sequence

Gene		Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Annealing temp. (°C)
Zo-1	F	AGA GCA CAG CAA TGG AGG AA	133	58
	R	GAC GTT TCC CCA CTC TGA AA		
Zo-2	F	AGC AGG AGC AGA AGC AGA AG	148	58
	R	CAT ATC AGC TCT TCC ATG CC		
JAM-A	F	TGC CTC TTC ATA TTG GCG AT	144	58
	R	TGT CAC GGA CTT GAA GGT GA		
Occludin	F	TTT GTG GGA CAA GGA ACA CA	137	58
	R	ATG CCA TGG GAC TGT CAA CT		
Tricellulin	F	GGC AGC TCG GAG ACA TAG AG	147	58
	R	TTT GCT GTT CTC AGT TCC TTG A		
Claudin1	F	GCA GAT CCA GTG CAA AGT CT	136	58
	R	CAT ACA CTT CAT GCC AAC GG		
Claudin3	F	GCA TGG ACT GTG AAA CCT CA	145	58
	R	AAT ATC AAG TGC CCC TTC CA		
Claudin4	F	CGC ATC AGG ACT GGC TTT AT	131	58
	R	AGT TGA GGA CCT GGA AGG CT		
Claudin6	F	GGC CCT CTG AGT ACC CTA CC	136	58
	R	GCA GGA GGC AGA AAC AAA AG		
Claudin7	F	ATG TAC AAG GGG CTG TGG AT	132	58
	R	CAC CAG GGA GAC CAC CAT TA		
Claudin8	F	GGC TGT TTC TTG GTG GTG TT	137	58
	R	CAC GCA ATT CAT CCA CAG TC		

7) 상처치유분석(Wound healing assay)

HaCaT 세포를 6 well plate에 6×10^5 cells/well로 분주한 뒤, plate에 confluent 될 때까지 배양해 주었다. 200p tip을 이용하여 HaCaT 세포의 표면에 스크래치(scratch)를 만들고 PBS로 한번 세척한 후 꽃송이버섯 열수추출물을 0.25 mg/ml 농도로 측정하여 처리한 후 12 시간 배양하였다. 현미경을 이용하여 시간에 따른 치유(healing) 정도를 관찰하였고, 남아 있는 스크래치(scratch)의 면적을 측정하여 시료를 처리하지 않은 대조군과 대조해 세포 이동의 면적을 백분율(%)로 나타내었다.

3. 통계처리

대조군과 각 실험군과 평균의 차이를 student's t-test로 분석하였고 p 값이 .05 미만일 경우 통계적으로 보았을 때 의미 있는 차이가 있는 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. 항산화능 측정

꽃송이버섯 열수추출물이 가지는 항산화능을 ABTS assay를 통해 항산화능으로 잘 알려진 resveratrol과 비교해서 확인하였다. 그 결과 resveratrol 25, 50, 100 μ M의 항산화 효능은 각각 35.2, 56.7, 72.6 %로 나타났으며 꽃송이버섯 열수추출물 항산화 효능인 Sparassis crispa는

0.5, 1, 2, 4 mg/ml에서 각각 37.9, 55.5, 77.7, 90.4 %로 나타났다(Fig 1).

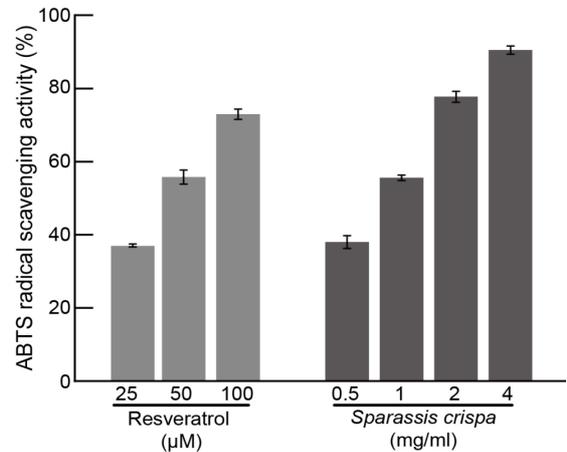


Fig 1. ABTS Radical erasing activity of SC and resveratrol.

2. HaCaT 세포에 대한 세포활성도에 대한 영향

꽃송이버섯 열수추출물이 HaCaT 세포에 대한 세포활성도를 MTS assay를 실시하여 실험에 처리할 수 있는 유효한 농도를 확인한 결과 0.5 mg/ml의 꽃송이버섯 열수추출물을 24 시간 동안 처리한 HaCaT 세포에서 대조군 대비 181.9 %의 세포활성도를 나타내었다. 세포독성 없이 약 200 % 세포성장을 확인하여 0.5 mg/ml 이하의 농도로 측정하여 꽃송이버섯 열수추출물을 HaCaT 세포에 처리한 후 연구를 하였다(Fig 2).

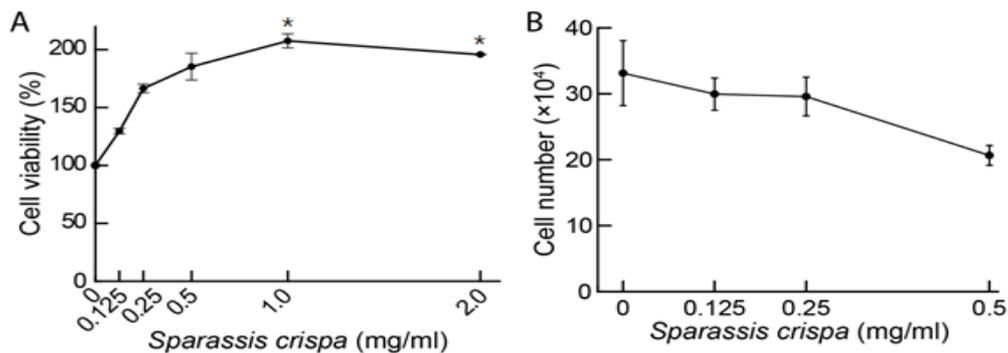


Fig 2. The effect of SC on cell viability. HaCaT cells were treated at a concentration of 24 hours. (A) Cell viability was measured by MTS analysis. (B) The number of cells was determined by counting them directly into the hemocytometer. * $p < .05$, comparison to control.

3. 밀착연접 관련 유전자 발현

농도 0.5 mg/ml로 측정하여 36 시간 처리한 꽃송이버섯 열수추출물을 HaCaT 세포에 qRT-PCR을 이용하여 밀착연접에 관여하는 여러가지 유전자의 mRNA 발현을 확인한 결과 꽃송이버섯 열수추출물을 처리한 HaCaT 세포에서 claudin 1, 3, 4, 6, 7, 8, Zo-1, 2, JAM-A, Claudin, Tricellulin의 mRNA 발현은 각각 1.11, 1.20, 1.46, 1.05, 1.05, 1.21, 1.12, 1.07, 1.22, 1.15, 1.10배 증가하였다. 이 결과를 통해 꽃송이버섯 열수추출물이 HaCaT 세포의 밀착연접 유전자 발현에 다양하게 변화가 나타나는 것을 확인하였다(Fig 3).

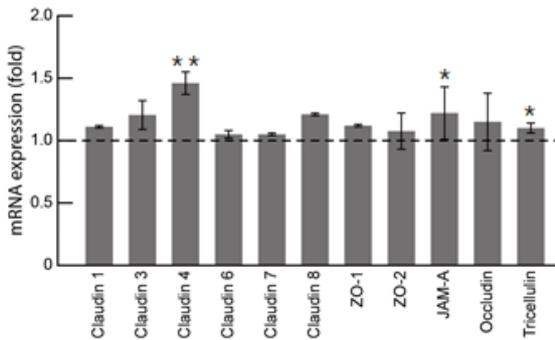


Fig 3. The effect of SC in tight-junction related mRNA expression level. After 36 hours of 0.5 mg/ml SC treatment on HaCaT cells, mRNA expression level was measured by Quantitative RT-PCR. *p<.05, comparison to control.

4. 세포이동에 대한 영향

이전 실험을 통해 꽃송이버섯 열수추출물을 처리한 HaCaT 세포에서 밀착연접 유전자의 mRNA 발현이 다양한 변화를 확인하였다. 이러한 꽃송이버섯 열수추출물의 작용이 HaCaT 세포의 세포이동에 대한 영향을 알아보기 위해 상처치유분석(Wound healing assay)를 진행하였다. 그 결과 농도를 0.5 mg/ml로 측정하여 꽃송이버섯 열수추출물을 처리한 HaCaT 세포의 세포이동은 대조군 대비 73.2 %로 감소하였다(Fig 4).

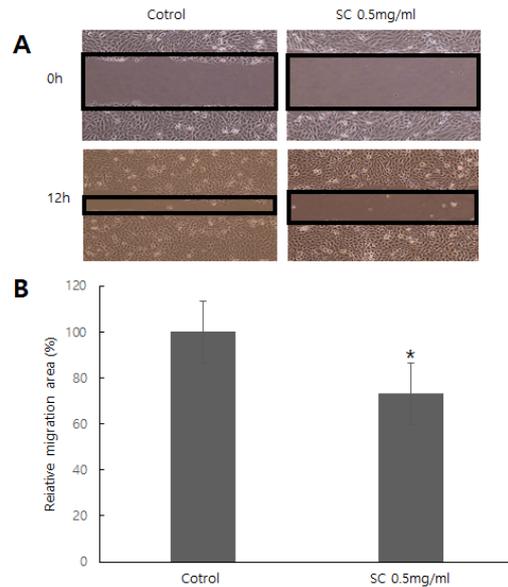


Fig 4. Reduction by HaCaT cell migration of 0.5 mg/ml of SC. (A) Typical image of wound healing analysis. (B) Percentage of the mobile area of HaCaT cells treated with SC 0.25 mg/ml for 12 hours. *p<.05, comparison to control.

IV. 고찰

β -1,3-D-glucan의 함유량이 다른 버섯에 비해 높은 꽃송이버섯은 면역증강과 항암효과가 알려지면서 식용뿐만 아니라 약용으로도 사용되고 있다(Nhu Ngoc 등, 2018). 성분 중에는 benzoic acid 계열인 veratric acid 등의 성분이 다른 버섯에 비해 많이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(Lee 등, 2016).

약리작용으로는 Kim 등(2018)은 골관절염 억제효과를, Kim 등(2013)은 항암 효과와 면역세포 활성화를, Baek 등(2020)은 간세포에서의 대사 활성 효과를, Bang 과 Lee(2019)은 꽃송이버섯의 구성성분과 약리효과를 통해 면역조절 및 항암 효과, 항염 효과, 항산화 및 간보호 효과, 항당뇨 효과, 항비만 효과, 그 외에도 항혈전효과, 혈압강하 및 신경보호효과, 피부콜라겐합성 증가 효과, 피부보습과 갱년기 증상 개선효과 등을 보고하였다.

본 연구에서는 꽃송이버섯 열수추출물이 가지고 있는

항산화능의 비교와 HaCaT 세포에서 밀착연접에 대한 영향을 확인하기 위해 실험을 하였다.

활성산소는 원자 배열과 불완전한 분자에서 이탈한 전자를 가지고 있는 분자 구조로서 성질이 다른 분자와 만나게 되면 이온의 불균형이 되어 또 다른 활성산소가 만들어진다. 또한 세포 내에서 알갱이와 시토졸(cytosol)에서 생성된다(Vinay 등, 2014). 이러한 활성산소를 효과적으로 제거하는 항산화능은 피부 질환 예방에 있어 매우 중요하다. resveratrol은 항산화능을 가지고 있어 많은 연구 결과가 보고되었다(Mary 등, 2011). 이러한 이유로 꽃송이버섯 열수추출물과 resveratrol의 항산화능을 ABTS assay로 비교 확인하였다. 그 결과 대조군으로 항산화능이 높은 것으로 잘 알려져있는 resveratrol 100 μ M의 ABTS 라디칼 소거능이 72.6 %로 농도로 나타났으며 꽃송이버섯 열수추출물 4 mg/ml의 항산화능 또한 resveratrol 100 μ M 90.4 %로 농도로 resveratrol 보다 높은 항산화능이 나타났다. 이를 통해 꽃송이버섯 열수추출물은 resveratrol과 같이 높은 항산화능을 가지고 있으며, 꽃송이버섯 열수추출물을 사람 피부에 적용하였을 때 효과적으로 활성산소를 감소시켜 피부 질환과 피부 노화의 방지에도 효과가 있을 것으로 기대된다.

꽃송이버섯 열수추출물이 HaCaT 세포에 대한 세포활성도를 MTS assay를 통해 확인하여 실험에 처리할 수 있는 유효한 농도를 확인한 결과 0.5 mg/ml의 꽃송이버섯 열수추출물을 24 시간 동안 처리한 HaCaT 세포에서는 대조군 대비 181.9 %의 세포활성도를 나타내었다. Cho 등(2017)의 실험에서 비슷한 결과를 나타냈으며, 세포독성 없이 약 200 % 세포성장을 확인하여 꽃송이버섯 열수추출물을 0.5 mg/ml 이하의 농도로 측정하여 HaCaT 세포에 처리하여 연구를 진행하였다.

세포와 세포사이의 연결 요소 중 밀착연접(tight junction)은 정점세포간 연접(apical intercellular junction)으로써 세포막의 선택적 투과와 상피세포의 극성(epithelial polarity) 기능 유지하는 것에 중요한 역할을 한다(Bhat 등, 2020). 밀착연접(TJ) 가닥은 주로 두 가지 유형의 4 개 막 횡단 단백질인 occludin 및 claudin으로 구성되며, 그 사이에서 occludin은 ZO-1 / ZO-2 / ZO-3에 직접 결합하는 것으로 보고되어 있다(Hiroaki 등, 2018). Claudin은 20 개 이상의 단백질로 구성된다. 유전자 계열

의 구성원인 밀착연접(TJ) 가닥의 통합 막 단백질이며, Occludin은 밀착연접(TJ)장벽 기능에 기여하는 밀착연접(TJ)-스트랜드의 구성 단백질이다(Volksdorf 등, 2017). ZO-1은 클라우딘(claudin)과 오클루딘(occludin)뿐만 아니라 액틴 세포 골격에 결합하는 밀착연접(TJ)에서 조립된 주요 세포질 단백질로 perijunctional actin과 밀착 접합 단백질인 오클루딘(occludin)과 클라우딘(claudin) 사이의 중요한 링커 역할을 하기 때문에 산화제 유도 장벽 파괴와 관련이 있다(Ding 등, 2017). 반면 ZO-2는 또한 결합할 수 있는 또 다른 세포질 단백질로 액틴 세포 골격은 ZO-1과 독립적인 복합체를 형성할 수 있다(Itoh 등, 2018).

피부장벽은 각질형성세포의 분화 말기과정에서 분비되는 분화 촉진인자들에 의해 각질세포막을 형성함으로써 물리적 장벽의 정상적인 기능을 유지하게 된다(Yu 등, 2015). 이번 연구를 통해 꽃송이버섯 열수추출물이 HaCaT 세포의 밀착연접과 관련된 유전자 발현에 대한 영향을 확인하여 꽃송이버섯 열수추출물이 가지는 피부 보습 관련 효과와의 상관관계를 확인하였다. HaCaT 세포에 농도를 0.5 mg/ml로 측정하여 36 시간 처리한 꽃송이버섯 열수추출물을 qRT-PCR을 통해 밀착연접과 관련된 여러가지 유전자의 mRNA 발현을 확인하였다. 그 결과 꽃송이버섯 열수추출물을 처리한 HaCaT 세포에서 claudin 1, 3, 4, 6, 7, 8, Zo-1, 2, JAM-A, Claudin, Tricellulin의 mRNA 발현은 각각 1.11, 1.20, 1.46, 1.05, 1.05, 1.05, 1.21, 1.12, 1.07, 1.22, 1.15, 1.10배 증가하였다. 이 결과를 통해 꽃송이버섯 열수추출물이 HaCaT 세포의 밀착연접과 관련된 유전자 발현을 통해 피부장벽기능 조절과 관련이 있다는 것을 확인하였다. 현재까지는 꽃송이버섯 열수추출물이 피부 보습의 효과, 피부 노화 방지의 효과 그리고 밀착연접과 관련된 유전자들의 발현에 대한 영향과의 상관관계는 여전히 미비하고 피부에 대한 부작용 또한 정확한 메카니즘은 잘 알려지지 않았기 때문에 앞으로 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

밀착연접과 관련하여 claudin 단백질은 세포대 세포 접촉 단백질로서 세포의 이동을 쉽게 하여 정상세포의 이동과 암의 전이에 있어서도 중요한 의미를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Akihiro 등, 2016).

이전 실험을 통해 꽃송이버섯 열수추출물을 처리한

HaCaT 세포에서의 밀착연접 mRNA 발현이 다양하게 변
화된 것을 확인하였다. 이러한 꽃송이버섯 열수추출물에
의한 HaCaT 세포의 세포이동에 대한 작용을 확인하기
위해 상처치유분석(wound healing assay)를 진행하였다.
그 결과 농도를 0.5 mg/ml로 측정하여 꽃송이버섯 열수추
출물을 처리한 HaCaT 세포의 세포이동을 확인하였을 때
대조군과 대비 73.2 %로 감소하였다. Cho 등(2017)의 실
험에서 비슷한 결과를 나타냈으며, 이 결과는 세포의 이
동을 감소하는데 중요한 의미를 가지고 있을 것으로 생
각된다. 꽃송이버섯 열수추출물을 처리한 HaCaT 세포에
서의 세포이동 감소 현상에 따른 피부에 대한 영향은 앞
으로 더욱 연구·개발되어야 한다.

이러한 결과들을 통해 꽃송이버섯 열수추출물은 항산
화능을 가지고 있어 피부의 산화적 손상을 효과적으로
감소시킬 수 있어 피부의 손상 및 노화 방지에도 효과가
있을 것으로 사료되며, 또한 꽃송이버섯 열수추출물은
다양한 밀착연접 유전자의 발현에 영향을 일으키는 것
으로 생각된다. 향후 꽃송이버섯 열수추출물을 활용하여
항산화제를 개발하기 위한 분자 및 세포수준에서의 기
전연구 등 더욱 세심한 연구 개발이 필요하다고 생각되
어지는 바이다.

V. 결 론

본 연구에서 꽃송이버섯 열수추출물로 항산화능의 비
교와 HaCaT 세포에서 밀착연접에 대한 영향을 평가하여
다음과 같은 결론을 내릴 수가 있었다.

1. 항산화능이 있다고 가장 잘 알려진 resveratrol과 비
교하여 ABTS 프리라디칼 소거능(free radical
elimination ability)을 확인한 결과 4 mg/ml의 항산화
능은 resveratrol 100 μ M 90.4 %로 나타나 항산화
효능이 있는 것으로 나타내었다.
2. 본 실험 결과 HaCaT 세포의 세포활성도를 MTS
assay를 사용한 결과 대조군 대비 181.9 %의 세포
활성도를 나타내었다.
3. 본 실험을 통해 HaCaT 세포의 밀착연접에 관여하
는 유전자 claudin 1, 3, 4, 6, 7, 8, Zo-1, 2, JAM-A,

Claudin, Tricellulin의 mRNA 발현이 증가하였다.

4. 본 실험에서 상처치유분석(wound healing assay)를
진행한 결과 0.5 mg/ml 처리 군에서 HaCaT 세포의
세포이동을 확인하였을 때 대조군과 대비 73.2 %
로 감소하였다.

이상의 실험결과는 꽃송이버섯 열수추출물이 항산화
능을 가지고 있어 피부의 산화적 손상을 효과적으로 감
소시켜 피부의 손상 및 노화 방지에도 효과가 있을 것으
로 사료된다. 또한 꽃송이버섯 열수추출물은 여러가지
밀착연접 유전자의 mRNA 발현에 큰 영향을 미칠 것으
로 사료되며, 앞으로 꽃송이버섯 열수추출물의 항산화능
연구의 수행 및 확장이 필요할 것으로 생각되는 바이다.

참고문헌

Akihiro W, Maki H, Kiyohito Y, et al(2016). Checkpoint
kinase 1 activation enhances intestinal epithelial barrier
function via regulation of claudin-5 expression. Plos
One, 11(1), Printed Online. [https://doi.org/10.1371/
journal.pone.0145631](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145631).

An GH, Han JG, Cho JH(2019). Antioxidant activities and
β -glucan contents of wild mushrooms in Korea. J
Mushrooms, 17(3), 144-151. [https://doi.org/10.14480/
JM.2019.17.3.144](https://doi.org/10.14480/JM.2019.17.3.144).

Baek SJ, Cho NJ, Cho SJ, et al(2020). The metabolic
activity of sparassis crispa extract in hepatocytes. KSBB
J, 35(2), 150-156. [https://doi.org/10.7841/ksbbj.2020.
35.2.150](https://doi.org/10.7841/ksbbj.2020.35.2.150).

Bang R, Lee YJ(2019). A review on phytochemistry and
pharmacology of sparassis crispa. Korea J Herbol,
34(6), 131-138. <https://doi.org/10.6116/kjh.2019.34.6.131>.

Bhat AA, Syed N, Therachiyil L, et al(2020). Claudin-1, a
double-edged sword in cancer. Int J Mol Sci, 21(2),
569. <https://doi.org/0.3390/ijms21020569>.

Boivin FJ, Schmidt-Ott KM(2017). Transcriptional
mechanisms coordinating tight junction assembly during

- epithelial differentiation. *Ann New York Acad Sci*, 1397(1), 80-99. <https://doi.org/10.1111/nyas.13367>.
- Cho HJ(2012). Studies on antitumor, immunopotentiating and antityrosinase effects of *sparassis crispa*. Graduate school of Incheon University, Republic of Korea, Master's thesis.
- Cho NJ, Lee BK, Lee WH, et al(2017). Investigation of the effect of *Lithospermi Radix* on tight-junction related genes in HaCaT cells. *Kor J Herbol*, 32(3), 55-61. <https://doi.org/10.6116/kjh.2017.32.3.55>.
- Ding C, Cong X, Zhang XM, et al(2017). Decreased interaction between ZO-1 and occludin is involved in alteration of tight junctions in transplanted epiphora submandibular glands. *J Mol Histol*, 48(3), 225-234. <https://doi.org/10.1007/s10735-017-9716-5>.
- Ga KH, Park WC, Yoon GH(2007). *Sparassis crispa*. Seoul, Korea Forest Research Institute, pp.13.
- Han HS, Hong SG(2017). Investigation of the IL-1 β , TNF- α and iNOS gene differential expression in Raw 264.7 cells by the water extract of *Angelicae Radix* from Korea, China and Japan. *J Digit Converg*, 15(11), 513-522. <https://doi.org/10.14400/JDC.2017.15.11.513>.
- Han Y(2020). Cytotoxic effect of disulfiram on dendritic cells. Graduate school of Jeju National University, Republic of Korea, Master's thesis.
- Hiroaki H, Satomura K, Goda N, et al(2018). Spatial overlap of claudin- and phosphatidylinositol phosphate-binding sites on the first PDZ domain of zonula occludens 1 studied by NMR. *Molecules*, 23(10), 2465. <https://doi.org/10.3390/molecules23102465>.
- Itoh M, Nakadate K, Matsusaka T, et al(2018). Effects of the differential expression of ZO-1 and ZO-2 on podocyte structure and function. *Genes Cells*, 23(7), 546-556. <https://doi.org/10.1111/gtc.12598>.
- Jeon HL, Cho NJ, Kim KK, et al(2018). Investigation of the differential effect of juice or water extract from *Puerariae Radix* on hair growth related-genes in dermal papilla cells. *Kor J Herbol*, 33(1), 1-7. <https://doi.org/10.6116/kjh.2018.33.1.1>.
- Kim EN, Roh SS, Jeong GS(2018). Inhibitory effect of *sparassis crispa* (Wulf.) extract on monosodium iodoacetate induced osteoarthritis. *Korea J Pharmacogn*, 49(3), 262-269.
- Kim IK, Yun YC, Shin YC, et al(2013). Effect of *sparassis crispa* extracts on immune cell activation and tumor growth inhibition. *J Life Sci*, 23(8), 984-988. <https://doi.org/10.5352/JLS.2013.23.8.984>.
- Kwak JN(2019). Analysis of active components according to extraction method of *sparassis crispa*. Graduate school of Hanseo University, Republic of Korea, Master's thesis.
- Lee KE, Park JE, Jung ES, et al(2016). A study of facial wrinkles improvement effect of veratric acid from cauliflower mushroom through photo-protective mechanisms against UVB irradiation. *Arch Dermatol Res*, 308(3), 183-192. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1633-z>.
- Lee YG, Thi NN, Kim HG, et al(2016). Ergosterol peroxides from the fruit body of *sparassis crispa*. *J Appl Biol Chem*, 59(4), 313-316. <https://doi.org/10.3839/jabc.2016.053>.
- Mary N, Carol P, Hasan M, et al(2011). The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. *Arch Biochem Biophys*, 508(2), 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.030>.
- Nhu Ngoc LT, Oh YK, Lee YJ, et al(2018). Effects of *sparassis crispa* in medical therapeutics: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Mol Sci*, 19(5), 1487. <https://doi.org/10.3390/ijms19051487>.
- Tokudome Y(2019). Improvement of the skin barrier function with physiologically active substances. *Yakugaku Zasshi*, 139(12), 1549-1551. <https://doi.org/yakushi.19-00181-1>.
- Vinay K, Abul A, Jon A(2014). Robbins and cotran pathologic basis of disease. 9th ed, Amsterdam, Elsevier, pp.86.
- Volksdorf T, Heilmann J, Eming SA, et al(2017). Tight

junction proteins claudin-1 and occludin are important for cutaneous wound healing. *Am J Pathol*, 187(6), 1301-1312. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.02.006>.
Yu HY, Yang IJ, Lincha VR, et al(2015). The effects of

the fruits of *foeniculum vulgare* on skin barrier function and hyaluronic acid production in HaCaT keratinocytes. *J Life Sci*, 25(8), 880-888. <https://doi.org/10.5352/JLS.2015.25.8.880>.