

표고버섯 藥鍼液이 Cytochrome P450 1A1과 1A2 활성 억제에 미치는 효과

문진영¹

¹동국대학교 한의과대학 경혈학교실

Inhibitory Effect of *Lentinus edodes* Aqua-acupuncture Solution on the Cytochrome P450 1A1 and 1A2 Activities.

Jin-Young Moon¹

¹Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Abstract

Objectives : Inhibition of phase I enzymes such as cytochrome P450 (CYP) 1A1 or 1A2 is considered a major mechanism of protection against initiation of carcinogenesis. The inhibition of toxic enzymes and CYP were studied with so many oriental herbal medicine. Recently, numerous polysaccharides and polysaccharide-protein complexes have been isolated from mushrooms and used as a source of therapeutic agents. The most promising biopharmacological activities of these polymers are their immunomodulation and anti cancer. But, in this study the inhibitory effect was on the aqua-acupuncture of *Lentinus edodes*.

Materials : *Lentinus edodes* aqua-acupuncture solution (LEAS) was prepared and tested for the inhibition of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1A2 activities. LEAS type I from fruit body of these mushrooms. Type II was extracted from cultured broth of *Lentinus edodes* mycelum.

Results : LEAS type I and type II were significantly inhibited CYP 1A1 and 1A2 enzymes at concentration of 5.0 and 10.0 mg/ml.

Conclusion : These results suggested that LEAS may act as block agent against carcinogenesis by inhibition of phase I enzymes.

Key words : *Lentinus edodes* aqua-acupuncture solution (LEAS), Cytochrome P450 (CYP)

I. 서 론

藥鍼療法은 本草學的으로 有效한 藥物이나 處方을 選擇하여 蒸溜 또는 알코올 抽出 등의 方法을 利用하여 注射液으로 만들어 經絡學的으로

- 교신저자: 문진영, 경상북도 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 경혈학교실, Tel. 054-770-2665, Fax. 054-770-2649, E-mail : ampmoon@mail.dongguk.ac.kr
- 이 논문은 2004년도 동국대학교 우수학술지 논문 게재 장려금 지원에 의하여 수행되었습니다.
- 접수 : 2004/05/25 • 수정 : 2004/06/08 • 채택 : 2004/6/16

有效한 經穴이나 阿是穴 또는 皮膚 陽性反應點에 注入함으로써 生理機能을 強化시키고 病理的인 狀態를 改善시키는 新鍼療法으로 水鍼療法, 穴位藥物注射療法이라고도 한다¹⁻⁴⁾.

Cytochrome P450 (CYP) 酵素들은 自然界 거의 모든 生物 중에서 발견되며, 人間과 같은 哺乳動物에서는 주로 肝세포의 endoplasmic reticulum 막에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이들은 체내로 유입된 xenobiotics (화학물질)의 산

화를 촉매 하는 주요 효소체계이며 지방산의 대사 및 스테로이드의 생합성에도 관여 한다^{5,6)}. 기능적인 측면에서 CYP isozymes 들은 외부의 유해 물질이나 발암원에 대하여 중요한 방어체계의 역할을 하고 있다. 즉, 외부로부터 유입된 물질의 해독작용 (detoxification)을 하는 것으로 현재까지 알려져 있다⁶⁾. 그러나 최근의 연구에서는 CYP 효소들이 어떤 물질의 독성을 감소시키는 경우보다 오히려 증가시키는 것으로 밝혀졌으며, CYP가 발암과정을 유도하거나 각 종 질병의 발생원인으로 생각되고 있다⁷⁾.

최근 버섯의 항암 및 항산화 효과에 대한 관심이 높아지면서 각 종 생리활성 성분 및 항암 성분들이 분리 정제되어 항암제로 개발되고 있다. 특히 상황버섯 등은 희소 가치가 높고 암에 저항하는 능력이 탁월한 것으로 조사 되어 품귀 현상에 까지 이르고 있다. 이와 같이 식용으로 사용되는 여러 종류의 버섯은 대부분 균사 및 자실체에서 얻어진 다당체에 관한 연구가 상당 부분 진행⁸⁾되어 왔고, 그 결과 최근 인간의 각 종 암에 대한 저항성을 높이고 항산화 효능을 나타내는 것으로 연구 결과가 보고 된 바 있다⁹⁻¹¹⁾.

한편 표고버섯은 性味가 甘平 하고 理氣祛風 하는 효능이 있으며, 특히 장복하면 胃와 腸을 튼튼하게 한다고 알려져 있다¹²⁾. 하지만 현재까지의 연구에서는 주로 표고버섯의 다당체를 이용한 항암 효과 및 항산화 효능의 증가에 초점이 맞추어져 왔다. 따라서 본 논문에서는 韓方 약침의 생리기능 강화 측면 및 경락학적 유효성을 근거하여 난치성 질환에 대한 접근을 시도 하였으며, 표고버섯의 자실체 및 균사를 배양한 배양액에서 조제한 약침액이 발암과정 중 개시 단계의 중요 대사 효소인 CYP 1A 계열을 저해하는 효과가 관찰되어 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

실험동물

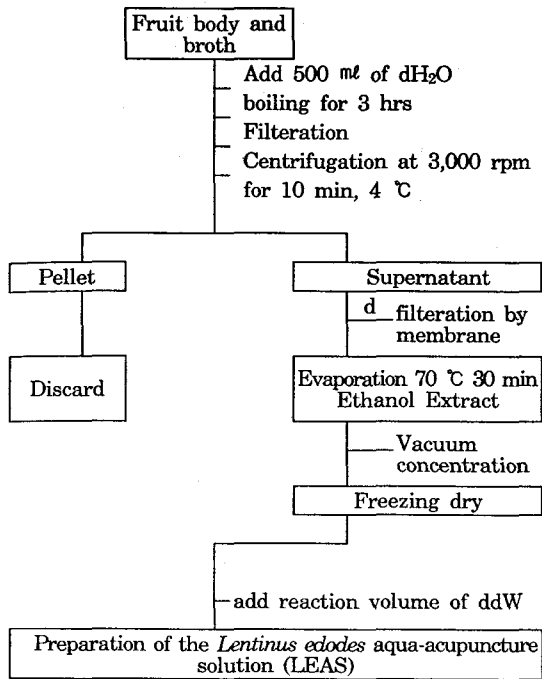
대한실험동물센터(충북, 음성)에서 분양받은 5주령 수컷의 Sprague-Dawley rats (body weight 140-160 g)을 사용하였다. 실험동물은 본 교실에 구비 되어있는 항온 항습기 (LS2105, LS Tech 社, 한국)에서 일정한 조건 (온도 24±2℃, 습도 50~60 %)하에서 7 일간 안정화시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험 기간 중 사료와 물은 자유로 먹게 하였다.

표고버섯 균사 배양액 및 자실체

본 실험에서 사용한 표고버섯 약침액 (*Lentinus edodes* aqua-acupuncture solution : LEAS)을 제조하기 위하여 표준균주와 표고버섯 자실체 국내산을 정선하여 실험에 사용하였다. Voucher specimen은 동국대학교 한의과대학 경혈학교실에 보관되어 있다.

약침액의 조제

표고버섯 약침액은 수제 알콜침법¹³⁾을 근거하여 조제하였다. 먼저 자실체 약침액 (type I)의 경우 버섯의 자실 100 g을 3차 필터 된 순수 증류수 500 ml을 가한 뒤 전탕기에서 80 ℃ 이상으로 3시간동안 추출하고, 이를 whatman filter # 1으로 여과한 후 4 ℃, 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리 하였다. 회수된 상층액은 rotary evaporator (EYELA N1000S, JAPAN)에서 감압 농축하여 추출하고, 이 농축된 용액에 99.9 % ethanol을 가하여 75 %, 85 %, 95 %의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여별하고, pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μm, Whatman. Germa-



Scheme 1. Preparation of the *Lentinus edodes* aqua-acupuncture solution (LEAS).

ny)로 여과하였다. 그리고 이러한 과정을 통하여 얻어진 약침액은 freezer dry (ILSIN社, 한국)를 통하여 동결 건조한 후 (회수율 2.5%) 실험 조건에 맞는 농도로 희석하여 사용하였다 (Scheme 1). 균사체의 broth로부터 제조한 약침액은 broth 500 ml을 자실체에서의 조제법과 동일하게 하였다. 즉, yeast-malt extract media (pH 6.2±0.2 at 25 °C)에서 150 rpm - 170 rpm으로 한 달간 현탁 배양한 broth를 이용하여 본 실험의 약침액을 조제 하였다.

시 약

Ethyl alcohol anhydrous, Methyl alcohol anhydrous 는 Merck사 (Merck KGaA, Germany), yeast extract, Malt extract는 DIFCO사 (BBL & DIFCO, USA), Glucose, NaCl, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaH₂PO₄, Tris-HCl, bovine

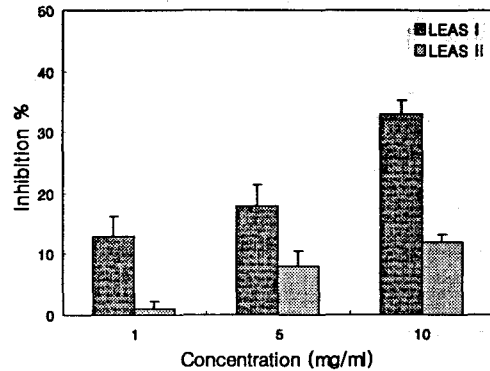


Fig. 1. Inhibition of cytochrome P450 1A1 activity by *Lentinus edodes* aqua-acupuncture solution (LEAS). LEAS I means LEAS from fruit body extraction. Type II was extracted from cultured broth of *Lentinus edodes* mycelium. Experimental details are described in material and methods. Values are mean ±S.D. of three experiments.

serum albumin (BSA), β-naphthoflavone (βNF), glucose-6-phosphate, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺), yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, dicoumarol, potassium phosphate, KH₂PO₄, Na-phosphate, Na-EDTA, ethoxyresorufin (EROD), methoxyresorufin (MROD), resorufin standard, bicinchoninic acid protein kit, resveratrol, flavone 은 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였고, KOH, HCl, CaCl₂·H₂O, MgSO₄·7H₂O 는 Junsei사 (Junsei chemical Co., Japan)의 특급 시약을 사용하였다. 기타 시약은 모두 효소 측정용 특급 시약을 사용하였다.

실험동물 처치 및 microsomal protein 분리

실험동물은 실험 전 3일간 80 mg/kg body weight/day β-naphthoflavone (βNF)을 corn oil에 희석한 것을 복강 주사 하여 CYP 1A1/2

효소계 유도를 하였고, 고형 사료와 물은 자유롭게 먹게 하였다. 이들은 마지막 β NF를 투여한 지 24 시간 후에 경추탈골을 하여 처치한 후 간을 적출하였다. 그리고 microsome을 얻기 위하여 적출된 흰쥐의 간 조직에 1.15 % KCl 완충용액을 이용하여 perfusion하여 조직 중 혈액을 제거하고, 여러 번 세척 후 흡습지로 수분을 완전히 제거시켰다. 수분이 제거된 간은 마쇄(099C-K44, Glas-Col, U.S.A.)한 후, 1.15 % KCl 완충용액을 첨가하여 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 7,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후, 침전물을 제외한 상층액을 다시 0.1 M CaCl_2 in 0.25 M sucrose에 적당한 용량으로 희석시키고 77,000 \times g에서 60분간 초원심분리(Centricon, USA)하였다. 여기에서 형성된 침전물을 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 재현탁하여 microsome 분획으로 실험에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 실시하였다.

세포내 총 단백질 검량

세포내 총 단백질은 bicinchoninic acid protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준 검량 선을 구하고 각 실험군의 단백질 양을 산출하였다. 정량된 분획은 일정량씩 나누어 실험에 사용할 때까지 -70 $^{\circ}\text{C}$ deep freezer에서 냉동 보관하였다.

Cytochrome P450 1A1/2 효소계 활성의 측정

Cytochrome P450 1A1는 ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 활성으로 측정하였고, cytochrome P450 1A2의 활성은 methoxyresorufin O-demethylase (MROD) 방법¹⁴⁾을 이용하여 활성으로 측정 하였다. 즉, 실험쥐의 간으로부터 분리한 microsomal protein (1.0 mg/ml) 200 μl 에 640 μl 의 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5),

100 μl 의 BSA (10 mg/ml in Tris-HCl buffer), 20 μl 의 0.25 M MgCl_2 , 40 μl 의 cofactor solution (NADP^+ and glucose-6-phosphate in KCl buffer), 2.5 unit의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10 μl 의 substrate (1 mg of ethoxyresorufin in 10 ml of methanol and 1 mg of methoxyresorufin in 10 ml of methanol)을 첨가하였다. 그리고 모든 시약들을 잘 섞은 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4 분간 반응시키고, 2 ml의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고, 형광분광광도계(BIO-TEK SFM25, USA)로 측정 (550 nm excitation and 585 nm emission) 하였다. 이상의 결과는 대조군에 대한 각 표고 약침액의 저해도 정도를 백분율로 나타내었다.

실험 결과의 통계 처리

실험 결과에 대한 통계적 처리 및 유의성 분석은 통계 처리 프로그램인 SigmaPlot 8.0을 이용하여 student's t-test를 하였으며, 평균값과 오차 (means \pm SD)로 나타내었다.

III. 결 과

Cytochrome P450 1A1 효소계 활성 저해 측정 결과

표고버섯의 자실체와 균사체 배양액 broth로부터 조제한 약침으로 실험동물에서 유도한 cytochrome P450 1A1 효소계 활성의 억제를 살펴본 결과 자실체 1, 5 및 10 mg/ml의 농도에서 대조군 활성의 13 %, 18 % 그리고 33 %의 억제 효과를 나타내었다 (Figure 1). 그러나 균사체 배양액 broth로부터 추출한 2차 대사산물을 target으로 조제한 약침은 자실체 약침의 처리군 보다 낮은 억제 활성을 보였다. 하지만 약침

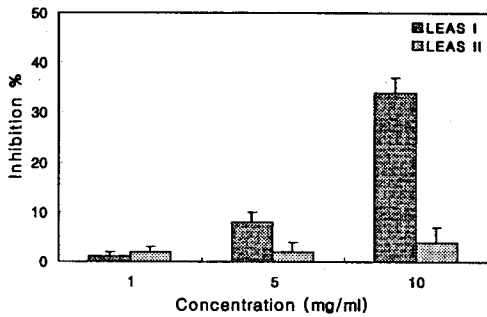


Fig. 2. Inhibition of rat liver microsomal cytochrome P450 1A2-dependent O-deethylase (MROD) activity by aqua-acupuncture solution from *Lentinus edodes*. Data are expressed as inhibition percentage from normal control. Experimental details are described in material and methods. Values are mean \pm S.D. of three experiments.

액 모두 각 각의 저농도 및 고농도에서 농도 의존적인 결과를 관찰할 수 있었다. 표고버섯의 약침 100 mg/ml에서는 더 이상의 억제 효과를 관찰할 수 없었다 (data not shown).

Cytochrome P450 1A2 효소계 활성 저해 측정 결과

표고버섯의 자실체와 균사체 broth 약침액에서 cytochrome P450 1A 계열 2의 활성에 미치는 영향을 측정하여 본 결과 CYP 1A1에서와 같이 자실체 10 mg/ml의 농도에서 대조군 활성의 34%의 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 2). Broth 10 mg/ml과 100 mg/ml (data not shown)의 농도에서는 각 4%와 11% 대조군 활성 억제가 관찰되었으나 농도 의존적으로 높은 억제 효과를 관찰할 수 없었다.

IV. 고 찰

표고버섯의 약리작용으로 마우스에서 항종양 효과와 복수암 세포를 억제한다고 알려져 있

며¹⁵⁾, 일반적으로 암 전이 억제, 발암 억제, 탈콜레스테롤, 산성 음식 중독 방지 및 항바이러스 효과¹⁶⁾ 등이 있고, 임상적으로 감기와 피부염, 간경화, 혈관경화 그리고 고혈압 등의 예방에 쓰이는 것으로 보고 되었다. 이처럼 표고버섯은 광범위한 약리 작용 및 임상적 가치가 탁월한 제제로 lentinan으로 더 잘 알려져 있다. Lentinan은 평균 분자량 500,000 Da의 β -D-glucan 성분이 면역활성 증가와 생체방어증강에 효과가 있는 것으로 연구 되어 왔다¹⁷⁾. 특히 각 종 버섯의 연구에 있어 β -D-glucan에 대한 효과가 입증되어, 이 물질의 생리 활성에 관한 연구가 집중되고 있다¹⁸⁾.

한편, 최근 막 구성 단백질 및 효소에 관한 관심이 증가되어 막 구성 성분들의 기능과 성분의 분성 및 대사경로에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. Cytochrome P450은 막구성 단백질의 형태로 hemoprotein 환원 상태에서 이산화탄소와 결합하면 405 nm에서 최고의 흡광도를 나타내고, 간장 내 microsome 단백질 함량의 20% 이상을 차지한다. 또한 약물 효소계의 전자 운반 과정에서 마지막 전자 수령체의 역할을 하며, 여러 대사 과정을 거쳐 약물과 산소 분자의 결합부위를 제공 하게 된다. 이러한 대사 과정을 통하여 CYP가 일반적으로 외부 독성물질에 대하여 무독화 시키거나 유해 물질의 직접적인 저해를 한다고 알려져 왔다⁶⁾. 그러나 최근 세포 내에서 CYP의 역할과 기능, 구조 및 조절기작 등이 다양하게 밝혀지면서 어떤 경우에는 CYP 효소가 독성을 감소시키기 보다는 오히려 증가시키는 기능을 하는 것으로 알려 졌으며, 특히 이러한 작용은 여러 가지 질병의 발생원인 되는 것으로 연구 되었다. 즉, 환경에서 유래하는 각종 유해 물질, 발암물질, 체내로 유입되는 각종 약물 등의 여러 가지 화학물질에 대하여 CYP가

이들 중 일부를 암의 개시와 진행 단계로 유발시키는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. 따라서 한약재 등의 생리활성 성분이 이들 CYP 효소계 활성을 억제하는 것은 곧 발암과정의 대사를 저해 시킨다고 할 수 있다.

한약물을 대상으로 CYP 약물대사 효소계 저해능을 가진 약물을 탐색하기 위한 연구가 活血化痰藥을 중심으로 보고¹⁷⁾ 된 것처럼 현재 한약에서 이들 CYP 억제에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 또한 앞서 밝힌바와 같이 버섯류를 자원으로 한 연구에서는 각 종 버섯에서 추출한 다당체로부터 항암제 및 항산화에 관한 연구²⁰⁾가 활발하게 진행이 되어 왔으며, 주목할 만한 결과가 발표되고 있다. 그러나 동일한 자원에서 다당체를 제외한 물질의 발암 효과 억제에 관한 연구와 항암, 항산화 등에 관한 실험적 접근은 부족하다.

이에 본 연구에서는 표고버섯의 항암 효과 증대 단계의 일부분에서 강력한 대사 작용을 하는 cytochrome P450 1A 계열의 저해를 목적으로 하여 표고버섯 약침액을 자실체와 균사체 배양액을 이용한 실험에 착수하였다.

본 논문에서 표고버섯을 대상으로 자실체에서 추출, 제조한 약침액과 균사체의 배양액에서 분리 정제된 약침액을 대상으로 CYP의 활성 억제 효과를 검토한 결과, CYP 1A 계열의 1과 2에서 표고버섯 약침액에 의해 각 효소의 활성이 유의성 있게 억제되었다. 즉, 표고버섯 약침액은 외부물질이나 대사산물에 의해 일어날 수 있는 종양이나 암의 발생을 높은 효과로 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 표고버섯의 약침액을 대상으로 흰쥐의 간 조직에서 유도된 cytochrome P450

효소의 억제 효과를 관찰함으로써, 표고버섯이 다당체뿐만 아니라 약침의 유효성분이 발암과정의 개시를 저해 하는 것을 규명하고자 하였다.

1. 고농도의 β -naphthoflavone (80 mg/kg/day)을 실험쥐의 복강에 3일간 corn oil에 희석하여 주사하여, 간세포 내 cytochrome P450 1A1의 증가를 시켜 표고버섯 약침액의 저해 효과를 살펴본 결과 표고버섯 약침액은 자실체 유래와 균사체의 배양액에서 추출한 성분 모두 농도 의존적으로 CYP 1A1 효소를 유의성 있게 감소시켰다.
2. β -naphthoflavone (80 mg/kg/day)에 의하여 유도된 실험쥐의 간세포 cytochrome P450 1A2는 표고버섯 자실체 및 균사체 배양액 약침액에서 비교적 높은 억제 효과가 관찰되었으며, 특히 자실체를 약침액으로 조제한 것에서는 농도 의존적이고 유의성이 억제 효과를 보여 주었다.

이상의 연구 결과를 종합하였을 때, 흰쥐의 간에서 증가된 cytochrome P450 1A1 및 1A2는 표고버섯 약침의 처리로 비교적 안정적으로 감소하였음을 확인하였다. 이러한 효과에 대한 보다 심도 있는 접근을 위하여 표고에서 추출된 다당체와의 비교 분석이 필요하다고 사료되며, 나아가서는 약침 처치의 경락·경혈학적 유용성 해석을 위한 추가 실험이 필요할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. 金廷彦. 奇蹟의 藥鍼療法. 서울 : 金剛出版社. 1987 : 53-106.
2. 南相千. 經絡. 서울 : 世明文化社. 1993 : 445-56.
3. 南相千. 經絡原論. 서울 : 實踐醫學社. 1994 : 19-39.

4. 上海中醫學院. 鍼灸學. 香港 : 商務印書館. 1981 : 95, 211-2, 67-274, 331-5.
5. Guengerich FP. Metabolism of chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000 ; 21(3) : 345-51.
6. Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev*. 1989 ; 40(4) : 243-88.
7. Ioannides C, Lum PY, Prake DV. Cytochrome P448 and the activation of toxic chemicals and carcinogens. *Xenobiotica*. 1984 ; 14 : 19-137.
8. Kim HS, Kacew S, Lee BM. In vitro chemoprevention effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis*. 1999 ; 20(8) : 1637-40.
9. Ng ML, Yap AT. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med*. 2002 ; 8(5) : 581-9.
10. deVere White RW, Hackman RM, Soares SE, Beckett LA, Sun B. Effects of mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer. *Urology*. 2002 ; 60(4) : 640-4.
11. Murcia MA, Martinez-Tome M, Jimenez AM, Vera AM, Honrubia M, Parras P. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *J Food Prot*. 2002 ; 65(10) : 1614-22.
12. 劉小波. 中國藥用真菌. 中國 : 山西人民出版社. 1984.
13. 錢百炎. 中草藥注射劑. 上海 : 上海科學技術出版社. 1981 : 71-132.
14. Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Pharmacol*. 1994 ; 48 : 923-36.
15. Ooi VE., and Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem*. 2000 ; 7(7) : 715-29.
16. 朴婉熙, 李虎得. 韓國버섯圖鑑. 서울 : 教學社. 1999 : 389-91.
17. Ng ML, Yap AT. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med*. 2002 ; 8(5) : 581-9.
18. Mizono M, Minato K, Tsuchida H. Preparation and specificity of antibodies to an anti-tumor beta-glucan, lentinan. *Biochem Mol Biol Int*. 1996 ; 39(4) : 679-85.
19. Guengerich FP. Role of cytochrome P450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res*. 1988 ; 48 : 2946-54.
20. Jeong HG, You HJ, Chang YS, Park SJ, Moon YH, Woo ER. Inhibitory effects of medicinal herbs on cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Kor J Pharmacogn*. 2002 ; 33(1) : 35-41.