

# 상황버섯 균사체를 이용한 발효주의 추출물이 염증관련 단백질의 발현과 세포내 활성산소 생성에 미치는 영향

이준혁 · 최영현<sup>1</sup> · 이용태<sup>2</sup> · 최성희<sup>3</sup> · 정경태<sup>4</sup> · 정영기<sup>4</sup> · 최병태\*

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 생화학교실, 2: 생리학교실,  
3: 동의대학교 생활과학대학 식품영양학과, 4: 동의대학교 자연과학대학 생명응용과학과

## Effect of the Evaporating Extract from Liquor of Fermentation Using Mycelium of *Phellinus linteus* on the Expression of Inflammatory Proteins and the Generation of Reactive Oxygen Species

Jun Hyuk Lee, Yung Hyun Choi<sup>1</sup>, Yong Tae Lee<sup>2</sup>, Sung Hee Choi<sup>3</sup>, Kyung Tae Chung<sup>4</sup>,  
Young Kee Jeong<sup>4</sup>, Byung Tae Choi\*

Departments of Anatomy, 1: Department of Biochemistry, 2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine,  
3: Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology,  
4: Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University

*Phellinus linteus* is known as a medicinal mushroom, which has the pharmaceutical activity on tumors and inflammatory diseases in traditional Oriental medicine. However, despite extensive pharmacological studies on *P. linteus*, the liquor of fermentation using mycelium of *P. linteus*(LFMP) has not been investigated. In the present study, it was examined the effect of the evaporating extract from LFMP(E-LFMP) on the expression of inflammatory proteins and the generation of reactive oxygen species in human hepatocarcinoma HepG2 cells. E-LFMP inhibited acetaldehyde-induced morphological change in HepG2 cells. Also, E-LFMP inhibits expression of inflammatory proteins including cyclooxygenase(COX)-1 and COX-2 through suppressing nuclear translocation of nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) and degradation of inhibitory  $\kappa$ B $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ ). In addition, E-LFMP inhibits generation of reactive oxygen species(ROS) by hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in HepG2 cells. These results suggest that LFMP has the pharmaceutical, especially anti-inflammatory, activity similar to *P. linteus* mushroom.

Key words : *Phellinus linteus*, cyclooxygenase, acetaldehyde, nuclear factor  $\kappa$ B, reactive oxygen species

### 서 론

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 동의보감 탕액편에 상목이(桑木耳)라는 이름으로 기재되어 있으며<sup>1)</sup>, 다른 이름으로 목질진흙버섯이라고도 불리는 목재부후균의 일종으로 두께 2~10 cm, 지름 6~12 cm의 갓을 가지고 갓의 형태는 반원 모양, 편평한 모양, 말굽 모양 등 다양한 모양을 하고 있다. 한의학에서 상황버섯은 생식기관 및 소화기관의 혈병과 어혈 등을 치료하는데 사용되어

왔으며<sup>2)</sup>, 최근에 이르러 체내의 면역력 증대를 통해 각종 암에 대한 저항성을 부여하는 것으로 알려지고 있다. 국내에서 자생하는 상황버섯의 종류는 모두 8종으로 알려져 있으며, 이 중 *P. linteus*의 균사체로부터 자라나는 목질진흙버섯의 항암 및 항염증 작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>3-5)</sup>.

최근 기능적 식품의 등장과 함께 단일 또는 복합 한약재나 그 추출물을 첨가한 기능성 주류가 출시되고 있다. 이들의 대부분은 양조주(brewing liquor)로서 누룩을 이용하여 곡물을 발효시켜 제조하고 있다. 그러나 누룩을 사용함에 따라 누룩 발효주 특유의 향이 그대로 남아 있는 경우가 많아 일부 기피하는 경향이 있다. 본 연구진은 선행 연구에서 *P. linteus*의 균사체가 알코올을 생산하는 것을 이용하여 상황버섯 균사체 발효주(liquor of

\* 교신저자 : 최병태, 부산시 진구 양정 2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학  
· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8635  
· 접수 : 2004/09/21 · 수정 : 2004/10/25 · 채택 : 2004/11/25

fermentation using mycelium of *Phellinus linteus*, LFMP)를 개발하였다<sup>6)</sup>. LFMP는 연한 노란색을 띠며 누룩 발효주와는 달리 독특한 향을 내는 발효주로 상황버섯 고유의 효능을 가지고 있다면 또 다른 기능성 주류로서 자리매김할 수 있을 것이다. 그러나 LFMP와 같은 기능성 발효주 역시 인체에 해를 주는 알코올이라는 한계를 벗어나지 못하므로 이에 대한 고찰이 필요하다.

알코올의 체내 흡수는 주로 위와 소장을 통해서 일어나며, 흡수된 알코올은 혈류를 통해 간으로 이동하고 alcohol dehydrogenase에 의해 acetaldehyde와 acetic acid로 분해되며, acetaldehyde는 다시 aldehyde dehydrogenase에 의해 acetate, 물, 이산화탄소 등의 순차적인 경로로 분해된다. 음주로 인한 혈중 acetaldehyde의 증가는 자율신경계와 심혈관계에 작용하여 구토, 어지럼증 등과 같은 급성 증상을 나타내며 체내의 거의 모든 기관에 손상을 입히며, 특히 간 세포의 염증 유발에 강한 전사인자로 작용하는 nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)의 활성화를 일으켜 하위에 있는 염증관련 유전자들의 전사를 유발하여 급·만성적인 손상을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>7,8)</sup>. 또한 알코올의 섭취에 의해 일어나는 간 질환은 간 세포내에 생성되어 축적되는 reactive oxygen species(ROS)와 관련 있으며, 생성된 ROS는 간 세포의 괴사 및 사멸을 유도하여 간 기능의 손상을 나타낼 수 있다<sup>9)</sup>.

이에 본 연구에서는 LFMP의 증발 추출물(E-LFMP)이 acetaldehyde에 의한 간 세포 형태 변화 및 염증관련 단백질의 발현 변화에 어떤 영향을 미치는지를 Western blotting으로 조사하였으며, 또한 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의한 간 세포내 ROS 생성에 미치는 영향을 형광현미경 관찰법으로 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. LFMP의 제조 및 E-LFMP의 추출

알코올 수득율을 높이기 위해 쌀을 기초로 한 배지를 사용하였으며 *Aspergillus oryzae*와 *P. linteus*의 균사체(mycelium, Fig. 1)를 함께 배양하였다. 우선 *A. oryzae*를 1.2 Kg의 멸균된 쌀에 접종하여 충분한 균체를 형성시킨 후 3 Kg의 멸균된 쌀과 90 g의 *P. linteus* 균사체를 혼합하였으며, 이어 멸균한 물을 총 5 L가 되도록 부가하여 25°C에서 11일 간 발효시켰다. 이를 통해 얻은 LFMP를 0.22  $\mu$ m pore size를 가진 여과지로 여과한 후 rotary evaporator로 감압농축하고 동결건조시켜 E-LFMP를 추출하였다.



Fig. 1. The mycelium of *P. linteus* in liquor medium(A) and photomicrograph(B)

### 2. HepG2 세포주의 배양 및 처리

본 연구에 사용된 인체 간암 세포주인 HepG2 세포는 한국

세포주은행에서 구입하였으며, 세포의 배양을 위해 90%의 DMEM(Gibco BRL, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(Gibco BRL)과 1% penicillin/streptomycin(Gibco BRL)이 포함된 성장 배지를 사용하였으며, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C humidity incubator에서 배양하였다. 실험을 위하여 배양 플라스크에 부착되어 있는 HepG2 세포를 trypsin-EDTA(Gibco BRL)로 부유시켜 각각의 실험에 맞는 수로 T-25, T-80, 60 mm, 100 mm 배양 용기에 나누는 다음, 24시간 동안 안정화시킨 후, serum이 들어있지 않는 배지에 E-LFMP를 녹여 1시간 동안 전처리하고 acetaldehyde를 처리하거나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하고 parafilm 등으로 밀봉하여 적절한 시간동안 배양하였다.

### 3. 광학현미경적 관찰

직경 60 mm의 배양용기에 HepG2 세포를 분주하고 세포를 부착시킨 후, 시료의 처리가 끝난 24시간 후 inverted microscope(Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 관찰하고 200배율로 사진을 찍었다.

### 4. Nitric oxide(NO) 농도 측정

HepG2 세포에 다양한 농도의 E-LFMP를 1시간 동안 전처리하고 250  $\mu$ M의 acetaldehyde를 24시간 동안 처리한 후, 그 배지를 Greiss A 및 Greiss B 용액<sup>10)</sup>의 혼합액과 동량으로 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하여 상대적인 값을 비교하였다.

### 5. Nuclear extract의 분리

Nuclear extract는 Yang *et al.*의 방법<sup>11)</sup>을 사용하여 분리하였으며, 간단히 설명하면 다음과 같다. HepG2 세포를 PBS로 세 번 수세하고, ice-cold hypotonic buffer(10 mM HEPES/KOH, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9)로 10분 간 반응시키고 15,000 × g에서 30초간 원심 분리하여 세포핵 침전물을 얻어내었다. 침전물에 ice-cold saline buffer(50 mM HEPES/KOH, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9)를 가하여 20분간 반응시킨 후 15,000 × g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 nuclear extract로 사용하였다.

### 6. SDS-PAGE 및 Western blotting

HepG2 세포를 PBS로 세 번 수세하고, radioimmunoprecipitation(RIPA) buffer(50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin)로 lysis를 실시하고, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 단백질을 포함하는 상층액을 얻어내어 Bradford's method에 따라 정량한 후 Laemli's sample buffer와 섞어 3분간 끓인 후 8-12%의 polyacrylamide gel상에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겨 10% skim milk로 blocking을 한 후, 순차적으로 일차항체 및 이차항체를 처리한 후 enhanced chemiluminescence method로

발광시켜 X-ray 필름에 감광하였다.

7. Reactive oxygen species (ROS) 검출을 위한 형광염색

HepG2 세포에 2.0 mg/ml의 E-LFMP를 1시간 동안 전처리하고 0.2 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 40분 동안 처리하면서 0.5 μl/ml의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA, Molecular Probes, USA)를 첨가하여 20분간 더 배양하였다. 3.7%의 formaldehyde로 고정시킨 후, PBS로 수세하고 10 μg/ml Hoechst 33258(Molecular Probes)로 핵을 염색하고 PBS와 DW로 수세한 다음 형광현미경 (Carl Zeiss)으로 관찰 한 다음 디지털 카메라 (Carl Zeiss)로 그 영상을 200배의 배율로 촬영하였다.

8. 단백질 밴드의 optical density 측정

SDS-PAGE와 Western blotting의 결과로 나온 필름상의 단백질 밴드의 optical density는 Personal Densitometer(Molecular Dynamics, USA)를 사용하여 측정하였으며, 이에 대한 값은 mean±SE로 표시하였다.

결 과

1. Acetaldehyde에 의한 간암세포의 형태변화에 미치는 E-LFMP의 영향

LFMP에서 증발 추출법으로 얻은 E-LFMP를 0.1 mg/ml의 농도에서부터 2.0 mg/ml의 농도까지 배지에 희석하여 24시간 동안 인체 간암세포주인 HepG2세포에 처리하여 그 형태를 위상차 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 2).

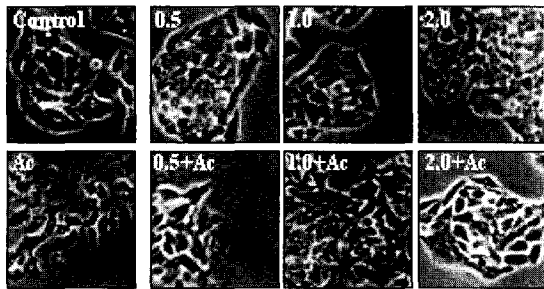


Fig. 2. Effect of E-LFMP on acetaldehyde-induced morphological change in HepG2 cells. Cells were pretreated with or without E-LFMP(0.5-2 mg/ml) for one hour and incubated with 250 μM of acetaldehyde (Ac) for 24 hours, subsequently, photographed by microscope (×200).

상대적으로 고농도의 E-LFMP인 2.0 mg/ml 처리 세포에서도 대조군과 비교하여 특이한 형태적인 변화나 세포수의 감소 등이 관찰되지 않았으며(0.1 및 0.2 mg/ml의 처리 결과 미제시), trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수를 계수하여 E-LFMP이 처리되지 않은 대조군과 비교하여도 차이가 없었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 250 μM의 acetaldehyde가 24시간동안 처리된 HepG2세포는 비정형적인 형태로 형태적 변화를 일으켰으며, colony를 형성하며 인접한 세포와 붙어 자라 대조군과는 상이하게 세포사이의 연결이 끊어져 분산된 형태를 나타내었다. 그러나 1.0 mg/ml의 E-LFMP를 한 시간 동안 전처리하고

acetaldehyde를 처리한 HepG2 세포의 경우 acetaldehyde를 단독으로 처리한 세포에 비해 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았으며, 이러한 현상은 2.0 mg/ml의 E-LFMP를 전처리한 세포에서 현저하게 나타났다. 이러한 결과는 E-LFMP가 포함하고 있는 유효성분이 acetaldehyde에 의한 간암세포의 형태적인 변화 및 손상을 억제할 수 있음을 보여 준다.

2. Acetaldehyde에 의한 간암세포의 cyclooxygenase(COX)-1 및 COX-2단백질 발현에 미치는 E-LFMP의 영향

상대적으로 높은 2 mg/ml의 E-LFMP농도에서도 간암세포의 형태에 어떠한 영향을 미치지 않으며 오히려 acetaldehyde에 의한 형태적 변화를 억제하였으므로 2.0 mg/ml의 E-LFMP를 1시간 동안 전처리하여 acetaldehyde에 의한 간암세포의 COX-1과 COX-2단백질의 발현을 24시간 후 Western blotting으로 조사하였다. COX는 염증유발 물질인 prostaglandin E2를 arachidonic acid로부터 합성하는 단백질로 다양한 세포와 자극에 의하여 발현되는 것으로 알려져 있다<sup>[2]</sup>. Fig. 3A에서 보이는 바와 같이 acetaldehyde에 의한 COX-1과 COX-2의 발현 증가는 현저히 나타나지는 않으나 이미지 분석 프로그램을 통해 이를 확인한 결과 Fig. 3B의 결과에서처럼 부분적인 증가가 일어남을 확인하였다. 특이한 것은 COX-1의 발현은 2 mg/ml의 E-LFMP 단독 처리에 의해서도 대조군에 비해 감소하였지만 COX-2단백질의 발현은 E-LFMP 단독 처리에 의해 대조군에 비해 오히려 증가하였으며, acetaldehyde를 단독으로 처리한 HepG2세포와 근사한 정도의 발현을 나타내었다는 것이다. 그러나 2 mg/ml의 E-LFMP를 전처리한 후 acetaldehyde를 처리한 HepG2세포의 경우 COX-1과 COX-2의 발현이 양쪽 모두 대조군과 acetaldehyde 단독 처리군보다 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 COX의 발현 증가로 대변되는 acetaldehyde에 의한 일련의 염증성 반응 유도 기전이 부분적이기는 하지만 E-LFMP에 의해 억제될 수 있음을 나타낸다.

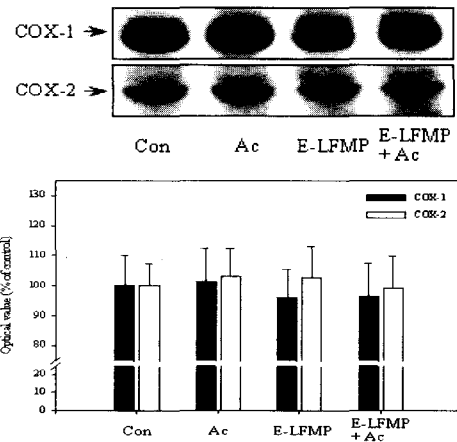


Fig. 3. Effect of E-LFMP on the expression of COX-1 and COX-2 by acetaldehyde in HepG2 cells. A, Cells were pretreated with or without E-LFMP(2 mg/ml) for one hour and incubated with 250 μM of acetaldehyde for 24 hours, subsequently, analyzed by Western blotting using anti-COX-1 and 2 antibodies. B, Protein expression density was determined by densitometer. Each point represents the mean±SE of three independent experiments.

3. Acetaldehyde에 의한 간암세포의 NF-κB 활성화에 미치는 E-LFMP의 영향

COX-2는 대표적인 염증 반응의 매개 단백질로 국소 염증 부위뿐만 아니라 인체의 각종 암 조직 부위에서도 발현의 증가가 나타나는 것으로 알려져 있으며<sup>13)</sup>, COX-2의 발현 조절은 전사인자인 NF-κB의 활성화에 의하여 일어난다<sup>14)</sup>. 또한 acetaldehyde는 HepG2세포의 NF-κB를 활성화시키는 것으로 보고되어 있어 acetaldehyde에 의한 NF-κB의 활성화가 본 실험 조건에서도 일어나는지를 확인하고, 활성화가 일어난다면 이에 대한 E-LFMP의 효과를 조사하고자 하였다. 먼저 HepG2세포에 E-LFMP를 한 시간 동안 전처리하고 acetaldehyde를 30분간 처리한 후, HepG2세포의 nuclear extract를 얻어내어 NF-κBp65에 대한 SDS-PAGE와 Western blotting을 실시하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 Ac를 처리하면 대조군에 비하여 많은 양의 NF-κBp65가 핵 속에서 관찰되는 것으로 나타났으며, NF-κB의 억제 조절자인 inhibitory κB(IκB)α의 경우 대조군에 비해 그 양이 현저히 감소함을 알 수 있었다. 흥미롭게도 앞서 Fig. 3의 결과와 유사하게 NF-κBp65 단백질의 핵으로의 이동이 acetaldehyde 단독 처리군 보다 상대적으로 낮지만 E-LFMP를 단독으로 처리한 세포에서도 관찰되었다. 그러나 핵으로의 NF-κBp65 이동은 E-LFMP 전처리에 의하여 부분적으로 억제되었으며, 또한 이를 조절하는 IκBα의 분해 역시 부분적으로 억제됨을 알 수 있었다. Fig. 4B는 이 결과가 이미지 분석 프로그램을 통하여서도 확인되었음을 보여준다.

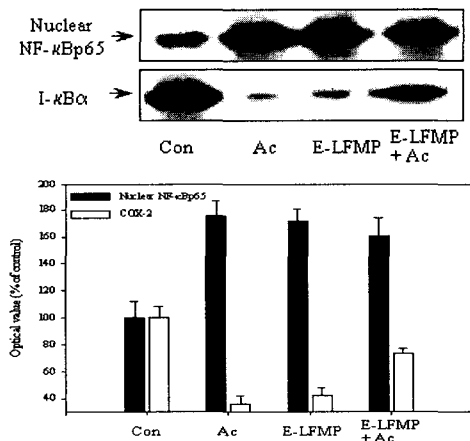


Fig. 4. Effect of E-LFMP on acetaldehyde-induced nuclear translocation of NF-κBp65 in HepG2 cells. A, Cells were pretreated with or without E-LFMP(2 mg/ml) for one hour and incubated with 250 μM of acetaldehyde for 30 minutes, subsequently, analyzed by Western blotting using anti-NF-κBp65 and anti-IκBα antibodies. B, Protein expression density was determined by densitometer. Each point represents the mean±SE of three independent experiments.

4. Acetaldehyde 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 간암세포의 NO와 ROS생성에 미치는 E-LFMP의 영향

산화적 스트레스는 세포내의 산화·환원 상태에 영향을 주어 신호전달계의 교란을 일으키고 그로 인해 여러 질환의 원인이 되기도 하며, 노화를 유발하는 것으로도 알려져 있다<sup>15,16)</sup>. 음주로 인해 체내로 섭취된 알코올은 대사과정을 통해 acetaldehyde로 전환되어 세포내의 신호전달계를 거치면서 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 보고되고 있으므로<sup>17)</sup> 본 연구에

서는 HepG2세포에 E-LFMP를 전처리하여 acetaldehyde에 의한 NO 생성에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. HepG2세포에 E-LFMP를 한 시간 동안 전처리한 후, 250 μM의 acetaldehyde처리하고 24시간 동안 배양한 후 NO를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같이 나타났다. Acetaldehyde에 의한 NO의 생성은 대조군에 비해 50% 이상 증가되었으나, acetaldehyde단독 처리군에는 못 미치지만 E-LFMP 단독 처리군 역시 농도에 따라 낮게는 18%에서 높게는 거의 20%까지 대조군에 비해 NO의 생성이 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 앞서의 Fig. 3과 4에서 보여준 COX 단백질의 발현 양상, 그리고 NF-κB의 핵으로의 이동 현상과 유사하다. 또한 결정적으로 E-LFMP의 전처리에 의하여 acetaldehyde에 의한 NO의 생성이 부분적으로 억제되는 것으로 보임으로 이러한 결과들은 앞서 보인 결과들과 연관이 있을 것을 생각된다.

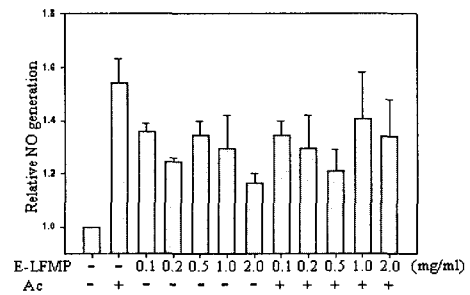


Fig. 5. Effect of E-LFMP on acetaldehyde-induced NO generation in HepG2 cells. Cells were pretreated with or without E-LFMP(2 mg/ml) for one hour and incubated with 250 μM of acetaldehyde for 24 hours. NO synthesis was determined by assaying culture supernatants for nitrite, the stable reaction product of NO with molecular oxygen. Each point represents the mean±SE of three independent experiments.

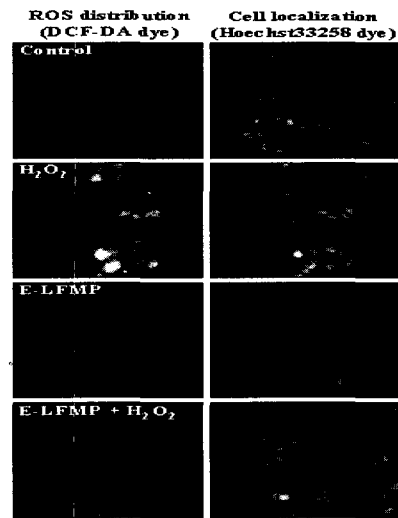


Fig. 6. Effect of E-LFMP on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS generation in HepG2 cells. Cells were pretreated with or without E-LFMP(2 mg/ml) for one hour and incubated with 0.2 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for one hour. And then, cells were stained with DCFH-DA and Hoechst 33342 (×200).

Acetaldehyde에 의한 NO의 생성을 E-LFMP에 의해 부분적으로 억제하므로, 강력한 세포내 ROS유발 물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 ROS생성에 E-LFMP가 어떤 영향을 미치는지를 조사하고자, HepG2세포에 E-LFMP를 한 시간 동안 전처리한 후 1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 한 시간 동안 배양하고 세포내 ROS에 특이적

으로 결합하여 형광을 나타내는 시료를 이용하여 형광 염색을 실시하였다. Fig. 6의 우측 패널은 세포핵을 염색하여 HepG2세포의 분포를 보여주고 있으며, 좌측 패널은 생성된 ROS를 보여주고 있다. HepG2 세포는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에 의하여 많은 양의 ROS 생성을 유도하였으나, E-LFMP의 전처리에 의하여 이러한 생성 유도는 거의 완벽하게 억제됨을 알 수 있었으며, 또한 대조군에서 약하게 보이는 세포내 ROS가 E-LFMP의 단독 처리군에서는 basal level이하로 떨어지는 것도 확인하였다.

## 고 찰

본 연구에서 상황버섯의 균사체를 이용하여 만든 LFMP의 증발 추출물인 E-LFMP가 알코올의 이차산물인 acetaldehyde에 의한 인체 간암세포의 염증 반응 및 손상과 활성산소종의 형성에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. Acetaldehyde에 의한 HepG2의 형태변화는 세포사이의 연결이 해체되는 양상은 이미 보고되어 있다<sup>18)</sup>. 세포간 결합의 대표적인 경로는 tight junction과 adherent junction이 있으며, 여기에는 E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex와 occludin/ZO-1 complex가 각각 중요한 기능을 담당하고 있는 것을 알려져 있다<sup>19)</sup>. Acetaldehyde는 세포간의 tight junction을 방해하여 scattering을 유발하는 것으로 이미 알려져 있으며<sup>20)</sup>, 최근의 연구결과에 따르면 이러한 현상은 세포내 골격인 actin cytoskeleton으로부터 occludin, E-cadherin, ZO-1 및  $\beta$ -catenin을 떼어 내어 cell-cell adhesion을 방해하는 것으로 보고되었다<sup>21)</sup>. 흥미롭게도 본 연구 결과에서는 이러한 현상이 E-LFMP에 의해 억제되었다. Acetaldehyde에 의한 세포의 scattering을 억제하는 물질로는 L-glutamine이 보고되어져 있으며<sup>21)</sup>, 상황버섯에는 glutamine이 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있어<sup>22)</sup> acetaldehyde에 의한 세포 간 연결의 분해가 E-LFMP에 의해 억제되는 이유로 제시될 수 있다.

COXs는 세포내에서 항상 발현되는 형태로 존재하는 COX-1과 세포의 특이 자극에 의해 발현되는 COX-2 두 가지 형태가 존재하며, 염증과 각종 암에서 과다 발현되는 것은 COX-2로 알려져 있다<sup>12)</sup>. COX-2는 여러 pro-inflammatory cytokine에 의해 발현이 유도되며, 최근 알코올 및 acetaldehyde에 의한 발현 유도가 보고되어진바 있다<sup>23)</sup>. COX-2를 특이적으로 억제하여 염증성 질환의 치료와 항암제로 개발하려는 노력이 전 세계적으로 활발히 진행 중이며 대표적인 약물로는 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)의 일종인 NS-398, celecoxib 등이 개발되어 있다<sup>24,25)</sup>. 앞서 본 연구의 결과에서 제시된 바와 같이 COX-2의 발현 증가는 미약하지만 acetaldehyde에 의해 일어나고 있으며, E-LFMP에 의해 억제되는 양상을 보이고 있다 (Fig. 3). E-LFMP에 의해 acetaldehyde에 의한 COX-2와 같은 염증성 단백질의 발현 증가가 억제되는 것은 E-LFMP의 유효성분 중에 앞서 제시하였던 NSAIDs로 작용할 가능성이 있는 물질이 존재함을 시사하며 이에 대한 분석은 앞으로 더 진해되어야 할 것으로 사료된다. 그러나 E-LFMP를 단독으로 처리한 HepG2 세포에서도 발현증가가 일어나는 현상에 대해서는 더 많은 연구

가 필요할 것으로 사료되지만 Fig. 4에서 보여준 바와 같이 E-LFMP 단독 처리에 의해서 COX-2의 대표적인 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 핵 속으로의 이동이 나타났으므로 이와 관련지어 설명할 필요가 있을 것으로 판단된다. 정상적인 조건에서 NF- $\kappa$ B는 그 억제 조절 단백질인 I $\kappa$ B와 결합되어 세포질에 존재하며, 세포외부의 특이적인 신호물질에 의해 여러 신호전달경로를 거쳐 I $\kappa$ B kinase(IKK)의 활성화가 일어나면 연속적으로 일어나는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화와 분해로 인해 자유롭게 되고, 핵 속으로 이동하여 여러 염증관련 유전자의 프로모터에 결합하여 전사를 유도한다<sup>26)</sup>. Fig. 4는 acetaldehyde에 의한 NF- $\kappa$ B의 핵 속으로의 이동이 E-LFMP의 전처리에 의하여 부분적으로 억제됨을 보여주고 있으며, 이는 억제 조절자인 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해가 억제되어짐으로써 일어남을 보여주었다. 그러므로 이러한 현상은 I $\kappa$ B $\alpha$ 를 인산화시켜 ubiquitination에 의해 분해되도록 만드는 IKK를 억제함으로써 가능할 것으로 사료되나 이에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것이다. 그리고 앞서 언급하였듯이 E-LFMP 단독으로 처리된 HepG2세포에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해와 함께 NF- $\kappa$ B의 핵 속으로의 이동이 관찰되어 동일 조건에서의 COX-2발현이 부분적으로 설명되어 지지만 그 원인에 대해서는 더 자세한 연구가 필요하다. 그러나 NF- $\kappa$ B에 의한 전사가 단지 염증반응만을 활성화시키는 것이 아니라 여러 생리활성반응, 특히 세포 생존에 관계되는 여러 단백질들의 발현에도 관련이 있으므로 이 부분으로의 연구 진행도 흥미로운 것으로 사료된다.

활성산소종인 ROS에 의한 세포내의 산화-환원 상태의 붕괴는 현재 다양한 질환 및 노화와 관련이 있는 것으로 보고되어져 있고, 특히 음주로 인한 알코올의 섭취는 간세포의 ROS를 생성시키는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 세포내에서 생성되는 ROS로 대표적인 예로 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical(OH $\cdot$ ), reactive oxygen(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 및 nitric oxide(NO) 등이 보고되어 있다<sup>27,28)</sup>. 본 연구에서 Fig. 5는 비록 미약한 정도이긴 하지만 Ac의 처리에 의해 HepG2세포에서 NO가 생성됨을 알 수 있었으며, 이러한 현상이 E-LFMP에 의해 억제됨을 보았다. NO는 면역체계에서도 작용하지만 신호전달물질로도 작용하며 nitric oxide synthases (NOSs)에 의해 생성되어 지는데, 주로 inducible NOS (iNOS)에 의해 생성되며, iNOS는 NF- $\kappa$ B의 발현조절을 받는 것으로 알려져 있다<sup>29)</sup>. 그러므로 E-LFMP에 의한 NO 생성 억제는 NF- $\kappa$ B 활성화 억제와 연관이 있을 것으로 사료된다. 또한 앞서의 결과들과 마찬가지로 E-LFMP가 단독으로 처리된 HepG2세포에서 NO가 대조군에 비해 증가하는 결과는 이를 뒷받침한다. 세포내의 ROS는 여러 방법으로 관찰이 가능하나 최근에는 ROS에 직접 결합하여 형광을 나타내는 시료를 사용하여 형광 또는 공초점현미경로 관찰하는 방법이 주로 사용되어 지며, 본 연구에서도 이 방법을 사용하였다. Fig. 6에서 보여준 바와 같이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에 의해 세포내 ROS 형광반응이 증가하였으나 E-LFMP의 전처리에 의해 이러한 현상이 억제되는 것은 E-LFMP의 유효성분 중에 항산화제로 작용 가능한 물질이 존재함을 시사한다. 여러 질환들, 그리고 특히 사회적 관심사로 대두되고 있는 노화 현상이 세포내 활성산소종의 증가와 많은 관련이 있는 것을 생

각한다면 E-LFMP에 의한 ROS의 억제 결과는 흥미로운 수밖에 없다. 그러나 이러한 억제현상이 어떤 기전을 통해서 일어나는 지에 대한 연구는 앞으로 더 진행되어야 할 것이다.

이상의 결과에서 E-LFMP는 인체 간암세포인 HepG2세포에서 세포 간 연결을 보호하며, NF- $\kappa$ B의 핵 내로의 이동을 저해하여 COX-2의 발현과 NO의 생성을 억제하고, 또한 ROS의 생성을 억제함으로써 알코올의 이차산물인 acetaldehyde에 의한 염증 및 세포 손상에 대하여 보호 작용을 함을 알 수 있었다. 본 연구 결과는 다른 주정을 사용하여 제조하는 주류와는 달리 상황버섯 *P. linteus*의 균사체를 이용하여 생산되는 주류는 알코올의 섭취로 인해 유발되는 알코올성 질환을 일으킬 가능성이 적으며 오히려 그러한 질환을 유발하는 알코올 이차산물에 의한 여러 반응을 억제함으로써 건강을 위한 기능성 주류로 자리매김할 수 있음을 시사한다. 또한 기존에 알려져 있는 상황버섯의 효능이 그 균사체를 이용하여 제조한 발효주에도 일부 포함되어 있는 것을 알 수 있었다. 앞으로 상황버섯 균사체를 이용한 발효주의 유효성분 중 어떤 물질이 이러한 보호기전을 나타내는지를 조사하면 상황버섯의 효능에 대한 추가적인 자료로 사용되어 질 수 있을 것이며, 다른 기능성 주류의 개발에도 참고 자료가 될 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(첨단기술개발분야) 및 J&J 바이오의 연구비 지원에 의해 이루어 졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 허준. 동의보감, 남산당, 서울. p719, 1993.
- 이시진. 본초강목, 고문사, 서울. p980, 1975.
- Kim, G.Y., Han, M.G., Song, Y.S., Shin, B.C., Shin, Y.I., Lee, H.J., Moon, D.O., Lee, C.M., Kwak, J.Y., Bae, Y.S., Lee, J.D., Park, Y.M. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF- $\kappa$ B. *Biol Pharm Bull*, 27, 1656-1662, 2004.
- Choi, Y.H., Huh, M.K., Ryu, C.H., Choi, B.T., Jeong, Y.K. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of *Phellinus linteus* in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Med*, 14, 227-232, 2004.
- Kim, S.H., Lee, H.S., Lee, S., Cho, J., Ze, K., Sung, J., Kim, Y.C. Mycelial culture of *Phellinus linteus* protects primary cultures rat hepatocytes against hepatotoxins. *J Ethnopharmacol* 95, 367-372, 2004.
- 정영기. 버섯균사체가 분비하는 알코올의 생산과 이를 이용한 기능성 주류의 개발. 농림부 연구과제. 2004
- Gukovskaya, A.S., Mouria, M., Gukovsky, I., Reyes, C.N., Kasho, V.N., Faller, L.D., Pandol, S.J. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology*, 122, 106-118, 2002.
- Machida, I., Matsuse, H., Kondo, Y., Kawano, T., Saeki, S., Tomari, S., Fukushima, C., Shimoda, T., Kohno, S. Acetaldehyde induces granulocyte macrophage colony-stimulating factor production in human bronchi through activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *Allergy Asthma Proc*, 24, 367-371, 2003.
- Koch, O.R., Pani, G., Borrello, S., Colavitti, R., Cravero, A., Farre, S., Galeotti, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med*, 25, 191-198, 2004.
- Francoeur, C., Denis, M. Nitric oxide and interleukin-8 as inflammatory components of cystic fibrosis. *Inflammation*. 19, 587-598, 1995.
- Yang, H., Sadda, M.R., Yu, V., Zeng, Y., Lee, T.D., Ou, X., Chen, L., Lu, S.C. Induction of human methionine adenosyltransferase 2A expression by tumor necrosis factor alpha. Role of NF- $\kappa$ B and AP-1. *J Biol Chem*, 278, 50887-50896, 2003.
- Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W.G., Isaacs, W.B., De Marzo, A.M. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett*, 215, 1-20, 2004.
- Chun, K.S. and Surh, Y.J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol*, 68, 1089-1100, 2004.
- Wu, K.K. Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. *Thromb Res*, 110, 273-276, 2003.
- Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44, 275-295, 2004.
- Apel, K., Hirt, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-399, 2004.
- Hoek, J.B., Pastorino, J.G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*, 27, 63-68, 2002.
- Ramanathan, R., Wilkemeyer, M.F., Mittal, B., Perides, G., Charness, M.E. Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *J Cell Biol*, 133, 381-390, 1996.
- Blystone, S.D. Integrating an integrin: a direct route to actin. *Biochim Biophys Acta*, 1692, 47-54, 2004.
- Atkinson, K.J., Rao, R.K. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G1280-G1288, 2001.
- Seth, A., Basuroy, S., Sheth, P., Rao, R.K. L-Glutamine

- ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G510-G517, 2004.
22. 나경수, 송치현, 양병근, 전용재. 목질진흙(상황) 버섯의 면역활성. *한국균학회지*, 26, 86-90, 1998.
23. Blanco, A.M., Pascual, M., Valles, S.L., Guerri, C. Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-kappa B. *Neuroreport*, 15, 681-685, 2004.
24. Roberts, E.G., Vona-Davis, L., Riggs, D.R., Jackson, B.J., Hohseni, H., Kandzari, S.J., McFadden, D.W. COX-2 inhibition and cancer: experimental findings and clinical correlates. *W V Med J*, 100, 96-101, 2004.
25. Abou-Issa, H., Alshafie, G. Celecoxib: a novel treatment for lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 4, 725-734, 2004.
26. Aggarwal, B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, 6, 203-208, 2004.
27. Jeremy, J.Y., Shukla, N., Muzaffar, S., Handley, A., Angelini, G.D. Reactive oxygen species, vascular disease and cardiovascular surgery. *Curr Vasc Pharmacol*, 2, 229-236, 2004.
28. Krotz, F., Sohn, H.Y., Pohl, U. Reactive Oxygen Species: Players in the Platelet Game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1988-1996, 2004.