

추출방법에 따른 상황버섯 추출물의 항산화활성 및 생물학적 특성

권대준¹ · 윤선주² · 조준구² · 최웅규³ · 강선철*

¹아시아대학교 한약자원학과, ²(주)바이오파머, ³아시아대학교 한방식품영양학과, 대구대학교 생명공학과

Antioxidant Activities and Biological Properties of *Phellinus linteus* Extracts according to Different Extraction Methods

Dae-Jun Kwoen¹, Sun-Joo Youn², Jun-Gu Cho², Ung-Kyu Choi³ and Sun-Chul Kang*

¹Department of Oriental Medicine Resource, Asia University, Kyungsan 712-220, Korea

²Biofarmer Co. Ltd, Kyungsan 712-714, Korea

³Department of Oriental Medical Food and Nutrition, Asia University, Kyungsan 712-220, Korea
Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan 712-714, Korea

Received December 12, 2005; Accepted May 17, 2006

Antioxidant activities and biological properties such as antimutagenic and cytotoxic effect of *Phellinus linteus* extracts from different extraction conditions were measured against *Salmonella typhimurium* and human cancer cell lines. DPPH free radical scavenging activities of the extracts were higher in the solutions extracted with ethanol (17.14) and ethanol after water (17.79), respectively. In the Ames test, ethanol extract of *P. linteus* alone did not exhibit any mutagenicity but showed substantial inhibitory effect against mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), and benzo (α) pyrene (B(α)P). The extracts of ethanol and ethanol after water of *P. linteus* (200 μg/plate) had the highest inhibitory effect of 61.5 and 60.9%, respectively, on the mutagenesis on *S. typhimurium* TA98 strain induced by B(α)P. Extracted solutions of ethanol and ethanol after water of *P. linteus* showed high antimutagenic effect against MNNG, 4NQO, Trp-P-1 and B(α)P, causing mutations in *S. typhimurium* TA100 strain. The anticancer effects of *P. linteus* extracts were investigated against human fibrosarcoma HT-29 and human hepatocellular carcinoma HepG2. The treatment of 0.5 mg/ml of ethanol, ethanol after water and water extracts of *P. linteus* had the highest cytotoxicity of 59, 57, 54%, respectively against HT-27 cell line, whereas low cytotoxicity effects were observed against HepG2 cell line in the range of 10~30%. The ethanol and water extracts of *P. linteus* also showed the nitrate scavenging ability at different pHs. The ethanol extract showed higher nitrate-scavenging ability compared to water extract of *P. linteus*.

Key words: *Phellinus linteus*, DPPH, Ames test, antimutagenic effect, cytotoxicity

서 론

최근 식품 및 영양물질이 암을 유발시키는 가장 중요한 요인 중 하나로 인식됨에 따라 암의 치료제 개발과 예방요법 등의 창출에 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 이미 개발된 합성 의약품들은 사용량이나 사용빈도에 따라 체내에서 부작용이나 독성이 밝혀지고 있다.¹⁾ 따라서 우리가 일상생활에서 섭취하고 있는 식품성분으로서 그 자체로는 유전독성이 없는 성분들은 기존 항암제와는 달리 세포독성 및 유전독성이 거의 없기

때문에 인체에 안전하게 사용될 가능성이 높다고 생각하여 우수한 치료제를 천연물로부터 개발하고자 하는 노력이 전 세계적으로 이루어지고 있는 실정이다. 담자균류는 식용뿐만 아니라 그 분류학적 특성으로 인해 항생물질을 비롯하여 항변이원성물질, 항콜레스테롤성 물질 등 여러 가지 생리활성을 나타내는 저분자물질들과 항암 면역 활성을 갖는 다당류 lentinan²⁾ 등과 같은 항암제 개발에 이르기까지 우수한 생리활성물질의 자원으로써 각광을 받고 있다. 상황버섯은 회귀 한방 약재로서 위암, 식도암, 십이지장, 결장암, 직장암 등의 소화기계통의 암을 비롯하여 간암 수술 후 화학요법을 병행할 때의 면역기능 향진에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 자궁출혈, 월경불순, 장출혈, 오장기능을 활성화시키고, 해독작용을 하는 것으로 알려져 있다.³⁾ 그러나 상황버섯은 자연계에서 분포 및 발생수

*Corresponding author
Phone: +82-53-850-6553; Fax: +82-53-850-6559
E-mail: sckang@daegu.ac.kr

가 극히 적어 자실체를 얻기 어려우며 인공배양 역시 어려운 것으로 알려져 이에 대한 화학적, 생화학적 연구가 거의 이루어지지 못하였다. 1990년대 중반 균사체 배양기술과 인공재배법이 확립된 후 농가에서 대량생산되기 시작하였으며 가정에서 대체의학 또는 민간요법용으로 많이 사용되고 있다.

상황버섯은 분류학적으로 소나무 비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 목질진흙버섯은 항암력이 매우 우수한 버섯으로 관심의 대상이 되고 있다.⁴⁾ Chang⁵⁾ 등은 17종의 담자균 가운데 월등히 높은 항암력을 가진 버섯 중 상황버섯이 종양억제율이 96.7%로서 가장 강력한 항암력을 지닌 것으로 보고하였고, 이러한 효능은 acidic heteroglucan에 의한 것으로 알려져 있다. 그러나 상황버섯의 생리활성에 대한 체계적이고 학술적인 연구뿐만 아니라 추출액의 품질 특성 및 최적 추출조건에 관한 연구는 Song⁶⁾ 등의 논문을 제외하고는 찾아보기 힘들다. 따라서 본 연구에서는 상황버섯 추출물의 항산화 활성과 생리적 기능에 대한 활성을 탐색하기 위하여 먼저 추출조건에 따른 항산화 활성을 조사하고, *S. typhimurium* TA98과 TA100을 이용하여 항돌연변이원성을 검토하였다. 그리고 결장암세포인 HT-29(colon carcinoma cell, human)와 간암세포 HepG2(hepatoma cell, human)에 대한 세포독성효과를 규명하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 추출. 실험에 사용한 상황버섯은 경북 경산에 위치한 버섯재배농가에서 구입하여 5-10 mm의 크기로 분쇄 후 최적 열수 및 ethanol 추출 방법에 의하여 추출, 여과하여 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결, 건조한 시료를 이용하였다.

상황버섯 추출 조건은 상황버섯 추출액을 원료로 한 다양한 종류의 제품 생산을 목적으로 pH, 갈색도, 가용성 건물중량, 조단백, 당도, 환원당, 총당 함량의 품질 변화를 SAS program의 반응표면분석법을 이용하여 열수 추출은 추출온도 100°C, 추출시간 4 hr, 가수량 20 g/로 하였고, ethanol 추출은 추출온도 80°C, 추출시간 4 hr, 가수량 50 g/로 추출하였다. 추출방법은 단계별로 열수와 ethanol을 조합하여 열수, ethanol(1차 추출물), 열수 후 열수, 열수 후 ethanol, ethanol 후 ethanol, ethanol 후 열수(2차 추출물)로 하였다.

변이원 물질. 직접 돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO)과 간접 돌연변이원인 benzo(α)pyrene(B(α)P)는 미국 Sigma 회사로부터 구입하였고, 이들 변이원 물질은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

세포주 및 배양. 실험에 사용한 세포주는 암세포로 사람의 간암세포 HepG2(hepatoma cell, human)와 결장암 세포 HT-29(colon carcinoma cell, human)를 사용하였다. HT-29 cell은 RPMI-1640 배지에 10% FBS(10% heat inactivated fetal bovine serum)와 1% 항생제(penicillin G/streptomycin)를 첨가하여 배양하였으며, HepG2 cell은 MEM 배지에 10% FBS와 1% 항생제를 첨가하여 배양하였다. 이들 세포주는 37°C에서

5% CO₂에 적응시켜 배양하였으며, 2~3일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

항산화활성 측정. 항산화 활성은 각 시료의 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH) radical⁷⁾에 대한 소거효과를 측정하였으며, cuvette 내에 농도별 test sample과 300 μM DPPH 용액(흡광도가 1.0이 되도록 용액을 희석)을 넣고 37°C에서 30분간 반응 후 515 nm에서 대조구와 시료구와의 흡광도 차이를 측정하였다. 시료처리에 의한 억제율은 DMSO가 처리된 대조구와 비교하여 계산하였고 IC₅₀값은 50% DPPH free radicals을 제어시키는 시료농도로 계산하였다.⁸⁾

돌연변이원성 실험. 상황버섯 추출물의 돌연변이원성 실험은 *S. typhimurium*의 변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation법⁹⁾으로 실시하였다. 상황버섯 추출물을 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각 50 μl씩 가하고 여기에 미리 TA-culture배지(Difco nutrient broth 0.8 g, NaCl 0.5 g, 증류수 100 ml)에서 하룻밤 배양시킨 균액 100 μl를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 μl가 되도록 하였다. 이것을 30분간 preincubation한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 ml씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀 돌연변이(His⁺ revertant colony) 수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

항돌연변이원성 실험. 항돌연변이원성 실험에 사용된 발암물질은 MNNG, 4NQO 및 B(α)P를 사용하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 상황버섯 추출물을 각각 50 μl씩 첨가하고 변이원 물질을 각각 50 μl 첨가한 다음 대사활성물질이 필요한 경우에는 본 실험실에서 Maron과 Ames⁹⁾의 방법에 따라 제조한 rat의 간 microsomal enzyme mixture인 S-9 mix를 250 μl씩 각각 첨가하였다. 여기에 하룻밤 배양시킨 균액을 100 μl씩 주입한 후 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종부피가 700 μl가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 30분간 진탕 배양한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하여 생성된 복귀 돌연변이 수를 측정하여 항돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 상황버섯 추출물과 변이원 물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며 항돌연변이 활성은 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(%)로 나타내었으며, 아래의 식으로 산출하였다.

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = (M - S_1) / (M - S_0) \times 100$$

M: 돌연변이원만 존재할 경우의 복귀 돌연변이 균수

S₀: 자연 복귀 돌연변이 균수

S₁: 시료를 첨가하였을 때의 복귀 돌연변이 균수

MTT assay. 상황버섯 각 추출물의 암세포 및 정상 간세포의 증식 억제 효과는 Green¹⁰⁾ 등의 방법에 따라 MTT assay를 이용하여 검토하였다. MTT 분석은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 10% fetal bovine serum 및 각각의 HepG2, HT-29를 함유하는 RPMI 1640과 MEM배지를 1×10⁴ cells/ml 농도로 200 μl씩 각 well

에 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 0.2 M 이하의 DMSO로 녹인 시료를 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도로 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 새로운 배지와 MTT 용액을 100 µl씩 첨가해 4시간 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 MTT 염색액은 네 번 정도 행구어, 건조시킨 후 DMSO 200 µl로 염색제를 녹인 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아질산염 소거능. 추출물이 발암성 nitrosamine 생성의 전구 물질인 아질산염을 소거하거나 또는 분해하는 작용을 알아보기 위하여 Kato¹¹⁾ 등의 방법으로 측정하였다. 즉 1 mM NaNO₂ 용액 1 ml에 일정농도의 시료를 첨가하고 여기에 0.1 N HCl(pH 1.2)과 0.2 M citric acid buffer(pH 3.0, 4.2, 6.0)을 사용하여 반응 용액의 pH를 각각 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0으로 조정한다. 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응용액 1 ml에 2% acetic acid 5 ml를 첨가한 후 Griess 시약 0.4 ml를 가하여 잘 혼합시킨 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 520 nm에서 비색 정량하여 아질산염 소거율을 계산하였다.

결과 및 고찰

항산화 활성 assay. 상황버섯 각 추출방법별 DPPH free radical scavenging 활성을 측정한 결과 최종적으로 열수로 처리한 것보다 ethanol로 처리한 것이 높게 나타났으며, ethanol, 열수 후 ethanol, ethanol 후 ethanol, 그리고 열수 후 열수 순으로 높게 나타났다(Table 1).

Table 1. Antioxidative activity of *Phellinus linteus* extracts according to different extraction conditions

Extraction condition	Extraction efficiency (mg/ml)	DPPH ^a
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	7.67	17.14
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	1.41	21.37
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	6.05	17.79
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	1.86	70.36
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	0.67	25.27
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	0.37	43.32

^aDPPH used for testing free radical scavenging activity (IC₅₀: µg/ml)

Ethanol, 그리고 열수 후 ethanol은 Table 1과 같이 각각 17.14, 18.15 µg/ml로 매우 높은 항산화 활성을 나타내었다. 특히 열수 후 열수는 비교적 높은 활성을 나타내었고, 열수와 반대의 결과를 나타내었다. 추출방법 중에서 활성이 높게 나타났던 ethanol 추출물의 회수율도 높아 항산화제로의 이용가능성 측면에서도 매우 좋을 것으로 생각된다. DPPH free radical scavenging 법은 항산화제가 안정한 free radical DPPH와 재반응하고, 다시 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazine^{12,13)}로 변환되는 정도를 조사하는 방법으로 많은 식물 추출물들의 항산화 활성을 bioassay-guided fractionation 시에 이용되어진다.

Lee¹⁴⁾가 700종의 식물추출물로부터 항산화 활성을 조사했을 시 IC₅₀ 값이 200 µg/ml 이하에서 80% 이상 억제하는 것을 활성이 있는 것으로 구분하여 그 중 102종이 항산화 활성이 높았다는 보고로 미루어 보면 상황버섯 추출물의 IC₅₀ 값은 ethanol의 경우는 21.37 µg/ml 이하 범위로 DPPH free radical scavenging activity는 매우 높은 것으로 평가되었고, 열수의 경우는 25.27에서 70.36 µg/ml로 나타났다.

Ames test에 의한 항돌연변이 효과. *S. typhimurium* TA98과 TA100을 이용한 Ames test를 행한 결과 음성대조군의 복귀 돌연변이 집락수는 TA98이 38±5, TA100은 193±8이었고, 각 추출물을 첨가하여 실험한 결과 집락수가 음성대조군에 비하여 농도의존성을 나타내지 않으므로 이 상황버섯 추출물은 돌연변이원성 및 독성을 나타내지 않은 것으로 판단되었다.

TA100 균주에 대하여 양성변이원 물질로 세포내의 DNA에 직접적으로 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 직접변이원 물질인 MNNG(0.4 µg/plate)와 4NQO(0.15 µg/plate)에 대한 돌연변이 억제효과를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 2가지 변이원 물질에 대한 억제율은 추출농도에 따라 증가함을 보여주었고, ethanol 분획물이 열수 분획물보다 상대적으로 높은 억제율을 보였다. MNNG에 대해서는 ethanol 추출 시 70.7%로 가장 높은 억제율을 보였고, 열수 후 ethanol 추출도 50% 이상의 억제율을 보였다. 4NQO에 대해서는 ethanol 추출 62.9%, 열수 후 ethanol 추출이 52.9로 50% 이상의 억제율을 나타내었다.

체내 간조직에서 대사과정을 거친 후 변이성을 나타내므로 *in vitro* 조건에서 변이원의 활성화를 위해 S-9 mix를 필요로 하는 간접변이원물질인 B(α)P(10 µg/plate)에 대한 항돌연변이 효과는 Table 3과 같다. B(α)P에 대해 TA98과 TA100 두 균주 모두 ethanol 추출물이 가장 높은 억제율을 보였고, TA98 균주는 ethanol 추출 시 61.5% 그리고 열수 후 ethanol 추출물

Table 2. Antimutagenic effect of extracts of *Phellinus linteus* against mutagens on *Salmonella typhimurium* TA100

Extraction condition	Extraction efficiency (mg/ml)	Dose (µg/plate)	Inhibition ratio (%)	
			MNNG ^a	4NQO ^b
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	7.67	383.5	70.7	62.9
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	1.41	70.5	43.4	35.1
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	6.05	302.5	60.9	52.9
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	1.86	93.0	40.7	33.9
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	0.67	33.5	23.2	20.4
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	0.37	18.5	14.6	6.2

^aDose of MNNG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) is 0.4 µg/plate.

^bDose of 4NQO(4-nitroquinoline-1-oxide) is 0.15 µg/plate.

Table 3. Antimutagenic effect of extracts of *Phellinus linteus* against B(α)P (10 µg/plate) on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Extraction condition	Extraction efficiency (mg/ml)	Dose (µg/plate)	Inhibition ratio (%)	
			TA98	TA100
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	7.67	383.5	61.5	54.2
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	1.41	70.5	45.0	29.7
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	6.05	302.5	60.9	50.4
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	1.86	93.0	40.0	30.4
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	0.67	33.5	28.9	13.2
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	0.37	18.5	26.3	-

Table 4. Growth inhibitory effect on the human cancer cell of *Phellinus linteus* extracts from different extraction methods

Extraction condition	Extraction efficiency (mg/ml)	Dose (mg/ml)	Growth inhibition (%)	
			HT-29	HepG2
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	7.67	383.5	55	25
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	1.41	70.5	15	10
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	6.05	302.5	54	25
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	1.86	93.0	10	8
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	0.67	33.5	-	-
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	0.37	18.5	-	-

이 60.92%의 항돌연변이 효과를 나타내었고, TA100 균주에서는 ethanol 및 열수 후 ethanol 추출물이 50% 이상의 억제율을 보였다. 간접돌연변이원도 농도가 증가함에 따라 억제효과가 높았으며, 열수추출의 경우 상대적으로 낮은 억제효과를 보였다. 이 결과는 지¹⁶⁾ 등이 물에 의하여 추출한 분획물이 ethanol 추출한 분획물에 비하여 상대적으로 효능이 떨어진다고 보고한 것과 같이 열수 추출물이 상대적으로 ethanol 추출물보다 낮은 항돌연변이 효과를 나타내었다.

상황버섯 추출물의 암세포 증식 억제 효과. MTT 검색법은 96-well plate를 사용하며 검사결과를 ELISA reader(Multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 sulforhodaminB(SRB) 검색법과 더불어 널리 사용되고 있는 assay 중의 한 방법이다. 암세포의 경우 대사과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 되며, 이는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것이다.¹⁵⁾

암의 다단계적인 진행과정에서 암유발 개시단계에서 돌연변이가 매우 중요한 작용을 하며 대부분의 발암물질이 돌연변이 원이라는 점에서 항돌연변이원성을 나타내는 물질이 항암 활성을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 각 추출물들이 직, 간접 발암물질에 대하여 강한 항돌연변이 효과를 나타냈으므로, 암세포 증식 억제 효과의 *in vitro* 검색 방법 중의 하나인 MTT assay를 이용하여 생존 암세포의 효소 활성을 측정하였다. 상황버섯 추출물에 의한 암세포 성장 억제효과는 Table 4에 나타내었다. 각 추출물들이 사람의 결장암 세포인 HT-29와 간암세포인 HepG2에 대한 억제율은 추출농도에 따라 증가함을 보여주었고, ethanol 분획물이 열수 분획물보다 상대적으로 높은 억제율을 보였다. HT-29 세포에 대해서는 ethanol 추출 시 55%로 가장 높은 억제율을 보였고, 열수 후 ethanol 추출도 50% 이상

의 억제율을 보였다. 간암세포 HepG2의 경우 ethanol 추출, 열수 후 ethanol 추출이 25%로 결장암 세포인 HT-29에 비해 낮은 활성을 나타내었다. 반면 각 추출물을 일정한 농도 0.5 mg/ml로 투여 시 HT-29 세포에 대해서는 ethanol 추출 59%, 열수 추출 54%, 열수 후 ethanol 추출 57%로 50% 이상의 억제율을 나타내었고, 특히 ethanol 추출과 열수 후 ethanol 추출에서는 0.25 mg/ml 농도에서 50% 이상의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. 그리고 간암세포 HepG2의 경우 ethanol 추출이 30%로 결장암 세포인 HT-29에 비해 비교적 낮은 활성을 나타내었다(Table 5). 이는 Ham 등이 보고한 상황버섯 추출물의 세포독

Table 5. Growth inhibitory effect of extracts of *Phellinus linteus* on the human cancer cell

Extraction condition	Dose (mg/ml)	Growth inhibition (%)	
		HT-29	HepG2
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	0.50	59	30
	0.25	53	19
	0.10	25	15
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	0.50	26	22
	0.25	25	17
	0.10	23	11
Ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	0.50	57	29
	0.25	54	24
	0.10	42	-
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	0.50	54	27
	0.25	37	15
	0.10	8	8
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after water (100°C, 4 hr, 20 g/l)	0.50	31	10
	0.25	30	8
	0.10	-	-
Water (100°C, 4 hr, 20 g/l) after ethanol (80°C, 4 hr, 50 g/l)	0.50	21	7
	0.25	10	3
	0.10	-	-

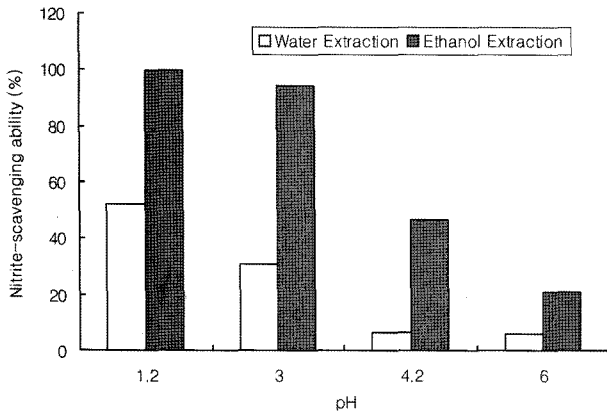


Fig 1. Nitrite-scavenging ability of *Phellinus linteus* extracts.

성효과에서 암세포 억제능이 유사한 효과를 나타내었고,¹⁷⁾ *Phellinus linteus*의 자질체 열수추출물은 소화기계통의 암에 저지효과가 있는 것으로 보고되었다. 그 외에도 상황버섯에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며 균사체 배양 추출물로부터 면역활성 및 항암활성도 입증되었다.¹⁸⁾

아질산염 소거능. Fig. 1는 상황버섯의 열수와 ethanol의 추출조건에 따른 아질산염 소거능을 알아보기 위해 열수와 ethanol로 처리하였을 때 열수 및 ethanol 추출물 모두에서 아질산염 소거능이 나타났으며, 열수추출물에 비해 ethanol 추출물이 2배 이상 높게 나타났다. 특히 pH 3.0에서 열수추출물과 용매추출물의 아질산염소거능이 각각 30.86과 94.16%인 것이, pH 4.2에서는 6.67과 46.42%로 급속히 감소하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합해보면 다양한 추출조건에서 추출한 상황버섯의 기능성 물질 함량과 기능성과의 상관관계를 비교했을 때 열수추출물에 비하여 ethanol 추출물이 상대적으로 추출물의 함량과 기능성 모두 우수함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 경상북도/안동시 바이오산업기술개발사업의 연구비 지원에 의한 것임으로 이에 감사드립니다.

초 록

상황버섯에 대한 다양한 추출방법별 항산화 활성과 항돌연변이성, 세포독성 등의 생물학적 활성을 *S. typhimurium*과 인체암 세포주들을 이용하여 측정하였다. DPPH free radical scavenging 활성을 통한 항산화 효과를 조사한 결과 열수로 추출한 것보다 ethanol로 처리한 것이 높게 나타났으며, ethanol 추출과 열수 후 ethanol 추출 시 각각 17.14, 17.79 µg/ml로 매우 높은 항산화 활성을 나타내었다. *S. typhimurium* TA98과 TA100을 이용한 Ames test에서는 직접변이원 물질인 MNNG와 4NQO에 대한 돌연변이 억제효과를 조사한 결과는 2가지 변이원 물질에 대한 억제율은 추출물의 농도와 양이 증가함에 따라 비례적으로 증가함을 보여주었고, MNNG에 대해서는 ethanol 추출물이 70.7%로 가장 높은 억제율을 보였고, 열수후

ethanol 추출 시에도 50% 이상의 억제율을 보였다. 4NQO에 대해서는 ethanol 추출물이 62.9%, 열수후 ethanol 추출물이 52.9%로 50% 이상의 억제율을 나타내었다. 간접변이원 물질인 B(α)P에 대한 항돌연변이 효과는 TA98과 TA100 두 균주 모두 ethanol 추출물이 가장 높은 억제율을 보였다. 즉 TA98 균주는 ethanol 추출물 61.5%, 열수후 ethanol 추출물이 50% 이상의 항돌연변이 효과를 나타내었으며, TA100 균주에서는 ethanol 추출물과 열수 후 ethanol 추출물이 50% 이상의 억제율을 보였다. 상황버섯 추출물에 의한 암세포 성장 억제효과를 사람의 결장암 세포인 HT-29와 간암세포인 HepG2에 미치는 영향으로 검토한 결과 각 추출물들이 추출농도에 따라 증가함을 보여주었고, ethanol 분획물이 열수 분획물보다 상대적으로 높은 억제율을 보였다. 반면 시료 0.5 mg/ml 투여 시 HT-29 세포에 대해서 ethanol 추출물 59%, 열수 추출물 54%, 열수후 ethanol 추출물 57%로 50% 이상의 억제율을 나타내었고, 특히 ethanol 추출물과 열수 후 ethanol 추출물에서는 0.25 mg/ml 농도에서 50% 이상의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. 그리고 간암세포 HepG2의 경우 ethanol 추출물이 30%로 결장암 세포인 HT-29에 비해 비교적 낮은 활성을 나타내었다. Ethanol 추출물과 열수추출물은 다양한 pH 조건에서 아질산염 소거능을 보여주었으며, 대체로 ethanol 추출물이 열수추출물 보다 높은 효과를 보여주었다.

Key words: *Phellinus linteus*, DPPH, Ames test, 항돌연변이 효과, 세포독성효과

참고문헌

- Rhew, T. H. (1985) Food, nutrition and cancer. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **14**, 305-313.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970) Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**, 2776-2781.
- Sung, J. M., Ryu, Y. B. and Cha, D. R. (1998) *Mushrooms*. Gyohak press, Seoul. pp. 593.
- Choi, J. H., Ha, T. H. and Rho, Y. D. (1996) Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* **24**, 214-222.
- Chang, S. T., John, A. B. and Chiu, S. W. (1993) In *mushroom biology and mushroom products*. World scientific, Washington, D.C. pp. 1-20.
- Song, H. N. and Oh, S. W. (2002) Optimization of extraction and clarification condition for preparation of liquid extract Tea from artificially cultivated *Phellinus linteus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 636-641.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1202.
- Seo, K. S., Lim, J. K., Park, J. H., Kim, C. H., Chung, G. Y. and Jeong H. J. (2003) Antioxidant activity and biological properties in extracts of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Kor. J. Life Sci.* **13**, 1-8.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for

- the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* **113**, 173-215.
10. Green, L. M., Reade, J. L. and Ware, C. F. (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods.* **70**, 257.
 11. Kato, H., Lee, I. E., Chuyen, N. V., Kim, S. B. and Hayase, F. (1987) Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1333.
 12. Cotelle, S., Bernier, J. L., Catteau, J. P., Wallet, J. C. and Gaydou, E. M. (1996) Antioxidant properties of hydroxyflavones. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 35-43.
 13. Smith, R. C., Reeves, J. C., Dage, R. C. and Schnettler, R. A. (1987) Antioxidant properties of 2-imidazolones and 2-imidazolthiones. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 1457-1460.
 14. Lee, S. K. (1997) Evaluation of cancer chemo-preventive activity mediated by antioxidants and modulators of tumor promotion. PhD thesis. University of Illinois at Chicago. pp. 52-54.
 15. Park, J. G., Kramer, B. S., Steinber, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazar, A. F. (1987) Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**, 5875-5879.
 16. Ji, J. H., Kim, M. N., Chung, C. K. and Ham, S. S. (2000) Antigenotoxic effects of *Phellinus linteus* and *Agaricus blazei* Murill extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 513-517.
 17. Ji, J. H., Kim, M. N., Chung, C. K. and Ham, S. S. (2000) Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 322-328.
 18. Kang, C. Y., Shin, M. J., Choi, E. C., Lee, Y. N. and Kim, B. K. (1981) Studies on antineoplastic components of Korean basidiomycetes. Mycelial culture and an antineoplastic component of *Ganoderma lucidum*. *J. Kor. Biochem.* **14**, 101-112.