

Hericium erinaceum 균사체와 자실체 열수 추출물의 몇몇 *In-Vitro* 및 *In-Vivo* 생물활성

¹정재현 · ²이광호 · †이신영

† 강원대학교 생물공학과, ¹충주대학교 식품공학과, ²건국대학교 생명과학부 생명공학과
(접수 : 2006. 7. 12., 게재승인 : 2007. 1. 12.)

Some *In-Vitro* and *In-Vivo* Biological Activities of Hot Water Extracts from Fruit Body and Cultured Mycelium of *Hericium erinaceum*

Jae-Hyun Jung¹, Kwang-Ho Lee², and Shin-Young Lee†

† Department of Biotechnology and Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Chungju National University, Chungju 380-702, Korea

²Department of Biotechnology, Faculty of Life Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

(Received : 2006. 7. 12., Accepted : 2007. 1. 12.)

The water-soluble materials extracted from fruit bodies and mycelium of *H. erinaceum* were prepared. *In-vitro* anticancer activities on cancer cells and *In-vivo* proliferation effect on mouse peritoneal exudate cell and spleen cell of samples were investigated. Also, nitric oxide (NO) generation of peritoneal exudate cell, IL-2 production capacity of spleen cells and phagocytic activity of peritoneal macrophages were examined. The water extracts of *H. erinaceum* suppressed the proliferation of cancer cell (HeLa, Raw264.7, Jurkat, KATO3, EL4, LyD9) with concentration-dependent. The water extract from fruit body showed better suppression effect than that from mycelium in most of cancer cells used. The anticancer effect of water extract of fruits body in the range of 0.01 and 10 mg/ml for Raw 264.7 and EL4 cell lines were the same as the Taxol with one thousandth equivalent of fruit body concentration. Water extracts of fruit body and liquid-cultured products of *H. erinaceum* induced nitric oxide (NO) generation of peritoneal exudate cell and increased NO generation by stimulus of lipopolysaccharide. Water extracts alone did not induce the proliferation and IL-2 production capacity of spleen cells. However, spleen's proliferation and IL-2 production were induced significantly by the addition of lipopolysaccharide and Con A (concanavalin A) or Con A alone, and the effectiveness of mycelium extract with water were more active than those from fruit body.

Key Words : *Hericium erinaceum*, mycelium, fruitbody, hot water extract, biological activity

서 론

산업적으로 매우 주목되고 있는 기능성 버섯의 하나인 노루궁뎅이 버섯 (*H. erinaceum*)에는 약리활성 성분으로 Hella cell 증식저해물질, 신경성장인자 (nerve growth factor: NGF) 합성유도촉진 물질, 면역기능조절 성분 (BRM 효과), 항종양 다당류, lectin, 식이섬유 (β -glucan, chitin질, hetero

다당) 등이 있으며, 이들에 의해 대응하는 각종의 생리활성이 보고되고 있다(1-5).

특히, *H. erinaceum* 자실체의 복합 다당류 (heteropolysaccharides)는 면역기능 조절에 기초한 항암작용 (위암, 식암, 간장암, 피부암 등)이 알려지고 있는데, Yang과 Jong(6)은 *H. erinaceum*의 면역체계 강화에 의한 위, 십이지장 궤양 및 위암, 식도암에의 치료효과를 보고한 바 있고, Ahn(7)도 항암 및 면역기능을 촉진시킴을 보고한 바 있다. 또 이러한 약효와 더불어 각종 식품기능 및 안전성도 확인되어 점차 각종 기능성 식품 소재 및 nutraceuticals로서의 잠재적 가능성이 매우 높은 것으로 인식되었다. 예로서 제11회 아시안게임(1990)에 채용되어 중국선수들의 활력의 원동력이 된 스포츠 드링크 Houtou가 *H. erinaceum*에 의한

† Corresponding Author : Department of Biotechnology and Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Tel : +82-33-250-6273, Fax : +82-33-243-6350

E-mail : sylee@kangwon.ac.kr

것임은 이미 잘 알려져 있는 사실이다.

지금까지 air-lift fermenter를 이용한 버섯의 액체배양 연구로 Song and Cho(8)는 표고 (*Lentinus. edodes*)의 균사체 배양에서 새로운 합성배지로부터 균체의 수율을 플라스크 배양시보다 5배나 증가시켰음을 보고하였다. 또 air-lift fermenter의 사용은 표고버섯 균사체의 pilot scale 생산이나 (9) 영지 (*Ganoderma lucidum*)의 항암세포외 다당류 생산에도 활용되었으나(10) *H. erinaceum*에 대해서는 보고된 바 없었다.

그러므로 저자 등은 그동안 체계적으로 연구된 바 없는 air-lift fermenter에 의한 *H. erinaceum*의 액체배양 공정을 확립하여 보고한 바 있다(11, 12). 본 연구에서는 각종 약리효과를 나타내는 *H. erinaceum*의 기능성 제품화 연구의 일환으로, air-lift fermenter를 이용한 액체배양에 의한 균사체를 시료로 이의 mouse 복강 및 비장세포 증식에의 영향, 탐식능, NO 및 IL-2 생산능, 골수세포 증식 및 암세포주 증식의 억제 효과 등 몇몇 생물활성을 자실체와 비교, 조사함으로써 *H. erinaceum* 액체배양 균사체의 특성과 생물활성을 평가, 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

생리활성의 측정에 사용한 재료는 *H. erinaceum*의 자실체 및 액체배양 생성물(균사체와 배양여액)이었다. 자실체는 상법에 따라 고체배양하고 동결건조 후 건조자실체 시료로 하였다.

한편, 전보의 최적화 배지(11) 50 ml를 함유한 250 mL 플라스크를 사용하여 PDA (potato dextrose agar) 평판배지에서 생육한 직경 5 mm의 mycelium disk 4~5개를 넣고, 온도 25°C, 진탕속도 100 rpm으로 10일간 진탕배양하여 전 배양하였다. 이를 자체 제작한 3 L 용량의 air-lift fermenter에 10%로 접종하여 온도 23°C, 통기속도 2.5 vvm으로 4일간 본 배양하였다(11, 12). 배양액을 원심분리 (8000 rpm, 15 min.)하고, 얻어진 침전물과 여액을 동결건조하였으며, 각각 건조 균사체 및 배양여액 시료로 하였다.

시료의 조제

시료는 각각 다음과 같이 처리하여 시료로 하였다. 즉, 자실체는 3배량의 물 (또는 75% ethanol)로 100°C의 수욕조에서 환류냉각하면서 3회 추출한 후 여과하고 잔사는 그대로, 여액은 감압 농축 (Brix 12°)하여 건조한 다음 시료로 하였다.

균사체 역시 자실체와 마찬가지로 3배량의 물로 수욕조에서 환류냉각하면서 3회 추출한 후 여과하고 여액을 감압 농축 (Brix 12°)하여 건조한 다음 균사체 추출물 시료로 하였으며, 여액에 ethanol을 첨가한 후 얻어진 침전물 [Mycelium/Et-OH(P)]도 시료로 하였다.

배양 여액의 경우는 그대로 (culture broth) 또는 배양 여액에 2배량의 ethanol을 첨가하고 원심분리한 다음 얻어진 침전물 [Broth/Et-OH(P)]과 상정액 [Broth/Et-OH(S)]을 각각

시료로 하였다.

복강 및 비장 세포 증식의 측정

① 실험동물: 본 실험의 동물은 6주령의 수컷 C57BL/6 계 mouse (대한실험동물센터)를 사용하였다. 온도 20 ± 4°C, 명암주기 12시간 단위로 조절하여 유지하였으며, 실험전 일주일 이상 동일한 실험조건하에서 사육하여 동물실 환경에 적응시켰다.

② 복강세포 증식: 시료 (5 mg/ml)를 실험동물의 복강 주사하고 3일 후 mouse 복강 세포를 채취하여 계수한 다음, 2×10^4 cells/well로 접종하여 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol을 함유한 RPMI 1640 완전배지 (Gibco)에서 37°C, 5% CO₂ 하에서 44시간 배양하였다. 세포 증식은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]를 첨가하여 4시간 배양 후 약 15분간 실온에서 shaking한 후 96 well plate용 ELISA (enzyme linked immunosorbant analyzer) reader로 550 nm에서의 흡광도를 측정하여 조사하였다(13). 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례한다.

③ 비장세포 증식: 비장세포의 경우는 0.83%의 Tris-NH₄Cl로 용혈 처리한 후 세포수를 계수하였으며, 이하 복강세포와 마찬가지로 방법으로 배양하여 조사하였다.

암세포 증식억제 실험

암세포 증식 억제 시험은 각 암 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 복강세포와 마찬가지로 방법으로 실시하였다. 암세포 억제를 위한 실험에 사용한 암세포주는 HeLa (human cervix epitheloid carcinoma; 인간 자궁 상피암세포), Raw 264.7 (mouse monocyte macrophage; 생쥐 단핵 대식세포), Jurkat (human acute T cell leukemia, 인간 급성 T 백혈병 세포), KATO3 (human gastric carcinoma 인간 위장 암세포), EL4 (mouse T lymphoma 생쥐 T 림프종 세포), LyD9 (mouse bone marrow pluripotent stem cell; 생쥐 공수유래 간세포) 등을 사용하였다.

NO (nitric oxide)의 측정

Mouse 복강세포의 NO 생산능은 Griess assay에 의해 배양액 내로 유리되는 nitrite (NO₂) 수준을 측정하였다(14). 즉, 복강 세포를 2×10^4 cell/wells로 하여 세포배양판 (96 well plate)에 가하고 LPS (lipopolysaccharide, *E. coli* 0111:B4, Sigma, USA) 또는 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 16~20시간 배양하였다. 무세포 배양액을 취하여 Griess 시약 (N-1 naphthyl ethylene diamine dehydrochloride 0.1% in H₂O, sulphonilamide 1% in 5% H₃PO₄, sigma, USA)을 넣고 실온에서 10분간 incubation한 후 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

IL-2 (interleukin-2) 생산능의 측정

Monoclonal antibody (MAbs)를 coating buffer (0.1 M NaHCO₃ buffer, pH 9.5)를 이용하여 1 : 250으로 희석하고

well에 분주한 다음 뚜껑을 닫고 하룻밤 방치하였다. 다음 날 well을 wash buffer (0.5 ml tween 20를 1 L PBS에 가하여 1 L로 한 용액)로 세척하였다. Assay diluent (bovine serum abumin 1 g을 PBS에 녹여 1 L로 한 용액)를 넣은 후에 실온에서 1시간 방치한 다음, 시료를 각 well에 100 μ l씩 넣고 실온에서 2시간 방치하였다. 5회 washing한 후 TMB (tetramethyl benzidine) 기질용액을 넣고 뚜껑을 닫지 않는 상태에서 30분간 암실에서 방치하였으며, 반응정지 용액을 넣고 ELISA reader로 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 IL-2의 생산능을 측정하였다.

골수세포의 증식 측정

골수 stroma 세포주인 S10과 골수 세포를 공 배양한 후 골수세포를 PI (propidium iodide) staining하여 FACscan으로 측정하였다.

분석자료의 취합은 모든 세포에 대한 forward scatter (FSC), side scatter (SSC) 및 fluorescence 1 (FL1)을 취합하고 FSC, SSC dual parameter dot plot 상에서 분석할 세포에 대하여 gating한 다음 FL1 plot에서 전체 세포에 대한 살아 있는 세포의 비율을 산출하였다.

복강세포의 탐식능 측정

15 ml 멸균 원심관에 희석 microbead 1.5 ml와 복강세포 현탁액 ($5 \times 10^6/ml$) 0.4 ml을 혼합시켰다. 진탕하면서 4시간 배양하고, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 후 빙냉 PBS로 세포를 세척한 다음, 2.5% formaldehyde/phosphate buffered saline 50 ml로 현탁하였다. 20분간 얼음에 방치한 후 FACscan (fluorescence-activated cell sorter: Becton Dikson Co., NJ, USA)로 분석하였다.

결과 및 고찰

암세포주의 증식에 미치는 영향

지금까지 많은 버섯의 자실체, 균사체 및 배지의 생성물은 Sarcoma 180/mice, ip 또는 po법에 의해 탐색한 결과, 현저한 항종양 활성을 나타내며, 이의 활성 성분으로 β -glucan, hetero glycan, 당단백, 핵산 등의 고분자 성분이 보고되고 있다(15).

균상재배 (병재배)된 *H. erinaceum* 자실체 열수 (100 $^{\circ}$ C) 추출물의 건조 분말은 경구투여에 의해 생체내의 독성이 전무한 것으로 밝혀졌는데, 강한 항종양 활성과 매우 양호한 연명 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(16). 이 활성의 주성분으로서 IR, NMR 해석에 의해서 glucoxytan, xylan, hetero xyloglucan, glucoxytan-단백질 복합체 및 galactoxyloglucan-단백질 복합체 등이 확인되었다(16).

하지만 균사체에 대해서는 자실체에 비해 별로 보고된 바가 없고, 또 이들을 비교 조사한 연구도 거의 없다. 따라서 본 실험에서는 각종 암세포주를 사용하여 자실체 및 균사체 열수 추출물의 암세포주 증식에 미치는 영향을 비교, 조사하였다.

HeLa 세포의 증식억제 효과

Fig. 1은 *H. erinaceum*의 균사체 추출물이 사람의 자궁상피암세포의 증식에 미치는 효과를 *H. erinaceum*의 자실체 추출물과 비교, 조사한 결과이다.

시료를 ml당 0.04~5mg 첨가하여 MTT법을 이용하여 측정하였으며, 세포의 증식정도는 Abs₅₅₀/well로 나타내었다. 자실체 및 균사체 추출물 시료 모두 농도 의존적으로 HeLa 세포의 증식을 억제하였다. 자실체 추출물은 균사체 추출물보다 세포 증식을 억제하는 효과가 컸으며, 0.04 mg/ml의 농도에서도 증식 억제 효과를 보였다.

Mizuno 등(1)은 HeLa cell을 이용하여 *H. erinaceum* 자실체의 열수추출물 (HE)에 대해 HeLa-229 종양세포 증식 억제작용을 검색한 결과, 활성은 나타나지 않았다고 하였다. 그러나 자실체의 ethanol 혹은 acetone에 의해 얻어진 추출물로부터 용매분획과 각종 chromatography법으로 얻은 지방 성분인 Y-A-2, hericenone A 및 B는 강한 활성을 나타내며, 균사체로부터는 HeLa cell에 대한 독성을 지표로 할 때, 시료 중 활성이 가장 강한 erinapyrones A와 B를 얻었음을 보고한 바 있다.

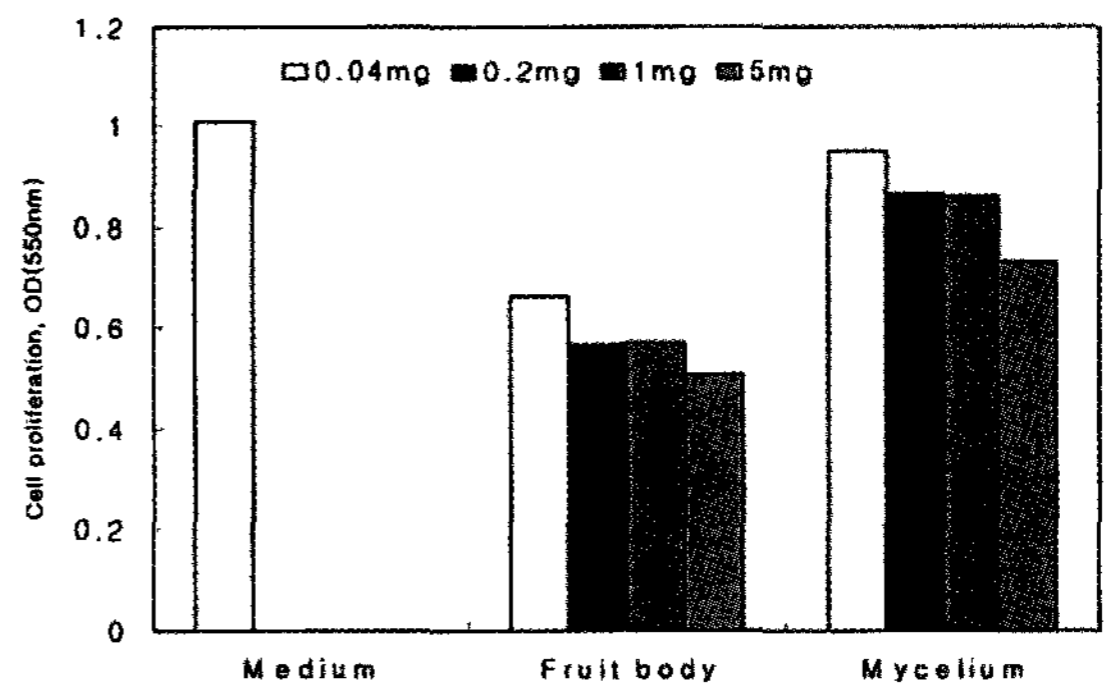


Figure 1. Inhibition effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on proliferation of HeLa cell (Hela cells ($2 \times 10^5/ml$) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

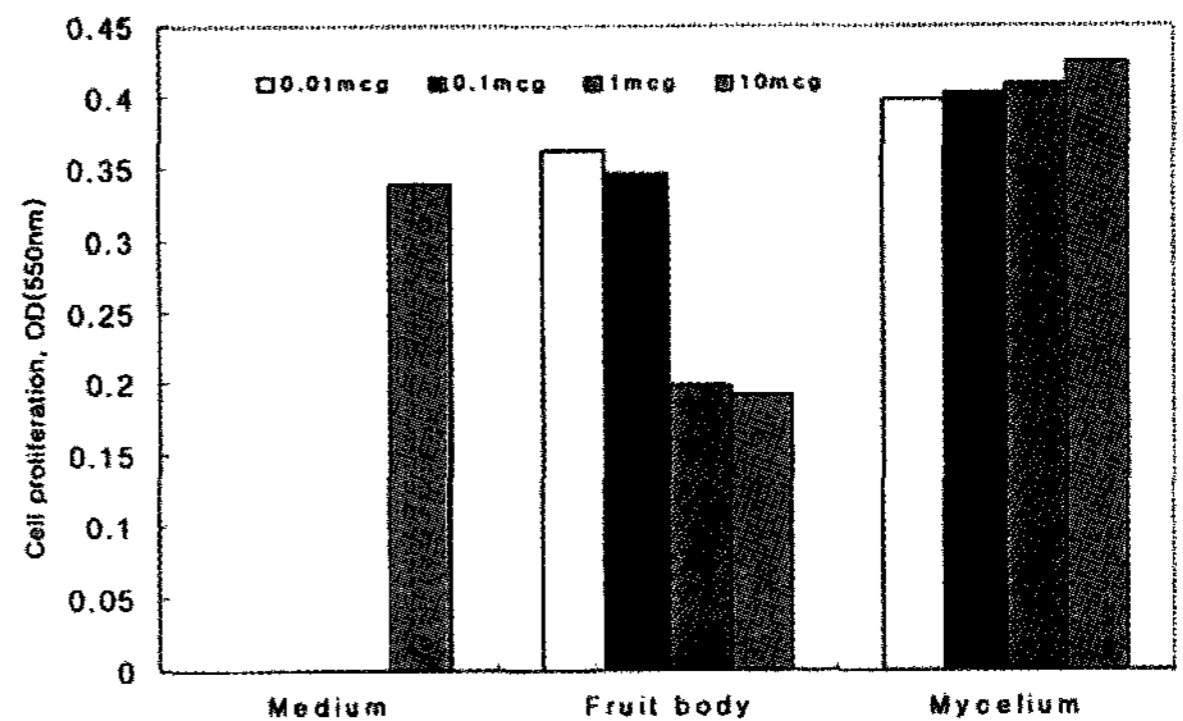


Figure 2. Inhibition effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on proliferation of KATO3 cell (KATO3 cells ($2 \times 10^5/ml$) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

KATO3 세포의 증식억제 효과

Fig. 2는 *H. erinaceum*의 자실체와 균사체의 열수 추출물

이 사람의 위장 암세포인 KATO3 세포의 증식에 미치는 효과를 조사한 결과로서 역시 MTT법(13)에 의해 세포의 증식정도를 Abs₅₅₀/well로 나타낸 것이다.

자실체의 열수 추출물은 0.01 mg/ml 농도에서부터 농도의존적으로 증식 억제효과를 보였으나 균사체 열수 추출물의 증식 억제효과는 관찰되지 않았다. 또 Fig. 3에서 보는 바와 같이, 자실체를 75% 에탄올로 추출하여 추출된 상정액을 동결건조한 시료 (supernatant: SUP)나 자실체의 에탄올 추출 잔사 (residue: RES) 시료도 증식억제 효과를 보였으나 자실체의 열수 추출물보다는 매우 낮아서 자실체의 열수 추출물에서 가장 높은 억제 효과가 나타났다.

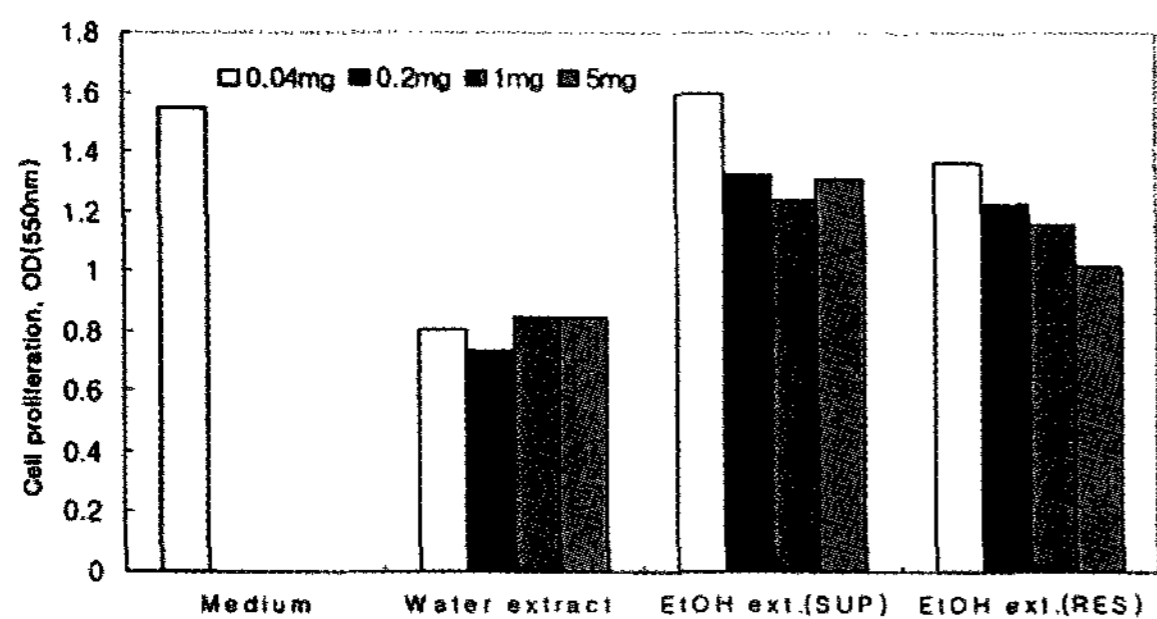


Figure 3. Comparison of inhibition effect of water and ethanol extracts from fruit body of *Hericium erinaceum* on proliferation of KATO3 cell (KATO3 cells (2×10^5 /ml) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

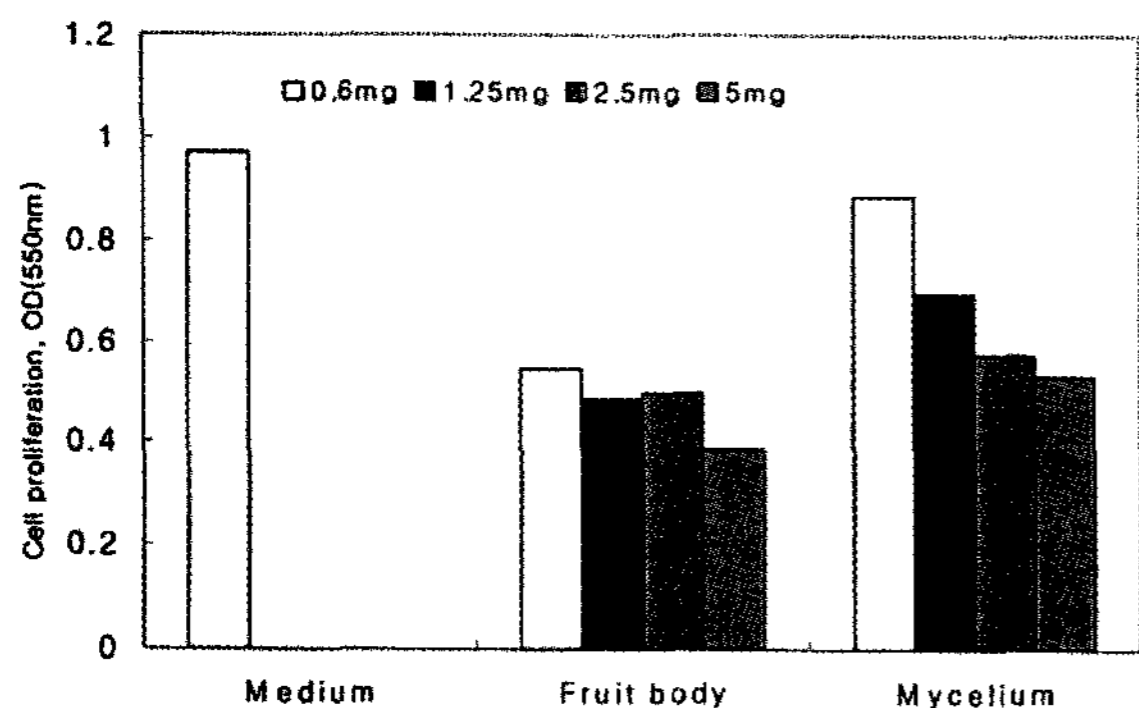


Figure 4. Inhibition effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on proliferation of Raw 264.7 cell (Raw 264.7 cells (2×10^5 /ml) were co-cultured with indicate amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

Raw 264.7 세포의 증식억제 효과

Fig. 4는 자실체 및 균사체 열수 추출물의 생쥐 단핵 대식세포 (Raw 264.7)의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과이다.

두 시료 모두 실험농도 범위 (0.6~5 mg/ml)에서 농도의존적으로 증식억제효과를 보였으며, 자실체 열수 추출물의 효과가 크게 나타났다. 또 Fig. 5에서 보는 바와 같이, 자실체 추출물 (0.01~10 mg/ml)의 효과는 자실체 사용량

의 1/1000에 해당하는 양의 항암제 (Taxol)의 효과와 비슷하였다.

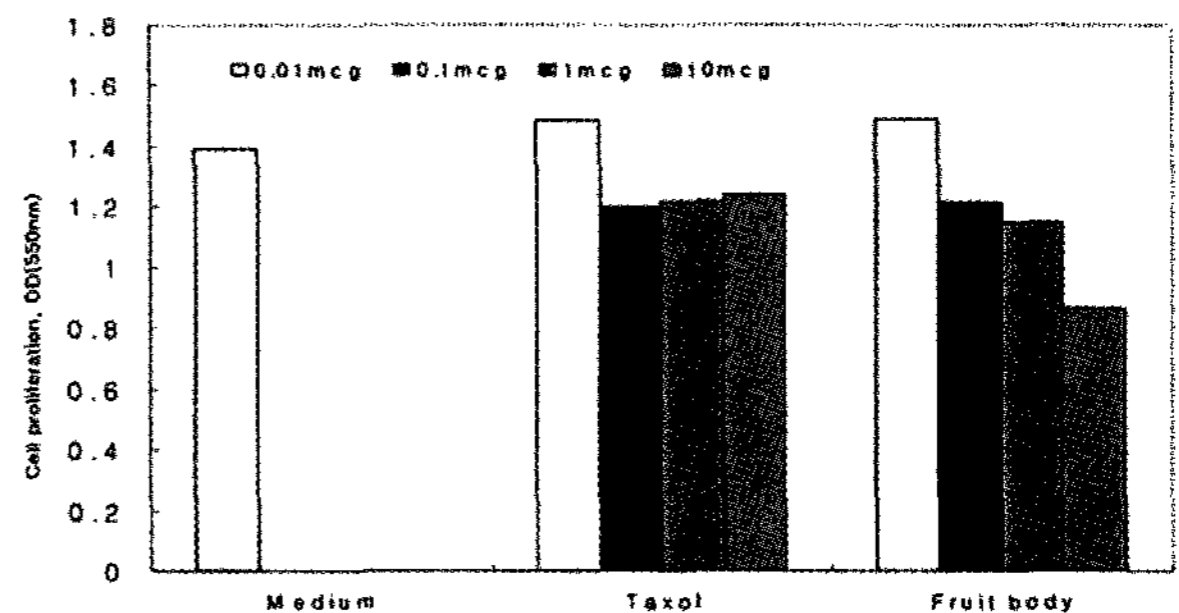


Figure 5. Comparison of inhibition effect of Taxol and water extract from fruit body of *Hericium erinaceum* on proliferation of Raw 264.7 cell (Raw 264.7 cells (2×10^5 /ml) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

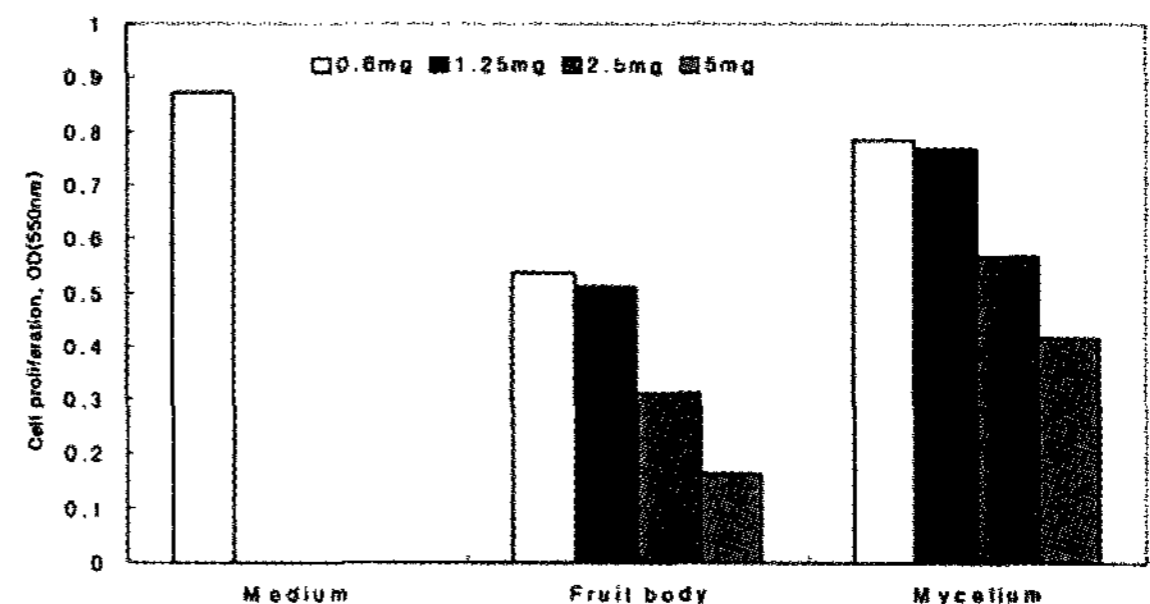


Figure 6. Inhibition effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on proliferation of EL4 cell (EL4 cells (2×10^5 /ml) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

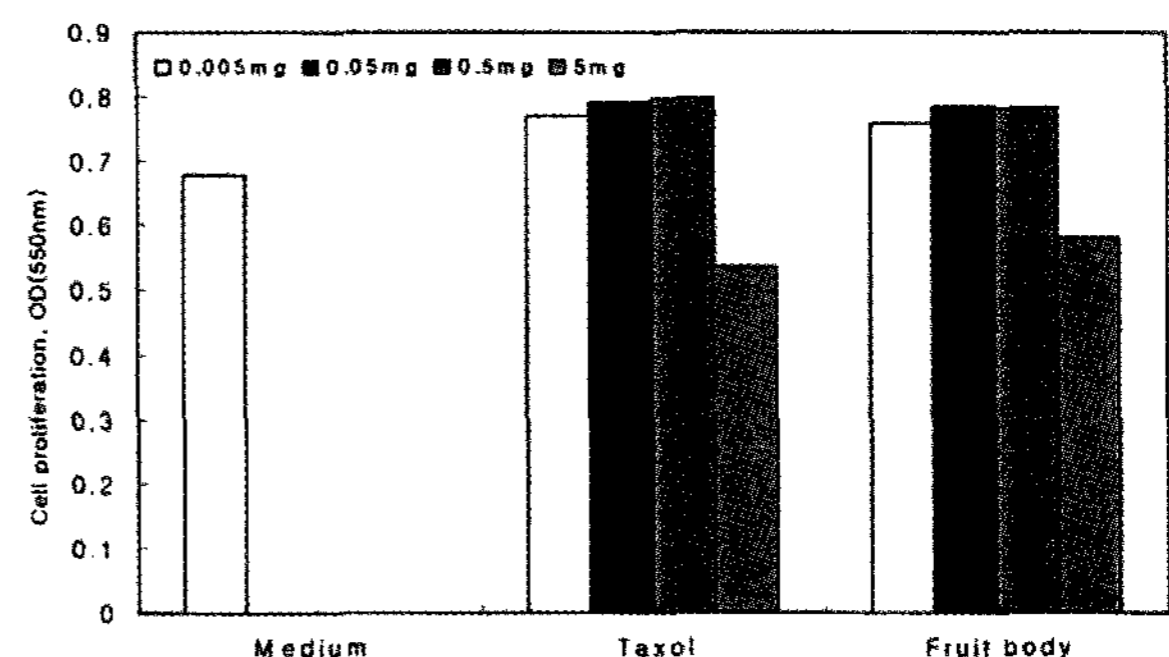


Figure 7. Comparison of inhibition effect of Taxol and water extracts from fruit body of *Hericium erinaceum* on proliferation of EL4 cell (EL4 cells (2×10^5 /ml) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

EL4 세포의 증식억제 효과

Fig. 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 생쥐 T 림프종 세포인 EL4 세포에 대해서도 *H. erinaceum* 자실체 및 균사체의 열

수 추출물은 농도 의존적으로 증식억제 효과를 보였으며, 자실체가 균사체의 경우보다 높은 억제 효과를 보였다. 또 자실체 추출물의 세포증식 억제효과는 자실체 양의 1/1000 상당량의 Taxol과 비교할 때 서로 비슷하였다(Fig. 7)

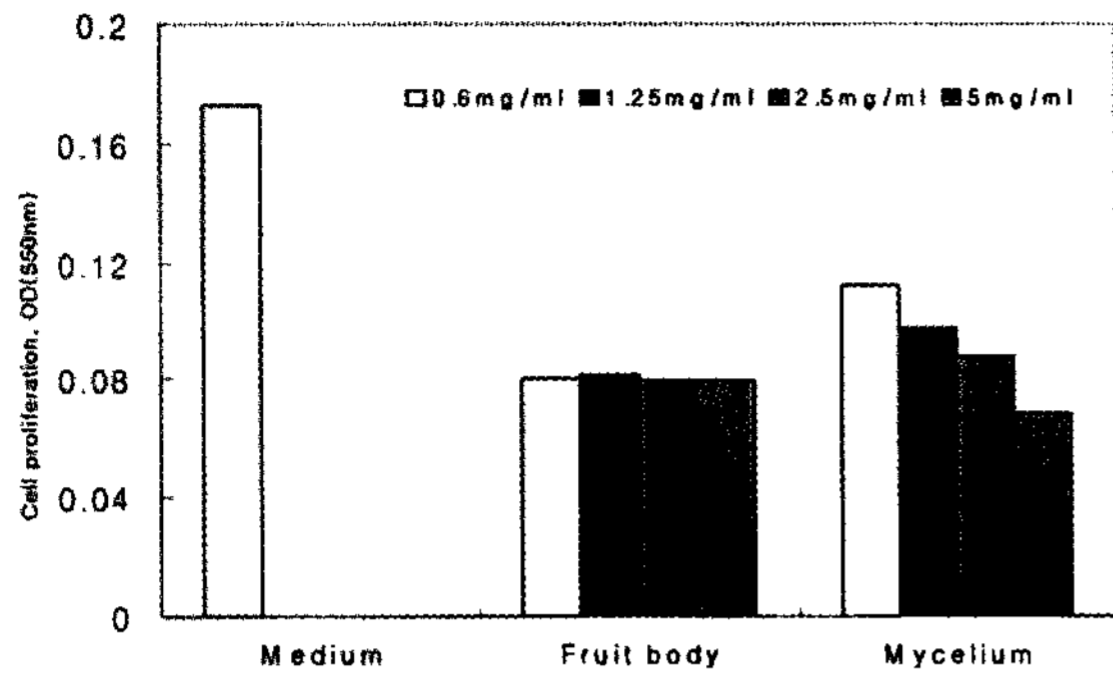


Figure 8. Inhibition effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on proliferation of Jurkat cell (Jurkat cells (2×10^5 /ml) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

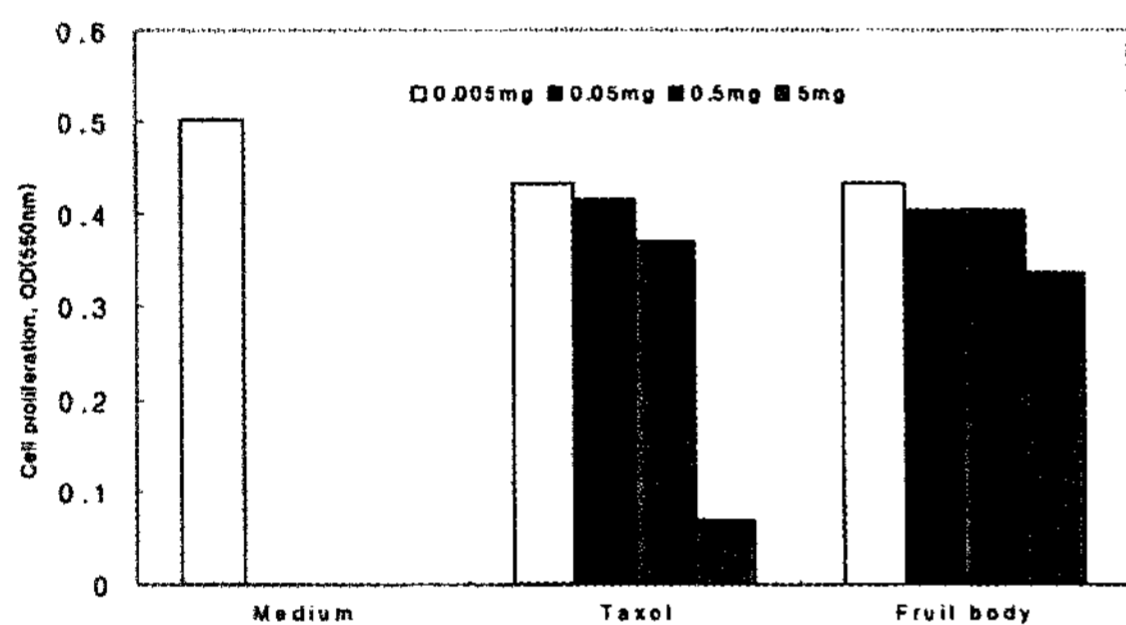


Figure 9. Comparison of inhibition effect of Taxol and water extracts from fruit body of *Hericium erinaceum* on proliferation of Jurkat cell (Jurkat cells (2×10^5 /ml) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

Jurkat 세포의 증식억제 효과

사람의 급성 T 백혈병 세포인 Jurkat 세포에서도 자실체 및 균사체 추출물은 증식억제 효과를 나타내었다. 자실체는 농도 의존성을 보이지 않았으나 균사체는 농도 의존성을 보여서 저 농도 (0.6~2.5 mg/ml)에서는 자실체 추출물의 증식억제 효과가 균사체보다 컸으며, 5 mg/ml의 고농도에서는 균사체 쪽의 증식억제 효과가 오히려 더 높았다 (Fig. 8). 여기서도 자실체와 Taxol을 비교한 결과, 저농도 범위에서 두 시료의 증식억제효과는 비슷하였다(Fig. 9).

LyD9 세포의 증식억제 효과

Mouse bone marrow pluripotent stem cell인 LyD9 세포의 증식에 미치는 *H. erinaceum* 자실체 및 균사체 열수 추출물의 효과는 Fig. 10과 같다.

자실체 추출물은 농도에 따른 차이는 크지 않았으나 농도 의존적으로 증식억제 효과를 나타내었으며, 균사체 추출물보다 증식억제효과가 컸다. 따라서 상기 결과로부터 자실체와 균사체 추출물의 암세포 증식억제능은 다르고, 대체로 0.6 mg/ml에서부터 억제 효과가 나타나기 시작하는데, 억제효과는 자실체 추출물의 경우가 균사체 추출물보다 더 크며, 이의 억제 효과는 농도차이에 따라 큰 변화가 없는 특징을 보임을 알 수 있었다.

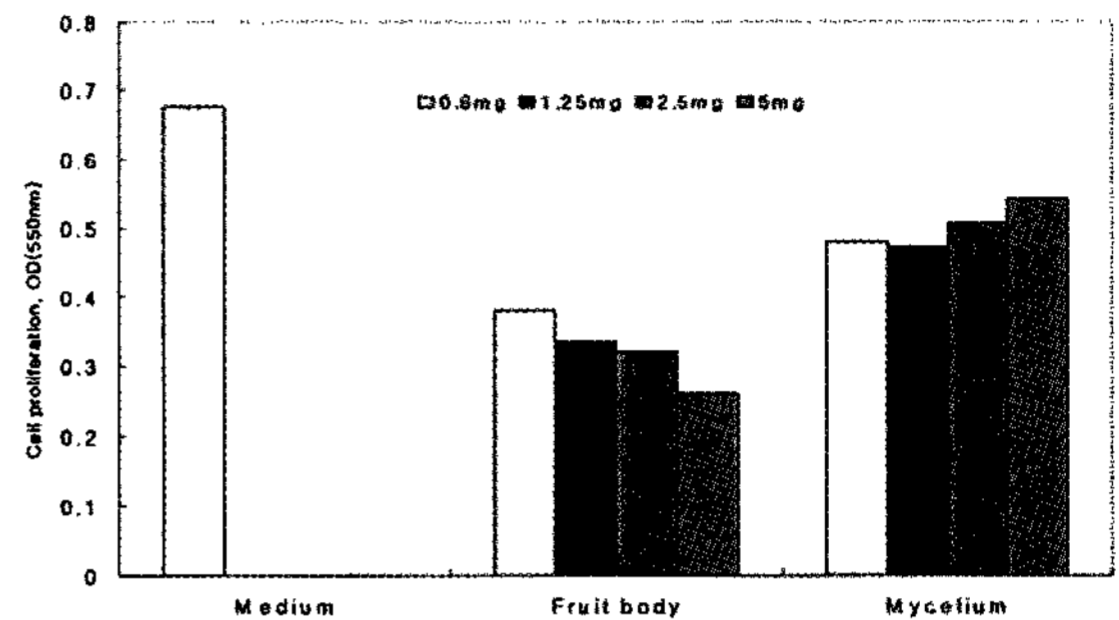


Figure 10. Inhibition effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on proliferation of LyD9 cell (LyD9 cells (2×10^5 /ml) were co-cultured with indicated amount of samples. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide was added after 44 hrs of incubation, and the proliferation profiles were measured at 550 nm).

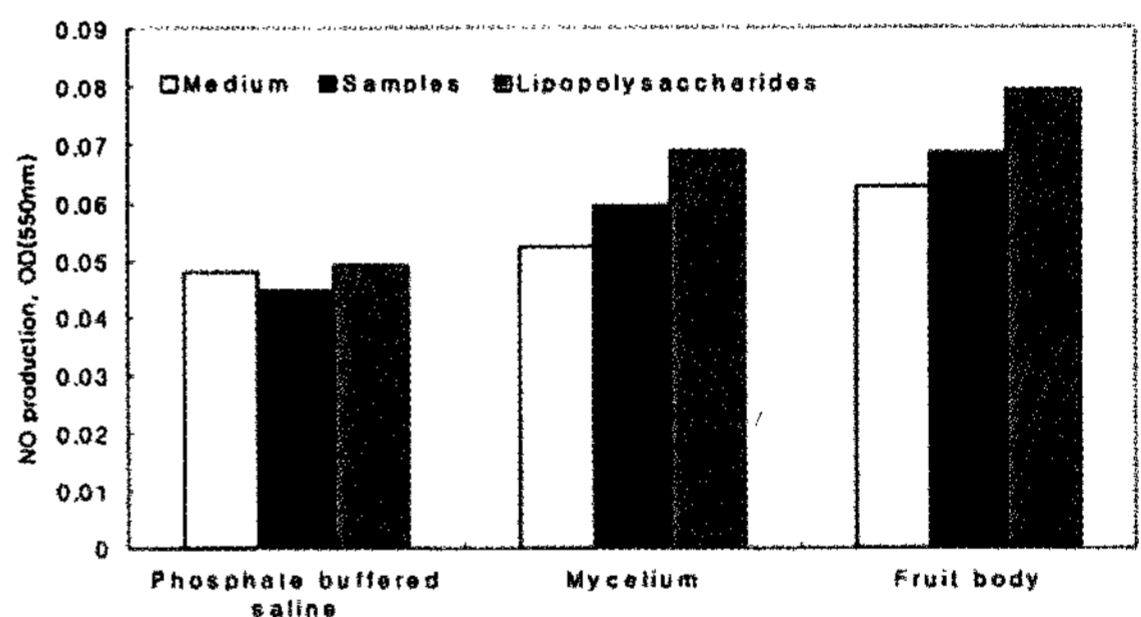


Figure 11. Effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on the production of nitric oxide from peritoneal cells (Extracts (1 mg/0.2 ml) were intraperitoneally injected. Peritoneal macrophages were prepared after 5 days of injection. Harvested peritoneal cells were stimulated with medium alone, indicated samples or LPS, and analyzed for NO production. Secreted NO were captured by grease solution and read on 550 nm).

복강세포의 NO 생산능에 미치는 영향

NO (nitric oxide)는 면역학적, 신경 및 심혈관 조직을 포함한 많은 생물계에서 중요한 생리적 effector 분자이다.

Fig. 11은 복강세포의 NO 생산능에 미치는 자실체 및 균사체 추출물의 영향을 조사한 결과이다. 시료 모두 NO 생산 유도능을 나타내었으며, LPS (lipopolysaccharides) 자극으로 더욱 유도능의 증가현상을 보였다. NO 생산 유도는 자실체가 균사체 보다 다소 높았으며, 1 mg/ml의 시료 농도에서 복강세포의 NO 생산을 유도하였다. 활성화된 대식세포에서 생성되는 NO는 숙주 방어기전에 중요한 역할을 한다고 보고되었는데(17), 지금까지의 연구에 의하면, 버섯

류의 β -glucan성 다당류는 복강대식세포 및 Raw 264.7과 같은 대식세포에서 IFN- γ 와 LPS 등에 의해 활성화되어 배지 내에 소량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다.

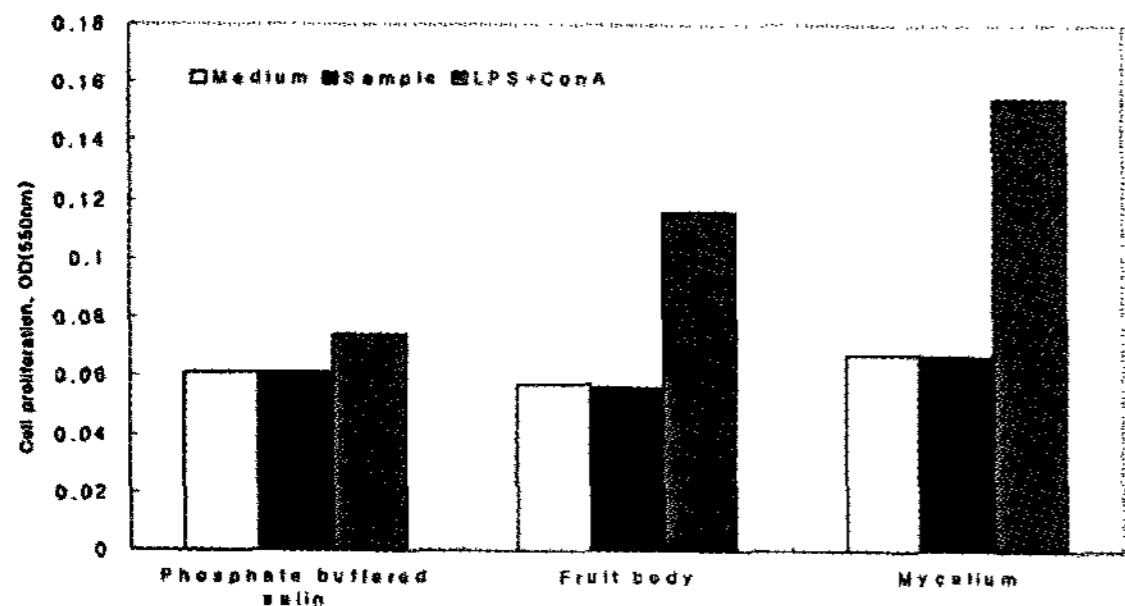


Figure 12. Effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on the proliferation of splenocytes (Splenocytes after intraperitoneal injection of samples were stimulated by medium alone, lipopolysaccharides with concanavalin A or samples. Cell proliferation was analysed by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide).

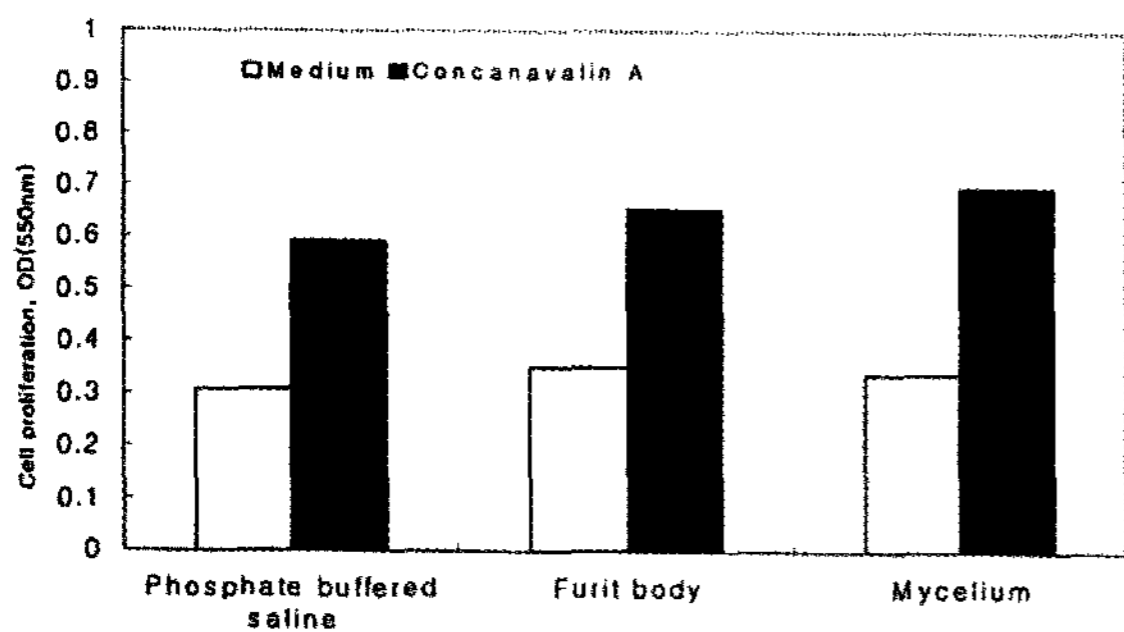


Figure 13. Effect of water extracts from *Hericium erinaceum* on IL-2 secretion from splenocytes (Splenocytes were harvested after intraperitoneal injection of samples, and stimulated by concanavalin A for 48hrs. Secreted IL-2 in culture supernatant were measured by using ELISA method).

비장세포의 증식 유도능 및 IL-2 생산능에 미치는 영향

Fig. 12는 PBS를 대조로 하여 자실체 및 균사체 추출물이 비장세포의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과이다.

각 시료 단독으로는 비장세포의 증식을 유도하지 않았으나 B-cell 및 T-cell의 mitogen인 LPS와 ConA로 자극시에는 비장세포의 증식 유도능을 보였다. LPS와 ConA가 함께 자극시 균사체 추출물은 복강세포에서와는 달리 자실체 추출물보다 비장세포의 증식 유도능을 강하게 나타내었다.

또, 비장세포의 IL-2 (interleukin-2) 생산에 미치는 자실체 및 균사체 추출물의 효과를 조사한 결과(Fig. 13)에서도, 각 시료 단독으로는 IL-2 생산에 영향을 주지 않았으나 T-cell mitogen인 Con A (concanavalin A)로 자극시에는 IL-2 생산 유도능을 나타내었다. 균사체가 자실체보다 다소 높은 IL-2 생산 유도능을 보였다.

일반적으로 IL-2는 활성화된 CD4⁺Th 세포에 의해 생산되는 14~16 kDa의 glycosylated polypeptide이다. 임파구 세포의 활성화 및 증식에 중요하며, 이들의 반응 중 대부분 T-세포, NK 세포 및 B-세포의 확장에 중심적 역할을 한다.

Xu 등(18)은 *H. erinaceus*의 다당류가 쥐의 T-cell 및 B-cell 증식에 미치는 효과를 조사한 결과 Con-A 단독보다는 다당류 (PHE)와 Con-A를 함께 투여할 경우 3배의 증식 효과를 나타낸다고 하였고, 비장세포의 증식도 PHE나 lipopolysaccharide 단독에 비해 PHE와 lipopolysaccharide의 동시 투여가 3배 더 향상된다고 하였다.

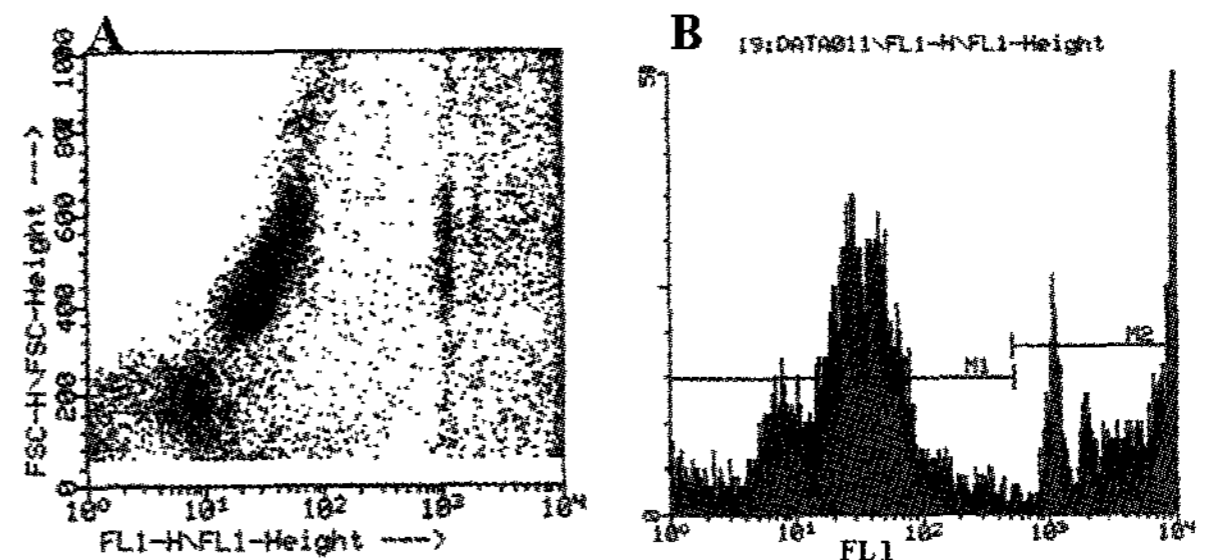


Figure 14. *In vitro* assay of the effect of extracts on cell viability (S10, the bone marrow stromal cells, were co-cultured with bone marrow cells with indicated amount of extracts from fruit body of *Hericium erinaceum* for 48 hrs. The cell population were stained with propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometer. M1 and M2 shows the PI stained cells).

골수세포의 증식에 미치는 영향

골수 stroma 세포주인 S10과 골수 세포를 공배양한 후 골수세포를 PI (propidium iodide) staining하여 FACS로 측정하였다. Fig. 14A는 세포 크기 (x-축, FSC) 및 과립도 (y-축, SSC)에 따라 분포시킨 그림이며, 염색된 비율은 FL1을 parameter로 한 histogram상에서 marker를 설정하여 강하게 양성으로 나타난 부분의 %를 취하였다(Fig. 14B).

Histogram statistics에 의해 골수 세포의 증식을 조사한 결과(Table 1), 자실체 및 균사체 추출물 모두 골수세포의 증식에 약간의 증식 효과를 보였다. 또, PI staining하여 세포의 viability를 조사한 결과(Table 2), 자실체 및 균사체 모두 큰 영향을 주지 않았으며, viable cell의 counting에서도 세포의 생존에 큰 영향을 주지 않았다.

Table 1. Numerated count of cell viability from propidium iodide staining analysis

Sample	M1 (%)	M2 (%)	M3 (%)
Medium	42.1	41.5	16.54
Fruit body (0.5 mg/ml)	47.92	36.81	15.4
Fruit body (5 mg/ml)	37.29	47.93	15.0

Cell viability analysis at figure is numerated. M1 and M2 shows the PI stained cells. Ratio of both M1 and M2 shows the dead cell population.

Table 2. Population of viable cells from Fig. 14

Sample	Viable cells Number(V)	Dead cells Number(D)	V/V+D
Medium	40	25	61.5
Fruit body (0.5 mg/ml)	58	24	70.7
Fruit body (5 mg/ml)	58	43	57.4

The ratio of viable cells in the total cell number are indicated with V/(V+D).

Table 3. Phagocytic activity of peritoneal macrophages

Sample	M1 (%)	M2 (%)
PBS	76.7	23.3
Fruit body	64.11	35.89
Mycelium	71.6	28.4

Analysed phagocytic activity by flowcytometer are shown with M1 and M2 ratio. M2 population shows the phagocytosed.

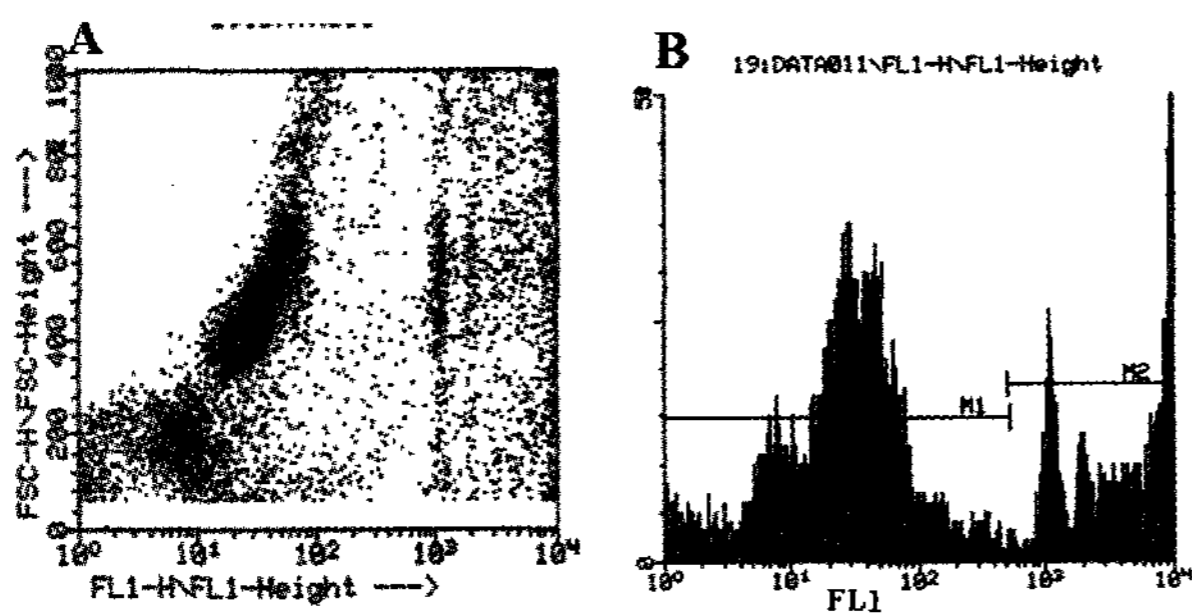


Figure 15. Analysis of phagocytic activity of peritoneal macrophages (Samples (1 mg/0.2 ml) were intra-peritoneally injected. Peritoneal cells were harvested with ice cold hank's solution after 5 days. The cells (5×10^6) were co-incubated with fluorescened microbeads for 3 hrs. Phagocytosis was analysed by flowcytometer. M2 populations show the phagocytosed cells).

복강세포의 탐식능에 미치는 영향

5 mg/ml 농도의 시료를 200 μ l 복강 주사한 후 3일 후 복강세포를 채취하여 microbeads를 이용한 탐식능을 FACS를 이용하여 측정하였다. Fig. 15a는 FL1이 양성인 모든 세포들을 FL1 vs. size를 보여주도록 재분석한 결과이며, Fig. 15b는 histogram markers M1과 M2를 갖는 염색 세포의 histogram이다.

대식세포가 활성화되면 첨가된 microbead를 외부 이물질로 인식하게 되어 세포 내로 흡수하게 되는데, M1의 오른쪽에 위치한 marker M2가 양성을 나타낸다. 따라서 M2가 microbead를 탐식한 세포이며, 이의 histogram statistics 자료인 Table 3을 보면 탐식능은 자실체 첨가구가 가장 높게 나타났고, 다음으로 균사체가 높은 탐식능을 보였다.

요 약

*H. erinaceum*은 현재 산업적으로 매우 주목되고 있는 기능성 소재들 중의 하나이다. 본 연구에서는 식용은 물론 각종 약리효과를 나타내는 *H. erinaceum*의 기능성 식품의 제품화 연구 일환으로, 지금까지 체계적으로 연구된 바 없는 *H. erinaceum*의 액체배양을 시도하고, 생성된 균사체의 생리 기능성의 변화를 자실체의 물 추출물과 비교, 조사함으로써 *H. erinaceum* 액체배양 생성물의 생리 기능 효과를 평가, 규명하고자 하였다. *H. erinaceum*의 자실체 및 균사체 물 추출물은 HeLa (human cervix epitheloid carcinoma; 인간 자궁 상피암세포), Raw264.7 (mouse monocyte macrophage; 생쥐 단핵 대식세포), Jurkat (human acute T cell leukemia, 인간 급성 T 백혈병 세포), KATO3 (human gastric carcinoma 인간

위장 암세포), EL4 (mouse T lymphoma 생쥐 T 림프종 세포), LyD9 (mouse bone marrow pluripotent stem cell; 생쥐 공수유래 간세포) 등 각종 암세포주에 대해 농도 의존적으로 증식 억제 효과를 나타내었다. 자실체 추출물은 균사체 추출물보다 대부분의 암세포 증식의 억제 효과가 컸으며, 가장 높은 암세포 증식 억제효과를 보인 자실체 열수 추출물의 효과는 Raw 264.7 및 EL4 세포주를 사용한 Taxol와의 비교실험 결과, 자실체 농도 0.01~10 mg/ml에서 자실체 사용량의 1/1000에 상당하는 양의 Taxol 효과와 비슷하였다. 자실체 및 균사체 열수 추출물들은 1 mg/ml 농도에서 복강세포의 nitric oxide 생산 유도능을 나타내었으며, lipopolysaccharides 자극으로 더욱 증가하였다. 반면, 비장세포의 증식유도능 및 interleukin-2 유도능에서는 각 시료 단독으로는 증식 유도 및 interleukin-2 유도능을 나타내지 않았으나 각각 lipopolysaccharide와 concanavalin A의 첨가 및 concanavalin A 자극으로 강한 증식유도능 및 interleukin-2 생산능을 나타내었고, 그 효과는 균사체 추출물에서 자실체보다 더욱 높았다. 또 각 시료는 골수세포에 대해서도 약간의 증식효과를 보였으며, 복강세포의 탐식능을 나타내었다.

REFERENCES

- Mizuno, T. (1995), Yamabushitake, *Hericum erinaceum*: Bioactive substances and medicinal utilization, *Food Reviews International* 11(1), 173-175.
- Kawagishi, H., H. Ando, K. Shinba, H. Sakamoto, S. Yoshida, F. Ojima, Y. Ishiguro, N. Ukai, and S. Furukawa (1993), Chromans, hericenones F, G and H from the mushroom *Hericum erinaceum*, *Phytochemistry* 32(1), 175-178.
- Kawagishi, H., A. Shimada, R. Shirai, K. Okamoto, F. Ojima, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, and S. Furukawa (1994), Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericum erinaceum*, *Tetrahedron Letter* 35(10), 1569-1572.
- Kawagishi, H., A. Shimada, S. Hosokawa, H. Mori, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, S. Sakemi, J. Bordner, N. Kojima, and S. Furukawa (1996), Erinacines E, F and G, stimulators of nerve growth factor(NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericum erinaceum*, *Tetrahedron Letter* 37(41), 7399-7402.
- Kawagishi, H., A. Shimada, K. Shizuki, H. Mori, K. Okamoto, H. Sakamoto, and S. Furukawa (1996), Erinacines D, a stimulator of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericum erinaceum*, *Heterocycl. Commun.* 2(1), 51-54.
- Yang, Q. Y. and S. C. Jong (1989), Medical mushrooms in china, *Mush. Sci.* 12(Part 1), 631-643.
- Ahn, D. K. (1992), Medicinal fungi in Korea, *Kor. J. Mycol.* 20, 154-165.
- Song, C. H. and K. Y. Cho (1987), A synthetic mmedium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*, *Mycologia* 79(6), 866-871.
- Lee, B. W., Im, G. H., Kim, D. W., Park, K. M., Son, S. H., and T. H. shon (1993), Cultural characteristics and pilot scale fermentation for submerged mycelial culture of *Lentinus edodes*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21(6), 609-614.
- Lee, S. Y., T. S. Kang, and M. C. Lee (1998), Condition of exopolysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13(5), 547-553.

11. Jung, J. H., K. E. Lee, and S. Y. Lee (2006), Cultural characteristics and scale-up for submerged cultivation of *Hericium erinaceum* through air-lift and jar fermenter system, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**(2), 96-102.
12. Jung, J. H., K. E. Lee, and S. Y. Lee (2006), Optimization of submerged cultivation of *Hericium erinaceum*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**(2), 96-102.
13. Michael, C. A., A. S. Domnic, and M. Ahne (1988), Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.* **48**, 589-601.
14. Ohno, N., Y. egawa, T. Hashimoto, and T. Yadomac (1966), Effect of β -glucan on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophages in mice, *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 608-612.
15. Lee, S. Y. (1996), Characteristics and production of antitumor polysaccharides from mushroom origin in Korean. *Biotechnology News*, **3**(2), 95-109.
16. Mizuno, T., T. Wasa, H. Ito, C. Suzuki, and N. Ukai (1992), Antitumor- active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, and edible and medicinal mushroom called Yamabushitake or houtou, *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(2), 347-348.
17. Nathan, C. F. and J. B. Jr. Hibbs (1991), Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity, *Current Opinion Immunol.* **3**, 65-70.
18. Zhou, H., W. Liou, Q. Chen, and S. Wang (1991), Antiaging effect of *H. erinaceus* polysaccharides, *J. China Pharmaceutical University* **22**(2), 86-88.