

## *Phellinus gilvus*의 항암활성, 간보호 및 항돌연변이성에 대한 평가

강은희 · 김길수 · 박승춘\*

경북대학교 수의과대학  
(게재승인: 2008년 2월 13일)

### Evaluation of antitumor, hepatoprotective and antimutagenic potentials of *Phellinus gilvus*

Eun-Hee Kang, Kil-Soo Kim, Seung-Chun Park\*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Accepted: February 13, 2008)

**Abstract :** This study was carried out to evaluate the antitumor, hepatoprotective and antimutagenic activities on hot water extract of *Phellinus gilvus* (PGE). Growth of tumor in mice that were orally given 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g·kg<sup>-1</sup> dose of PGE was inhibited in a dose-dependent manner ( $p < 0.05$ ). The hepatoprotective effect of PGE in the carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-intoxicated rats was studied. In CCl<sub>4</sub> + PGE group, PGE was orally administered with 100 mg/kg/day dose 7 days before the treatment of CCl<sub>4</sub>. The serum activity of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in CCl<sub>4</sub> + PGE group were decreased at a rate of 59.6% and 54.1% compared with those in CCl<sub>4</sub> group, respectively ( $p < 0.05$ ). Also, total cholesterol and triglyceride in CCl<sub>4</sub> + PGE group were significantly decreased at a rate of 90% and 73.6% compared with those in CCl<sub>4</sub> group ( $p < 0.05$ ). In the Ames test, we confirmed PGE doesn't have any activity as a mutant, and PGE showed inhibitory effect against mutagenesis induced by 2-amino fluoride and sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA1535 in a dose-dependent manner. From the above results, we may suggest that PGE might have useful as a material for functional food and/or animal pharmaceuticals.

**Keywords :** antimutagenic effect, antitumor, hepatoprotective effect, *Phellinus gilvus*

## 서 론

버섯류는 고등균류 중 담자균류에 속하며 여러 생리 활성물질을 함유하고 있어 고대로부터 식용 및 약용 등으로 널리 이용되고 있다. 약용버섯 중에서 상황버섯, 차가버섯, 표고버섯 그리고 잎새버섯의 추출물에 대한 항산화 및 당뇨병 치료제의 연구도 활발하게 진행이 되고 있다 [1-3, 5-7, 30]. 그 중에서도 상황버섯이라고 알려진 진흙버섯은 전 세계적으로 약 220종이 알려져 있고 한국에는 *Phellinus(P) linteus*, *P. igniarius*, *P. gilvus*, *P. robustus*, *P. pini*, *P. baumii*, *P. hartigii*의 7종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다 [9, 23]. 이 중 *P. linteus*와 *P.*

*baumii*가 한국식품의약품안전청에 의해 기능성식품으로 허가되어 있고 *P. linteus*는 국내에서 가장 애용되는 약용버섯으로 면역활성 [4], 항돌연변이원성 및 세포독성 효과 [11], 항암활성 [6, 21, 37], carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)와 고지방식을 투여한 랫트의 간에서의 지질대사에 대한 영향 [8], 생리활성 [5, 32], 유전독성 억제효과 [10], 간섬유화시 TGF- $\beta$  억제작용 [35], 항염작용 [24, 25], 항알러지작용 [20]등이 각종 문헌과 연구에서 입증되어 있다. 이러한 약리활성에도 불구하고 *P. linteus*의 2~3년의 긴 재배기간과 재배를 위한 참나무 혹은 뽕나무의 원목의 부담이 진흙버섯의 가격 상승으로 이어져 산업적 활용도가 떨어지고 있다.

\*Corresponding author: Seung-Chun Park

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea  
[Tel: +82-53-950-5964, Fax: +82-53-950-5964, E-Mail: parksch@knu.ac.kr]

본 연구에서 사용한 *P. gilvus*는 경북농업기술원에서 2001년에 품종 등록한 진흙버섯으로 대량생산이 가능하고 3개월 만에 자실체의 수확이 가능한 품종으로 *in vitro*와 *in vivo*에서 *P. linteus*와 *P. baumii*와 유사한 항암효과가 알려져 있다 [13, 14, 16-18]. 전보에서 *P. gilvus*에 대한 형태학적, 일반성분 그리고 무기성분에 대하여 *P. baumii* 및 *P. linteus*와 비교하여 연구하였으며 [4], lipopolysaccharide로 폐렴을 유도한 랫트에서 PGE가 항염증에 효과가 있음을 보고하였다 [22]. PGE에 대한 단회독성시험에서는 반수치사량(LD<sub>50</sub>)이 2,000 mg/kg 이상인 것으로 확인하였다 [15].

따라서 본 연구의 목적은 PGE에 대한 기초연구로 시험관내 암세포증식억제를 기준으로 PGE의 추출조건을 설정하고, 이 조건에서 얻어진 PGE가 암이 유발된 마우스에서 항암활성유무를 평가하였다. 이와 더불어 PGE에 대한 항돌연변이 효과와 간 손상 보호효과에 대한 정보를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### PGE의 제조

본 연구에서 사용한 *P. gilvus* 자실체는 3개월 동안 톱밥배지에서 숙성 재배된 것으로 경상북도 농업기술원에서 공급받아 사용하였다. PGE의 추출조건을 설정하기 위하여 SRB법을 이용한 *in vitro* 항암활성을 기준으로

최적의 조건을 설정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 Sarcoma 180과 P388 세포주에 대하여 *P. gilvus* 자실체를 1:30의 비율로 100, 13시간 추출 시 가장 높은 항암활성을 나타내었다. 따라서 본 내용을 토대로 다음과 같이 PGE를 제조하였다. 즉, *P. gilvus* 자실체를 1~2 cm의 크기로 절편하고 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거한 후 *P. gilvus* 자실체 100 g에 3 l의 증류수를 첨가하여 (*P. gilvus* 자실체 : 증류수 = 1 : 30), 열수 순환 추출법으로 추출하였다. 열수 순환 추출법은 증류수가 3 l에서 0.5 l로 증류되면 다시 순환하여 3 l가 되게 하는 방법으로, 총 13시간 동안 열수 추출을 하였다. 추출온도는 최초 60°C부터 시작하여 30분 간격으로 10°C 증가시켜 2시간 30분 동안 100°C가 되게 하였다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 열수 추출액을 1,500 rpm으로 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 60°C에서 감압농축한 후, 동량의 에탄올을 첨가하여 침전물을 얻은 후 침전물은 투석과정을 거쳐 동결건조하여 PGE를 얻었다.

### 실험동물 및 사육환경

PGE의 항암효과를 알아보기 위하여 3주령 수컷 ICR계 마우스(효창사이언스, 한국)를 사용하였으며 간 독성 예방효과를 알아보기 위하여 6주령, 체중 250 ± 20 kg의 수컷 Sprague-Dawley계 랫트(한국 샘타코, 한국) 사용하였다. 실험동물은 온도 23 ± 1°C, 습도 55 ± 5%, 배기 10-

**Table 1.** Optimal extraction time, temperature and proportion of hot water extract of *P. gilvus* based on *in vitro* anti-tumor activity

Temperature (°C)	Time (h)	Sarcoma 180				P388	
		1 : 10 <sup>a</sup>	1 : 20	1 : 30	1 : 10	1 : 20	1 : 30
80	6	58.5 <sup>b</sup>	58.9	75.4	29.2	61	69.4
	8	60.5	64.6	79.3	32.2	60.9	70.4
	10	49.5	66.9	77.3	22.7	55.4	72.2
	12	55.2	67.9	77.9	41.2	60.7	73.2
	13	49.5	63.9	79.7	42.5	59.6	74.2
90	6	54.7	67	71.6	27.7	52.4	68.7
	8	58.7	67.3	81.3	43.2	63.2	74.5
	10	62	66.3	78.3	47.2	59	74.6
	12	63.5	72	84.2	47.2	55.6	71.8
	13	56.4	68.9	84	48.5	54	71.5
100	6	73.7	83.9	91.2	52.7	69.5	75.1
	8	71.7	89.7	86.7	42	74.8	75.1
	10	78.7	89.2	90.9	60.2	71.9	75.2
	12	77.7	92.1	91.1	65	75.9	76.3
	13	71.2	91.5	92.7	63.7	76.1	77.6

<sup>a</sup>the proportion of *P. gilvus* to water (w/v).

<sup>b</sup>inhibition rate (%).

18회/h, 형광등 명암 12 h cycle, 조도 300-500 lux의 사육환경에서 사육하였다. 사료는 슈퍼피드의 실험동물용 사료를 구입하여 실험동물에 자유로이 급여하였으며, 음수는 1차증류수를 자유롭게 섭취시켰다. 상기 시험은 경북대학교 수의과대학의 동물실험규정(KNUVPT-202035)에 의거하여 실시하였다.

**항암활성시험**

PGE의 항암활성효능을 알아보기 위하여 Sarcoma 180 세포주 (KCLB No. 40066)를 ICR 마우스에 이식하여, 고형암을 유발시켜 시험에 사용하였다. 세포의 배양 및 유지를 위한 배지는 RPMI 1640을 이용하였으며, fetal bovine serum을 10%로 첨가하고, penicillin과 streptomycin을 각각 100 units/ml와 100 µg/ml의 농도가 되게 배양액에 첨가하였다. 1주일간 순화시킨 ICR 마우스의 옆구리 부분의 털을 깎은 후 10<sup>6</sup>개의 암세포를 이식하고 7일 후 육안으로 보아 뚜렷한 종양형성이 보일 때 PGE를 6일간 경구투여 하였다. 7일째 부검하여 암세포의 직경과 무게를 측정하여 억제백분율(I.R. = inhibition ratio)을 구하였다. 항암작용의 지표로 사용되는 억제백분율은 다음과 같은 식에 의해 구한 값이다.

$$I.R. = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100, \text{ 여기서 } C_w \text{는 대조군의 평균 중}$$

양 무게이고,  $T_w$ 는 처치군의 평균 중앙 무게이다.

**CCl<sub>4</sub>를 이용한 급성 간독성유발 및 시료의 투여**  
 시험군은 대조군(Control군, n = 5), CCl<sub>4</sub>투여군(CCl<sub>4</sub>군, n = 5), CCl<sub>4</sub>+PGE투여군(CCl<sub>4</sub>+PGE군, n = 5)의 3개 군으로 구성하였다. CCl<sub>4</sub>군과 CCl<sub>4</sub>+PGE군은 CCl<sub>4</sub>를 식물성 oil에 1:1로 혼합한 것을 2 ml/kg의 용량으로 실험동물에 1회 복강 투여하여 급성 간독성을 유발하였다. CCl<sub>4</sub>+PGE군은 PGE를 CCl<sub>4</sub> 투여 일주일 전부터 매일 100 mg/kg의 용량으로 경구투여 하였다. CCl<sub>4</sub> 투여 3일 후 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT), 총 콜레스테롤, 중성지방과 같은 간 기능 관련 혈액화학치를 측정하였다.

**PGE의 돌연변이원성시험**

PGE의 돌연변이원성은 *Salmonella typhimurium* 변이균주인 TA98, TA100 그리고 TA1535를 이용하여 Maron과 Ames의 방법 [28]을 변형하여 실시하였다. 실험에 사용한 균주는 바이오톡스테에서 제공받았으며 실험하기 전 histidine 요구성, deep rough(*rfa*), *uvrB* 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하였다. 물질대사를 활성화시키지 않는 직접법의 경우 standard plate incorporation

test로서 실시하였고 대사활성화 시키는 경우에는 Ames assay를 개량한 preincubation법 [33, 34]에 따라 실험하였다. 즉 대사활성화 시키는 않는 경우에는 PGE를 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 각각의 농도별로 50 µl씩 가하고 여기에 12시간 배양시킨 *S. typhimurium* TA98, TA100 그리고 TA1535를 100 µl를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 µl가 되도록 하였다. 이를 37°C에서 20분간 진탕배양한 후 histidine/biotin이 첨가된 2 ml Top agar(45°C)에 넣고 잘 혼합한 후 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate 위에 도말한 후 37°C 배양기에서 48시간 배양하여 생성된 복귀돌연변이(His<sup>+</sup> revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 대사활성화 시키는 경우에는 건열멸균 시킨 glass cap tube에 PGE를 각각의 농도별로 100 µl씩 가하고 여기에 12시간 배양시킨 *S. typhimurium* TA98, TA100 그리고 TA1535를 100 µl씩 가한 다음 Maron과 Ames의 방법 [28]에 따라 제조한 랫트의 간 microsomal enzyme mixture인 S9 mix를 500 µl 첨가하였다. 이것을 37°C에서 30분간 진탕배양 한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar plate 상에 도말한 후 37°C에서 48시간 배양하여 생성된 복귀돌연변이(His<sup>+</sup> revertant colony)수를 측정하여 추출물의 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 돌연변이원성의 판정은 용매대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다.

**PGE의 항돌연변이원성시험**

Ames test를 개량한 preincubation법에 따라 항돌연변이원성을 실험하였고 돌연변이 유발물질로는 TA98과 TA100에는 2-amino fluride(2-AF), TA1535에는 sodium azide(SA)를 사용하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 PGE를 각각 50 µl씩 첨가하고 여기에 12시간 배양시킨 *S. typhimurium* TA98과 TA100 및 TA1535를 100 µl씩 주입하였다. 간접 변이원성 시험을 위해서는 10% S9 mix를 250 µl씩 첨가하였다. 여기에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종부피가 700 µl가 되도록 하여 37°C에서 20분간 진탕배양 한 다음 상기의 돌연변이원성 시험과 같은 방법으로 시험하여 생성된 복귀돌연변이 수를 측정하여 PGE의 항돌연변이원성 효능을 판정하였다. PGE 및 돌연변이 유발물질의 농도는 예비실험을 통하여 독성이 나타나지 않는 범위 내에서 결정하였으며, 항돌연변이활성은 변이원물질의 활성화에 대한 시료의 억제율(inhibition, %)로서 나타내었으며 아래의 식으로 산출하였다.

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

M: 돌연변이 유발물질만 존재할 경우의 복귀 돌연변이 수

S<sub>0</sub>: 자연 복귀 돌연변이 수

S<sub>1</sub>: 시료를 참가하였을 때의 복귀 돌연변이 수

#### 통계학적 분석

시험결과는 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 통계학적 분석은 SAS statistical package(release 8.1 SAS Institute, USA)를 이용하여 일원배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하였으며 통계학적 유의성이 관찰되는 항목은 post-hoc test로 Duncan's multiple comparison test를 실시하였다. 이때 통계학적 유의 수준을  $p < 0.05$ 로 설정하였다. 비모수인 경우 분산에 대하여 Kruskal-Wallis nonparametric analysis를 실시하였다.

## 결 과

#### PGE의 종양 억제 효과

Sarcoma 180 세포의 옆구리 피부내 내 주입으로 고탄압이 유발된 ICR계 마우스에 대한 PGE의 종양 억제 효과는 Table 2와 같다. Table 2에서 보는 바와 같이 PGE를 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g/kg의 용량으로 6일간 경구 투여한 결과 대조군에 형성된 종양무게( $3.2 \pm 0.4$  g)와 비교하여 각각  $3.1 \pm 0.3$ ,  $2.3 \pm 0.4$ ,  $2.0 \pm 0.33$ ,  $1.60 \pm 0.2$  g으로 용량의존적인 종양억제를 나타내었고 0.5 g/kg 이상의 용량 투여군에서 유의성 있는 종양억제효능을 나타내었다( $p < 0.05$ ) (Table 2). 항암작용의 지표로 사용되는 억제백분율의 값은 각각의 농도에서 3.12%, 28.12%, 37.50% 그리고 50.00%로 측정되었다.

#### PGE의 간 손상에 대한 보호효과

PGE의 간 손상에 대한 보호효과를 알아보기 위하여 PGE를 100 mg/kg/day의 용량으로 랫트에 1주일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>를 복강 투여하고, 3일 후 혈중 간 손상지표인 AST와 ALT를 측정하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 CCl<sub>4</sub>군의 AST와 ALT는 정상군과 비교해 각각 2.4배와 4.5배로 증가하였고 PGE를 투여한 CCl<sub>4</sub>+PGE군은 CCl<sub>4</sub>군과 비교해 각각 59.6%와 54.1%의 감소된 AST와 ALT 수치를 나타내었다.

PGE의 CCl<sub>4</sub>를 투여한 랫트의 혈청중에 중성지질과 총 콜레스테롤의 함량에 미치는 영향은 Table 4와 같다. Control군과 비교해 CCl<sub>4</sub>군에서 각각 1.2배와 1.3배의 유의성 있는 중성지질과 총 콜레스테롤의 증가가 관찰되었고( $p < 0.05$ ), CCl<sub>4</sub>+PGE군은 CCl<sub>4</sub>군과 비교하여 각각 90%와 73.6%의 유의성 있는 중성지질과 총 콜레스

**Table 2.** Antitumor activity of hot water extract of *P. gilvus* in Sarcoma 180 implanted mice

	Average tumor weight (g) <sup>a</sup>	I.R (%) <sup>b</sup>
Control	3.20 ± 0.40	
0.25 g/kg	3.10 ± 0.30	3.12
0.5 g/kg	2.30 ± 0.40	28.12
1.0 g/kg	2.00 ± 0.33*	37.50
2.0 g/kg	1.60 ± 0.20**	50.00

<sup>a</sup>Values are means ± SD (n = 6).

<sup>b</sup>Inhibition ratio (%).

\*Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the control group.

\*\*Significant difference at  $p < 0.01$  level compared with the control group.

**Table 3.** Effects of hot water extract of *P. gilvus* on the serum enzyme activities of CCl<sub>4</sub>-treated rats

Group	AST <sup>a</sup>	ALT <sup>b</sup>
	IU/l	
Control	125.00 ± 14.14	25.60 ± 4.81
CCl <sub>4</sub> <sup>c</sup>	301.73 ± 198.47	116.35 ± 86.64
CCl <sub>4</sub> + PGE <sup>d</sup>	179.87 ± 111.67	62.92 ± 39.63

Values are means ± SD (n = 5).

<sup>a</sup>Aspartate aminotransferase.

<sup>b</sup>Alanine aminotransferase.

<sup>c</sup>Carbon tetrachloride.

<sup>d</sup>Hot water extract of *P. gilvus*.

**Table 4.** Effects of hot water extract of *P. gilvus* on the serum lipids in CCl<sub>4</sub>-treated rats

Group	Triglyceride	Cholesterol
	mg/dl	
Control	55.05 ± 1.06	63.05 ± 11.31
CCl <sub>4</sub> <sup>a</sup>	66.75 ± 11.19*	79.00 ± 2.65*
CCl <sub>4</sub> + PGE <sup>b</sup>	60.54 ± 2.06†	58.16 ± 7.89†

Values are means ± SD (n = 5).

<sup>a</sup>Carbon tetrachloride

<sup>b</sup>Hot water extract of *P. gilvus*

\*Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the control group

†Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the CCl<sub>4</sub> group

테롤 함량의 감소( $p < 0.05$ )를 나타내었다.

#### PGE의 돌연변이원성 및 항돌연변이원성

*S. typhimurium* TA98, TA100 그리고 TA1535를 이용

**Table 5.** Mutagenicity of hot water extract of *P. gilvus* using *S. typhimurium* TA98 and TA100

Treatment	Dose (µg/plate)	S9 mix	His <sup>+</sup> revertants/plate <sup>a</sup>		
			TA98	TA100	
Control <sup>b</sup> 2-AF <sup>c</sup>	0	-	44 ± 12	145 ± 13	
	1	-	48 ± 11	142 ± 13	
	313	-	40 ± 11	140 ± 13	
	625	-	42 ± 13	141 ± 14	
	1250	-	46 ± 19	141 ± 12	
PGE <sup>d</sup>	2500	-	49 ± 16	149 ± 14	
	5000	-	42 ± 14	143 ± 14	
	Control	0	+	48 ± 10	144 ± 16
	2-AF	1	+	243 ± 16	1,265 ± 112
313		+	47 ± 13	146 ± 16	
625		+	45 ± 14	145 ± 14	
1,250		+	48 ± 13	143 ± 14	
PGE	2,500	+	48 ± 14	144 ± 13	
	5,000	+	51 ± 12	147 ± 15	

<sup>a</sup>CFU/plate, values are means ± SD (n = 4).

<sup>b</sup>Control, 50 µl/plate of D.W.

<sup>c</sup>2-AF, 2-amino fluride was used as positive control.

<sup>d</sup>Hot water extract of *P. gilvus*.

**Table 6.** Mutagenicity of hot water extract of *P. gilvus* using *S. typhimurium* TA1535

Treatment	Dose (µg/plate)	S9 mix	His <sup>+</sup> revertants/plate <sup>a</sup>
			TA1535
Control <sup>b</sup> SA <sup>c</sup>	0	-	29 ± 2
	1	-	673 ± 7
	313	-	32 ± 3
	625	-	29 ± 5
	1250	-	31 ± 2
PGE <sup>d</sup>	2500	-	31 ± 5
	5000	-	33 ± 3
	Control	0	+
SA	1	+	676 ± 27
	313	+	30 ± 2
	625	+	31 ± 3
PGE	1,250	+	31 ± 3
	2,500	+	32 ± 4
	5,000	+	30 ± 3

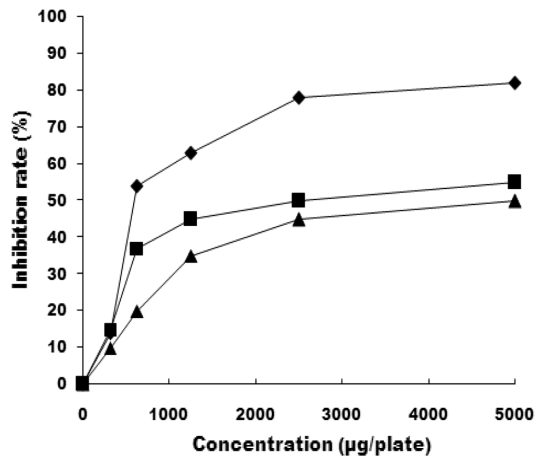
<sup>a</sup>CFU/plate, values are means ± SD (n = 4, 2 plates × 2 times).

<sup>b</sup>Control, 50 µl/plate of D.W.

<sup>c</sup>SA, sodium azide was used as positive control.

<sup>d</sup>Hot water extract of *P. gilvus*.

한 돌연변이시험을 실시한 결과를 Table 5와 6에 기술하였다. 음성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 대사활성



**Fig. 1.** Antimutagenic effects of hot water extracts of *P. gilvus* against 2-AF (1 µg/plate) for TA 98 and TA 100 and against SA (1 µg/plate) for TA 1535 at 0, 313, 625, 1,250, 2,500 and 5,000 µg/plate.

◆-; TA98, -■-; TA100, -▲-; TA1535.

물질 무첨가시는 TA98이 44 ± 12, TA100이 145 ± 13, TA1535는 29 ± 2이고 대사활성물질 첨가시는 TA98이 48 ± 10, TA100이 144 ± 16, TA1535는 33 ± 3이었다. PGE를 plate당 313, 652, 1250, 2500, 5000 µg의 농도로 첨가하여 실험한 결과 TA98의 복귀돌연변이 집락수가 대사활성물질 첨가시와 무첨가시에 모든 용량 투여군에서

음성대조군에 비해 변화가 없었다. TA100과 TA1535 역시 음성대조군과 비교해 농도의존적인 집락수의 증가 또는 감소를 나타내지 않으므로 PGE는 돌연변이원성을 나타내지 않은 것으로 판단되었다. PGE를 plate당 313, 652, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}$ 의 농도로 첨가하여 돌연변이 억제효과를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. TA98과 TA100에 대하여는 돌연변이 유발물질로 2-AF(1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )를 사용하였고 TA1535에 대하여는 돌연변이 유발물질로 SA (1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )를 사용하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이 PGE는 TA98, TA100 및 TA1535에 대하여 농도의존적인 항돌연변이원성을 나타내었다. PGE는 313, 652, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도에서 TA98에 대해서는 14%, 54%, 63%, 78% 그리고 82%의 돌연변이 억제율을 나타내었고, TA100에 대해서는 15%, 37%, 45%, 50% 그리고 55%, TA1535 균주에 대해서는 10%, 20%, 35%, 45% 그리고 50%의 항돌연변이활성을 나타내었다.

## 고 찰

최근에 애완동물 및 산업동물에서 기능성물질을 첨가하여 질병을 예방하고자 하는 연구가 상당히 이루어지고 있다. 그 중에서 버섯은 진균류에 속하는 담자균과 자낭균 중 자실체를 형성하는 고등균류로서 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등의 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐만 아니라 독특한 맛과 향기를 지니고 있어 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔다 [19, 26, 31]. 버섯 중에서 진흙버섯은 이미 많은 생리활성이 보고되어 있으나 가격이 고가이어서 산업동물에 사용이 제한되었으나 최근에는 새로운 품종인 *P. gilvus*를 개발하였으며, 축산농가에서도 사용을 검토하고 있다.

현재 한국식품의약품안전청에서 기능성식품으로 사용이 가능한 품종은 *P. linteus*와 *P. baumii*이다. 특히 *P. linteus*는 연구가 가장 많이 된 약용버섯으로 다기능성 생리활성물질로 면역활성 [2, 30], 항돌연변이원성 및 세포독성효과 [11], 항암활성 [6, 21, 37], 유전독성 억제효과 [10], 간섬유화시 TGF- $\beta$  억제작용 [35], 항염작용 [24, 25], 그리고 항알러지작용 [20]등이 알려져 있다. 이러한 다기능성 생리활성이 있음에도 불구하고 동물약품으로의 개발은 고가인 관계로 어려움이 있다. 이러한 어려움을 극복하기 위하여 전보에서 본 연구진은 *P. gilvus*를 원목을 이용한 인공재배 대신에 톱밥을 사용하여 생산 단가를 낮추고 단기간에 대량생산이 가능하도록 개발한 품종이다 [12, 23].

본 연구에서는 동물용의약품의 보조제 혹은 사료 첨가제로서 *P. gilvus*를 응용하기 위한 기초자료로서 PGE의 암세포증식 억제효과, 간 손상에 대한 보호효과 그리

고 *S. typhimurium* TA98과 TA100 및 TA1535를 이용한 항돌연변이원성에 대한 기능을 살펴보았다.

전보 [13]에서 *P. gilvus*의 추출물을 이용하여 실험관 내에서 항암활성을 측정하였다. 그 결과 열수추출물과 에탄올 추출물 모두 항암활성을 보였다. 이러한 결과를 근거로 마우스를 이용하여 Sarcoma 180 세포주를 배양한 후 이식한 동물 모델에서 PGE가 암 세포 증식을 억제하는지에 관해 알아보았다. 본 실험실에서 제공한 PGE에 대한 위암 모델 마우스에서 항암능이 뛰어난 결과를 Bac 등 [16-18]이 보고하였으나 이는 위암에 국한하여 보고된 내용으로 PGE를 투여시 직접적으로 전부 혹은 일정부분 암세포와 접촉되어 나타날 수 있다. Bac 등 [18]은 벤조피린을 투여하여 위암을 유발한 마우스에 PGE를 투여한 후 위암억제 효과를 확인하였으나 실험실에서 벤조피린 유발 암세포를 배양하여 PGE에 대한 직접적인 항암효과를 확인하지는 않았다. 또한 TMK-1 cell(a poorly differentiated human gastric adenocarcinoma cell line)에 대하여 시험관에서 용량별 항암활성을 측정하였으나, TMK-1 cell을 이식한 누드마우스에서 PGE를 용량별로 투여하여 항암활성을 확인하지 않았다 [16]. 통상적으로 기능성소재에 대한 항암활성을 측정할 경우 1차는 시험관내에서 항암활성을 확인한 후 그 암세포주를 실험동물에 이식하여 항암활성을 측정한다. 또한 지금까지 실험동물에서 PGE를 용량별로 투여하여 항암시험을 실시한 보고가 없다.

따라서 본 연구에서는 Table 1에 요약한 것처럼 시험관내에서 최적의 항암활성을 보여주는 추출조건을 먼저 확인하였다. 그 결과 *P. gilvus* 1 g : 물 30 l(w : v)으로 100°C에서 추출시 sarcoma 180과 P388 세포주에서 뛰어난 항암효과를 보였다. 시험관내에서 PGE의 항암활성을 확인한 후 실험동물에서 항암활성을 측정하였다. 먼저 sarcoma 180 고형암을 배양한 후 ICR 마우스 옆구리 부위에 고형암을 유발하여 PGE를 용량별로 6일간 경구 투여하여 항암활성 유무에 대하여 평가하였다. 그 결과 Table 2에서 보여주는 것처럼 대조군에서 형성된 종양과 비교시 용량의존적인 종양억제능을 나타내었고 0.5 g/kg 이상의 용량 투여군에서 유의성 있는 종양억제효과를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 항암작용의 지표로 사용되는 억제백분율(IR)의 역시 농도의존적인 종양억제효과가 있는 것으로 측정되었다. Nakamura *et al.* [29]에 따르면 항암효과가 뛰어나다고 알려진 *P. linteus* 열수추출물이 독성작용을 나타내지 않는 용량 범위에서 최대 45.80%의 종양 억제효과를 나타내었고, Yang *et al.* [36]에서는 *P. ignarius* 열수추출물을 각각의 용량으로 투여한 군에서 용량 의존적인 종양 억제 효과가 관찰되었고 최대 53.13%(0.4 g/kg 투여군)의 억제효과를 보여

본 실험결과와 유사한 결과를 보여주었다.

고용량으로 투여되는 PGE의 경우 간 독성에 대한 효과는 매우 중요하므로 본 연구에서는 PGE의 간독성 혹은 보호효과를 보기 위하여 PGE를 100 mg/kg/day의 용량으로 1주일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>를 투여하여 급성 간독성을 유발하고 3일 후 혈중 간 손상지표인 AST와 ALT를 측정하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 CCl<sub>4</sub>+PGE군은 CCl<sub>4</sub>군과 비교해 59.6%와 54.1%의 감소된 AST와 ALT 수치를 나타내었다. 또한 CCl<sub>4</sub>+PGE군은 CCl<sub>4</sub>군과 비교해 각각 90%와 73.6%의 유의성 있는 중성지방과 총 콜레스테롤 함량의 감소( $p < 0.05$ )를 나타내었다 (Table 4). 이러한 결과는 *P. linteus* 열수 추출물의 간 보호 효능을 연구한 정 등 [8]과 결과가 유사하였다. 정 등 [8]에 의하면 *P. linteus* 열수 추출물 투여 시 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군과 비교해 유의성은 없으나 AST, ALT등의 간 기능 지표 효소의 감소를 확인하였고, CCl<sub>4</sub> 단독 투여군과 비교해 *P. linteus* 열수 추출물 투여로 18.9%의 총콜레스테롤 수치의 감소를 관찰하였다.

대부분의 발암물질은 암 유발의 초기단계에서 돌연변이원으로 작용하는 공통점이 있다. 따라서 항암활성은 항돌연변이성을 나타내는 물질일 가능성이 많다 [27]. 지 등[11]은 *P. linteus* 추출물을 이용하여 항돌연변이성을 측정하였으나 *P. gilvus*의 추출물에 대해서는 돌연변이 혹은 항돌연변이성에 대한 시험이 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 PGE의 항돌연변이원성을 알아보기 위하여 *S. typhimurium* TA98, TA100 그리고 TA1535를 이용하였다. 그 결과, Table 5와 6에서 보는 바와 같이 PGE는 돌연변이원성을 나타내지 않았으며 TA98, TA100 그리고 TA1535 균주에 대해서 농도의존적인 항돌연변이능을 보였다. 이러한 결과는 *P. linteus* 추출물이 항돌연변이능을 보인다는 지 등 [11]의 결과와 일치하였다.

이상의 결과로부터 *P. gilvus*는 현재 고가로 판매되는 *P. linteus* 그리고 *P. baumii*와 생리활성을 비교시 비슷한 수준의 항암활성, 간보호 작용 그리고 항돌연변이능을 갖는 것으로 판명되었다. 그러므로 *P. gilvus*는 기존의 진흙버섯과는 달리 단 기간에 대량생산이 가능하여 생산 원가 낮으므로 대량으로 소비되는 식품, 기능성식품 혹은 의약품으로 이용이 가능하다. 또한 기존의 품종으로는 생산량이 적어 산업동물에서 이용이 불가능한 것으로 생각되었으나 *P. gilvus*가 대량생산이 가능함에 따라 동물용 의약품으로 상품화가 가능할 것으로 기대된다.

## 결 론

본 연구는 PGE에 대한 기초연구로써 PGE의 암세포

증식 억제, 항돌연변이효과 및 간 손상에 대한 보호효과를 알아보고자 실시하였다. Sarcoma 180 세포주를 이식한 암 동물 모델을 이용한 연구에서, PGE를 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g/kg의 용량으로 6일간 경구 투여한 결과 대조군과 비교해 농도의존적인 종양억제효능을 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). PGE의 간 손상 예방 효과를 보기 위한 연구에서, PGE를 100 mg/kg/day의 용량으로 1주일간 투여한 후 CCl<sub>4</sub>를 투여하여 급성간독성을 유발하고 3일 후 혈액화학치를 비교하였다. CCl<sub>4</sub>+PGE군은 CCl<sub>4</sub>군과 비교해 59.6%와 54.1%의 감소된 AST와 ALT 수치를 나타내었고 또한 CCl<sub>4</sub>+PGE군은 CCl<sub>4</sub>군과 비교해 각각 90%와 73.6%의 유의성 있는 중성지방과 콜레스테롤 함량의 감소( $p < 0.05$ )를 나타내었다. Amest test에서 PGE는 돌연변이원성을 나타내지 않는 것으로 확인되었으며 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 그리고 TA1535를 이용한 항돌연변이 시험에서, 2-AF와 SA로 돌연변이를 유발하였을 때 농도의존적인 돌연변이 억제능을 나타내었다. 이상의 결과를 토대로 할 때 PGE가 암 치료제로서 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각되며 또한 기능성식품 또는 동물용 의약품으로서도 유용하게 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술연구개발과제(202035)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 일부는 산업자원부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터와 지역산업기술개발사업에 의해 수행되었다.

## 참고문헌

1. 김형자, 진창배, 이용섭. 차가버섯으로부터 분리한 페닐성 화합물의 항산화효과. 생약학회지 2007, **38**, 164-169.
2. 나경수, 송치현, 양병근, 전용재. 목질진흙 (상황)버섯의 면역활성. 한국균학회지 1998, **26**, 86-90.
3. 박금주, 오영주, 이상윤, 김현수, 하효철. 3T3-L1지방세포 및 제2형 당뇨병모델(KK-A<sup>y</sup>)에서 잎새버섯(*Grifola frondosa*) 조다당체 추출물의 항당뇨 효과. 한국식품과학회지 2007, **39**, 330-335.
4. 배재성, 장광호, 이만희, 정규식, 조우식, 최성국, 김영환, 박승춘. *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 및 *Phellinus gilvus*의 형태, 일반성분, 원소분석 및 무기성분 함량의 비교. 대한수의학회지 2003, **43**, 423-428.
5. 이경환, 권효정, 천성숙, 김정환, 조영제, 차원섭. 상황버섯(*Phellinus linteus*) 추출물의 생리활성. 한국응용생명화학회지 2006, **49**, 298-303.
6. 이영경, 한명주, 박순영, 김동현. 상황버섯 자실체의 in vitro 및 in vivo 항암활성. 한국식품과학회지 2000,

- 32, 477-480.
7. 장지호, 김민선, 김정연, 최응환, 이상선. 표고버섯 보충이 제 2형 당뇨병 환자의 혈당, 지질 대사 및 항산화 효소 활성에 미치는 영향. 한국영양학회지 2007, **40**, 327-333.
  8. 정명은, 함승시, 남상명, 강일준, 김수진, 정차권. 상황버섯이 사염화탄소와 고지방을 투여한 흰쥐의 간지질 대사에 미치는 생화학적, 형태학적 연구. 한국식품영양과학회지 2001, **30**, 331-337.
  9. 정확성. 한국산 목재부후균류의 분포상에 대한 연구 (2)-담자균류 민주름 버섯목의 분포에 대하여. 한국균학회지 1994, **22**, 62-99.
  10. 지정환, 김미남, 정차권, 함승시. 상황버섯(*Phellinus linteus*)과 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei murill*) 추출물의 유전독성 억제효과. 한국식품영양과학회지 2000, **29**, 513-517.
  11. 지정환, 김미남, 정차권, 함승시. 상황버섯(*Phellinus linteus*)추출물의 항돌연변이원성 및 세포독성 효과. 한국식품영양과학회지 2000, **29**, 322-328.
  12. 조우식, 류영현, 김창배, 최성국. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)의 톱밥재배 기술에 관한 연구. 한국균학회지 2002, **30**, 109-112.
  13. 황미현, 김영환, 김길수, 김태완, 조우식, 최성국, 김중춘, 박승춘. 참나무 원목 및 톱밥에서 재배된 마른진흙버섯 자실체의 에탄올 추출물에 대한 항산화 및 항암활성. 대한수의학회지 2005, **45**, 151-154.
  14. Bae JS, Hwang MH, Jang KH, Rhee MH, Lee KW, Jo WS, Choi SK, Yun HI, Lim JH, Kim JC, Park SC. Comparative Antitumor Activity of Water Extracts from Fruiting Body of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. J Toxicol Pub Health 2004, **20**, 37-42.
  15. Bae JS, Jang KH, Choi SG, Jo WS, Rhee MH, Kwon OD, Kim YH, Kim EY, Park SC. Acute oral toxicity of extract derived from fruiting body of *phellinus gilvus* in rats. J Toxicol Pub Health 2003, **19**, 211-215.
  16. Bae JS, Jang KH, Jin HK. Effects of natural polysaccharides on the growth and peritoneal carcinomatosis of human gastric adenocarcinoma in a nude mouse model. Cancer Lett 2006, **235**, 60-68.
  17. Bae JS, Jang KH, Yim H, Jin HK. Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. Cancer Lett 2005, **218**, 43-52.
  18. Bae JS, Jang KH, Yim HN, Park SC, Jin HK. Inhibitory effects of polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* on benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice. World J Gastroenterol 2005, **11**, 577-579.
  19. Chen KC, Peng CC, Peng RY, Su CH, Chiang HS, Yan jH, Hsieh-Li HM. Unique Formosan Mushroom *Antrodia camphorata* Differentially Inhibits Androgen-Responsive LNCaP and -Independent PC-3 Prostate Cancer Cells. Nutr Cancer 2007, **57**, 111-121.
  20. Choi YH, Yan GH, Chai OH, Lim JM, Sung SY, Zhang X, Kim JH, Choi SH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. Inhibition of anaphylaxis-like reaction and mast cell activation by water extract from the fruiting body of *Phellinus linteus*. Biol Pharm Bull 2006, **29**, 1360-1365.
  21. Guo J, Zhu T, Collins L, Xiao ZX, Kim SH, Chen CY. Modulation of lung cancer growth arrest and apoptosis by *Phellinus Linteus*. Mol Carcinog 2007, **46**, 144-154.
  22. Jang BS, Kim JC, Bae JS, Rhee MH, Jang KH, Song JC, Kwon OD, Park SC. Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. Biotechnol Lett 2004, **26**, 31-33.
  23. Jo WS, Rew YH, Choi SG, Seo GS, Sung JM, Uhm JY. The culture conditions for the mycelial growth of *Phellinus* spp. Mycobiology 2006, **34**, 200-205.
  24. Kim BC, Jeon WK, Hong HY, Jeon KB, Hahn JH, Kim YM, Numazawa S, Yosida T, Park EH, Lim CJ. The anti-inflammatory activity of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curt.) is mediated through the PKC $\delta$ /Nrf2/ARE signaling to up-regulation of heme oxygenase-1. J Ethnopharmacol 2007, **113**, 240-247.
  25. Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH, Lim MH, Chang W, Lim S, Choi S, Song WO, Sung JM, Hwang KC, Kim TW. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF-B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. J Ethnopharmacol 2007, **114**, 307-315.
  26. Kobori M, Yoshida M, Ohnishi-Kameyama M, Shinmoto H. Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. Br J Pharmacol 2007, **150**, 209-219.
  27. Kuroda Y, Inoue T. Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. Mutat Res 1988, **202**, 387-391.
  28. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 1983, **113**, 173-215.
  29. Nakamura T, Matsugo S, Uzuka Y, Matsuo S,



- Kawagishi H.** Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. Biosci Biotechnol Biochem 2004, **68**, 868-872.
30. **Oh GS, Lee MS, Pae HO, Kwon J, Lee SS, Jeong JG, Shin MK, Kwon TO, Chung HT.** Effects of oral administration of *Phellinus linteus* on the production of Th1- and Th2-type cytokines in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol 2006, **28**, 281-293.
31. **Sarangi I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK.** Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. Int Immunopharmacol 2006, **6**, 1287-1297.
32. **Shin JY, Lee SY, Bae IY, Yoo SH, Lee HG.** Structural and biological study of carboxymethylated *Phellinus linteus* polysaccharides. J Agric Food Chem 2007, **55**, 3368-3372.
33. **Yahagi T, Degawa M, Seino Y, Matsushima T, Nagao M, Sugimura T, Hashimoto Y.** Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. Cancer Lett 1975, **1**, 91-96.
34. **Yahagi T, Nagao M, Seino Y, Matsushima T, Sugimura T, Okada M.** Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella. Mutat Res 1977, **48**, 121-129.
35. **Yang KL, Chang WT, Chuang CC, Hung KC, Li E.** Antagonizing TGF- $\beta$  induced liver fibrosis by a retinoic acid derivative through regulation of ROS and calcium influx. Biochem Biophys Res Commun 2008, **356**, 484-489.
36. **Yang Q, Hu XG, Wan Q, Wang WQ.** Study on anti-tumor effect of medicinal fungi *Phellinus igniarius* extracts. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2006, **20**, 1713-1715.
37. **Zhu T, Guo J, Collins L, Kelly J, Xiao ZJ, Kim SH, Chen CY.** *Phellinus linteus* activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells. Br J Cancer 2007, **96**, 583-590.