

차가버섯의 항결핵 활성에 대한 연구

송호연¹, 이대진², 이병의^{1,2}
순천향대학교¹, 허니버섯영농조합법인²

Studies on the anti-pulmonary tuberculosis of *Inonotus obliquus*

Ho-Yeon Song¹, Dae-Jin Lee² and Byung-Eui Lee^{1,2*}

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Soonchunhyang University, 23-20, Bongyong-Dong, Dongnam-gu, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea

²Honeymush Agricultural Cooperative, Ipjang, Seobukgu, Cheonan, Chungnam 330-820, Korea

(Received October 5, 2011, Revised October 15, 2011, Accepted October 25, 2011)

ABSTRACT : *Inonotus obliquus* is a traditional medicine mushroom that was developed from traditional medicine originating in ancient. It has been applied for cancer or immunotherapy, but its effect on pulmonary tuberculosis is not reported. Therefore, we measured the pulmonary tuberculosis therapeutic effect of methyl alcohol extract from MGIT 960 system with fluorescent indicator. *Inonotus obliquus* extract showed 14 day more inhibitory activity than the positive control. In addition, the anti-pulmonary tuberculosis activity of *Inonotus obliquus* was 50 μ m. These results suggest that *Inonotus obliquus* methyl alcohol extracts could contribute to inhibition of pulmonary tuberculosis.

KEYWORDS : Immunotherapy, Medicinal mushroom, MGIT 960, *Inonotus obliquus*, Pulmonary tuberculosis

서론

소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 시루뿔버섯(*Inonotus*)속에 속하는 약용버섯인 차가버섯(*Inonotus obliquus* (persoon) pilat)은 시베리아와 북아메리카, 북유럽 등 북위 45도 이상 지방의 자작나무에 기생하는 버섯으로 바이러스에 의해 착생하여 수액을 먹고 자라며 대개 15~20년 동안 성장한다. 주산지인 러시아에서는 1958년부터 차가버섯에 대한 연구가 진행되었는데 다양한 약리작용을 나타내는 주성분은 β -glucan에 glucose, galactose, xylose, mannose, arabinose, fucose 등이 결합된 xylogalactoglucan이며(Mizuno 등, 1999) 항암(황용주 등, 2003; 정봉환 등, 2010), 항산화(Kim 등, 2005; Kim 등, 2011; Yun 등, 2011), 항돌연변이(함승시 등, 2003), 항고지혈증(김민아 등, 2009), 항당뇨(김민아 등, 2009) 등의 생리활성이 보고되었다.

결핵은 인류의 역사와 함께 했을 정도로 오랫동안 인간의 생명을 위협하여 왔으며 WHO의 보고에 의하면 전 세계 인구의 1/3 정도가 결핵균에 감염되어 있고, 매년 약 300만명이 결핵으로 사망할 정도로 단일 질환으로는 가장 높은 사망률을 나타내고 있다(WHO, 1994, 2007). 한국은 2007년 결핵 신환 발병률이 인구 10만 명당 71.6명으로 노령층과 20대의 신환 발병률이 높아 여전히 후진국형 결핵 감염 양

상을 보이고 있다(질병관리본부, 2007 결핵환자 신고현황 연보). 그러나 결핵이 심각한 질병임에도 불구하고 현재 임상에서 결핵치료에 사용되고 있는 주요 결핵약은 5종 미만으로 대부분 1960년대 이전에 개발된 것이다. 특히 치료과정에서 약물에 대한 내성을 갖는 다재내성 결핵균의 출현으로 치료가 어려운 난치병 형태로 진화하고 있으며 다재내성 결핵균의 경우 기존의 결핵치료제로 치료될 수 없기 때문에 새로운 결핵치료제의 개발이 절실히 요구되고 있다(O'Brien과 Nunn, 2001). 최근들어 전 세계적으로 병원미생물 감염성 질병의 치료에 효과가 있는 신약후보물질을 천연물에서 찾으려는 많은 연구가 이루어지고 있다(Koehn과 Carter, 2005, Newman과 Crgg, 2007).

따라서 본 연구에서는 기존에 보고되지 않은 신규 생리활성에 대한 연구를 진행하고자 국내 보급률이 높으며 오랫동안 약용버섯으로 이용되어 온 차가버섯을 메탄올에 추출한 후 차가버섯 메탄올 추출물에서 항결핵능을 보이는 신규 생리활성에 대한 연구를 수행하여 차가버섯을 의약품신소재로 개발하고자 한다.

재료 및 방법

차가버섯 추출물의 제조

본 실험에 사용한 러시아산 차가버섯은 광명당 제약(울산시

* Corresponding author (belee316@hanmail.net)

Table 1. BACTEC MGIT 960 instrument inventory report to anti-pulmonary tuberculosis effect

Sample	Concentration(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	Depression proliferation(day)
Negative control	50	7.9
Positive control	50	> 42
Methanol extract	50	10.2
Methylene Chloride fraction	50	14.7
Ethyl acetate fraction	50	9.3

소재)에서 구입하여 절편한 다음 사용하였으며 러시아산 차가버섯 1kg을 상온에서 3주간 메탄올로 추출하여 11.6g의 차가버섯 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물은 methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol에 순차적으로 분획하여 methylene chloride 분획물 4.8g, ethylacetate 분획물 1.73g, n-butanol 분획물 1.87g, 나머지 물층 1.78g을 얻었다.

결핵균주 및 배양

본 실험에 사용한 H37Ra(ATCC 35835) 균주는 7H10 평판배지에서 3~4주간 배양한 후 7H9 액체배지에 접종한 다음 37°C에서 21일 동안 배양하여 정지기에 도달하면 균체를 수집하고 수집한 균체는 10% Middlebrook oleic acid albumin dextrose catalase가 첨가된 7H9 액체배지에 현탁시킨 후 글리세롤을 최종 10%(v/v)가 되도록 첨가한 다음 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

BACTEC MGIT 960 system에 의한 항결핵 활성 검증 시험

항결핵 활성검정 방법(Collins와 Franzblau, 1997)은 BACTEC MGIT 960(Becton Dickinson, USA) system을 이용하였으며, 차가버섯 추출물은 1~100 μg 의 농도로 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 희석하여 사용하였다. 7ml의 MGIT(Becton Dickinson, USA) 전용 Tube에 Middlebrook oleic acid albumin dextrose catalase(OADC; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 0.8ml과 DMSO에 농도별로 희석한 추출물 0.1ml을 넣은 후 1×10^5 CFU/ml 농도의 결핵균 H37Ra(ATCC 35835) 0.05ml를 접종하였다. 7H9 액체배지에 결핵균만 접종한 것을 대조군으로 사용하였다.

데이터 분석은 60분마다 알고리즘에 의해 균의 성장 유무가 자동 검색되는 MGIT 960 배양기에서 6주 동안 배양하면서 균이 성장하여 양성으로 반응한 시간 및 결핵균의 growth unit 값을 비교 분석하여 수행하였다.

결핵균의 형태학적 관찰

Scanning electron microscope(SEM)을 통해 결핵균의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 차가버섯 추출물을 72시간 동안 처리한 결핵균은 2% glutaraldehyde로 2시간 동안 고정 한 후 0.1M 인산 완충용액으로 희석된 1% OsO₄에서 1.5시

간 동안 후고정을 실시하였다. 고정된 시료는 0.1M PBS(pH 7.4)로 10분 동안 3회 수세한 후 50~100%의 에탄올로 탈수시켰다. 건조제는 hexamethyldisilazene (Sigma)를 사용하였고 준비된 시편은 백금 스퍼터링을 이용하여 코팅한 후 FE-SEM(JSM-7401F, JEOL)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

항결핵 활성 측정기기인 형광분석기 MGIT 960 system을 이용하여 버섯을 신규 항결핵 소재로 개발하고자 하였다. 결핵은 국내에서 40% 이상이 보균자로 보고되어 있으며 생활환경에 따라 체내 면역력이 현저히 떨어질 때 발병하는 질병이다. 최근에는 OECD 국가 중에서 가장 높은 사망률을 보이고 있는 질병으로 20대 전후의 젊은 층에서 많이 발병하고 있다. 본 연구에서는 국내에서 유통 중인 버섯류 중 차가버섯에서 항결핵 활성을 가진 생리활성물질을 분리하기 위하여 용매분획 활성 시험을 수행하였다. 분획물의 항결핵활성은 결핵균만을 처리한 대조군과 결핵균 및 차가버섯 추출물을 처리한 시험군의 growth days를 비교하여 확인하였다. 차가버섯 분획물 중 메틸클로라이드 분획물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 실험군에서 결핵균의 평균 검출시간은 14.7일로 차가버섯 추출물 중 결핵균의 증식을 가장 오랫동안 억제하는 것을 확인하였으며 이는 항결핵제 첨가하지 않은 음성 대조군에 비해 약 5일의 차이를 보였다(Table.1).

차가버섯 추출물을 처리한 결핵균에서 일어나는 형태학적 변화는 SEM으로 관찰하였다. 무처리구인 음성 대조군(Fig. 1)과 비교해 보면 Rifampin을 처리한 양성 대조군에서는 결핵균의 세포벽에 뚜렷한 변화는 없었으나 간혹 세포의 형태가 일그러져 있는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 차가버섯 추출물의 에틸아세테이트 분획물과 메틸클로라이드 분획물을 처리한 결핵균은 세포 표면에 둥글한 형태의 particles이 관찰되었다. 이는 결핵균의 세포벽 성분이 mycolic acid 합성 저해능을 갖는 약물인 isoniazid 처리 후 전자현미경으로 관찰한 것과 유사한 결과를 보이는 것을 확

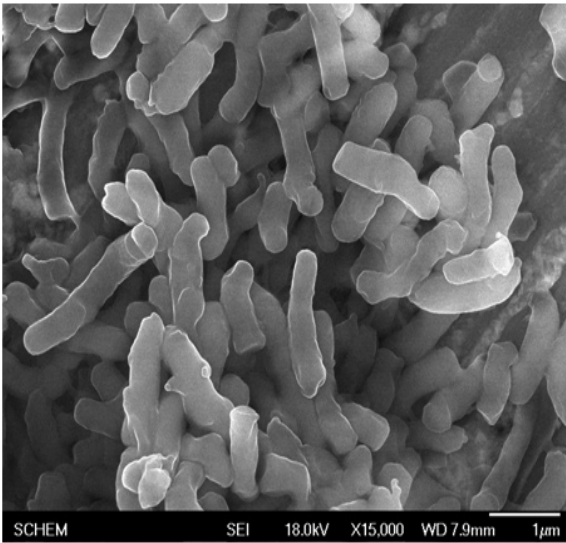


Fig. 1. Scanning electron micrograph of pulmonary tuberculosis surface of negative control. Pulmonary tuberculosis surface is clean and healthy.

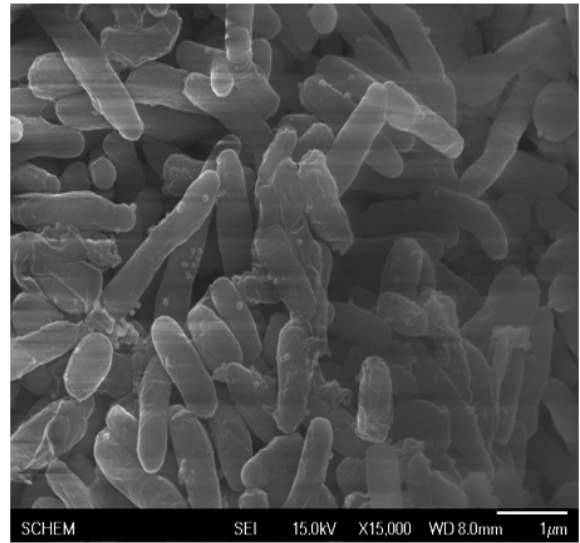


Fig. 3. Scanning electron micrograph of pulmonary tuberculosis surface with ethyl acetate fraction treatment. Crack is formed on the pulmonary tuberculosis surface.

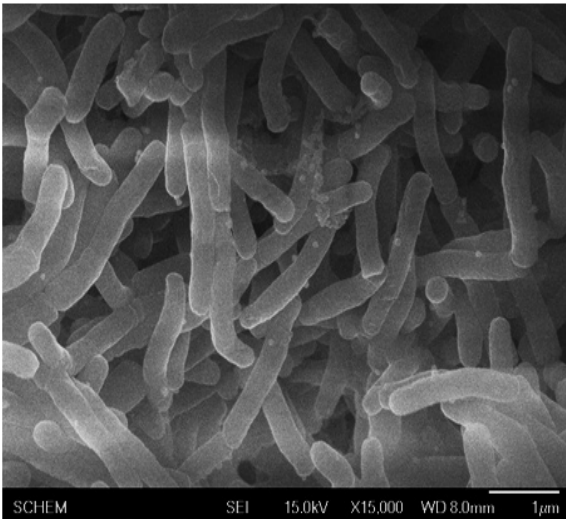


Fig. 2. Scanning electron micrograph of pulmonary tuberculosis surface with methylene chloride fraction treatment. Crack is formed on the pulmonary tuberculosis surface.



Fig. 4. Scanning electron micrograph of pulmonary tuberculosis surface with rifampin treatment. Crack is formed on the pulmonary tuberculosis surface.

인하였다 (Taka yama 등, 1973; Catherine 등, 2000). 이것으로 보아 차가버섯 추출물이 세포벽 지질 성분의 생합성을 저해하거나 제거하여 생성된 결핵균의 세포벽 성분으로 사료된다(Fig. 2, 3).

결핵균 세포벽의 지방산은 분지(branch)형의 긴 사슬 구조를 형성하며 긴 사슬의 분지성 지방산은 mycolic acid로 구성되어 있어서 수분과 기름 성분 모두가 통과하기 어려운 구조로 결핵을 치료하기 위해 사용되는 약물들 중 mycolic acid 합성을 저해하는 약물들(isoniazid, ethinamide 등)이 포함되어 있는데 이 약물에 내성을 갖는 결핵균의 경우 결핵 치료를 위해 사용되는 항생제 약물도 결핵균 세포벽을

통과하지 못함으로써 결핵균이 자연적인 약물 저항성이 생기며 다재내성 결핵균의 출현으로 이어진다고 사료된다 (Johnson 등, 2006).

그러므로 mycolic acid 합성 억제 약물에 내성을 갖는 결핵 치료를 위해 결핵균의 세포벽 성분인 mycolic acid 합성 저해를 target으로 갖는 새로운 약물의 개발이 절실히 필요할 것으로 사료된다.

차가버섯이 결핵균의 세포벽 합성을 억제하거나 제거하는 기전을 갖는 것을 확인하였으며 이는 항결핵 신약의 중요한 표적 중 하나이며 차가버섯이 결핵균에 작용하는 정확한 약물 표적(drug target) 유전자를 찾아낼 필요가 있을

것으로 사료된다.

특히 차가버섯 메탄올 추출물을 용매별로 분획한 분획물에 대한 항결핵 활성을 비교하였을때 ethyl acetate 분획물보다 methylene chloride 분획물에서 높은 활성을 나타내었으며 methylene chloride는 비극성 용매에 속하므로 활성물질은 비극성의 저분자 물질로 추정된다. 또한 현미경학적으로 관찰한 결과 음성대조군에 비하여 양성대조군인 리팜핀 처리군과 차가버섯 추출물인 methylene chloride 분획물 및 ethyl acetate 분획물이 결핵균 표면 조직을 파괴시키며 항결핵 활성을 보이는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과를 근거로 지속적인 실험을 수행한다면 항결핵 활성 단일물질의 확인도 가능할 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 논문은 안동시 농업기술센터 연구개발사업의 연구비를 지원받아 수행된 연구입니다.

참고문헌

- 김민아, 정용석, 전계택, 차연수. 2009. C57BL/6J Mice에서 단백질다당체 함유 차가버섯 균사체의 지질개선 및 혈당조절효과. 한국식품영양과학회지. 38 : 667-673.
- 김형자, 진창배, 이용섭. 2007. 차가버섯으로부터 분리한 페놀성 화합물의 항산화효과. 생약학회지. 38 : 164-169.
- 정봉환, 서훈석, 김홍식, 우선희, 조용구. 2010. 상황버섯, 차가버섯, 느타리버섯 발효식초의 항산화와 항암활성 효과. 한국약용작물학회지. 18 : 113-117.
- 함승시, 오상화, 김영균, 신광순, 장현유, 정국훈. 2003. 차가버섯 분획물의 항돌연변이 활성 및 암세포 성장억제효과. 한국식품영양과학회지. 32 : 1088-1094.
- 황용주, 노건웅, 김선희. 2003. 차가버섯 추출물이 소화기계 암세포의 증식 및 Caspase-3 활성에 미치는 영향. 한국영양학회지. 36 : 18-23.
- Kim, Y. R. and Hong, E. K. 2011. *Inonotus obliquus* Protects MIN6N Beta-cells from Oxidative Damage by Hydrogen Peroxide. The Korea Society for Biotechnology and Bioengineering.
- Kim, E. K., Lee, S. J., Hwang, J. W., Kim, C. G., Choi, D. K., Lim, B. O., Kang, H., Moon, S. H., Jeon, B. T., and Park, P. J. 2011. In Vitro investigation on anti-oxidative effect of *Inonotus obliquus* extracts against oxidative stress on PC12 cells. J. Kor. Soc. for App. Bio. Chem. 54 : 112-117.
- Vilcheze, C., H. R. Morbidoni, T. R. Weisbrod, H. Iwamoto, M. Kuo, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs, 2000. Inactivation of the inhA-Encoded Fatty Acid Synthase II (FASII) Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Induces Accumulation of the FASI End Products and Cell Lysis of Mycobacterium smegmatis. Journal of Bacteriology. 182 : 4059-4067
- Collins and Franzblau, L. A. Collins and S.G. Franzblau. 1997. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 41, pp. 1004-1009.
- Newman, D. J. and Crgg, G. M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod., 70 : 461.
- Koehn, F. E. and Carter, G. T. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. Carter. Nat. Rev. Drug Disc. 4 : 206.
- Johnson R., Streicher E. M., Louw G. E., Warren R. M., Helden P. D., and Victor T. C., 2006. Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. Curr. Issues Mol. Biol. 8 : 97-112
- O'Brien, R. J. and Nunn, P. 2001. The need for new drugs against tuberculosis: Obstacles, opportunities, and next steps. Am. J. Respir. Cell Mol. Crit. Car. Med. 162 : 1055.
- Takayama K., Wang L. and Merka l. R. S. 1973. Scanning Electron Microscopy of the H37Ra Strain of Mycobacterium tuberculosis Exposed to Isoniazid. American Society for Microbiology. 4 : 62-65
- World Health Organization. Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing, HO Report 2007. WHO/HTM/TB/ 2007.376. World Health Organization 2007.
- World Health Organization. TB—a global emergency—WHO report on the TB epidemic. Tuberculosis Programme, WHO, Geneva, 1994. (A.71), WHO/TB/94. 177.
- Yun, J. S., Pahk, J. W., Lee, J. S., Shin, W. C., Lee, Y., and Hong, E. K. 2011. *Inonotus obliquus* protects against oxidative stress-induced apoptosis and premature senescence. Molecules and cells. 31 : 423-429 .