

팽이버섯 추출물의 항산화 및 항염증 활성

강 현 우

영산대학교 한국식품조리학과

Antioxidant and Anti-inflammatory Effect of Extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer

Hyun Woo Kang

Dept. of Korean Food & Culinary Arts, Youngsusan University, Busan 612-080, Korea

Abstract

The potential antioxidant and anti-inflammatory effect of water and ethanol extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer (FVS) on hydrogen peroxide (H_2O_2) and LPS-induced oxidative damage in PC-12 and RAW264.7 cells were investigated. The DPPH radical scavenging activities of the water extract from FVS was the highest, and the 50% inhibitory concentration value was 0.388 mg/mL. Also, the antioxidant activities of water and ethanol extracts were determined by ferric reducing antioxidant power, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activity. In addition, water extract from FVS showed a strongly inhibitory effect on lipid peroxidation by measuring ferric thiocyanate values. The water extract decreased cell apoptosis in PC-12 cells against H_2O_2 -induced oxidative damage. In addition, FVS extracts exhibited the strongest nitric oxide (NO) inhibition activity. It was also found that FVS extract inhibited LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells. The findings of the present study suggest that extracts of FVS exhibit anti-oxidative and anti-inflammatory activity against oxidative stress and/or stimulated cells.

Key words: antioxidant, anti-inflammation, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, hydrogen peroxide

서 론

필요 이상으로 많은 산소가 체내로 유입된 경우 대사과정에서 잔여 산소 중 일부는 활성이 큰 자유라디칼이 생성되는데 반응성이 큰 자유라디칼은 체내 세포에 손상을 주고 최종적으로 세포사를 유도한다(1). 이와 같은 세포사는 노화나 염증 등의 질병으로 진행이 되며 특히 염증성 질환과 밀접한 관계를 갖고 있는데(2) 산화적 손상 및 자극에 대하여 염증성 사이토카인이나 단백질이 발현하여 염증을 유발한다고 알려져 있다(3). 따라서 자유라디칼은 생체 내의 불균형이 문제이며, 이러한 자유라디칼을 조절하기 위한 항산화제의 복용이 증가되고 있는 추세이다. 항산화제의 연구는 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), *tert*-butylhydroquinone(TBHQ) 그리고 propyl gallate(PG)와 같은 합성 항산화제가 강력한 항산화제 기능을 지니고 있긴 하지만, 여러 가지 부작용(3,4) 때문에 합성 항산화제의 사용을 기피하는 추세이며 이에 따라 많은 연구자들은 안전성과 부작용에 대한 각종 질병의 예방 및 치료가 동시에 가능한 천연 항산화제 개발에 초점을 두고 연구가 이루어지고 있다(5). 또한, 천연 항산화제에 대한 관심이 높

아짐에 따라 특히 생리활성이 우수한 버섯 유래의 천연 항산화 물질에 관한 연구 또한 활발히 진행 중이다(6).

염증반응은 이러한 자유라디칼에 의하여 생체 내의 조직 손상을 유발하고 그 외 감염에 의해 발생하며, 대표적인 요인으로 macrophage 등이 병원체에 반응하여 interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, 그리고 tumor necrotic factor- α (TNF- α)와 같은 사이토카인(cytokine)을 생성하고, iNOS와 cyclooxygenase-2(COX-2)를 생합성하여 nitric oxide(NO) 및 prostaglandin E2(PGE2)를 생성한다(7-10). 일반적으로 NO는 생체 내에서 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하며 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 하며(11), neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS) 그리고 iNOS 세 가지 형태의 NOS에 의해 합성된다. nNOS와 eNOS는 세포 내에 항상 존재하지만, iNOS는 interferon- γ , LPS 그리고 다양한 염증유도 사이토카인에 노출되는 경우에만 발현된다(9). 따라서 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성되고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다(12). Prostaglandin E2(PGE2)는 통증과 발열에 주로

관여하는 염증 인자로서 염증 반응이 일어나면 대식세포의 COX-2에 의해 생성된다(13). 따라서 염증 반응에서 생성되는 물질 중 iNOS, COX-2와 같은 물질의 생성 억제를 확인하여 항염증 효과를 확인할 수 있다(14).

본 연구에 사용한 송이과의 팽이버섯은 내한성 균으로 식용이 가능하고 팽나무의 그루터기에서 생성되며, 전 세계적으로 분포되어 있다. 팽이버섯에는 펠수아미노산, 비타민, 무기질이 다량 함유되어 있고 특히 비타민 B 성분 함량이 높은 것으로 보고되어지고 있으며 버섯류에는 베타글루칸 함량이 높으며 이 베타글루칸은 생리활성이 매우 우수한 것으로 알려져 있고 버섯의 동물모델을 이용한 뇌의 지질 산화의 억제 효능(15), 항염증 활성(16,17) 및 혈압 강하 작용에도 관여한다고 보고되어지고 있다(18).

따라서 본 연구에서는 팽이버섯 추출물의 항산화 및 항염증 활성을 탐색하고 신경세포인 PC-12와 마크로파지 세포인 RAW264.7을 이용하여 세포 보호 효능을 확인하여 팽이버섯을 이용한 생리 기능성 바이오 소재 개발을 위한 기초자료로 제공 및 응용하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 버섯은 재래시장(부산, 한국)에서 구입하여 읍지에서 건조하여 마쇄 후 사용하였다. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS), potassium persulfate, 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ), linoleic acid, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)와 LPS는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양계에서 항산화 작용과 항염증 활성을 측정하기 위해 사용한 PC-12와 RAW264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 또한, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Fetal Bovine Serum(FBS), penicillin-streptomycin는 Invitrogen사(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 항체로 사용한 iNOS와 COX-2 그리고 actin은 Cell signaling(Danvers, MA, USA)제품을 사용하였고 그 외의 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

버섯 추출물 제조방법

실험에 사용된 시료 추출을 위하여 열수와 에탄올 추출을 시행하였다. 팽이버섯 건조 분말 시료 50 g에 3차 멸균 증류수와 에탄올(95%)을 각각 1,000 mL을 첨가하여 추출하였고 같은 과정을 3회 반복하여 여과지(No. 5, Whatman, Maidstone, England)로 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조하여 시료화 한 후 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

라디칼 소거능 측정은 Lee 등(19)의 방법에 따라 메탄올에 용해시킨 60 μM DPPH 60 μL와 농도별로 준비한 시료 60 μL를 섞은 후 10초간 강하게 교반하여 2분간 실온에서 방치한 후 capillary tube에 옮겨 ESR spectrometer(Jeol Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 측정하였으며, 그 측정 조건은 central field: 3475 G, modulation frequency: 100 kHz, modulation amplitude: 2 G, microwave power: 5 mW, gain: 6.3×10^5 , temperature: 298 K였다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력 측정

ABTS 라디칼을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리라디칼이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 Park 등(20)의 방법에 따라 7 mM ABTS 용액에 potassium persulfate를 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12~16시간 동안 반응시켰다. 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정한 후 3.0 mL를 취하여 추출물 1.0 mL를 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ferric reducing antioxidant power(FRAP)를 이용한 총 항산화력 측정

FRAP 측정은 Benzie와 Strain(21)의 방법을 사용하였다. 즉, 300 mM acetate buffer(pH 3.6), 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 및 20 mM FeCl₃·6H₂O를 각각 10:1:1(v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP 시약을 제조하였다. 이어서 고품분 함유량이 1~5 mg 되도록 희석한 시료액 0.15 mL과 3.0 mL의 FRAP 시약을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 FeSO₄·7H₂O를 표준물질로 하여 mM FeSO₄ eq./mg extract로 표시하였다.

Ferric thiocyanate(FTC) 방법에 의한 지질과산화 억제 활성 측정

FTC에 의한 지질과산화 측정은 Kikuzaki와 Nakatani(22)의 방법에 의해 측정하였다. 추출물 4.0 mL, 2.51% linoleic acid 4.1 mL, 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0) 8.0 mL, 증류수 3.9 mL를 첨가하여 용액을 잘 혼합한 후 40°C 어두운 곳에서 항온처리 하여 과산화를 유도시켰다. 이 혼합용액 0.1 mL, 75% ethanol 9.7 mL, 30% ammonium thiocyanate 0.1 mL를 순서대로 첨가한 후 잘 섞어주었다. 여기에 20 mM ferrous chloride(3.5% HCl에 녹인 것)를 0.1 mL 가한 후 잘 섞이도록 한 후 정확히 3분 후에 UV-VIS Spectrophotometer를 이용하여 500 nm에서 변화된 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군으로는 시료 대신 물을 사용하여 반응시켰고, 양성 대조군으로 α-tocopherol을 사용하였다.

세포 배양

PC-12 세포의 배양은 DMEM 배지에 10% 불활성 시킨

FBS를 첨가하고 항생제를 mL당 10 µg 넣은 것을 사용하였다. PC-12 신경세포를 10~12번의 계대배양을 통해 세포가 안정된 상태에서 실험을 진행하였다. 또한, RAW264.7 세포는 PC-12세포와 동일한 조건의 배지를 사용하였고 배양기의 온도는 37°C이었으며 5%의 농도로 CO₂를 사용하였다.

세포 생존율 측정

세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다(23). 세포를 24-well plates에 5×10^4 cells/mL 농도로 1.0 mL씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양하고 각 시료를 최종 농도(0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 그리고 2.0 mg/mL)가 되도록 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT 용액(5.0 mg/mL)을 가하고 37°C에서 4시간을 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan이 배지에서 분리되지 않도록 배지를 제거하였다. DMSO를 200 µL 분주하여 20분 동안 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide(NO) 생성 억제효과 분석

RAW264.7 세포를 24-well plates에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 12시간 배양하였다. 각 버섯 추출물을 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 그리고 2.0 mg/mL와 LPS 1.0 µg/mL의 농도로 동시처리 또는 LPS 단독처리 하여 18시간을 배양하였다. NO의 측정은 Griess reagent system을 이용하여 측정하였다.

유세포 분석기를 이용한 세포사 측정

수확한 세포를 PBS로 씻어주고 원심분리기에서 15분, 2회 반복하고 그 세포에 0.5% Tween-20이 첨가된 에탄올로 고정을 시킨다. 그리고 RNase A 10 µg/mL와 프로피디움 요오드화물 0.05 mg/mL를 1 mL의 PBS에 넣어서 세포에 넣고 30분간 37°C에서 방치 후 유세포 분석기로 측정을 하였다(FACS-caliber, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Western blot법을 이용한 단백질 발현량 분석

RAW264.7 세포를 24 well plate에 2×10^6 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후 single-detergent lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 1% Nondet P-40, 1 µg/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가한 후 sonication으로 잘 혼합시킨 후에 반응시킨다. 단백질 정량은 BCA protein assay reagent kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 결정하였다. 각 시료의 단백질 양을 동일하게 하고 12% SDS PAGE로 전개시키고 protran nitrocellulose transfer membrane(Schleicher & Schuell, Hanover, Germany)을 사용하여 transfer했다. Membrane을 5% Tween-20 Tris-buffer에 skim milk로 block하고 일차항체로 24시간 결합시킨 후 이차항체로 반응시킨다. ECL 용액(Amersham Pharmacia Biotech, Piscat-

away, NJ, USA)을 섞어 membrane에 용액을 처리한 후 1분간 반응시키고 측정하였다.

통계분석

모든 결과는 3회 반복 측정 후 평균±표준편차로 나타내었으며, 유의성 검증은 Graph Pad Prism(Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 Student *t*-test one way를 이용하였으며 Duncan's new multiple range test으로 사후검증 하였다.

결과 및 고찰

추출물의 라디칼 소거활성

생체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 산화를 일으키기 쉬운 자유라디칼 중 DPPH 라디칼은 보라색으로 반응성이 매우 안정하기 때문에 기존의 천연 혹은 합성 항산화 물질의 분석에 많이 이용되고 있다(1). DPPH는 항산화 활성이 있는 물질과 반응하면 라디칼이 소거되어 짙은 자색이 탈색되어 흡광도가 감소하는 원리를 이용함으로써 항산화 물질의 수소 공여능을 측정하는데 널리 이용되어진다(24). 본 연구에서 추출한 팽이버섯은 열수 추출물이 39.7±2.38%, 그리고 에탄올 추출물이 21.3±1.77%의 수율을 각각 나타내었다. 본 연구와 기존 노루궁뎅이버섯 혹은 능이버섯에 대한 추출물과 비교를 하였을 때 유사한 결과를 확인하였으며 팽이버섯 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정된 결과 열수 추출물의 2.0 mg/mL의 농도에서 95.24%의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다(data not shown). 50% 라디칼을 저해하는 농도(IC₅₀)의 값은 2.0 mg/mL에서 반회색법을 이용하여 얻었으며 열수 추출물과 에탄올 추출물이 각각 0.388±0.007, 0.412±0.019 mg/mL로 이는 양성대조군인 비타민 C보다는 소거활성이 낮았지만 일차적 추출이기 때문에 분리·정제를 통한 유효물질에 대하여 높은 가능성을 가지고 있다(Table 1). Oh와 Lee(6)는 팽이버섯 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거능에 대하여 시료농도 0.2 mg/assay 시 11.99%, 0.5 mg/assay 시 24.90%, 1.0 mg/assay 시 31.77%의 라디칼 소거능을 확인하였고 이는 팽이버섯 에탄올 추출물의 처리농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거활성이 증가한다고 보고하였다. 이는 본 연구결과와 소거능을 비교하였을 때 유사하지만 본 연구에서 사용한 팽이버섯 추출물의 효능이 더 우수한 것을 확인하였다. Lee 등(25,26)은 능이버

Table 1. DPPH radical scavenging activity of water and ethanol extracts from *Flammulina velutipes* (Curt. & Fr.) Sing (IC₅₀ mg/mL)

	Water extract	Ethanol extract
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt. & Fr.) Sing.	0.388±0.007 ¹⁾	0.412±0.019
Vitamin C	0.003±0.001	

¹⁾Values represent means±SD (n=3).

Table 2. ABTS radical scavenging and FRAP activity of water and ethanol extracts from *Flammulina velutipes* (Curt. & Fr.) Sing

	TEAC (mM Trolox eq./mg extract)	FRAP (mM FeSO ₄ eq./mg extract)
Water extract	0.328±0.031 ¹⁾	0.810±0.120
Ethanol extract	0.246±0.052	0.486±0.055
BHT	1.503±0.021	1.301±0.133

TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity, FRAP: Ferric reducing antioxidant power.

¹⁾Values represent means±SD (n=3).

섯과 노루궁뎅이버섯에 대한 DPPH 라디칼 소거능이 pepsin 효소를 이용하여 가수분해한 물질이 우수하다고 보고하였다. 효소를 이용한 가수분해 추출물은 일반 추출보다 저분자화 되어 생리활성을 높인다는 연구결과에 기인한 것으로서 IC₅₀ 값은 0.734와 0.205 mg/mL이었다. 본 연구와 비교하였을 때, 팽이버섯 열수 추출물이 능이버섯 pepsin 가수분해물보다 약 2배 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하였고 노루궁뎅이버섯과 유사한 결과를 확인하였다. Kim 등(27)의 연구에서 보고한 차가버섯의 효소 가수분해물의 DPPH 라디칼의 소거활성과 본 연구의 결과도 유사한 수치를 확인하였다.

이러한 라디칼 소거활성을 바탕으로 버섯을 이용하여 천연 항산화제로써의 사용이 가능할 것으로 기대된다.

ABTS 라디칼을 이용한 총 항산화력

버섯류의 항산화 활성은 주로 버섯류 자실체 추출물 내에 존재하는 flavonoids 및 phenol 함량에 따라 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 소거하는 효과가 나타난다(28). Kim 등(29)도 팽이버섯에 polyphenol성 함량이 높을수록 전자공여능이 높았다고 보고하였고 버섯류로부터 추출한 단백질-다당체에 대한 자유라디칼 소거활성도 보고하였다. Table 2는 팽이버섯의 추출물에 따른 ABTS 라디칼 소거활성을 분석한 결과로써, 열수 및 에탄올 추출물 모두 ABTS 라디칼 소거능이 높게 나타났으며 각각 0.328±0.03, 0.246±0.05 mM Trolox eq./mg extract의 활성을 나타내었다. Kim 등(5,30)은 돼지감자잎과 왕귀뚜나리의 열수 추출물의 ABTS 소거능이 0.416과 0.073 mM Trolox eq./mg extract라고 보고하였고 에탄올 추출물의 ABTS 소거능은 0.192, 0.130 mM Trolox eq./mg extract 것과 비교하였을 때, 팽이버섯 열수 추출물이 돼지감자잎과 왕귀뚜나리 열수 추출물보다 유사하거나 약 네 배 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 나타내었다. 본 결과들을 바탕으로 세포모델을 이용한 연구를 진행할 때 팽이버섯 열수 추출물을 선택하여 연구를 진행하였다.

FRAP을 이용한 총 항산화력

FRAP법은 전자공여 능력을 통해 산화 활성을 검증하는 방법 중 하나로 즉 산화제로 작용하는 Fe³⁺와 항산화제와의 반응을 통해 생성된 Fe²⁺을 흡광도를 통해 정량할 수 있는

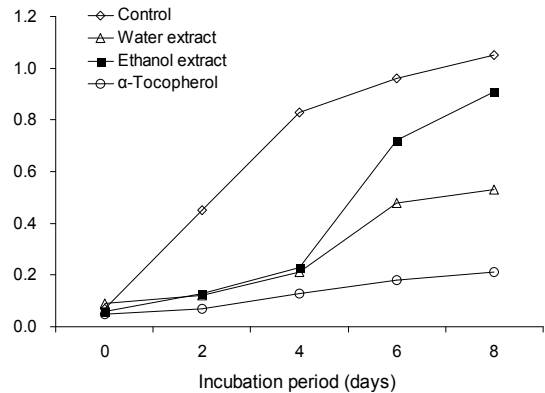


Fig. 1. Antioxidant activities of water and ethanol extracts at 1.0 mg/mL in linoleic acid auto-oxidation system measured by the ferric thiocyanate (FTC) method.

방법(30)으로 본 연구에서는 항산화 활성을 측정하기 위해 사용하였다. 본 연구의 결과로 팽이버섯 열수 및 에탄올 추출물이 높은 효과를 확인하였고 각각 0.810±0.12, 0.486±0.05 mM FeSO₄ eq./mg extract를 확인하였으며, 열수 추출물의 경우 양성대조군인 BHT에는 못 미치지만 높은 활성으로 인하여 항산화제로써 가능성을 제시하였다(Table 2).

지질과산화 억제 활성

팽이버섯의 열수 및 에탄올 추출물을 첨가하여 FTC 방법으로 지질과산화 억제 활성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군에서는 시간이 지남에 따라 과산화지질이 생성되어 흡광도가 점차적으로 증가하였으며 8일째까지 증가하는 경향을 나타내었다. 추출물을 첨가한 처리구는 FTC 방법에서 4일째 이후에 산화가 급격히 진행되는 경향을 나타내었으나, 열수 추출물과 에탄올 추출물 모두 8일째까지 산화가 급격히 증가하지는 않았고 에탄올 추출물보다 열수 추출물이 지질과산화 억제 활성이 우수한 것을 확인하였다. 양성대조군으로 사용한 α-토코페롤은 대조군 및 모든 추출물보다 높은 지질과산화 억제활성을 나타내었다. 따라서 팽이버섯 열수 추출물의 경우 천연 항산화제인 α-토코페롤과 큰 차이를 보이지 않아 가공을 통한 천연 항산화제로써 사용이 가능할 것으로 판단된다.

세포 생존율

팽이버섯 열수 추출물을 이용하여 정상 신경세포인 PC-12와 마크로파지 세포인 RAW264.7 세포에 대한 세포 생존을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였으며, PC-12 세포의 경우 팽이버섯 열수 추출물을 농도별로 처리한 결과 1.0 mg/mL 농도 이상에서는 세포 생존이 진행하지 못한 것을 확인하였다[Fig. 2(A)]. 또한, RAW264.7 세포에서도 마찬가지로 2.0 mg/mL 이하의 농도에서 100% 이상의 세포 생존을 확인하였다[Fig. 2(B)]. Kim 등(27)은 차가버섯에 대한 가수분해물이 PC-12세포에 본 연구와 유사한 결과인 2.0 mg/mL의 농도에서 세포 생존이 100% 이상임을 보고하였다. 그러므로 팽이버섯 열수 추출물의 세포 보호 효과 측정

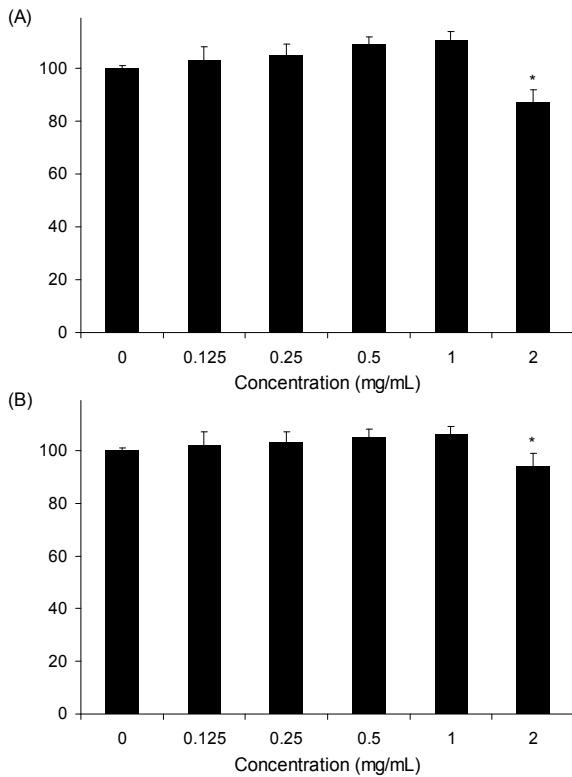


Fig. 2. Effect of water extract on cytotoxicity in PC-12 cells (A) and RAW264.7 cells (B). Water extract was treated with various concentrations in PC-12 and RAW264.7 cells for 24 hr. Values are expressed as the mean \pm SD (n=3) of determinations made in triplicate experiments. *p<0.05 versus 0 mg/mL.

을 할 때 0.125, 0.25, 0.5 그리고 1.0 mg/mL의 농도를 선택하여 다음 실험을 진행하였다.

NO 생성 억제 효과

세균 내독소로 알려진 LPS를 마크로파지에 처리하게 되면 염증성 cytokine, NO와 같은 매개물질이 생성되어 병리학적인 반응이 유발되어진다(31). RAW264.7 세포에 LPS(100 ng/mL) 단독처리군 및 LPS와 항산화 활성이 우수했던 팽이버섯 열수 추출물을 0.125, 0.25, 0.5 그리고 1.0 mg/mL 농도의 동시처리군의 NO 생성 억제 효과를 확인하였다(Fig. 3(A)). 팽이버섯 열수 추출물에 대하여 농도 의존적으로 NO 생성 저해 활성을 확인하였으며 1.0 mg/mL의 농도에서 유의적인 NO 생성 저해 활성을 나타내었다.

유세포 분석기를 이용한 세포사 분석

PC-12 세포에 총 1.0 mM H₂O₂ 처리에 의한 세포사 수준이 대조군에서는 약 40%를 나타내었지만, 팽이버섯 열수 추출물을 처리한 경우 농도 의존적으로 그 수준이 감소하는 것을 확인하였다. 0.125, 0.25, 0.5 그리고 1.0 mg/mL의 농도에서 각각 35, 29, 24, 18%의 세포사에 대한 결과에 따라 팽이버섯 열수 추출물이 1.0 mM H₂O₂에 대하여 세포사가 유도되는 손상을 보호하는 것을 확인하였다(Fig. 3(B)). Lee 등(25)의 연구에서는 팽이버섯 maltogenase 가수분해물의 1.0

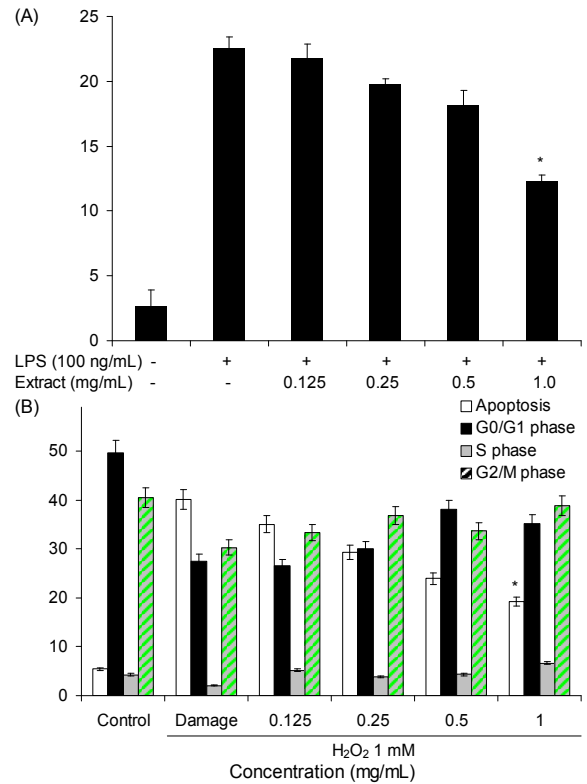


Fig. 3. (A) Effect of water extract on NO production in RAW 264.7 cells. (B) PC-12 cells were treated with hydrogen peroxide and water extract. Values are mean \pm SD (n=3) of determinations in each case. *p<0.05 versus LPS or hydrogen peroxide group.

mg/mL 농도에서 약 25%의 세포사가 유도된 결과와 비교하였을 때 본 연구의 팽이버섯 열수 추출물 처리 시 팽이버섯 효소 처리군보다 세포 보호효능이 더 우수하다는 결과를 확인하였다. 따라서 1.0 mM H₂O₂ 처리로 인해 발생하는 세포사의 증가를 팽이버섯 열수 추출물이 감소시켰으므로 신경 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

마크로파지 세포의 단백질 발현량 분석

염증반응 매개물질인 NO와 PGE2는 각각 NOS와 COX2는 효소에 의하여 생합성 되는데(9,10) 앞에서 연구된 팽이버섯 열수 추출물에 의한 NO의 생성억제효능과 iNOS와 COX-2의 단백질 발현억제에도 기인하는지 확인하고자 western blot으로 분석하였다. RAW264.7 세포에 LPS(100 ng/mL) 단독처리군과 팽이버섯 열수 추출물 1.0 mg/mL의 농도로 동시처리군에 대하여 24시간 배양하였고 그 결과, iNOS 단백질 발현 억제에 크게 관여하는 것을 확인하였지만(Fig. 4(A)) COX-2에서는 유의적으로 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 4(B)). 이러한 결과로부터 팽이버섯 열수 추출물이 iNOS의 발현억제효과(54.7%)가 탁월함을 확인할 수 있었으며 iNOS의 발현억제가 NO의 생성억제를 유도함을 확인할 수 있었다.

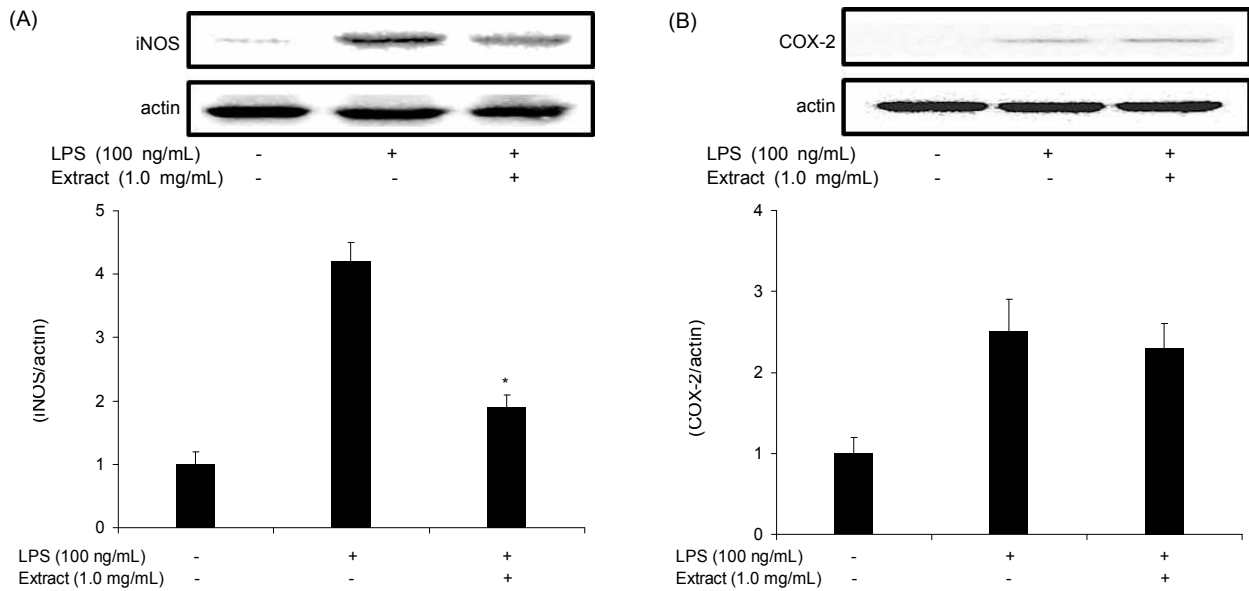


Fig. 4. Effect of water extract on LPS-induced iNOS (A) and COX-2 (B) expression in RAW264.7 cells. Data are presented as the mean \pm SEM (n=3) for three independent experiments. *p<0.05: compared with the LPS-treated group by ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison test.

요 약

본 연구는 팽이버섯으로부터 열수 및 에탄올 추출물의 항산화와 항염증 활성을 탐색하였다. 라디칼 소거능을 측정할 결과, DPPH 라디칼 소거능은 팽이버섯 열수 추출물의 경우 천연 항산화제인 비타민 C보다 활성이 우수하지는 않지만 다른 종류의 버섯 추출물보다 우수한 효능을 확인하였고 추후 분리, 정제를 통하여 유효 물질을 발굴하여 새로운 소재를 찾아내는 연구가 필요할 것으로 판단된다. ABTS 라디칼 소거능과 FRAP을 이용한 총항산화 효능에 관한 결과에서도 팽이버섯 추출물이 항산화 효과를 나타내는 것을 확인하였고, FTC법을 이용한 지질과산화 억제 효능을 살펴본 결과도 마찬가지로 열수 추출물이 에탄올 추출물보다 항산화 활성이 우수한 것을 확인하였다. 한편, 세포 독성을 살펴보기 위하여 항산화력이 우수한 팽이버섯 열수 추출물을 이용하여 정상 신경세포에 MTT assay를 수행한 결과, 세포의 생존율은 1.0 mg/mL의 이하 농도까지는 생존에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였고 신경세포 보호효능 실험에서는 1.0 mM H₂O₂로 유도시킨 세포사에 대해 농도의존적인 신경세포 보호 효과가 있는 것을 확인하였으며, 마크로파지 세포에서도 독성에 대하여 신경세포와 유사한 결과를 확인하였다. NO의 저해효능도 농도 의존적으로 감소하였고 추가적으로 세포의 유전학적 분석인 western blot으로 iNOS와 COX-2를 수행하였을 때 LPS군에 비해 팽이버섯 열수 추출물군에서 iNOS 단백질 발현량이 감소하는 것을 확인하였다. 하지만 좀 더 명확한 결과를 위하여 차후 효소활성 및 동물연구등이 추가적으로 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 영산대학교 교내 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

문 헌

- Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now. *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
- Lee JH. 2007. Studies of antioxidant and anti-inflammatory activity for *Elsholtzia splendens*. *Annals of Plant Resources Research* 6: 147-161.
- Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Oh HJ, Chenong SH, Moon SH, Jeon BT, Lee SM, Park PJ. 2010. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chem* 123: 216-220.
- Ito N, Fukushima S, Tsuda H. 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants. *Crit Res Toxicol* 15: 109-150.
- Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeon BT. 2011. Antioxidant activity and protective effects of extracts from *Helianthus tuberosus* L. leaves on t-BHP induced oxidative stress in chag cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1525-1531.
- Oh SI, Lee MS. 2010. Functional activities of ethanol extracts from *Flammulina velutipes*. *Korean J Food Nutr* 23: 15-22.
- Jin JH, Kim JS, Kang SS, Son KH, Chang HW, Kim HP. 2010. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. *J Ethnopharmacol* 127: 589-595.
- Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. 1994. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transpl Int* 7: S647-S649.

9. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
10. Wink DA, Mitchell JB. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25: 434-456.
11. Kubes P. 2000. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* 47: 6-9.
12. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. 1996. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 10: 291-316.
13. Wang MT, Honn KV, Nie D. 2007. Cyclooxygenases, prostanooids and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 26: 525-534.
14. Koundouras S, Marinos V, Gkoulioti A, Kotseridis Y, van Leeuwen C. 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *J Agric Food Chem* 54: 5077-5086.
15. Kim SJ, Han D. 2005. Effect of plants extracts on lipid peroxidation of rat brain tissue induced by reactive oxygen species. *Korean J Food Sci Technol* 37: 976-982.
16. Borchers AT, Krishnamurthy A, Keen CL, Meyers FJ, Gershwin ME. 2008. The immunobiology of mushrooms. *Exp Biol Med* 233: 259-276.
17. Lee SR, Nam DY, Lee HJ, Park CH, Heo JC, Kim JG, Lee JM, Lee CY, Park HJ, Lee SH. 2009. Analysis of anti-tumor activity of *Flammulina velutipes* extract on B16 cells. *Korean J Food Preserv* 16: 599-603.
18. Kim BK, Shin GG, Jeong BS, Cha JY. 2001. Cholesterol lowering effect of mushrooms powder in hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 510-515.
19. Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Oh HJ, Yang SI, Lee SJ, Jeon BT, Kim SK, Park PJ. 2009. Free radical scavenging activity of β -chitooligosaccharides. *J Chitin Chitosan* 14: 24-28.
20. Park MK, Kim CH. 2009. Extraction of polyphenols from apple peel using cellulase and pectinase and estimation of antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 535-540.
21. Benzie IFF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
22. Kikuzaki H, Nakatani N. 1993. Antioxidant effect of some ginger constituents. *J Food Sci* 58: 1407-1410.
23. Je JY, Park PJ, Kim EK, Ahn CB. 2009. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of *Bambusae caulis* in Liguamen. *Food Chem* 113: 932-935.
24. Seo JK, Kang MJ, Shin JH, Lee SJ, Jeong HG, Sung NJ, Chung YC. 2010. Antibacterial and antioxidant activities of solvent extracts from different parts of hagocho (*Prunella vulgaris*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1425-1432.
25. Lee SJ, Kim EK, Oh HJ, Kwon HJ, Hwang JW, Moon SH, Jeon BT, Park PJ, Lim BO. 2011. Free radical scavenging activity and protective effect against H_2O_2 -induced stress in neuronal cells of enzymatic extracts from *Sarcodon aspratus*. *Korean J Medicinal Crop Sci* 19: 77-82.
26. Lee SJ, Kim EK, Hwang JW, Kim CG, Choi DK, Lim BO, Moon SH, Jeon BT, Park PJ. 2010. Neuroprotective effect of *Hericium erinaceum* against oxidative stress on PC12 cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 53: 283-289.
27. Kim EK, Lee SJ, Hwang JW, Kim CG, Choi DK, Lim BO, Kang H, Moon SH, Jeon BT, Park PJ. 2011. *In vitro* investigation on antioxidative effect of *Inonotus obliquus* extracts against oxidative stress on PC12 cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 54: 112-117.
28. Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J Food Sci Technol* 28: 232-239.
29. Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J Food Sci Technol* 33: 626-632.
30. Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. 2011. Antioxidant activity of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1642-1647.
31. Harris SG, Padila J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 23: 144-150.

(2012년 4월 19일 접수; 2012년 7월 16일 채택)