

약용버섯류 자실체의 아질산염 소거능 및 항염증 효능 분석

조재한¹ · 이강효¹ · 한재구¹ · 김형돈³ · 전창성^{2*}

¹국립원예특작과학원 버섯과

²월간버섯 J&K 버섯연구소

³국립원예특작과학원 인삼특작이용팀

Comparative analysis of nitrite scavenging activity and anti-inflammation effects in the fruiting bodies of medicinal mushrooms

Jae-Han Cho¹, Gang-Hyo Lee¹, Jae-Gu Han¹, Hyung-Don Kim³ and Chang-Sung Jhune^{2*}

¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA Chungbuk Eumseong 277-09, Korea

²J&K Institute, The Korea Mushroom Journal, Gangnam-daero 34, Seoul, Korea

³Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA Chungbuk Eumseong 277-09, Korea

ABSTRACT: This study was carried out to compare the anti-inflammation effects of various fruiting body of *Ganoderma* species and *Cordyceps militaris*, *Phelinus linteus* extracts. We concentrated *Ganoderma* species and other medicinal mushrooms by extracting with ethanol. And We made it 100 µg/ml concentration. As a result of nitrite scavenging activity, in the contrast to the positive control; Ascorbic acid was 25%, ASI 7080 of *Ganoderma* species was disappeared up to around 40%. And in the contrast to Ascorbic acid was 55%, ASI 7002 was 78.5% that was the highest anti-inflammation effect in the result of "No assay test". The *Cordyceps militaris* showed 75% and *Hericium erinaceus* showed 59.7% of anti-inflammation effect. As a result of the fungus yield control test of TNF-α through ELISA method to ASI 7002 of *Ganoderma* species that showed the highest anti-inflammation, it was reduced as same as LPS non-treatment. We extracted RNA from ASI 7002 *Ganoderma* species 10, 50, 100 µg/ml concentration and LPS 10 µg/ml of Raw 264.7 cell. And we tested the expression of iNOS, COX-2 and TNF-α that are kinds of inflammation gene after synthesizing RNA with cDNA. Finally we could find that iNOS, COX-2 and TNF-α were all controlled expression in the result of above experiment.

KEYWORDS: Nitrite scavenging activity, NO assay

서론

최근 성인병에 대한 대처방안으로 천연식품에서 기능성 물질을 섭취하려는 요구 증가에 따라 생리활성물질 개발에 노력하고 있으며, 그 중에서도 질병의 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물로 버섯이 주목받고 있다. 그 중 약용 버섯류인 영지버섯, 노루궁뎅이버섯, 상황버섯, 동충하초의 항염항암작용, 항산화 활성 효과 등이 보고되고 있으며 다양한 연구가 많이 이루어지고 있다(Jo *et al*, 2010; Um *et al*, 2010; Yongcai Qi *et al*, 2013).

따라서 본 연구에서는 영지버섯, 노루궁뎅이버섯, 상황버섯, 동충하초 자실체를 70% 에탄올로 추출하여 아질산염 소거능과 RAW 264.7세포에서 NO 생성 저해 효과; 염증관련 단백질인 iNOS, COX-2, TNF-α의 발현 억제를 확인하여 질병 치료 및 예방에 효과가 있는 천연물로

J. Mushrooms 2015 December, 13(4):330-333
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2015.13.4.330>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author

E-mail : csjhune@naver.com

Tel : +82-2-572-7723, Fax : +82-2-529-6011

Received November 27, 2015

Revised December 26, 2015

Accepted December 28, 2015

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서의 가치를 알아보기 위하여 연구를 진행하였다.

아질산염은 2급 및 3급 amine류와 반응하여 발암물질인 Nitrosoamine을 생성하는 것으로 알려져 있으며, Nitrosoamine은 체내에서 diazoalkane(C_nH_{2n}N₂)으로 변화하여 핵산이나 단백질 또는 세포내의 성분을 알카리화합으로써 암을 유발한다고 보고되어 있다. 또한 NO(nitrite oxide)형성은 체내방어기능, 신호전달기능, 혈관확장 등의 다양한 생리기능을 가지고 있지만 과도한 NO의 형성은 염증을 심화시켜 조직의 손상, 유전자변이, 패혈성 쇼크 및 신경손상 등을 일으킨다고 알려져 있다. 마우스 대식세포인 Raw 264.7 cell에 LPS (lipopolysaccharides)로 자극하여 많은 양의 NO를 형성하며 이에 의한 염증반응 관련 정도를 알아보았고, 이와 더불어 염증관련 단백질인 iNOS, COX-2, TNF-a의 발현을 억제하는지 여부를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그리고 ELISA assay를 통해 TNF-a의 생성량이 줄어드는 것을 확인하였다.

재료 및 방법

공시균주

실험에 사용된 영지버섯자실체는 Table 1과 같이 농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과에 보존되어 있는 ASI(Agricultural Sciences Institute) 균주 중 6종을 충북 음성군에 위치한 버섯과 버섯종합재배동 원목재배사에서 재배하였다. 재배법은 영지버섯의 표준재배법에 따라 참나무 원목에 재배하여 각각의 자실체를 수확한 후에 열풍 건조하여 분쇄한 시료를 얻었다. 나머지 버섯(노루궁뎅이버섯, 상황버섯, 동충하초)은 건물을 구입하여 실험에 사용하였다. (Table 1)

아질산염(NaNo2) 소거능(Nitrite-scavenging activity)

아질산염 소거능(nitrite-scavenging effect)은 Gray등의 방법으로 1 mM NaNO₂ 0.1 ml에 시료 추출물 0.2 ml, 0.1 N HCL(pH 1.2) 1 ml을 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2% acetic acid 5 ml, Griess reagent(30% acetic acid, 1% sulfanylic acid, 1% naphthylamine 1:1 비율 혼합한 것) 0.4 ml을 혼합시킨다. 이를 15분간 암반응 시킨 후 흡광도 520 nm에서 측정하여 잔존하는 아질산염량을

구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 ml를 넣어주었고, 이를 백분율(%)로 표기하였다.

$$\text{아질산염소거능 } N(\%) = \left(1 - \frac{A-X}{B}\right) \times 100$$

- A : 1 mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 방치 후 흡광도
- B : NaNO₂ 용액의 흡광도
- C : 시료자체의 흡광도

항염증 효과 (NO assay)

RAW 264.7 cell line으로부터 생성되는 nitric oxide의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 nitric oxide를 griess 시약을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. RAW 264.7 cell을 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 37°C 배양기에서 5% CO₂ 농도 하에 계대배양한 후 96 well plate에 2×10⁵ cells/ml 농도로 조절한 cell을 100 μl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 계대배양한 후 2시간 후에 각각의 시료(200 ug/ml)와 LPS(1 ug/ml) 농도로 첨가된 배지로 교체하였다. 24시간 후, 각각의 well에서 100 μl씩의 배지를 회수하여 griess reagent 100 μl 씩과 혼합하여 15분간 반응시킨 후, 540 nm에서 O.D값을 측정하였다.

Real-time PCR

ASI 7002를 열수추출 하여 농도별(10, 50, 100 μg/ml) 처리와 LPS 10 μg/ml 처리한 RAW 264.7 cell 에서 total RNA를 추출한 후, 역전사효소(reverse transcriptase)를 사용하여 complementary DNA (cDNA)를 만들고 합성된 cDNA와 primer로 PCR을 이용하여 유전자의 발현정도를 측정하였다. PCR 산물은 1.5% 한천(agarose) 겔에서 전기영동 후 EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 UV에서 증폭된 DNA band를 확인하였다. (Table 2)

Table 2. Used primer sequence in the RT-PCR

Primer name	Sequence
GAPDH-F	5'-ACA TCA TCC CTG CAT CCACT-3'
GAPDH-R	5'-AGA TCC ACG ACG GAC ACA TT-3'
INOS-F	5'-CTT TAG ACC TCA ACA GAG CC-3'
INOS-R	5'-GTA GGA CAA TCC ACA ACT CG-3'
COX2-F	5'-AAC CGT GGG GAA TGT ATG AGC A-3'
COX2-R	5'-AAC TCT CTC CGT AGA AGA ACC TTT TCC-3'
TNF-a F	5'-CTC AGA TCA TCT TCT CAA AAT TCG AGT GAC A -3'
TNF-a R	5'-CTT CAC AGA GCA ATG ACT CCA AAG T -3'

Table 1. List of *Ganoderma* strains used in this study

ASI No.	Scientific name	Collection year	Country
7002	<i>Ganoderma lucidum</i>	1980	Korea
7025	<i>Ganoderma lucidum</i>	1985	Korea
7063	<i>Ganoderma lucidum</i>	1988	USA
7071	<i>Ganoderma lucidum</i>	1988	Korea
7080	<i>Ganoderma lucidum</i>	1992	Korea
7108	<i>Ganoderma lucidum</i>	1994	Japan

사이토카인류 TNF- α 분비량 측정 (ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent assay)

10% FBS가 첨가된 DMEM으로 전 배양한 RAW264.7 cell을 24 well plate에 1×10^5 cells/ml의 농도로 24 well plate에 seeding하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 혈청이 배제된 DMEM를 가하여 12시간 starvation 시킨 후, FBS가 첨가되지 않은 DMEM에 희석한 실험물질을 가해 20분간 전처리하고. lipopolysaccharide를 가하여 16시간 배양한 후, 상층액을 취해 ELISA Kit (Biosource, USA)를 이용해 TNF- α 를 정량하였다.

결과 및 고찰

아질산염 소거능 (Nitrite-scavenging activity)

영지버섯과 기타 약용버섯류를 에탄올 용매로 추출하여 농축한 뒤, 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 아질산염 소거능을 실험한 결과 양성대조구인 Ascorbic acid는 25%인데 반해 영지버섯 중 ASI 7080은 40%이상 소거하는 것으로 나타났으며, 그 다음으로는 상황버섯이 37% 소거능을 보였다. ASI 7002도 양성대조구보다 높은 소거능을 보였고, 그 이외의 다른 실험구는 양성대조구인 Ascorbic acid보다 낮은 아질산염 소거능을 확인 할 수 있었다. (Fig. 1)

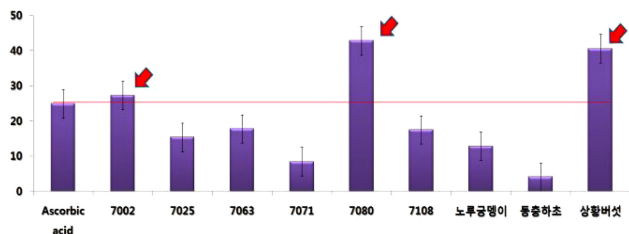


Fig. 1. Nitrite scavenging activity(%) of Ganoderma mushrooms and other medicinal mushrooms by extracting with ethanol (노루궁뎅이 : *Hericium erinaceum*, 동충하초 ; *Cordyceps militaris*, 상황버섯 ; *Phellinus linteus*)

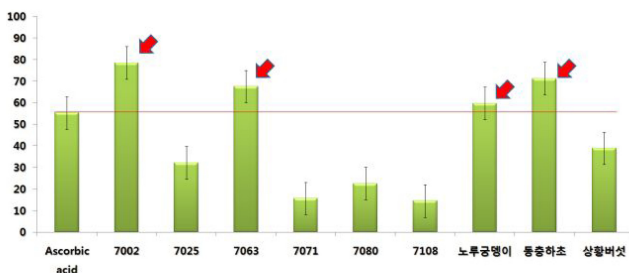


Fig. 2. NO assay (%) of Ganoderma mushrooms and other medicinal mushrooms by extracting with ethanol (노루궁뎅이 : *Hericium erinaceum*, 동충하초 ; *Cordyceps militaris*, 상황버섯 ; *Phellinus linteus*)

항염증 효과 (NO assay)

영지버섯과 기타 약용버섯류를 에탄올 용매로 추출하여 농축한 뒤, 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 NO assay 실험을 한 결과, 양성대조구로 사용한 Ascorbic acid는 항염증 효능이 55%인데 반해 ASI 7002는 78.5%로 가장 높은 항염증 효능을 보였으며, 그 다음으로 ASI 7063이 67.5%였다. 기타 약용버섯류인 동충하초는 71.2%로 가장 높게 나타났으며, 노루궁뎅이는 59.7%의 항염증 효능을 보였다. (Fig. 2)

Real time PCR

영지버섯 ASI 7002를 에탄올 용매로 추출하여 농축한 뒤, 농도별(10, 50, 100 μ g/ml)로 처리하고 LPS 10 μ g/ml 처리한 Raw 264.7 cell에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 Real-time PCR kit를 이용하여 염증 관련 유전자인 iNOS와 COX-2와 TNF-a의 primer를 Table 2. 와 같이 제작하였고, iNOS와 COX-2와 TNF-a의 발현정도를 본 결과 세 유전자 모두 농도 의존적으로 염증관련 유전자 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. (Fig. 3)

사이토카인류 TNF- α 분비량 측정 (ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent assay)

영지버섯류 중 ASI 7002의 추출물을 처리하여 면역관련 TNF- α 생성량을 ELISA assay를 통해 살펴 본 결과,

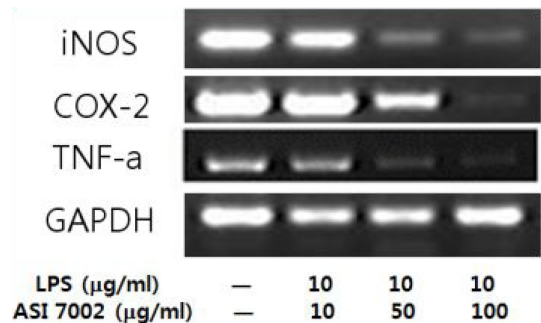


Fig. 3. RT-PCR were performed to detect iNOS, COX-2, TNF-a at the level of mRNA.

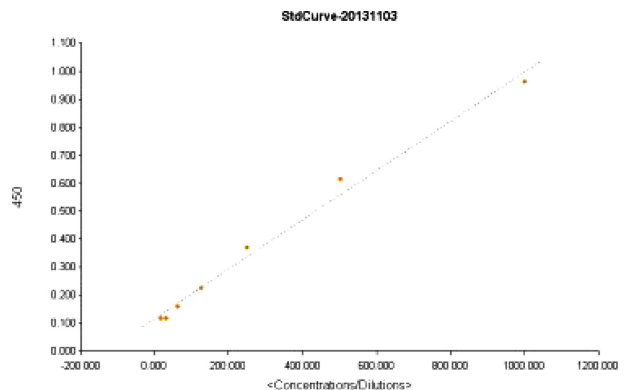


Fig. 4. Standard curve for ELISA measurement.

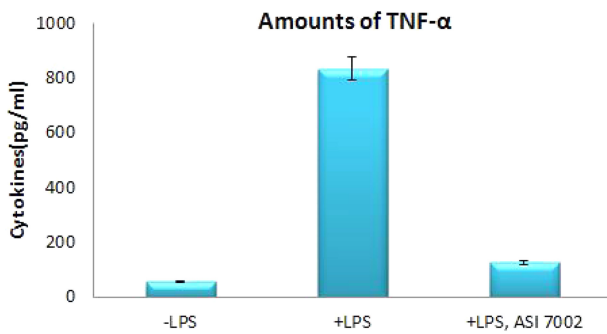


Fig. 5. ELISA assay for measuring the TNF-a amounts.

LPS를 처리하지 않았을 때의 값과 비슷하게 줄이는 것을 알 수 있었다. (Fig. 4, 5)

적 요

영지버섯과 기타 약용버섯류를 에탄올 용매로 추출하여 농축한 뒤, 100 µg/ml의 농도로 처리하여 아질산염 소거능을 실험한 결과 양성대조구인 Ascorbic acid는 25%의 소거능을 보이는데 반해 영지버섯 중 ASI 7080은 40% 이상 소거하는 것으로 나타났으며, 그 다음으로는 상황버섯이 37%를 보였다. ASI 7002도 양성대조구보다 높게 나타났고, 그 이외의 다른 실험구는 양성대조구인 Ascorbic acid보다 낮은 아질산염 소거능을 보였다.

NO assay 실험을 한 결과, 양성대조구로 쓰인 Ascorbic acid는 항염증 효능이 55%인데 반해 ASI 7002는 78.5%로 가장 높은 항염증 효능을 보였으며, 그 다음으로 ASI 7063이 67.5%를 보였다. 기타 약용버섯류인 동충하초는 71.2%로 가장 높게 나타났으며, 노루궁뎅이 버섯은 59.7%의 소거능을 보였다. 영지버섯 ASI 7002를 에탄올 용매로 추출하여 농축한 뒤, 농도별(10, 50, 100 µg/ml)로 처리하고 LPS 10 µg/ml 처리한 RAW 264.7 cell 에서 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 Real-time PCR kit를 이용하여 염증 관련 유전자인 iNOS와 COX-2와 TNF-a의 primer를 Table 1과 같이 제작하였고, iNOS와 COX-2와 TNF-a의 발현정도를 본 결과 세 유전자 모두 농도 의존적으로 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 말씀

이 연구는 농촌진흥청 기관과유연구사업인 ‘약용버섯류의 특성 및 기능성 평가’ 과제에서 시행한 연구결과입니다. (과제번호 : PJ0085232015)

References

- Jo SH, Jin GE, Yu Y, Choi JS, Yun HS, Yu YB, Park KM. 2010. Physiological activity of *Flammulina velutipes* sp. ethanol extract. *ksms* 8: 150-156.
- Um SN, Jin GE, Park KY, Yu YB, Park KM. 2010. Physiological activity and nutritional composition of *Pleurotus* species. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42(1): 90-96.
- Qi Y, Zhao X, Lim YI, Park KY. 2013. Antioxidant and anticancer effects of edible and medicinal mushrooms. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42(5): 655-662.
- Kim SS, Kim YS. 1990. Korean mushrooms. Yupoong Publishing Co., Seoul, Korea. p 3.3.
- Kim HJ, Lee IS. 2004. Anti-mutagenic and cytotoxic effects of Korean wild mushrooms extracts. *Korean J Food Sci Technol* 36: 662-668.
- Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Lim SS. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1087-1096.
- Yang JH, Lin HC, Mau JL. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem* 77: 229-235.
- Mus JL, Lin HC, Song SF. 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res Int* 35: 519-526.
- Choi YH, Kim MJ, Lee HS, Yun BS, Hu C, Kwak SS. 1998. Antioxidative compounds in aerial parts of *Potentilla fragarioides*. *Korean J Pharmacogn* 29: 79-85.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C 1999. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. *FreeRadical Biology Medicine*, 26: 1231-1237
- Gray JI, Dugan JLR 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. *J Food Sci*, 40: 981-985
- Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ 2006. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation new directions and perspectives. *J Food Compos Anal*, 19: 405-419
- Lee SH, Lim BO, Choue RW. 2004. Immunoregulatory Effects of Water Extracts of *Scutellariae Radix* in DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease Animal Model. *Korean J Nutr.* 37(6): 431-9.
- Politch JA, Tucker L, Bowman FP, Anderson DJ. 2007. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum Reprod.* 22(11): 2928-35.
- Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2(10): 907-16.
- Du C, Guan Q, Diao H, Yin Z, Jevnikar AM. 2006. Nitric oxide induces apoptosis in renal tubular epithelial cells through activation of caspase-8. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290(5): 1044-54.