

버섯류 추출물이 전립선 암 세포 내 PSA 발현에 미치는 영향

김은경 · 당옥교 · 최희리¹ · 최은주^{1,*}

건국대학교 식품생명과학부

¹건국대학교 스포츠과학부

The effect of the mushrooms extract on the PSA expression in prostate cancer cells

Eun-Kyung Kim, Yujiao Tang, Heeri Choi¹ and Eun-Ju Choi^{1,*}

Division of Food Bio Science, Konkuk University, Chungju, 380-701

¹Division of Sport Science, Konkuk University, Chungju, 380-701

ABSTRACT: Mushroom have long been valued as highly nutritious and tasty foods in many societies throughout the world. It is known for biological activities including anti-inflammatory and anti-oxidative potential. However little is known about anti-cancer property. In this study, we investigated the anti-prostate cancer activity of mushrooms. For that, eight kinds of mushrooms such as, *T. matsutake*, *S. crispa*, *G. lucidum-US*, *G. lucidum-AS*, *C. cardinalis-BR*, *G. frondosa*, *P. linteus*, *U. esculenta* were extracted with hot water. Among them, three kinds of mushrooms including *T. matsutake*, *G. lucidum-US* and *C. militaris-BR* extracts inhibited prostate specific antigen (PSA) expression in prostate cancer cell, LNCaP. These results demonstrate that some of mushrooms inhibited PSA expression suggesting that the mushrooms might be a candidate for the treatment of prostate cancer.

KEYWORDS: LNCaP, Mushroom, Prostate cancer, PSA

서 론

암은 전 세계적으로 사망률이 높은 질병으로 지속적인 의학발전에도 불구하고 계속 증가 하고 있다. 전립선암은 전 세계적으로 가장 흔한 남성 비뇨기계 종양 중 하나로서 영국과 미국 남성에서 거의 공통적으로 암사망률에서 2위로 나타났다(Siegel, 2011). 2013년에 발표된 중앙암등록본부 자료에 의하면 2011년에 우리나라에서는 연 218,017

건의 암이 발생하였는데, 그 중 전립선암은 연 8,952건 발생하여 전체 암 발생의 4.1%, 남성의 암 중에서는 5위를 차지하였고, 인구 10만 명당 조발생률은 17.9건이며, 연령 대별로는 70대가 41.9%로 가장 많고, 60대가 36.4%, 80대가 10.9%의 손으로 발생했다(한국인 전립선암 조사자료 분석 보고서, 2013). 또한 2015년 보험개발원 발표에 따르면 2003년부터 2012년 10년간 전립선암 발병률은 16위에서 7위로 급증하였다(암발생 통계분석, 2015).

한편, 전립선특이항원(PSA, prostate specific antigen)의 높은 발현은 종양의 발현을 의미하며 전립선암의 표지자로서 사용되고 있다(Peracaula *et al*, 2003). 따라서 전립선암 세포주인 LNCaP cell line 내 PSA의 발현정도를 통해 전립선암치료를 선별하는 등 PSA는 유용한 전립선암 표지자로서 역할을 하고 있다.

화학요법의 일환으로 사용되는 전립선암 치료약은 부작용이 많아 환자에게 두번째 고통을 줄수 있다. 따라서 부작용이 적은 천연물유래 전립선암 치료제 개발이 시급하다 (Kim *et al*, 2015).

한편, 버섯은 약리 작용을 갖는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서 고등 담자균류인 약용버섯과 식용버섯 등 여

J. Mushrooms 2015 September, 13(3):181-184
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2015.13.3.181>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
 E-mail : jstkd@cju.ac.kr
 Tel : +82-43-229-8623, Fax : +82-43-229-8628

Received August 10, 2015
 Revised September 30, 2015
 Accepted October 2, 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.

러 종류의 균사체로부터 분리한 다당류와 단백질로 구성된 고분자물질이 sarcoma-180 복수암 세포에 항암 작용 및 항돌연변이성 효과를 나타낸다는 보고가 있다 (Ahn, 1992). 따라서 본 연구에서는 8종류의 버섯 - 참송이버섯 (*Tricholoma matsutake*), 꽃송이버섯 (*Sparassis crispa*), 편각영지 (*Ganoderma lucidum-umbrella shape*), 녹각영지 (*Ganoderma lucidum-antler shape*), 현미 동충하초버섯 (*Cordyceps cardinalis* cultivated on brown rice), 잎새버섯 (*Grifola frondosa*), 상황버섯 (*Phellinus linteus*), 석이버섯 (*Umbilicaria esculenta*)으로부터 열수 추출물을 획득하고 이들의 PSA 발현량 억제율을 통해 항전립선암 효능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

버섯시료 추출 방법

국내에서 생산하는 8종의 버섯을 준비하였으며, 100 g의 건조된 시료에 물 1 L를 가해 100°C에서 1시간 추출하여 감압농축한 후 동결건조 하였다.

세포 배양

전립선암세포인 LNCaP 세포주는 한국세포주은행 (KCLB No. 21740)에서 분양받아 사용하였으며, CO₂ 세포배양기 (37°C, 5%, CO₂)에서 소태아혈청 (10%), 페니실린G (100 IU/mL)을 첨가한 RPMI배지에서 배양하였다.

RNA isolation

전립선암세포인 LNCaP세포는 6-well plate에서 키운 세포 (2×10⁶)에서 지시한대로, 버섯류 추출물을 처리하여 배양시키고, RNA를 추출하기 위하여 chloroform을 첨가하여 vortex를 20-30초로 해준 후 4°C에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 이때 용액이 세 부분으로 나누어지는데 가장 위의 RNA가 있는 층에 Isopropyl alcohol을 넣고 10분간 상온에 놓은 뒤 4°C에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 75% EtOH(in DEPC water)로 washing한 후 4°C에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액은 버리고, pellet을 DEPC water를 이용하여 녹였다. 이렇게 추출된 RNA는 -80°C에 보관하였다. 전체 RNA농도 측정은 RNase가 처리된 0.1% DEPC water로 용해시켜 UV spectrophotometer로 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

전립선 암세포에서 semiquantitative RT-PCR법을 이용하여 mRNA에 대한 PCR 산물을 정량하였다. 역전사반응은 추출된 전체 RNA (1 µg)와 Oligonucleotide dT

primer (100 pmol)을 Accupower RT PreMix (Bioneer Co, Korea) tube에 혼합한 후, 반응 전체 용량을 20 µl로 하여 70°C에서 5분 동안 전처리하였다. cDNA합성은 42°C에서 1시간동안 반응시켰고, 역전사 효소를 불활성화하기 위해 80°C에서 15분동안 열처리 하였다. PCR (Polymerase Chain Reaction)은 Accupower[®] PCR PreMix (Bioneer Co., Korea) tube에 역전사된 cDNA 1 µg과 각각 Forward와 Reverse Primer 10 pmol을 사용하여 중합반응 하였다. 중합반응 조건은 초기 94°C에서 5분 동안 열처리하여 cDNA를 변성시킨 후 다음과 같이 시행하였다. Human의 primer PSA는 5'-GCT GAC CTG AAA TAC CTG-3'(sense), 5'-AGC CCC AAG CTT ACC ACC-3'(antisense), 그리고 GAPDH의 발현은 5'-CCA TGG GGA AGG TGA AGG TG-3'(sense)와 5'-AAA TGA GCC CCA GCC TTC TC-3'(antisense)를 이용하여 확인하였다(Choi *et al.*, 2011).

정량적 역전사 반응(Real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)

PSA mRNA를 특이적으로 검출하도록 디자인된 primer와 probe는 Applied Biosystems사로부터 구입하였다. qPCR 반응액은 TaqMan Universal Master Mix 2X (Applied Biosystems, CA, USA) 10 µl, 10 pmol forward primer 0.5 µl, 10 pmol reverse primer 0.5 µl, DNA template 1 µl, Nuclease-free water 8 µl를 넣어 총 부피가 20 µl가 되게 하였다. 핵산 증폭은 pre-denaturation은 95°C에서 10분, denaturation은 95°C에서 15초, annealing은 60°C에서 1분으로 하여 40 cycle을 수행하였다.

PCR정량 분석

증폭된 PCR products는 1%의 agarose gel에서 전기영동하여 band의 정량을 ImageJ 1.44d (Image J is a public domain Java image processing program inspired by NIH Image)를 사용하여 band를 정량화 하였다.

통계처리

자료처리는 SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균(M)과 표준편차(SD)를 산출하였으며, 대조군과 실험군간의 비교를 위해 t-test를 실시하였다. 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 국내에서 식용버섯으로 많이 사용되고 있는 참송이버섯, 꽃송이버섯, 편각영지버섯, 녹각영지, 현미동충하초버섯, 잎새버섯, 석이버섯, 상황버섯 열수 추출물의 PSA 발현 억제율을 통해 전립선암에 대한 억제 효과를 측정하였다.

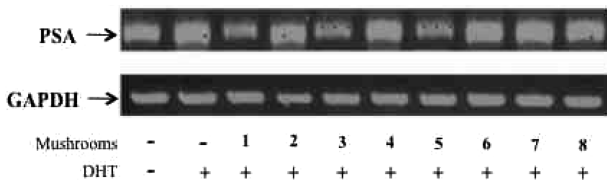


Fig. 1. Effect of mushrooms extracts on the PSA expression in LNCaP.

1, *Tricholoma matsutake*; 2, *Sparassis crispa*; 3, *Ganoderma lucidum* (umbrella shape); 4, *Ganoderma lucidum* (antler shape); 5, *Cordyceps cardinalis* cultivated on brown rice; 6, *Grifola frondosa*; 7, *Phellinus linteus*; 8, *Umbilicaria esculenta*

전립선암세포(LNCaP)에서 8종 버섯류 열수 추출물의 PSA mRNA 발현 억제효과

전립선암에서 DHT (1 nM)로 자극한 PSA에 열수 추출한 버섯류 1 mg/ml을 처리한 후 24시간 뒤에 PSA를 측정하였다. 그 결과 참송이버섯, 편각영지버섯 및 현미동충하초버섯 등에서 PSA의 발현이 유의하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1).

전립선 암은 나이든 남성에게 높은 비율로 이환된다. 동충하초는 자낭균류 맥각균목 동충하초과로 주로 한국, 일본 등 전세계에 서식하며, 현미로 재배한 현미동충하초는 코디세핀(cordycepin)이 기존 동충하초보다 16.7% 높다고 알려져있다(Kim *et al*, 2010). 이러한 현미동충하초는 심장병, 부정맥, 고혈압, 당뇨병, 백혈병, 비염, 류마티스 관절염 등에 효과를 나타내고 항암기능 및 항종양기능도 가지고 있다(Yoo, 2010). 또한, 최근까지의 연구에 의하면 참송이버섯, 편각영지 및 현미동충하초버섯에 대한 다양한 연구가 이루어져 있지만 전립선 암에대한 연구가 없다(Hwang *et al*, 2003). 따라서 본 연구가 참송이버섯, 편각영지버섯 및 현미동충하초버섯을 활용한 항전립선암 연구에 대한 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

전립선암세포(LNCaP)에서 참송이버섯, 편각영지버섯 및 현미동충하초버섯 열수 추출물의 PSA mRNA 발현 억제효과

배양한 LNCaP 세포에 참송이버섯, 편각영지버섯 및 현미동충하초버섯 열수 추출물을 농도별로(0.125, 0.250, 0.500, 1.000 mg/ml) 처리한 후 24시간 뒤에 qPCR법으로 PSA 수치를 측정 한 결과, 대조군에 비하여 버섯 추출물 처리군의 PSA 수치가 감소된 결과를 보여주었다(Fig. 2-4).

참송이버섯은 0.125 mg/ml 부터 유의적인 저해효과를 보였고(Fig. 2), 편각영지버섯은 0.250 mg/ml 처리군의 수치가 20%로 현저하게 감소된 결과를 보여주었으며(Fig. 3), 현미동충하초는 0.500 및 1.000 mg/ml 농도에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). 이상의 결과로 보아 참송이버섯, 편각영지버섯 및 현미동충하초버섯 열수 추출물은 PSA를 감

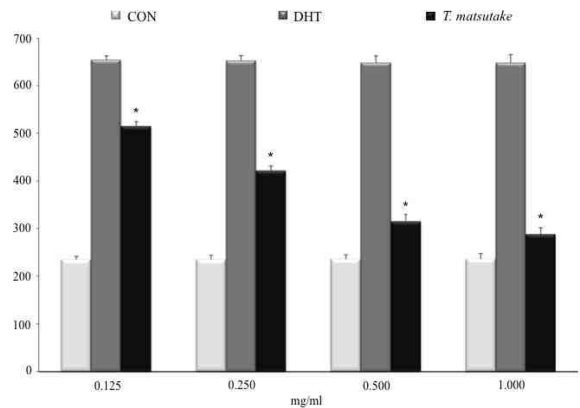


Fig. 2. Effect of *Tricholoma matsutake* extract on the PSA expression in LNCaP. *Significant difference from the DHT alone group shown at $p < 0.05$.

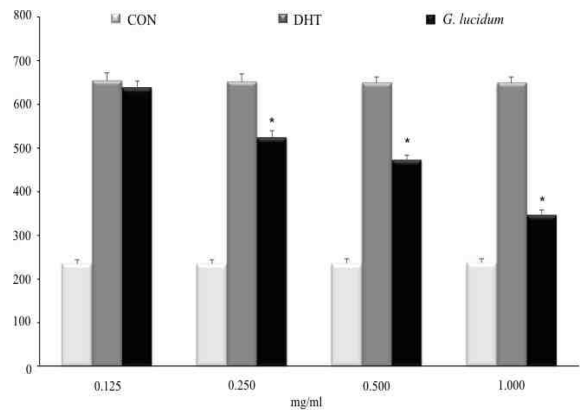


Fig. 3. Effect of *Ganoderma lucidum* extract on the PSA expression in LNCaP. *Significant difference from the DHT alone group shown at $p < 0.05$.

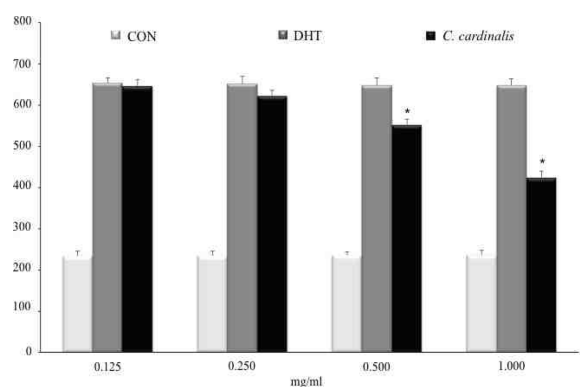


Fig. 4. Effect of *Cordyceps cardinalis* cultivated on brown rice extract on the PSA expression in LNCaP. *Significant difference from the DHT alone group shown at $p < 0.05$.

소시켜 전립선암을 치료 또는 예방한다고 유추해 볼 수 있다. 또한, 이러한 효과에 대한 정확한 기작을 확인 할 수 있는 추가적인 연구가 수행 되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

버섯은 영양소 및 풍미가 뛰어나 오래전부터 식재료로 널리 활용되고 있으며 항염증 및 항산화효능도 뛰어난 것으로 알려져 있다. 그러나 버섯의 항산화 효능은 아직 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 버섯의 항전립선암 효능을 분석하였다. 이를 위해, 식용버섯인 참송이버섯, 꽃송이버섯, 편각영지버섯, 녹각영지, 현미동충하초버섯, 잎새버섯, 석이버섯, 상황버섯 등 8종 버섯의 열수 추출물에 대한 항전립선암 효능을 전립선암 세포주인 LNCaP에서 확인한 결과 참송이버섯, 편각영지버섯 및 현미동충하초버섯이 PSA 발현을 저해하는 효능이 탁월한 것을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(Project No. PJ010181) 및 연구재단 이공분야기초연구사업(2013R1A1A3006958)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Siegel R, (2011). Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 61: 212-36.
- 대한민국 보건복지부 중앙암등록본부. 한국인 전립선암 조사자료 분석 보고서. 2013.
- 보험개발원. 암발생 통계분석. 2015.
- Peracaula R, Tabares G, Royle L, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, de Lorenis R. 2003. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiol.* 13: 457-470.
- Kim EJ, Kim JH. 2015. Fibrinolytic, thrombin inhibitory, anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Pleurotus ferulea*. *J Mushroom* 13: 30-36.
- Ahn DK. 1992. Medicinal fungi in Korea. *Korean Mycol* 20: 154-166.
- Kim SY, Shrestha B, Sung GH, Han SK, Sung JM. 2010. Optimum conditions for artificial fruiting body formation of *Cordyceps cardinalis*. *Mycobiolol.* 38, 133-136.
- Yoo JH. 2010. The effect of complex mushroom extracts on the improvement in skin conditions with atopic dermatitis and acne symptoms. Chosun University.
- Hwang YJ, Nam HK, Chang MJ, Noh GW, Kim SH. 2003. Effect of *lentinus edodes* and *pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 217-222.