

식용 및 약용버섯의 항산화 및 *In vitro* 항암 효과

치용카이¹ · 조 흔¹ · 임양이² · 박건영^{1*}

¹부산대학교 식품영양학과
²성신여자대학교 식품영양학과

Antioxidant and Anticancer Effects of Edible and Medicinal Mushrooms

Yongcai Qi¹, Xin Zhao¹, Yaung-lee Lim², and Kun-Young Park^{1*}

¹Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Dept. of Food Science and Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul 142-732, Korea

Abstract

The antioxidant and anticancer effects of the edible mushrooms *Lentinus edodes* (LE, Pyogo mushroom) and *Agaricus blazei* (AB, Agaricus mushroom), and the medicinal mushrooms *Cordyceps militaris* (CM, Dong chun-ghacho), *Ganoderma lucidum* (GL, Youngji mushroom), *Inonotus obliquus* (IO, Chaga mushroom), and *Phellinus linteus* (PL, Sangwhang mushroom) were studied *in vitro*. The bioactive components were extracted by methanol. The antioxidant effects were evaluated using the DPPH and hydroxyl radical scavenging assays. The antioxidant activities of medicinal mushrooms (35~90%) were higher than edible mushrooms (4~23%). The *in vitro* anti-cancer effects of the mushrooms were evaluated using the MTT assay in AGS gastric adenocarcinoma cells, HCT-116 colon carcinoma cells, and HepG2 hepatoma cells. The medicinal mushrooms CM, GL, IO, and PL showed 28~91% inhibition, while the edible mushrooms LE and AB exhibited 5~40% inhibition. The medicinal mushrooms, compared to edible mushrooms, effectively down-regulated the gene expression of the anti-apoptosis related gene Bcl-2 and inflammation-related genes iNOS and COX-2, and up-regulated the pro-apoptosis gene Bax ($p < 0.05$). Total polyphenol and flavonoids contents of the medicinal mushrooms were 9.1~35.7 mg/g, while the edible mushrooms showed 0~13.3 mg/g. This study showed that antioxidant activities and anticancer activities *in vitro* increased in the order LE, AB, GL, CM, IO and PL. LE and AB showed the lowest effects among the samples, GL and CM had medium effects, and IO and PL exhibited the highest effects in the antioxidant and anticancer effect for three different human cancer cells. Taken together, PL resulted in the highest and LE the lowest effects in this study.

Key words: mushrooms, antioxidation, anticancer effect, human cancer cells

서 론

버섯은 고등균류로써 담자균강과 일부의 자낭균강에 속하는 종으로 동양에서는 기원전부터 식용 혹은 약용 등의 목적으로 사용하여 왔다(1). 버섯은 향미성분이 풍부하고 단백질과 지질의 함량이 낮은 반면 다당류, 비타민 및 무기질을 다량 함유하고 있다. 최근에는 항암활성, 면역증강, 항산화 등의 약리효과가 밝혀지면서 건강기능식품의 소재로 많이 이용되고 있다(1). 우리나라에는 약 1,150여종의 버섯이 자생하는 것으로 알려져 있고, 그중 330여종이 식용 및 약용 버섯으로 활용 가능하고, 약 20여종 이상이 인공 재배되어 대부분 식용으로 사용되고 있다(2). 식용으로 많이 이용되는 버섯으로는 송이버섯, 새송이버섯, 양송이버섯, 느타리버섯, 팽이버섯, 표고버섯 등이 있으며, 아가리쿠스 버섯은 식용 또는 약용으로 사용된다. 약용으로 많이 이용되는 버섯으로

는 영지버섯, 상황버섯, 동충하초, 천마, 복령, 운지버섯, 차가버섯 등이 있다.

버섯의 생체기능조절 및 암, 뇌졸중, 심장병 등 소위 성인병에 대한 예방과 개선효과가 그동안 연구되었고(3,4), 특히 버섯의 항산화활성에 관한 연구가 많은 부분을 차지하여 영지, 능이, 양송이, 표고버섯 등의 전자공여능이 보고되었고(5-7), 운지버섯의 단백질다당류는 superoxide dismutase활성과 유사한 항산화 활성을 나타내었다(6). 버섯의 항산화 기능에 관여하는 주요 성분으로는 페놀성 화합물이 주를 이룬다고 보고되어 있다(5,6). 또한 버섯의 β -glucan은 면역활성체계의 기능, 항산화기능, 생체조직 재생과 치유기능, 항균 및 항바이러스 효과와 대식세포를 자극하여 돌연변이세포를 인식하고 공격하는 항종양효과가 보고된바 있다(8-10). 여러 종류의 버섯에 대한 다양한 연구들이 그동안 진행되어 왔지만 주로 일상생활에서 소비되고 있는 버섯들을 대상으

*Corresponding author. E-mail: kunypark@pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510-2839, Fax: 82-51-514-3138

로 소화기관과 관련된 인체 암세포에 대한 항암효과를 비교한 연구는 거의 없었다.

따라서 본 연구에서는 식용버섯과 약용버섯 중에서 기능성 소재로 사용되거나, 항암효과가 뛰어나다고 알려져 있고, 환자들의 회복을 위하여 주로 사용되어지는 표고버섯, 아가리쿠스버섯, 동충하초, 영지버섯, 차가버섯, 상황버섯 6가지를 선택하여 항산화효과와 소화기계통의 인체 위암, 대장암 및 간암세포를 이용한 *in vitro* 항암효과와 이들의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 본 연구를 통하여 식용버섯 및 약용버섯을 기능성식품의 소재로 이용하는데 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

추출물 제조

버섯은 서울의 동대문구 제기동에 소재하는 경동시장에서 구입하였다. 식용버섯으로는 표고버섯(*Lentinus edodes*, LE, 국내산)과 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei*, AB, 국내산)을 구입하였고, 약용버섯으로는 동충하초(*Cordyceps militaris*, CM, 국내산), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*, GL, 국내산), 차가버섯(*Inonotus obliquus*, IO, 러시아산), 상황버섯(*Phellinus linteus*, PL, 국내산)을 구입하였다. 각 버섯은 모두 건조된 것으로 구입하여 깨끗이 손질하여 deep freezer(-50~-86°C)에서 24시간 보관 후 동결건조 하였다. 이것을 분쇄하여 시료에 20배(v/v)의 메탄올을 첨가하고 24시간 교반을 3회 반복한 후 여과하였다. 여과물은 회전식 진공증발기(rotary vacuum evaporator, EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Miyagi, Japan)로 농축하여 표고버섯(LE), 아가리쿠스(AB), 동충하초(CM), 영지버섯(GL), 차가버섯(IO), 상황버섯(PL)의 추출물을 만들고 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험에 사용하였다.

항산화실험

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거 효과: 농도별로 희석한 시료 100 μ L와 DPPH 용액 100 μ L를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 분광광도계(UV/VIS spectrophotometer, Jasco, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리라디칼 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다(11).

Hydroxy radical(OH·) 소거활성: Chung 등(12)의 방법에 따라 10 mM FeSO₄·7H₂O-ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt(EDTA)에 10 mM의 2-deoxyribose와 농도별 시료용액을 혼합한 다음, 10 mM의 H₂O₂를 첨가하여 Fenton 반응에 따라 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid(TCA) 1.0 mL와 1.0% thiobarbituric acid(TBA) 1.0 mL를 첨가하여 끓는 물에서 10분간 반응시킨 다음 냉각시킨 후 520 nm에서 UV/VIS spectrophotometer(Jasco)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

In vitro 항암실험

인체 암세포 및 인체 정상세포: 실험에 사용된 암세포는 HCT-116 인체 결장암세포(HCT-116 human colorectal carcinoma cell)를 미국 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 분양받아 사용하였고, AGS 인체 위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell)와 HepG2 인체 간암세포(HepG2 human hepatoma cells)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다.

시료의 정상세포에 대한 독성을 측정하기 위해서 식용버섯에서는 표고버섯(LE)을 약용버섯에서는 상황버섯(PL)을 선택하여 인체정상세포에 대한 독성을 측정하였다. 독성실험에 사용한 HaCaT 인체정상피부세포는 조선대학교 단백질소재 연구센터에서 분양받아 사용하였다.

인체 암세포 배양 및 MTT assay: 세포배양을 위해 RPMI 1640, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA, 100 units/mL penicillin-streptomycin을 GIBCO(Grand island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 세포배양은 5% CO₂ incubator(model 311S/N29035, Forma, Marietta, OH, USA)를 사용하였다. 배양된 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding 하고 6~7일만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리 한 후 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 배양된 암세포는 96 well plate에 well당 1×10^4 cells/mL가 되도록 180 μ L씩 분주하고 24시간 부착시킨 후 시료 20 μ L를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/L의 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 용액 20 μ L를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다. 이때 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여서 ELISA reader(model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, OD range 0.00~3.50 내의 측정값을 실험 결과에 사용하였다.

Apoptosis 및 염증 관련 유전자 mRNA 발현 측정

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 Trizol reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다.

이 cDNA를 template로 사용하여 apoptosis 관련 유전자 Bax(forward 5'-AAG CTG AGC GAG TGT CTC CGG CG-3', reverse 5'-CAG ATG CCG GTT CAG GTA CTC AGT C-3'), Bcl-2(forward 5'-CTC GTC GCT ACC GTC GTG ACT TGG-3', reverse 5'-CAG ATG CCG GTT CAG GTA CTC AGT C-3'), 염증 관련유전자 iNOS(forward 5'-AGA GAG ATC GGG TTC ACA-3', reverse 5'-

CAC AGA ACT GAG GGT ACA-3'), COX-2(forward 5'-TTA AAA TGA GAT TGT CCG AA-3', reverse 5'-AGA TCA CCT CTG CCT GAG TA-3') 유전자를 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭하였다.

이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH, forward 5'-GGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3', reverse 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3') 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다(13).

총 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물 측정

버섯의 활성물질인 총 폴리페놀과 플라보노이드를 측정하였다. 총 폴리페놀 물질함량은 Folin-Denis 방법(14)으로 측정하였다. 메탄올로 추출한 시료를 일정량의 증류수에 희석한 시료 1 mL에 10% Na₂CO₃을 2 mL 혼합하고 5분 후에 Folin reagent를 1 mL 가하여 30분간 실온에서 반응시킨 뒤 700 nm에서 흡광도를 측정했다. 표준시약은 gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였고 표준 곡선을 작성하여 정량하였다.

물질 속에 총 플라보노이드 함량을 측정하기 위해서 Woisky와 Salatino 방법(15)을 사용하였다. 시료 1 mL에 1.5% AlCl₃ 1 mL를 첨가한 후 실온에서 30분간 안정화시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다. Rutin (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 표준곡선을 작성하고 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 하였으며, 결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistical Package for the Social Sciences(v15, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

DPPH 및 hydroxy radical 소거활성능 변화

DPPH를 이용하여 각 버섯 추출물의 전자공여능을 측정하였다(Fig. 1). DPPH의 분자 내 라디칼은 다른 유리라디칼과 결합하여 안정한 complex를 만들기 때문에 항산화활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되어 짙은 자색이 감소된다. DPPH는 이러한 특성을 이용하여 항산화능력을 측정하는 방법이며(16), 버섯은 항산화효과가 있는 것으로 알려져 있다(17). 버섯추출물 농도가 높을수록 유리라디칼의 소거효과가 높게 나타났으며, 500 μ g/mL 농도에서 식용버섯

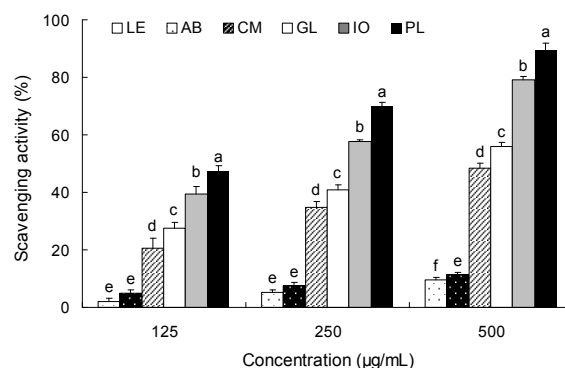


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activity of the edible and medicinal mushroom extracts. ^{a-f}Means with the different letters on the bars at different concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. All values present the mean \pm SD of triplicate determinations. LE, *Lentinus edodes* extract; AB, *Agaricus blazei* extract; CM, *Cordyceps militaris* extract; GL, *Ganoderma lucidum* extract; IO, *Inonotus obliquus* extract; PL, *Phellinus linteus* extract.

인 표고버섯(LE), 아가리쿠스버섯(AB) 추출물은 각각 9%, 11%의 DPPH radical 소거효과를 나타내었고, 약용버섯인 동충하초(CM), 영지버섯(GL), 차가버섯(IO)과 상황버섯(PL) 추출물은 각각 48%, 56%, 78%, 90%의 유리라디칼 소거효과를 나타내었다. 약용버섯의 유리라디칼 소거능은 식용버섯보다 5배 이상 높았으며, 약용버섯 중에서는 상황버섯의 항산화 효과가 가장 우수하였다. 오미자 핵산추출물과 ascorbic acid의 라디칼 소거능이 500 μ g/mL 농도에서 76%와 95%라고 보고한 결과(18)와 비교하면 70% 이상의 항산화효과를 나타낸 차가버섯과 상황버섯의 항산화 능력은 우수하였다. 그러나 식용버섯인 표고버섯의 항산화 능력은 9%로 낮은 수준으로 나타났다.

OH· 소거활성에 의한 각 버섯 추출물의 항산화 효과를 측정하였다(Fig. 2). Hydroxy radical은 활성산소 중에서 화학적으로 반응성이 가장 크며 생체 내의 산화 원인이 되어 DNA 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져

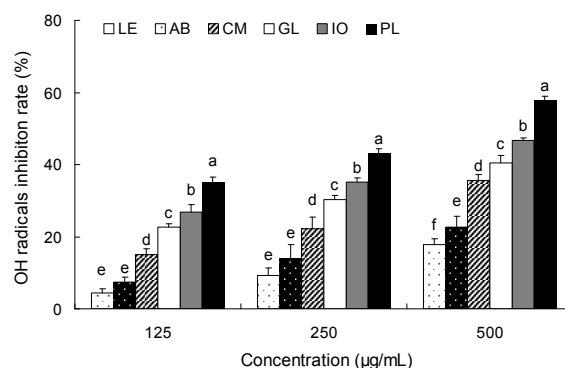


Fig. 2. Hydroxy radical scavenging activity of the edible and medicinal mushroom extracts. ^{a-f}Means with the different letters on the bars at different concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. All values present the mean \pm SD of triplicate determinations. The abbreviations are same as shown in footnotes of Fig. 1.

있다. 500 µg/mL 농도에서 식용버섯인 표고버섯과 아가리쿠스버섯은 18%와 23%의 OH· 소거활성효과를 나타내었고, 약용버섯인 동충하초, 영지버섯, 차가버섯, 상황버섯은 각각 36%, 40%, 47%, 58%의 OH· 소거활성을 보였다. 표고버섯, 아가리쿠스버섯, 동충하초, 영지버섯, 차가버섯, 상황버섯의 추출물 순으로 OH· 소거효과가 높았으며, DPPH radical 소거효과의 결과와 같이 식용버섯보다 약용버섯의 OH· 소거효능이 높았고($p<0.05$), 약용버섯은 식용버섯보다 2배 이상의 OH· 소거효능을 나타내었다. 약용버섯 중에서는 동충하초와 영지버섯보다는 차가버섯과 상황버섯의 항산화 효과가 더 우수하였다. DPPH에서의 결과와 같이 상황버섯이 가장 효과가 높았고 표고버섯이 가장 항산화능이 낮게 나타났다. 시판중인 국내산 버섯 14종의 메탄올 추출물의 실험에서 DPPH와 ABTS 자유라디칼 소거능에 따른 항산화활성은 51.2~90.1%로 나타났고, 상황버섯의 라디칼 소거능이 90.1%, 95.3%로 가장 높게 측정되었다(19). 이는 본 연구의 식용버섯과 약용버섯의 라디칼 소거활성과 비슷하였다.

인체 암세포에서의 *in vitro* 항암효과

인체 정상피부세포에 대한 세포독성: 다른 인체암세포에 처리한 농도의 안전성을 확인하기 위해 버섯추출물 농도별로 정상세포(HaCaT 인체피부세포)를 처리하여 세포 생존율의 독성실험을 하였다(Fig. 3). 표고버섯과 상황버섯의 추출물 처리농도가 가장 높았던 500 µg/mL에서 정상세포의 생존율이 73~80%를 보였다($p<0.05$).

AGS 인체 위암세포 성장저해 효과: 버섯추출물의 AGS 인체 위암세포에 대한 억제효과를 알아보기 위해 MTT assay 방법으로 위암세포 저해율을 측정하였다(Table 1). 약용버섯 중 상황버섯과 차가버섯 추출물의 AGS 인체 위암세포의 저해율은 500 µg/mL에서 각각 87%와 83%로 높았으며, 영지버섯, 동충하초 추출물은 77%, 71%의 저해율을 보였고, 식용버섯인 표고버섯과 아가리쿠스 버섯추출물은 38%와 40%로 다소 낮은 저해율을 나타내었다($p<0.05$). 국내에

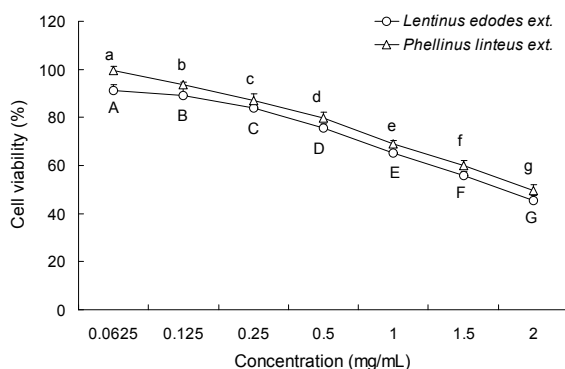


Fig. 3. Effects of *Lentinus edodes* extract and *Phellinus linteus* extract on cell viability of HaCaT human keratinocytes *in vitro*. a-g, A-G Means with the different letters are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. All values present the mean \pm SD of triplicate determinations.

Table 1. Inhibitory effects of edible and medicinal mushroom extracts with different concentrations on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells by MTT assay (Unit: $\times 10^{-1}$)

Treatment	OD ₅₄₀ (level of sample, mg/mL)		
	0.125	0.25	0.5
Control	6.7 \pm 0.2 ^a		
<i>Lentinus edodes</i>	5.9 \pm 0.2 ^b (12) ¹⁾	5.1 \pm 0.2 ^b (24)	4.1 \pm 0.1 ^b (38)
<i>Agaricus blazei</i>	5.5 \pm 0.2 ^c (17)	4.4 \pm 0.2 ^c (33)	4.0 \pm 0.1 ^c (40)
<i>Cordyceps militaris</i>	5.5 \pm 0.3 ^d (18)	3.6 \pm 0.1 ^d (46)	1.9 \pm 0.1 ^d (71)
<i>Ganoderma lucidum</i>	4.2 \pm 0.2 ^d (37)	2.1 \pm 0.2 ^e (68)	1.5 \pm 0.1 ^e (77)
<i>Inonotus obliquus</i>	3.4 \pm 0.1 ^e (48)	1.9 \pm 0.1 ^f (72)	1.1 \pm 0.1 ^f (83)
<i>Phellinus linteus</i>	3.1 \pm 0.1 ^f (52)	1.5 \pm 0.1 ^g (77)	0.8 \pm 0.1 ^g (87)

¹⁾The values in parentheses are the inhibition rates (%).

^{a-g}Means with the different letters in the same column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. All values present the mean \pm SD of triplicate determinations.

많이 사용되는 5가지 약용버섯이 위암 세포주 MKN-74 증식억제에 미치는 영향에 대한 실험에서 차가버섯이 위암세포 억제 효과가 높았다는 결과처럼(20), 본 연구에서도 식용버섯보다는 약용버섯인 상황버섯과 차가버섯이 위암세포의 성장을 억제하는 효능이 가장 높게 나타났다.

HCT-116 인체 결장암세포 성장저해 효과: 식용버섯과 약용버섯 추출물의 HCT-116 인체 결장암세포의 성장저해 효과는 500 µg/mL의 농도에서 상황버섯과 차가버섯 추출물은 91%와 89%로 높은 저해율을 보였으며, 영지버섯, 동충하초 추출물은 79%, 72%의 인체 결장암세포 성장 저해율을 나타내었다($p<0.05$). 한편 식용버섯인 아가리쿠스버섯과 표고버섯은 13%와 5%의 낮은 저해율을 나타내었다(Table 2). HCT-116 결장암세포 저해효과는 AGS 인체 위암세포 억제율과 비슷한 경향을 보였다. 약용버섯 중 상황버섯과 차가버섯의 결장암세포 억제효과가 높았으며 이는 상황버섯과 차가버섯의 항염증효과, 면역 증진 및 암세포의 apoptosis를 유도하는 효능(20,21)이 높기 때문으로 생각된다. 또한 상황버섯을 이용한 발효식초의 추출물에서도 HCT-116 결장암세포를 억제하는 효과가 나타났다(22). 이 연구에서도 상황

Table 2. Inhibitory effects of edible and medicinal mushroom extracts with different concentrations on the growth of HCT-116 human colon carcinoma cells by MTT assay (Unit: $\times 10^{-1}$)

Treatment	OD ₅₄₀ (level of sample, mg/mL)		
	0.125	0.25	0.5
Control	7.6 \pm 0.1 ^a		
<i>Lentinus edodes</i>	7.5 \pm 0.1 ^b (1) ¹⁾	7.4 \pm 0.1 ^b (3)	7.2 \pm 0.1 ^b (5)
<i>Agaricus blazei</i>	7.3 \pm 0.2 ^b (4)	7.0 \pm 0.2 ^c (8)	6.6 \pm 0.2 ^c (13)
<i>Cordyceps militaris</i>	6.1 \pm 0.4 ^c (21)	4.3 \pm 0.3 ^d (44)	2.1 \pm 0.1 ^d (72)
<i>Ganoderma lucidum</i>	5.8 \pm 0.4 ^c (24)	3.2 \pm 0.2 ^e (57)	1.6 \pm 0.1 ^e (79)
<i>Inonotus obliquus</i>	2.8 \pm 0.1 ^d (64)	1.7 \pm 0.1 ^f (78)	0.8 \pm 0.1 ^f (89)
<i>Phellinus linteus</i>	2.6 \pm 0.4 ^d (66)	1.5 \pm 0.4 ^f (80)	0.6 \pm 0.3 ^f (91)

¹⁾The values in parentheses are the inhibition rates (%).

^{a-f}Means with the different letters in the same column are significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test. All values present the mean \pm SD of triplicate determinations.

Table 3. Inhibitory effects of edible and medicinal mushroom extracts with different concentrations on the growth of HepG2 human hepatoma cells by MTT assay (Unit: $\times 10^{-1}$)

Treatment	OD ₅₄₀ (level of sample, mg/mL)		
	0.125	0.25	0.5
Control	6.2 \pm 0.2 ^a		
<i>Lentinus edodes</i>	6.0 \pm 0.1 ^b (2) ¹⁾	5.8 \pm 0.2 ^b (5)	5.5 \pm 0.3 ^b (11)
<i>Agaricus blazei</i>	5.8 \pm 0.1 ^c (6)	5.7 \pm 0.1 ^b (8)	5.4 \pm 0.2 ^b (12)
<i>Cordyceps militaris</i>	5.3 \pm 0.3 ^d (14)	5.0 \pm 0.2 ^c (19)	4.4 \pm 0.2 ^c (28)
<i>Ganoderma lucidum</i>	4.8 \pm 0.1 ^d (16)	4.6 \pm 0.2 ^c (20)	2.5 \pm 0.2 ^d (57)
<i>Inonotus obliquus</i>	4.6 \pm 0.1 ^e (21)	2.5 \pm 0.2 ^d (56)	1.5 \pm 0.1 ^e (75)
<i>Phellinus linteus</i>	4.6 \pm 0.3 ^e (23)	2.6 \pm 0.2 ^d (58)	1.4 \pm 0.1 ^e (77)

¹⁾The values in parentheses are the inhibition rates (%).

^{a-e}Means with the different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. All values present the mean \pm SD of triplicate determinations.

버섯은 HCT-116 결장암세포를 현저히 억제하였다.

HepG2 인체 간암세포 성장저해 효과: HepG2 인체 간암세포에서도 위의 두 가지 암세포의 억제 경향과 비슷한 효과를 보였다(Table 3). 버섯추출물 500 μ g/mL를 처리한 HepG2 간암세포의 성장 저해율이 식용버섯인 표고버섯, 아가리쿠스버섯은 11%, 12%의 저해율을 보였고, 동충하초(28%), 영지버섯(57%)의 저해율보다 차가버섯, 상황버섯의 저해율이 75%, 77%로 더 높았다($p < 0.05$).

Sohn 등(18)은 위암세포와 간암세포 성장 억제효과에서 차가버섯과 상황버섯 물추출물의 암세포 억제율을 65~68%로 보고하였다. 본 연구의 차가버섯과 상황버섯의 암세포 억제율은 71~91%로 Sohn 등(16)의 연구보다 다소 높게 나타났다.

식용버섯과 약용버섯추출물의 인체 암세포(AGS, HCT-116, HepG2)에서의 억제효과는 식용버섯과 약용버섯추출물 모두에서 효과가 있었으며, 표고버섯, 아가리쿠스버섯, 동충하초, 영지버섯, 차가버섯, 상황버섯의 순으로 억제효과가 크게 나타났다. 식용버섯보다는 약용버섯의 인체 암세포에 대한 억제효과가 더 높았으며, 약용버섯 중에서는 상황버섯과 차가버섯의 *in vitro* 항암효과가 가장 우수하였다. 그 다음으로 영지버섯과 동충하초 순으로 항암효과를 나타내었고, 아가리쿠스버섯과 표고버섯은 효과가 낮게 나타났다. 본 연구에서 표고버섯은 항암효과가 낮았지만, 우리 식생활에서 쉽게 접할 수 있는 버섯이므로 자주 섭취하게 된다면 그 효과를 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

Apoptosis와 inflammation에 관련된 mRNA 유전자 발현에 미치는 효과

Bcl-2 및 Bax apoptosis 유도 유전자의 발현: Bcl-2 family에 속하는 유전자는 apoptosis를 직접적으로 유발하거나 억제하는데 관여하며, 그들 사이의 상대적인 유전자 발현의 양적 차이에 의해 apoptosis유발 여부가 결정된다. Bcl-2 family의 대표적 유전자인 Bcl-2는 anti-apoptotic 인자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는

pro-apoptotic 인자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다(21).

식용버섯과 약용버섯추출물의 인체 암세포(AGS, HCT-116, HepG2)에 대한 apoptosis 유도를 측정하기 위해 RT-PCR 분석을 하였다(Fig. 4).

인체 암세포에 대한 Bax 유전자의 발현은 식용버섯과 약용버섯추출물에서 대조군보다 모두 증가되었으며, 표고버섯, 아가리쿠스버섯, 동충하초, 영지버섯과 차가버섯, 상황버섯 순서로 Bax 유전자의 발현이 증가되었다. 식용버섯보다 약용버섯의 Bax 유전자의 발현이 많았으며($p < 0.05$) 약용버섯 중에서 상황버섯과 차가버섯의 Bax 유전자의 발현이 가장 증가하였다.

인체 암세포에 대한 Bcl-2 유전자의 발현은 식용버섯과 약용버섯추출물 처리군은 대조군보다 감소하였다. 식용버섯보다 약용버섯추출물에서 Bcl-2 유전자의 발현이 더 감소되었고, 상황버섯과 차가버섯에서 가장 많은 감소를 나타내었다.

버섯추출물은 Bcl-2와 Bax 유전자의 발현을 조절하여 암세포 증식을 억제하는 것으로 사료된다. 약용버섯의 apoptosis를 조절하는 능력이 식용버섯보다 더 우수하였으며, 상황버섯과 차가버섯의 apoptosis 조절 효과가 높게 나타났다. 상황버섯의 단백질을 함유한 다당체가 SW480 인체 대장암세포의 성장단계 G2/M 단계를 중지시켜 apoptosis를 유도했다는 연구(23)와 차가버섯이 정상 대장점막세포의 유리라디칼(ROS) 소거효과 및 인체대장암세포 DLD-1의 apoptosis를 유도한다(24)는 연구결과와 같이 상황버섯과 차가버섯의 apoptosis 조절 효과의 우수성을 확인할 수 있었고, 상황버섯의 apoptosis 조절 효과가 가장 우수하였다.

iNOS 및 COX-2 염증유전자의 발현: 식용버섯과 약용버섯추출물의 AGS 인체 위암세포, HCT-116 인체 결장암세포, HepG2 인체 간암세포의 증식억제가 iNOS와 COX-2의 염증유전인자의 발현억제와의 관련성을 조사하기 위해 iNOS와 COX-2 mRNA 발현 변화를 RT-PCR analysis로 측정하였다(Fig. 5). 500 μ g/mL 농도에서 표고버섯, 아가리쿠스버섯, 동충하초, 영지버섯, 차가버섯과 상황버섯의 추출물 순으로 대조군에 비하여 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$). 식용버섯보다 약용버섯의 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현이 더 감소되었고, 약용버섯 중에서 상황버섯과 차가버섯추출물의 iNOS와 COX-2의 유전자 발현이 가장 많이 감소되었다. 이는 Yayah 등(25)의 연구결과와 비슷한 경향을 보였다.

COX-2는 암세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다(20). 많은 종류의 암 조직에서 COX-2는 높은 수준으로 발현되고 있으며, COX-2 유전자의 발현을 증대시킬 경우 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(21).

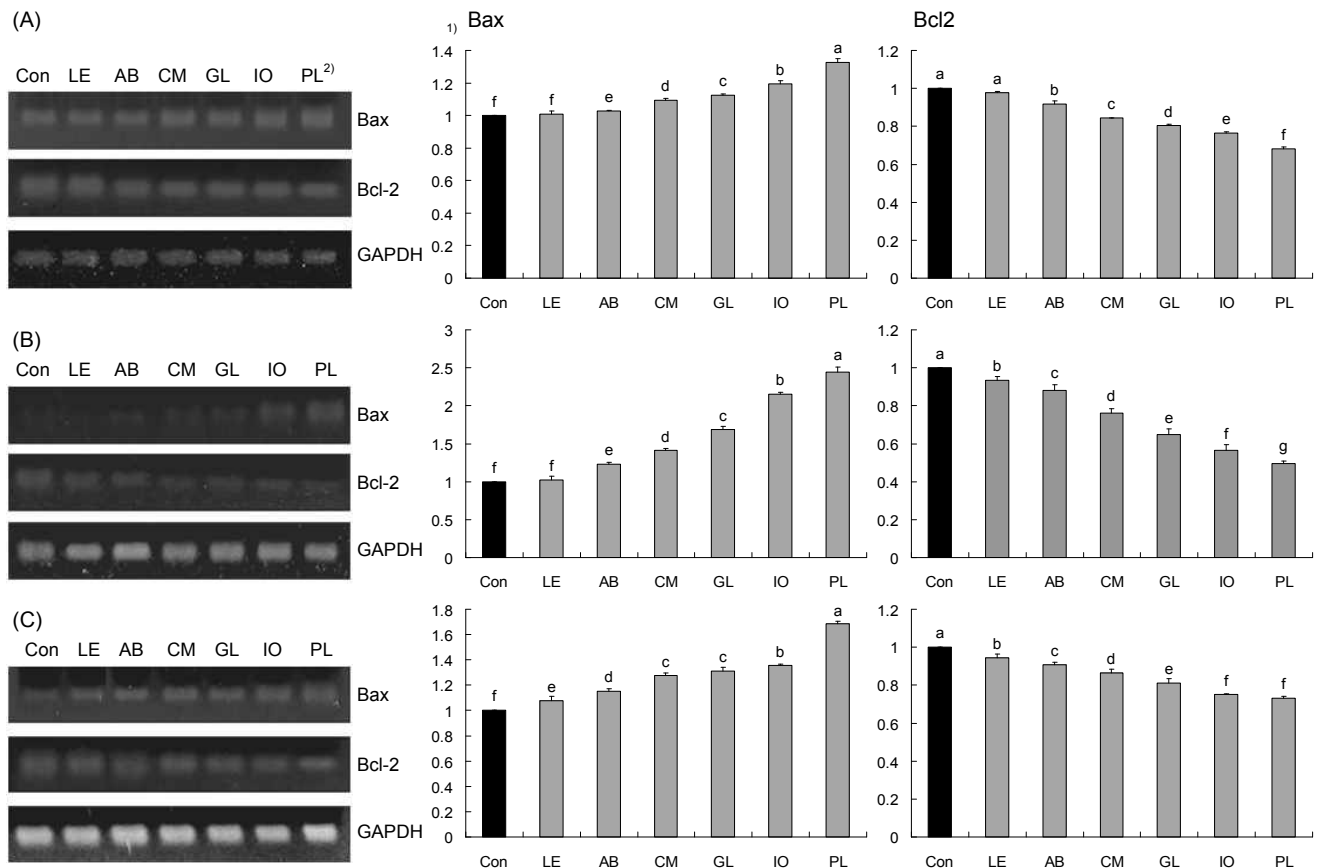


Fig. 4. Effects of mushroom samples (500 µg/mL) on mRNA expressions of Bax and Bcl-2 in AGS human gastric adenocarcinoma cell (A), HCT-116 human colon carcinoma cell (B) and HepG2 human hepatoma cell (C). ¹⁾The intensity of the band was measured with densitometer and expressed as fold-rate of control. Fold ratio: Gene expression/ GAPDH × control numerical value (control fold ratio: 1). ²⁾The abbreviations are same as shown in footnotes of Fig. 1. ^{a-f}Means with the different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물의 함량

식용버섯과 약용버섯의 생리활성 물질인 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 측정하였다(Table 4). 상황버섯 추출물의 총 폴리페놀 함량이 317.2 mg/g으로 가장 높게 나타났고, 다음으로 차가버섯, 영지버섯, 동충하초, 아가리쿠스버섯, 표고버섯추출물이 209.0 mg/g, 49.4 mg/g, 41.1 mg/g, 13.3 mg/g, 10.0 mg/g의 순으로 나타났다. Choi 등(26)의 연구 결과에서도 상황버섯의 페놀성분이 369.8 mg/g으로 가

장 높은 함량을 나타내어 본 연구와 비슷하였다.

식용버섯과 약용버섯추출물의 총 플라보노이드 함량은 표고버섯(0.01 mg/g), 아가리쿠스버섯(0.01 mg/g), 동충하초(9.1 mg/g), 영지버섯(15.5 mg/g), 차가버섯(19.0 mg/g), 상황버섯(35.7 mg/g) 추출물 순으로 나타났다. Kim 등(27)의 연구에서 상황버섯 에탄올 추출물의 플라보노이드 함량이 42.6 mg/g을 나타낸 것과 유사하였다.

식용버섯보다 약용버섯의 총 페놀 및 플라보노이드의 함량이 높았다. 이는 DPPH 및 OH· radical 소거효과와 인체 소화기 계통 암세포(AGS, HCT-116, HepG2) 성장억제효과와 같은 결과를 나타내었다. 버섯시료에 함유된 총 페놀함량과 DPPH 및 ABTS 소거능과는 각각 0.76, 0.84의 상관관계를 나타내어 버섯의 라디칼 소거능에 따른 항산화활성은 자체내 함유된 총 페놀함량이 유의적인 영향을 미쳤다고 하겠다(19). 이에 본 연구에서도 폴리페놀 및 플라보노이드의 물질은 버섯추출물의 항산화효과 및 *in vitro* 항암효과와 관련이 있으며, 이들 물질을 많이 함유한 버섯의 항산화효과 및 *in vitro* 항암효과가 증가하였다고 생각된다.

식물의 phytochemical의 강력한 항산화 능력은 인체 정상

Table 4. Total polyphenol and flavonoid contents in edible and medicinal mushroom extracts (mg/g)

Samples	Total polyphenol	Total flavonoids
<i>Lentinus edodes</i>	10.0 ± 1.1 ^{e1)}	0.01 ± 0.14 ^e
<i>Agaricus blazei</i>	13.3 ± 1.2 ^d	0.01 ± 0.17 ^e
<i>Cordyceps militaris</i>	41.1 ± 1.4 ^c	9.1 ± 0.1 ^d
<i>Ganoderma lucidum</i>	49.4 ± 1.2 ^c	15.5 ± 0.2 ^c
<i>Inonotus obliquus</i>	209.0 ± 0.9 ^b	19.0 ± 0.7 ^b
<i>Phellinus linteus</i>	317.2 ± 0.7 ^a	35.7 ± 5.1 ^a

¹⁾All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations.

^{a-e}Values in the column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

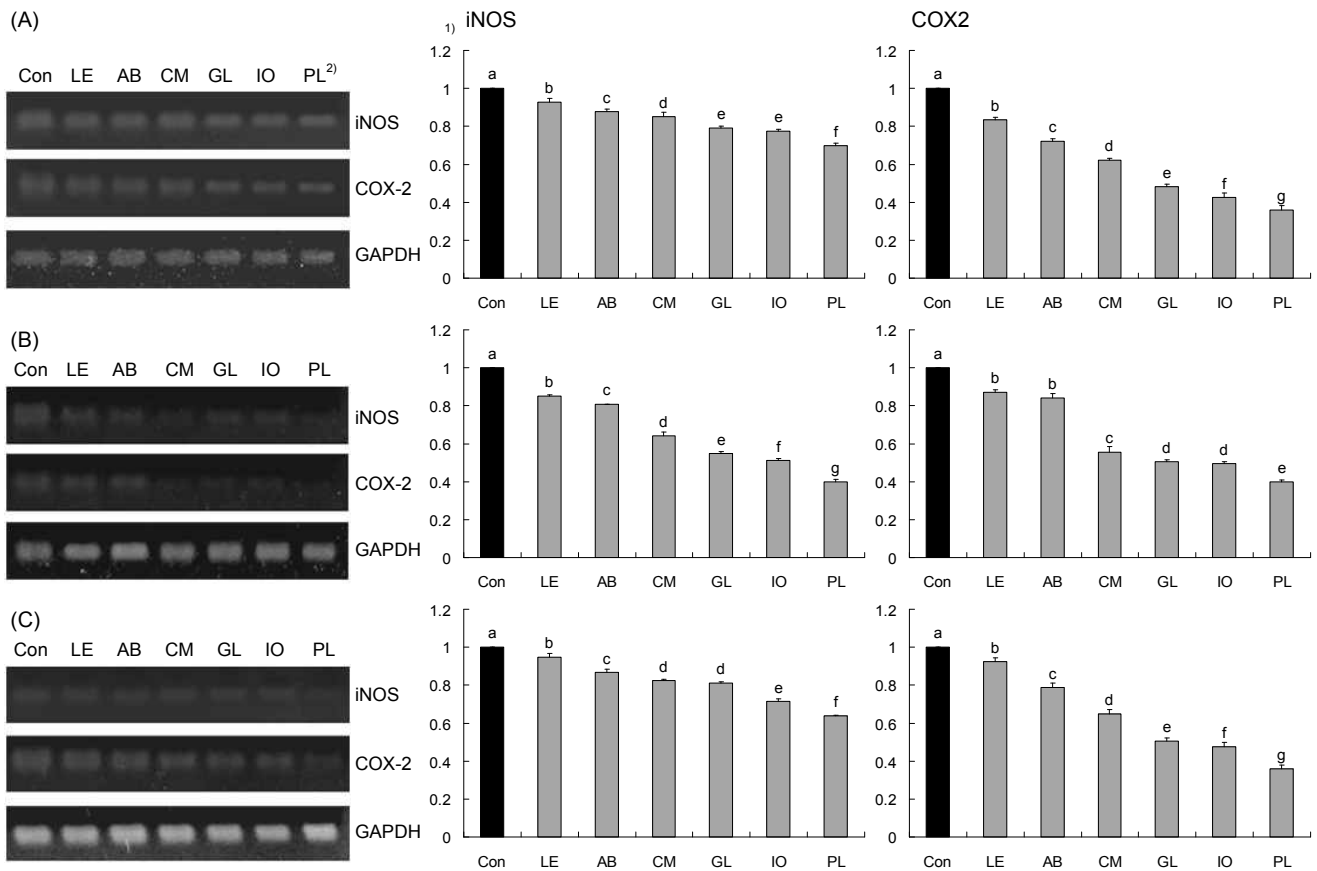


Fig. 5. Effects of mushroom samples (500 μ g/mL) on mRNA expressions of iNOS and COX-2 in AGS human gastric adenocarcinoma cell (A), HCT-116 human colon carcinoma cell (B) and HepG2 human hepatoma cell (C). ¹⁾Y axis values are same as shown in footnotes of Fig. 4. ²⁾The abbreviations are same as shown in footnotes of Fig. 1. ^{a-g}Means with the different letters on the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

세포를 공격하는 유리라디칼(ROS, OH \cdot , NO)의 산화 작용에 의한 염증 발생을 줄여 항염증, 항암 기능성을 가지게 된다(23). 특히 폴리페놀과 플라보노이드는 유리라디칼을 소거하는 기능기를 포함하고 있다.

요 약

식용버섯(표고버섯과 아가리쿠스버섯)과 약용버섯(영지버섯, 동충하초, 차가버섯, 상황버섯) 추출물의 항산화효과와 인체 암세포(AGS, HCT-116, 및 HepG2) 성장 저해율, apoptosis 유도에 관련된 Bcl-2, Bax 유전자, 그리고 염증에 관련된 iNOS 및 COX-2 유전자의 분석을 통해 식용버섯과 약용버섯의 *in vitro* 항암효과를 비교하였다. DPPH와 hydroxy radical(OH \cdot) 소거능력은 표고버섯, 아가리쿠스버섯, 동충하초, 영지버섯, 차가버섯, 상황버섯 순으로 높았으며, 식용버섯보다는 약용버섯의 항산화효과가 더 높았고, 약용버섯 중 차가버섯과 상황버섯의 항산화효과는 78%와 90%로 상황버섯이 가장 우수하였다($p < 0.05$). AGS 위암세포, HCT-116 결장암세포, HepG2 간암세포에 대한 억제효과는 식용버섯인 아가리쿠스버섯과 표고버섯 추출물은 5~40%,

약용버섯인 영지버섯과 동충하초 추출물은 28~79%, 상황버섯과 차가버섯 추출물은 75~91%로 나타났다. Apoptosis 유도에 관련된 Bcl-2 및 Bax 유전자 발현과 염증에 관련된 iNOS 및 COX-2 유전자 발현은 표고버섯, 아가리쿠스버섯, 동충하초, 영지버섯, 차가버섯, 상황버섯 순으로 apoptosis를 유도하는 작용과 세포의 발암(염증) 유도과정을 억제하는 효과가 높게 나타났다. 총 폴리페놀과 플라보노이드 화합물의 함량은 상황버섯의 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 각각 317.2 mg/g 및 35.7 mg/g으로 가장 높게 나타났으며 차가버섯, 영지버섯, 동충하초, 아가리쿠스버섯, 표고버섯 추출물 순으로 함량이 낮아졌다. 식용버섯보다 약용버섯의 총 폴리페놀과 플라보노이드 화합물의 함유량이 많았고, 이들 화합물 함량이 많을수록 항산화효과와 인체 암세포의 성장 억제효과가 높아졌다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Moradali MF, Mostafavi H, Ghods S, Hedjaroude GA. 2007. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int Immunopharmacol* 7: 701-724.
- Kim SS, Kim YS. 1990. *Korean mushrooms*. Yupoong Publishing Co., Seoul, Korea. p 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 fragariodes*. *Korean J Pharmacogn* 29: 79-85.
- Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi T, Mazda O, Takeuchi M. 2002. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol* 2: 1205-1211.
- Chang HL, Chao GR, Chen CC, Mau JL. 2001. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chem* 74: 203-207.
- Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. 1998. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 434-437.
- Bak SS, Kong CS, Rhee SH, Rho CW, Kim NK, Choi KL, Park KY. 2007. Effect of sulfur enriched young radish kimchi on the induction of apoptosis in AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J Food Sci Nutr* 12: 79-83.
- Chung EJ, Kim SY, Nam YJ, Park JH, Hwang HJ, Lee-Kim YC. 2005. Effects of kale juice powder on serum lipids, folate and plasma homocysteine levels in growing rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1175-1181.
- Choi EJ, Kim SH, Shim SH, Chung HJ, Bang WS. 2012. Antioxidative activity of the *n*-hexane fractions from *Spatholobus suberectus* (SS), *Scutellaria barbata* (SB), *Psoralea corylifolia* (PC), *Curcuma zedoaria* (CZ), *Schisandra chinensis* (SC), and *Corydalis turtschaninovii* (CT). *Korean J Food Sci Technol* 44: 493-497.
- Ryu DY, Kim MS, Min OJ, Kim DW. 2008. Antioxidative effects of *Phellinus linteus* extract. *Korean J Plant Res* 21: 91-95.
- Woisky RG, Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res* 37: 99-105.
- Sohn HY, Shin YK, Kim JS. 2010. Anti-proliferative activities of solid-state fermented medicinal herbs using *Phellinus baumii* against human colorectal HCT116 cell. *J Life Sci* 20: 1268-1275.
- Kim JK, Bae JT, Lee JW, Hwang Bo MH, Im HG, Lee IS. 2005. Antioxidative activity and inhibition effects on human leukemia cells of edible mushrooms extracts. *Korean J Food Preserv* 12: 80-85.
- Choi YH, Park C, Jung IH, Choi BT, Lee YT, Park DI, Jeong YK. 2005. *In vitro* cytotoxic effects of wine produced by *Phellinus linteus* fermentation. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 19: 950-954.
- Hong MH, Jin YJ, Pyo YH. 2012. Antioxidant properties and ubiquinone contents in different parts of several commercial mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1235-1241.
- Li YG, Ji DF, Zhong S, Zhu JX, Chen S, Hu GY. 2011. Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/EGFR/Akt signaling pathway in colorectal carcinoma. *Int J Biol Macromol* 48: 511-517.
- Huang HY, Chieh SY, Tso TK, Chien TY, Lin HT, Tsai YC. 2011. Orally administered mycelial culture of *Phellinus linteus* exhibits antitumor effects in hepatoma cell-bearing mice. *J Ethnopharmacol* 133: 460-466.
- Chung BH, Seo HS, Kim HS, Woo SH, Cho YG. 2010. Antioxidant and anticancer effects of fermentation vinegars with *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Medicinal Crop Sci* 18: 113-117.
- Li G, Kim DH, Kim TD, Park BJ, Park HD, Park JI, Na MK, Kim HC, Hong ND, Lim K, Hwang BD, Yoon WH. 2004. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 216: 175-181.
- An BJ, Bae MJ, Choi HJ, Zhang YB, Sung TS, Choi C. 2002. Isolation of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon (*Diospyros kaki* L. Folium). *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 45: 212-217.
- Yayeh T, Oh WJ, Park SC, Kim TH, Cho JY, Park HJ, Lee IK, Kim SK, Hong SB, Yun BS, Rhee MH. 2012. *Phellinus baumii* ethyl acetate extract inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and proinflammatory cytokine expression in RAW264.7 cells. *J Nat Med* 66: 49-54.
- Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Kim JK, Lim SS. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1087-1096.
- Kim JO, Jung MJ, Choi HJ, Lee JT, Lim AK, Hong JH, Kim DI. 2008. Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 684-690.

(2012년 12월 7일 접수; 2013년 4월 19일 채택)