

싸리버섯 추출물의 항돌연변이성 및 암세포 성장 억제 효과

김현정 · 이인선* · 이갑량†

영남대학교 식품영양학과

*계명대학교 식품가공학과

Antimutagenic and Anticancer Effects of *Ramaria botrytis*(Fr.) Rick Extracts

Hyun-Jeong Kim, In-Seon Lee* and Kap-Rang Lee†

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

*Dept. of Food science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Abstract

The inhibitory effect of *Ramaria botrytis* on the mutagenicity in *Salmonella* assay and cytotoxicity on cancer cell were studied. *Ramaria botrytis* methanol extracts showed antimutagenic effects of 60~90% on B(a)P and AFB₁ in *S. typhimurium* TA98 and TA100. These extracts showed 73~85% antimutagenicity on TA100 against MNNG. The methanol extracts with strong antimutagenic activities were further fractionated by ethylacetate and water, the ethylacetate fraction were found to be stronger antimutagenicity against MNNG than water fraction. *Ramaria botrytis* methanol extracts and ethylacetate fraction revealed the highest cytotoxicity against HT-29 human colon adenocarcinoma cells in which cell growth was inhibited by 57~88% and 69~94% at 0.25~1.0mg/ml, respectively. These methanol extract and ethylacetate fraction exhibited 53~79% and 66~87% inhibition against HepG2 human hepatocarcinoma cells, respectively. But water fraction showed only 10~24% inhibition. However, these extract and fractions did not show cytotoxic effect against human chang liver cells. From these results, it is considered that *Ramaria botrytis* has stronger antimutagenic and anticancer effects *in vitro*.

Key words: *Ramaria botrytis*, antimutagenicity, anticancer effects

서 론

최근 식품 및 천연식품 자원으로부터 생리활성을 가진 물질 검색이 많이 수행되고 있으며, 그중에서도 버섯류는 옛부터 식용 및 약용으로 널리 이용되었으며 최근들어 버섯류의 생리활성이 많이 보고되고 있다. 버섯류는 항암 효과, 항변이원성 효과, 항콜레스테롤성 등의 여러 생리활성이 존재한다고 알려져 암 및 성인병에 대한 예방 및 개선 효과가 기대되는 좋은 소재라 할 수 있다(1,2).

싸리버섯(*Ramaria botrytis*(Fr.) Rick)은 가을에 활엽수림내 땅위에 군생 또는 단생하며, 주로 동아시아, 유럽, 북미 그리고 우리나라의 산야에 널리 분포하고 있다. 특히 자실체가 닭싸리, 산호 모양으로 맛과 향기가 좋아 기호성 높은 식품으로 우리나라에서는 옛부터 널리 식용으로 이용되고 있다(3).

싸리버섯에 관해 알려진 바에 의하면, 싸리버섯에는 아미노산 중 aspartic acid가 가장 많이 존재하며, cysteine, histidine, glutamic acid 등이 많으며, 유기산으로는 succinic acid, malic acid, citric acid 등이, 유리당으로

서는 glucose, sucrose, maltose, fructose 등이 존재하고, 무기질로는 K, Na, Mg 등은 많으나 일반 식물성 성분에는 많은 Ca이 싸리버섯에서는 매우 적다고 알려져 있다(4, 5). 그리고 싸리버섯과에 속하는 붉은 싸리버섯(*Ramaria formosa*)은 마우스에서 sarcoma 180에 대하여 항암 효과가 있음이 보고되었으나(6), 싸리버섯(*Ramaria botrytis*(Fr.) Rick)에 대한 약리작용에 관한 연구는 아직도 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 산야에 존재하며 옛부터 식용으로 이용되고 있는 이 싸리버섯의 항돌연변이 및 항암 효과를 검색하기 위하여, 싸리버섯 메탄올 추출물과 그 분획물을 제조한 다음 직접 및 간접 변이원에 대한 항돌연변이 효과와 함께 암세포 증식 억제 효과를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 싸리버섯(*Ramaria botrytis*(Fr.) Rick)

† To whom all correspondence should be addressed

은 충청도 속리산에서 채취하여 말린 후 사용하였고, *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100은 미국 캘리포니아 대학의 B. N. Ames 교수로부터 제공받아 사용하였다. 암세포주인 HT29 과 HepG2 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받아 사용하였으며, 인간 유래의 정상 간세포인 chang cell은 본 대학 연구실의 세포를 사용하였다.

돌연변이 유발원인 aflatoxin B₁(AFB₁), benzo(a)pyrene(B(a)P), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide(4-NQO) 그리고 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 Sigma사로부터 구입하였으며, 기타 시약들도 특급 또는 일급 시약을 사용하였다.

시료 조제

건조된 찌리버섯은 먼저 waring blender로 3,000rpm에서 5분 동안 분쇄하여 분말화한 다음, 분말시료에 먼저 10배의 80% methanol을 첨가한 후 환류냉각기를 설치한 60°C의 수욕상에서 8시간 동안 3회 반복추출한 후 여과하였다. 이 여액을 감압농축시켜 메탄올 추출물로 사용하였다. 메탄올 추출물은 다시 에틸아세테이트와 증류수를 동량 혼합한 용액을 첨가하여 교반, 추출하여 다시 에틸아세테이트층과 물층으로 분리한 후 각각 감압여과하여, 이 여액을 다시 감압농축하고 동결건조하여 건조된 에틸아세테이트 분획과 물 분획을 얻었다. 이 시료들은 -30°C 보관하면서 사용하였으며, 실험시 증류수와 소량의 에탄올에 용해시켜 사용하였다.

항변이원성 검사

Ames와 Maron(7)의 방법에 의해 실험하였다. 즉 미리 멸균시킨 capped tube에 시료 50μl, 돌연변이원 50μl, S9 mix 500μl(직접변이원의 경우, 0.2M phosphate buffer), 균주 100μl를 넣고 37°C에서 20분 동안 preincubation시켰다. 이것을 top agar 2ml와 혼합한 후 최소평판배지(minimal glucose agar plates)에 끌고루 도말하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후 배지위의 복귀변이주(revertant)의 콜로니 수를 계수하였다. 체내 대사 활성 체제인 microsomal fraction 즉 S9 mixture 제조는 Ames와 Maron(7)의 방법으로 제조하였다. 한 시료에 대하여 3개의 최소평판배지를 사용하였으며, 변이원에 대한 억제효과는 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition %)로 나타내었다. 한편 시료와 변이원 물질의 농도는 예비 실험을 통하여 결정하였다.

암세포 증식 억제 효과

세포주 배양

암세포주로는 인간 유래의 colon carcinoma cell인 HT

29과 hepatoma cell인 HepG2를 사용하였다. 그리고 인간 유래의 정상 간세포인 chang cell을 사용하였다. HT 29와 chang 세포주는 RPMI-1640 배지에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillinG/streptomycin)을 첨가하여 배양하였고, HepG2 cell은 F-10배지에 10% FBS, 1% antibiotics을 첨가하여 배양하였으며, 이들 세포주는 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양세포는 2~3일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

MTT assay

MTT assay(8)는 먼저 배양된 cell에서 배지를 제거한 후 phosphated buffered saline(PBS)를 첨가하여 가볍게 섞은 후, PBS를 다시 제거하고 0.25% trypsin-EDTA를 첨가하여 37°C에서 5분간 배양하여 cell이 culture dish의 바닥으로부터 완전히 분리되었는지 현미경하에서 관찰한 후, culture 배지를 첨가하여 잘 혼합하여 cell수를 1 × 10⁵ cells/ml로 조정하여 실험에 사용하였다. 그리고 시료는 PBS에 용해시킨 후 0.22μm membrane filter로 여과한 후 사용하였다. 96-well microtiter plate에 준비된 cell을 100μl씩 첨가하고 각 농도의 시료도 10μl씩 첨가한 후 37°C의 5% CO₂하에서 48시간 배양하였고, 정상세포주의 경우는 시료 처리후 6일 동안 배양하였다. 이때 대조군은 시료 대신 PBS를 10μl를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 배양 후 MTT(5mg/ml)용액 10μl을 각 well에 가해주고 다시 4시간 더 배양하였다. 배양 종료시 1,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상징액을 제거하고 DMSO 100μl를 첨가해 생성된 formazan 결정을 용해시켜 550nm에서 microplate reader(Bio-Rad Co.)로 흡광도를 측정하였다.

통계분석

대조군과 각 시료에 대한 실험결과는 SAS를 이용한 Duncan's multiple range test 및 student's t test로 분석하였다.

결과 및 고찰

찌리버섯의 항돌연변이 효과

천연물에는 변이원 및 항돌연변이원을 포함한 여러 가지 성분이 혼재되어 있을 수 있어 찌리버섯 추출물과 그 분획 자체의 돌연변이원성 유무를 확인한 결과, 자료는 나타내지 않았지만 시료농도의 증가에 따른 his⁺ revertant colony수의 증감이 없는 것으로 보아 시료 자체에 의한 돌연변이원성은 존재하지 않았다. 이는 먹물버섯 에탄올 추출물의 처리시에도 시료 자체의 histidine 저하현상이 나타나지 않았다는 결과와 유사하였다(9).

짜리버섯 메탄올 추출물의 간접 변이원인 benzo(a)pyrene(B(a)P)과 aflatoxin B₁(AFB₁)에 대한 항변이원 효과를 검토한 결과는 Table 1 및 2에 나타내었다. 먼저 짜리버섯 메탄올 추출물의 B(a)P에 대한 항돌연변이 효과는 *S. typhimurium* TA98에서 짜리버섯 메탄올 추출물은 10%에서만 75%의 저해를 보였으나, TA100의 경우는 메탄올 추출물의 농도가 10%에서는 94%의 높은 저해를 나타내었고, 5%와 2.5%에서는 각각 88%와 69%의 저해 효과를 나타내어 시료의 농도가 증가될수록 더 큰 저해 효과를 나타내는 농도 의존적인 억제활성을 보였다. 그리고 AFB₁에 대한 짜리버섯 메탄올 추출물의 투여는 TA98과 TA100 두 균주에 대해 60% 이상의 저해효과를 보였으며, 특히 10%의 농도에서 83~84%의 높은 저해효과를 나타내었다. 이와 같이 두 종류의 간접 변이원에 대해 짜리버섯 메탄올 추출물은 비교적 높은 항돌연변이 효과가 있음을 알 수 있었다.

한편 세포내의 DNA에 직접적으로 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 물질인 MNNG와 4-NQO에 대한 짜리버섯 메탄올 추출물의 항돌연변이 효과는 Table 3과 4에서 처럼 TA100의 경우 메탄올 추출물 5% 이상에서 MNNG에 대해 75% 정도의 저해 효과를 보였으며, 특히 2.5%의 농도에서 85%의 가장 강한 항돌연변이 효과를 나타내었다. 그러나 4-NQO에 대한 짜리버섯 메탄올 추출물의 항돌연변이 효과는 시료 농도에 관계없이 20~45% 정도의

Table 1. Antimutagenic effects of the methanol extracts from *Ramaria botrytis* on the mutagenicity of benzo(a)pyrene(10µg/plate) in *S. typhimurium* TA98 and TA100 with S9 mixture

Treatment	Revertants/plate	
	TA98	TA100
Spontaneous	55.7 ± 1.53 ¹⁾	105.7 ± 1.52
B(a)P	1,144.6 ± 2.52	1,141.7 ± 1.5
B(a)P + Methanol ext.		
10%	328.7 ± 3.06(75) ²⁾	167.7 ± 2.52(94)
5%	987.2 ± 1.35(15)	230.0 ± 2.00(88)
2.5%	1,077.0 ± 2.0(-)	426.0 ± 2.65(69)

¹⁾The values are mean ± SD of 3 replications.
²⁾The values in parenthesis are the inhibition rate(%).

Table 2. Antimutagenic effects of the methanol extracts from *Ramaria botrytis* on the mutagenicity of aflatoxin B₁(1.5µg/plate) in *S. typhimurium* TA98 and TA100 with S9 mixture

Treatment	Revertants/plate	
	TA98	TA100
Spontaneous	41.2 ± 1.18 ¹⁾	109.7 ± 1.53
AFB ₁	768.7 ± 1.15	945.7 ± 1.58
AFB ₁ + Methanol ext.		
10%	163.3 ± 1.53(83) ²⁾	244.3 ± 1.50(84)
5%	333.3 ± 2.52(60)	276.1 ± 1.24(80)
2.5%	337.2 ± 1.22(59)	420.2 ± 1.12(63)

¹⁾The values are mean ± SD of 3 replications.
²⁾The values in parenthesis are the inhibition rate(%).

Table 3. Antimutagenic effects of *Ramaria botrytis* methanol extracts on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(0.35µg/plate) in *S. typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate
Spontaneous	103.3 ± 4.16 ¹⁾
MNNG	842.7 ± 3.06
MNNG + Methanol ext.	
10%	300.7 ± 2.52(73) ²⁾
5%	287.0 ± 2.00(75)
2.5%	213.2 ± 2.12(85)

¹⁾The values are mean ± SD of 3 replications.
²⁾The values in parenthesis are the inhibition rate(%).

Table 4. Antimutagenic effects of *Ramaria botrytis* methanol extracts on the mutagenicity of 4-nitroquinoline-1-oxide(0.1µg/plate) in *S. typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate
Spontaneous	103.7 ± 1.53 ¹⁾
4-NQO	890.7 ± 2.08
4-NQO + Methanol ext.	
10%	536.3 ± 2.52(45) ²⁾
5%	617.3 ± 2.08(35)
2.5%	748.1 ± 2.52(18)

¹⁾The values are mean ± SD of 3 replications.
²⁾The values in parenthesis are the inhibition rate(%).

낮은 저해효과를 나타내었다.

이와같이 짜리버섯 메탄올 추출물은 직접 및 간접 변이원에 대해 높은 항돌연변이 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 즉 짜리버섯 메탄올 추출물이 암의 초기화 단계에서 일어날 수 있는 돌연변이 유발에 대한 억제효과를 가지므로, 메탄올 추출물을 에틸아세테이트와 물로 더 분획하여 이들 분획들의 항돌연변이 효과를 살펴본 결과는 Table 5와 같다. 짜리버섯 에틸아세테이트 분획 10%의 경우 MNNG에 대해 97%의 가장 높은 항돌연변이 효과를 보였으며, 5%와 2.5%의 경우는 각각 70%와 40% 정도

Table 5. Antimutagenic effects of ethylacetate and water fractions from *Ramaria botrytis* on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine(MNNG) in *S. typhimurium* TA100

Treatment	Revertants/plate
Spontaneous	106.2 ± 2.46 ¹⁾
MNNG	823.3 ± 2.30
MNNG + EtOAc fr.	
10%	127.5 ± 3.42(97) ²⁾
5%	321.1 ± 2.64(70)
2.5%	536.2 ± 2.95(40)
MNNG + Water fr.	
10%	550.5 ± 2.27(38)
5%	650.9 ± 2.08(24)
2.5%	701.1 ± 2.55(17)

¹⁾The values are mean ± SD of 3 replications.
²⁾The values in parenthesis are the inhibition rate(%).

의 억제활성을 보였다. 또한 싸리버섯 물 분획의 경우는 40% 이하의 다소 약한 억제효과를 보였으나 농도 의존적인 억제활성을 보였다. 즉 메탄올 추출물이 MNNG에 대해 75~85% 정도의 항변이원성을 가지다가 에틸아세테이트 분획물에서 97%의 가장 높은 항돌연변이 활성을 가지는 것을 알 수 있었다.

따라서 싸리버섯 메탄올 추출물로부터 분획한 싸리버섯 에틸아세테이트 분획에서 강한 항변이원성 물질이 존재하나 물분획에서는 거의 활성이 없음을 확인할 수 있었으므로, 이로 미루어 보아 싸리버섯 속의 항변이원성 활성 성분은 주로 지용성이라고 생각되며, 이 성분의 분리 및 물질 규명에 대한 연구를 현재 수행하고 있다.

싸리버섯의 암세포 증식 억제 효과

싸리버섯 메탄올 추출물과 그 분획물의 암세포 성장에 미치는 영향은 Fig. 1과 같이, 인간 유래의 결장암 세포인 HT29에서 시료 농도 1mg/ml 투여시 싸리버섯 메탄올 추출물은 88%의 저해율을 그리고 에틸아세테이트 분획의 경우는 94%의 가장 높은 저해율을 보였고, 0.5mg/ml의 투여시에는 각각 72%와 86%의 저해율을 보였으며, 0.25 mg/ml 농도에서는 57~69%의 저해를 나타내어 시료 농도증가에 따른 억제효과가 증가함을 알 수 있었다. 그러나 싸리버섯 물 분획의 경우는 농도에 관계없이 30% 정도의 낮은 억제효과를 보였으며, 특히 농도가 증가할수록 성장율이 증가하는 경향을 나타내었다.

또한 인간 유래의 간암 세포인 HepG2에서는 시료 농도에 관계없이 싸리버섯 메탄올 추출물의 경우는 50~80% 정도의 저해율을 보였고, 에틸아세테이트 분획의 경우는 60~90% 정도의 조금 더 높은 억제효과를 보였으

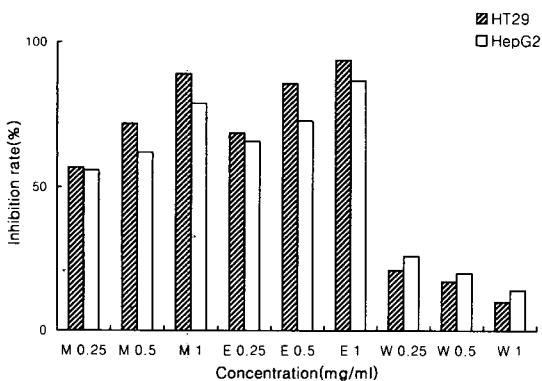


Fig. 1. Inhibitory effects of *Ramaria botrytis* on the growth of HT29 human colon carcinoma cells and HepG2 human hepatoma cells in MTT assay. M 0.25, methanol ext. 0.25; M 0.5, methanol ext. 0.5; M 1, methanol ext. 1.0; E 0.25, ethylacetate ext. 0.25; E 0.5, ethylacetate ext. 0.5; E 1, ethylacetate ext. 1.0; W 0.25, water ext. 0.25; W 0.5, water ext. 0.5; W 1, water ext. 1.0(mg/ml)

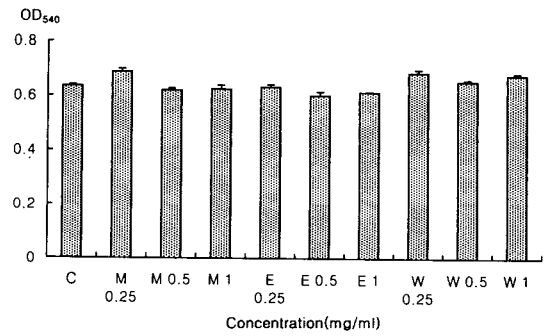


Fig. 2. Effects of *Ramaria botrytis* on the growth of human chang liver cells in MTT assay. C, control; M 0.25, methanol ext. 0.25; M 0.5, methanol ext. 0.5; M 1, methanol ext. 1.0; E 0.25, ethylacetate ext. 0.25; E 0.5, ethylacetate ext. 0.5; E 1, ethylacetate ext. 1.0; W 0.25, water ext. 0.25; W 0.5, water ext. 0.5; W 1, water ext. 1.0(mg/ml)

나, 물 분획의 경우는 20~40% 정도의 낮은 저해를 나타내었다.

한편 Fig. 2와 같이 인간 유래의 정상 간세포인 chang 세포에 대해서는 싸리버섯 추출물 및 분획물의 처리에 따른 세포 증식 저해 효과가 나타나지 않음을 알 수 있었다.

따라서 싸리버섯의 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획은 사람의 암세포주인 HT29 세포와 HepG2 세포에서만 유의적인 세포 독성이 있었고, 특히 결장암 세포인 HT29 세포에 대해서 간암 세포보다도 더 큰 억제 효과를 있음을 알 수 있었다.

돌연변이 억제 활성을 가진 물질중에는 종종 암세포의 성장을 저해하는 효과가 존재함이 많이 보고되고 있다. 들미나리 추출물의 경우 항변이원 효과 및 위암 세포인 AZ-521에 대해 항암 효과를 나타내며(10), 도라지 추출 성분도 항변이원성 효과 및 직장암과 결장암세포 등에 대해 항암 효과가 있음이 보고되기도 하였다(11). 이와같이 싸리버섯의 메탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획도 돌연변이 억제 효과가 존재하고, 또한 결장암 및 간암세포에 대해서 유의적인 세포 성장을 저해한 항암 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

싸리버섯(*Ramaria botrytis*(Fr.) Rick)의 항변이원성 및 암세포 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과, 싸리버섯 추출물과 분획물 그 자체의 돌연변이원성은 없었으며, 싸리버섯 메탄올 추출물은 간접변이원인 benzo(a)pyrene과 aflatoxin B₁ 그리고 직접변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine에 대해서 유의성 있는 돌연변이 억제효과를 나타내었다. 특히 에틸아세테이트 분획의 경우는 물 분획보다 MNNG에 대해서 더 큰 돌연변이 억제효과를 나타내었다. 또한 인간 유래의 결장암 세포인 HT29과 간암 세포인 HepG2에서도 싸리버섯 메탄올 추

출물 및 에틸아세테이트 분획의 경우 유의성 있는 암세포 성장 억제 효과를 나타내었으나, 정상 간세포인 chang cell에 대해서는 이들 시료들이 증식 억제 효과를 나타내지 않았다.

문 헌

1. Kada, T., Inoue, T., Morita, K. and Namiki, M. : Dietary desmutagens. In "Genetic toxicology of the diet" Knudsen, I.(ed.), Alan R. Liss Inc., New York, pp.245-251 (1986)
2. Micozzi, M. S. and Tangrea, J. A. : General introduction: Rational for the nutritional prevention of cancer. In "Nutrition and cancer prevention" Moon, T. E. and Micozzi, M. S.(eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp.3-12(1989)
3. Kim, S. S. and Kim, Y. S. : *Korean mushrooms*. Yupoong Publishing Co., Seoul, Korea, p.251(1990)
4. Seoh, J. H., Cho, S. Y. and Lee, S. W. : Study on the tasty constituents and minerals in *Clavariaceae botrytis*. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **3**, 17-21(1974)
5. Pyo, M. Y. and Ro, I. H. : A study on the amino acid contents of edible mushrooms. *Korean J. Nutr.*, **8**, 47-59 (1975)
6. Yoo, I. S., Woo, M. S., Choi, E. C. and Kim, B. K. : Studies on constituents of higher fungi of Korea(XXXIV) Antitumor components of *Ramaria formosa*. *Korean J. Mycol.*, **10**, 165-171(1982)
7. Ames, B. N. and Maron, D. M. : Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215 (1983)
8. Green, L. M., Reade, J. L. and Ware, C. F. : Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunological Methods*, **70**, 257-263(1984)
9. Kim, H. J., Lee, B. H., Kim, O. M., Bae, J. T., Park, S. H., Park, D. C. and Lee, K. P. : Antimutagenic effect of the fruiting body and the mycelia extracts of *Coprinus comatus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 452-457 (1999)
10. Park, Y. K., Lee, K. I. and Rhee, S. H. : Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **21**, 149-153(1992)
11. Lee, J. Y., Hwang, W. I. and Lim, S. T. : Effect of *Platycodon grandiflorum* DC extract on the growth of cancer cell lines. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **30**, 13-21(1998)

(1998년 8월 20일 접수)