

노루궁뎅이버섯 (*Hericium erinaceus*) 추출공정별 추출물의 대식세포 활성화에 대한 효과

김성필 · 최용희¹ · 강미영² · 남석현*

¹경북대학교 식품공학과, ²경북대학교 식품영양학과, 아주대학교 생명과학과

Effects of the Extracts by Extraction Procedures from *Hericium erinaceus* on Activation of Macrophage

Sung Phil Kim, Yong Hee Choi¹, Mi Young Kang² and Seok Hyun Nam*

Department of Biological Science, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

¹Department of Food Science and Technology

²Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received July 8, 2005; Accepted September 6, 2005

Effects of the aqueous or 50% ethanolic extracts prepared by various extraction procedures on macrophage activation were determined by using the mouse macrophage cell line RAW264.7 cells as a indicator cell. The results demonstrated that the fractions prepared by aqueous extraction for 2 h and by microwave extraction with 50% ethanol at 60 W for 3 min had the greatest inducing abilities for NO production, and that the greatest ROS scavenging abilities were found in the fractions prepared by hot water extraction for 2 h or 3 h, by microwave extraction with 50% ethanol at 60 W for 3 min and by 0.5% HCl extraction, respectively. Phagocytotic activities against *Candida albicans* were found to be highest for the 50% ethanolic extracts prepared by microwave extraction for 3 min at 60 W, 80 W and 12 W, respectively. Especially, we found that a extract prepared by microwave extraction with 50% ethanol at 60 W for 3 min enables to induce effectively overall functional activation of macrophage, such as NO production, ROS scavenging and phagocytosis of *C. albicans*, respectively. These results demonstrated that a 50% ethanolic extraction using microwave at 60 W for 3 min would be useful for enrichment of macrophage-activating components contained in *Hericium erinaceus*, implying participation of protein-bound polysaccharides as a active factor.

Key words: *Hericium erinaceus*, extraction procedures, macrophage, NO, ROS scavenging, phagocytosis

서 론

오랫동안 식용버섯이 암의 퇴행이나 면역증진, 그리고 세균성 감염의 억제에 효과가 있음이 알려져 왔다.¹⁾ 특히, 1962년 표고버섯 자실체의 열수추출물이 실험동물에 이식된 종양을 억제함이 밝혀진 이래, 표고버섯(*Lentinula edodes*)을 포함하여 무이버섯(*Grifola frondosa*), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 등의 다양한 버섯에서 항암활성이 보고 되었다.²⁾ 지금까지 *in vitro*나 실험동물에서 수행된 연구결과를 보면, 항암활성을 나타내는 성분의 일부는 다당류일 것으로 생각되며,³⁾ 실제로 약용버섯 그 자체로 또는 이들에서 추출한 다당성분을 이용하여 수행된 임

상치료의 결과에서 환자의 생존기간이 연장되었거나 암이 진전된 환자에 있어서 삶의 질이 개선되었다는 보고들과 같이 치료에 있어서 부분적인 성공 사례들이 있다.^{4,6)} 이와 같은 항암효과는 버섯 추출물이 직접적으로 암세포를 살해하거나 증식을 억제하는 것보다는 일반적으로 다당류 등 버섯 추출물의 성분이 생체의 면역반응을 활성화시킨 결과로 알려져 있어서, 대다수의 항암제가 암세포 특이적 살해활성이 없다는 점을 감안할 때, 암의 예방 및 치료 목적으로서 버섯 성분의 활용은 매우 고무적이라고 하겠다.

노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceus*)은 중국에서 후두버섯으로 부르고 약용 및 식용으로 소비되어 온 버섯으로서, 전통적으로 만성위염이나 신체허약증에 효과가 있다고 알려져 왔고, 최근에 버섯이 보유한 항산화활성, 항암활성 및 면역증강 활성화에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 최근에 노루궁뎅이버섯에 의한 혈관 평활근의 증식촉진 및 손상된 간에 대한 보호작

*Corresponding author
Phone: +82-31-219-2619; Fax: +82-31-219-1615
E-mail: shnam@ajou.ac.kr

용도 보고된 것에서 볼 때,⁷⁾ 이 버섯에는 약리활성을 가진 다양한 건강기능성 물질들이 함유되어 있을 가능성이 높다. 버섯 성분을 건강기능 보조제나 임상치료 보조제로 사용하기 위해서는 활성성분을 분별·분리하여 농화할 수 있는 간편한 공정의 개발이 절대적으로 요구된다고 하겠다. 따라서 본 실험에서는 노루궁뎅이버섯의 약리활성 중, 버섯의 항암활성과 밀접한 관련이 있는 내재면역 증강 활성화에 주목하여, 특히 내재면역계의 세포성분으로 가장 중요한 대식세포의 활성화 지표인 포식작용(phagocytosis), 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)의 생산 및 NO 생산을 지표로 하여 추출방법에 따른 추출물의 대식세포 활성화 유도활성을 측정하였다.⁸⁾

재료 및 방법

시료 및 시약. 본 실험에 사용된 건조 노루궁뎅이버섯은 경북대학교 농업생명과학대학 산림환경학실험실에 보존중인 *H. erinaceus* KNUF 1007 균주를 본 실험에 사용하였다. 사용균주는 potato dextrose agar(PDA)배지를 이용하여 25°C 항온기에서 배양하였다. 자실체 생산을 위한 배지는 톱밥배지(참나무톱밥 80%, 미강 20%)를 사용하였으며, 25°C에서 20일 동안 배양하여 균사활착이 완료된 후, 상대습도 95% 이상, 온도 15~18°C에서 자실체를 발생시켰다. 발생한 자실체는 즉시 읍건하여 시료로 이용하였다. Zymosan, luminol 및 기타 화학시약들은 모두 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였다. 효모 배양을 위한 YPD배지 제작에 사용된 peptone, yeast extract 및 agar는 Difco-BRL(Gaithersburg, MD, USA)의 제품을 사용하였으며, 동물세포배양에 사용된 배지 및 fetal bovine serum(FBS)과 염류용액은 모두 Hyclone사(Logan, UT,

USA)에서 구입하였다.

시료의 제조. 건조 노루궁뎅이버섯을 miller로 분쇄하고 나서 40 mesh의 표준망체를 통과시켜 만든 분말을 -20°C에서 보관하며 사용하였다. 시료와 추출 용매의 비율을 1:20으로 조절하며 열수 추출, 마이크로웨이브 추출, 산 및 염기 추출을 수행하였다. 열수 추출은 100°C에서 30분, 1, 2 및 3시간 동안 시행하였으며, 마이크로웨이브 추출은 2,450 MHz 주파수의 상압형 추출장치(Microdigest unit, Prolable, France)를 사용하여 40 W에서 120 W 조건에서 50% 에탄올을 용매로 사용하여 각각 1, 3, 5, 7, 9분간 추출하였다. 산 및 염기 추출의 경우에는 각각 0.3, 1, 3%의 HCl과 NaCl로 100°C에서 2시간 동안 추출하였다. 추출이 끝난 후 원심분리에 의하여 상침액을 회수하고 감압농축장치로 1/3 volume으로 농축한 뒤 4배량의 에탄올을 넣고 4°C에서 24시간 방치하였다. 원심분리에 의하여 침전물을 회수한 다음, 소량의 탈이온수로 침전물을 용해하여 dialysis tube(MWCO: 12 kDa, Sigma Chemicals)에 넣어 3일간 4°C에서 투석하고 동결·건조하여 분석용 시약으로 사용하였다. 시료의 추출수율은 원 시료량에 대한 조단백당류의 추출공정 후 시료량의 백분율로 구하였다. 각 시료분획별 추출방법은 Table 1에 정리하여 제시하였다. 추출된 시료분획 내의 endotoxin 혼입량은 E-TOXATE kit(Sigma Chemicals)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

추출물의 당질 및 단백질 함량 측정. 당류의 함량은 Saha와 Brewer의 방법⁹⁾에 따라 phenol-sulfuric acid법으로 수행하였다. 5%의 phenol(w/v) 0.2 ml과 sulfuric acid 1 ml을 시료 0.2 ml과 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 490 nm의 흡광도에서 측정하고 glucose 표준곡선을 기준으로 시료에 포함된 당 함량을 측정하

Table 1. Extraction procedures and yield rates, sugar and protein contents of the extracts

Fractions	Conditions for extraction	Yield (%)	Sugar (%)	Protein (%)	
No. 1	Control (hot-water extraction only)	ND#	ND	ND	
No. 2	Hot-water extraction	30 min	6.17	65.55	12.59
No. 3		60 min	6.25	83.33	14.00
No. 4		120 min	8.31	81.11	11.57
No. 5		180 min	4.90	61.10	8.80
No. 6	Microwave extraction with 50% EtOH at 80 W	1 min	3.27	41.83	6.85
No. 7		3 min	3.24	61.66	15.99
No. 8		5 min	3.41	38.25	8.64
No. 9		7 min	3.02	35.00	14.94
No. 10	9 min	3.79	25.50	15.35	
No. 11	Microwave extraction with 50% EtOH for 3 min	40 W	2.45	31.66	8.96
No. 12		60 W	1.09	51.83	6.77
No. 13		100 W	2.87	27.25	11.81
No. 14		120 W	2.95	22.33	19.41
No. 15	Acidic extraction with HCl	0.5%	7.04	58.33	1.85
No. 16		1%	10.82	61.67	6.97
No. 17		3%	6.14	75.00	3.19
No. 18	Basic extraction with NaOH	0.5%	8.15	51.66	6.12
No. 19		1%	14.94	62.23	1.36
No. 20		3%	24.69	41.34	0.75

not determined

였다. 단백질 함량은 BSA(bovine serum albumin) 표준곡선을 기준으로 Lowry 등의 방법¹⁰⁾에 따라 측정하였다.

Nitric oxide(NO) 생산 유도활성 측정. NO 소거활성은 마우스의 대식세포 세포주인 RAW 264.7 세포를 지시세포로 이용하여 Murakami 등의 방법¹¹⁾에 따라 측정하였다. RAW 264.7세포는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 공급자의 지시대로 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 media에서 계대 배양하였다. NO 소거활성을 측정하기 위하여 지시세포를 96-well에 1×10^5 cells/ml로 분주한 다음, 적당량의 시료를 세포배양 well에 첨가하여 37°C, 48시간 동안 5% CO₂의 공기조건에서 배양하였다. 시료에 대한 대조구로는 100 ng/ml의 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하여 활성화를 유도한 세포를 사용하였다. 배양 후, 상징액 100 μ l를 회수하고 여기에 동량의 Griess solution을 첨가하여 15분간 방치한 다음 상징액의 발색도를 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)를 사용하여 570 nm 및 650 nm의 흡광도로 측정하였다.

MTT assay에 의한 세포독성 검정. Mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다.¹²⁾ RAW264.7세포를 microplate에 NO 측정과 같은 조건으로 분주하여 24시간 배양한 후, 추출물 시료를 농도별로 처리하였다. 시료처리 후 48시간의 배양이 끝나면 배양액에 2 mg/ml의 MTT용액(Sigma Chemicals)을 50 μ l 첨가하고, 37°C에서 3시간 처리한 다음 150 μ l의 DMSO를 첨가하고 10분간 진탕시켜 세포 내에 들어간 색소를 충분히 용출시킨 후 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 570 nm와 690 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

세포 내 활성산소종 소거활성의 측정. 활성산소종에 대한 시료의 소거활성은 대식세포주인 RAW264.7 세포가 호흡폭발로 생산하는 활성산소종을 사용한 Boudard 등의 방법¹³⁾에 따라 측정하였다. 항체로 오피손화된 zymosan A는 멸균 탈이온수로 잘 세척한 100 mg의 zymosan A와 열 처리하지 않은 FBS 10 ml를 실온에서 30분간 방치한 후, HBSS로 3번 세척하여 제조하였다. RAW 264.7세포를 HBSS(Hank's balanced Salts Solution)

에 현탁한 다음, 1×10^6 개의 세포를 1.5 ml의 tube에 넣고 암실 조건에서 오피손화시킨 zymosan A와 luminol을 각각 1.1 mg/ml 및 10^{-5} M이 되도록 4°C에서 냉각하면서 혼합시켰다. 냉각 후, 진탕교반기를 사용하여 37°C에서 85 rpm의 조건으로 천천히 교반하면서 30분에서 35분간 재차 반응시켰으며, 반응이 끝난 후, luminometer(TD-2020, Turner Biosystems, CA, USA)를 사용하여 포식과정에서 생성된 활성산소종에 의한 산화 결과 나타나는 luminol의 발광도를 측정하였다.

Candida albicans를 이용한 포식활성의 측정. 인체감염 효모로 알려진 *Candida albicans*를 지시세포로 사용한 candidacidal assay는 Naama 등의 방법¹⁴⁾을 다소 변형하여 수행하였다. 간단히 설명하면, 적정농도의 각 추출시료를 1×10^7 cells의 RAW 264.7 세포에 첨가하여 37°C에서 5% CO₂의 공기조건에서 15분간 배양하였다. 배양 후, D-MEM배지를 이용하여 9×10^5 세포를 1.5 ml의 tube에 분주하고 미리 YPD 배지(2% peptone, 1% yeast extract, 2% glucose; w/v)를 이용하여 배양해 둔 *Candida albicans*와 2,000 : 1(RAW264.7 : *C. albicans*)의 세포 비율로 조정하여 37°C에서 다시 배양하였다. 배양이 끝나면 각 tube에서 0.1 ml를 회수하여 YPD 고체배지에 도말하고, 25°C에서 48시간의 배양으로 colony를 형성시킨 다음, 형성된 colony를 계수하였다.

통계분석. 3회 이상 반복실험에서 얻어진 data는 Statistical Analysis System software package로 분석하였다. 실험의 평균값은 mean \pm SD로 표시하였으며 실험군과 대조군, 그리고 실험군 사이의 평균값의 유의적 차이는 Anova Procedure test로 검증하였고, $p < 0.05$ 수준에서 통계적 유의성을 구하였다.

결과 및 토론

추출물의 제조. 담자균류의 protein-bound polysaccharide(단백다당)가 면역증진 효과를 가지며 특히 내재면역계의 활성화를 통한 생체의 면역증진효과가 이들 단백질다당류의 항암효과와도 밀접히 연관되어 있다는 사실이 표고버섯(*Lentinus edodes*)에서 추출된 β -1,3 glucan인 lentinan의 생물학적 효능의 검증 결과에

Table 2. Induction of NO production by the extracts from *Hericium erinaceus* in RAW264.7 cells

Fraction No.	NO production (μ M of nitrite)		Fraction No.	NO production (μ M of nitrite)	
	10 μ g/ml	100 μ g/ml		10 μ g/ml	100 μ g/ml
Control (-LPS)	0.36 \pm 0.000		Control (+LPS#)	24.13 \pm 0.353a	
1	0.24 \pm 0.060 ^{kl}	0.32 \pm 0.070 ^{hij}	11	0.80 \pm 0.070 ^{cd}	0.86 \pm 0.092 ^{def}
2	0.24 \pm 0.060 ^{kl}	0.38 \pm 0.092 ^{hi}	12	3.37 \pm 0.319 ^b	17.14 \pm 0.343 ^b
3	0.34 \pm 0.035 ^{jk}	0.44 \pm 0.092 ^{ghi}	13	0.52 \pm 0.070 ^{ghi}	0.70 \pm 0.035 ^{efg}
4	0.62 \pm 0.092 ^{defgh}	16.92 \pm 0.343 ^b	14	0.76 \pm 0.035 ^{de}	0.70 \pm 0.070 ^{efg}
5	0.42 \pm 0.000 ^{hijk}	2.75 \pm 0.368 ^c	15	0.98 \pm 0.035 ^c	0.86 \pm 0.139 ^{def}
6	0.64 \pm 0.092 ^{defg}	0.68 \pm 0.035 ^{efg}	16	-0.09 \pm 0.035 ^m	0.28 \pm 0.092 ^{hij}
7	0.82 \pm 0.035 ^{cd}	1.10 \pm 0.125 ^d	17	-0.09 \pm 0.070 ^m	0.01 \pm 0.035 ⁱ
8	0.56 \pm 0.070 ^{efgh}	0.94 \pm 0.035 ^{de}	18	0.03 \pm 0.092 ^{lm}	0.14 \pm 0.035 ⁱ
9	0.50 \pm 0.035 ^{ghij}	0.94 \pm 0.070 ^{de}	19	0.07 \pm 0.035 ^{lm}	0.01 \pm 0.035 ⁱ
10	0.72 \pm 0.060 ^{def}	0.72 \pm 0.000 ^{efg}	20	0.30 \pm 0.060 ^{jk}	0.58 \pm 0.092 ^{gh}

at a concentration of 100 ng/ml.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $p < 0.05$.

서 잘 보고되어 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 천연물에서 단백당류의 분리는 열수추출물을 에탄올로 침전시킨 조추출물을 순화시켜 나가는 방법이 주로 보고 되어있다.^{18,19)} 따라서 본 실험에서는 노루궁뎅이버섯에 함유된 다당 관련 생리활성물질을 농화시킬 수 있는 최적의 추출조건을 확립하기 위한 첫 단계로서 열수추출조건에 따른 추출분획별 생리활성을 평가할 목적으로 다양한 조건에서 노루궁뎅이버섯의 수용성 추출물을 제조한 다음 에탄올 침전을 통하여 회수한 조추출분획을 대상으로 추출분획의 회수율과 당류, 단백질의 함유도를 측정하였다. Table 1에서 보듯이 추출물의 회수율은 3% NaOH를 추출용매로 사용했을 때 가장 높게 나타났으며 전반적으로 산이나 알칼리 조건에서 추출물의 회수율이 높은 경향을 보였는데, 이것은 산이나 알칼리를 추출용매로 사용한 경우 버섯류의 세포벽에 함유되어 있는 유용물질인 단백당 관련물질의 추출이 용이하기 때문으로 생각된다.

추출분획별 NO 생산 유도활성. 이미 기술한 바와 같이 담자균의 단백당류는 내재면역계구성세포의 활성화를 통하여 생체의 면역력을 증강시키는 것으로 알려져 있기 때문에, 생체에 침입한 미생물을 직접 살해할 뿐 아니라 적응면역계의 작동을 유도하는 시발점으로서 작용하는 내재면역계의 세포인 대식세포의 활성화를 지표로 하여 노루궁뎅이버섯 조다당추출분획이 가지는 면역증강효과를 평가하였다. 마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7세포를 지시세포로 사용하여 각 추출조건 별 분획이 대식세포의 활성화로 생성되는 라디칼의 하나로서, 혈관확장 등의 감염초기 염증반응의 유도 및 NK 세포 활성화를 통한 암세포 제거에 깊이 관여하는 라디칼인 nitric oxide(NO)의 생성을 유도할 수 있는지 여부를 측정하였다.²⁰⁾ 실험 결과, 100 µg/ml의 시료농도에서 microwave를 사용하여 60 W에서 3분간 추출한 12번 분획이 가장 NO 생산 유도능이 높았으며, NO의 생산유도 활성은 양성대조구에서 사용한 그람음성세균의 대표적인 대식세포 활성화물질인 LPS에 의한 유도활성의 71%에 달하였다. 열수에서 2시간 추출한 4번 분획도 거의 12번 분획과 같은 수준의 NO의 생산유도 활성을 보였으나, 저농도의 시료 조건(10 µg/ml)에서도 12번 분획은 뚜렷하게 NO 생산을 유도하는 것으로 보아, 4번 분획보다 12번 분획의 활성이 높다는

것을 확인할 수 있었다. *Phellius linteus*의 산성 단백당류가 대식세포의 활성화를 통한 종양의 살해 및 수지상세포의 기능적 성숙을 강하게 유도한다는 보고^{21,22)}와 조단백당류의 회수율이 상대적으로 높은 산, 알칼리 추출분획의 NO 생성 유도활성이 낮게 측정된 본 실험의 결과는 상반되는 면이 있으나, 이것은 산, 알칼리 추출시 마이크로웨이브 추출방법에 비해 불용성의 단백당 관련물질이 많이 추출되어 나온 것이 때문으로 볼 수 있겠다.

추출분획별 활성산소종 소거활성. 대식세포의 포식작용과 더불어 지속적이고도 대량으로 생성되는 superoxide anion 등의 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)은 그 자체로 세포나 조직의 손상을 일으킬 뿐 아니라 동일한 세포에서 생성되는 NO와 반응하여 보다 독성이 강한 peroxynitrite를 생성하며, 이것이 DNA를 비롯한 세포 내 고분자 화합물의 산화적 손상 및 조절단백질의 nitration에 의한 불활성화를 유도하는 것으로 보고되어 있다.²³⁾ 따라서 ROS를 소거함으로써 peroxynitrite의 이차적 생성을 방지하는 것이 가능할 것으로 보기 때문에, 노루궁뎅이버섯의 각 조단백당류 분획이 가지는 ROS 소거활성을 재료 및 방법에서 기술한 대로 옵션화된 zymosan A를 처리한 대식세포주인 RAW264.7 세포를 이용하여 측정하였다 (Table 3). 실험 결과, 100 µg/ml의 시료를 첨가했을 경우, 실험의 대조구인 1번 분획과 6번 분획을 제외한 모든 분획에서 90% 이상의 ROS 소거활성이 측정되었다. 그러나 10 µg/ml의 시료처리 조건에서는 각 분획 별 ROS 소거활성의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 특히 4번 분획(2시간 열수추출)과 5번 분획(3시간 열수추출), 12번 분획(60 W 3분간 microwave 추출), 그리고 15번 분획(0.5% HCl 추출)이 91% 이상의 소거활성을 보였으며, 4번, 5번, 15번 분획의 소거활성이 12번 분획보다 약간 높게 나타났다. 이상의 실험을 통하여 12번 분획에는 대식세포의 NO 생산을 효과적으로 유도하는 반면, ROS를 적극적으로 소거하는 물질이 포함되어 있을 가능성이 강하게 시사되었다.

추출분획별 *C. albicans* 포식활성. 대식세포의 활성화 지표로서 감염 미생물에 대한 포식작용(phagocytosis)의 유도는 매우 중요하다. 대식세포의 포식활성을 간편하게 측정하는 것으로는

Table 3. Scavenging ability of the extracts from *Hericium erinaceus* to ROSs produced by optionized zymosan in RAW264.7 cells

Fraction No.	% of scavenging		Fraction No.	% of scavenging	
	10 µg/ml	100 µg/ml		10 µg/ml	100 µg/ml
Control (-LPS)	0.00 ⁱ	0.00 ^e	Control (+LPS#)	-29.89±2.365 ⁱ	-29.89±2.365 ^f
1	-6.74±4.774 ⁱ	38.68±2.361 ^d	11	60.74±4.913 ^{bc}	93.74±2.562 ^a
2	85.04±1.585 ^{bc}	97.15±3.137 ^a	12	91.36±2.444 ^{ab}	94.00±1.940 ^a
3	88.43±1.585 ^{abc}	91.46±2.424 ^a	13	53.58±8.179 ^e	96.53±2.394 ^a
4	97.43±0.340 ^a	98.06±1.164 ^a	14	33.98±5.968 ^b	92.66±4.002 ^a
5	96.76±1.000 ^a	97.80±1.469 ^a	15	98.24±0.872 ^a	94.45±2.188 ^a
6	-3.81±10.330 ⁱ	33.33±4.988 ^c	16	63.71±4.586 ^f	85.55±2.811 ^{ab}
7	1.09±10.411 ⁱ	83.74±2.835 ^{ab}	17	80.84±4.506 ^{cd}	95.60±0.565 ^a
8	69.04±3.155 ^{ef}	90.87±5.011 ^a	18	60.39±2.816 ^{bc}	95.69±0.964 ^a
9	74.14±3.720 ^{de}	96.24±0.944 ^a	19	65.20±1.034 ^{ef}	95.82±2.751 ^a
10	-4.531±0.625 ⁱ	97.73±0.835 ^a	20	61.89±1.417 ^{bc}	96.92±0.794 ^a

at a concentration of 100 ng/ml.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $p < 0.05$.

Table 4. Candidacidal assay for determining phagocytotic activity of the extracts from *Hericium erinaceus* in RAW264.7 cells

Fraction No.	% of cell killing at 100 µg/ml	Fraction No.	% of cell killing at 100 µg/ml
Control (-LPS)	16.32±3.997 ^{ghi}	Control (+LPS [#])	26.21±2.261 ^{bc}
1	14.94±2.446 ^{hi}	11	18.97±1.724 ^{defgh}
2	22.70±2.737 ^{ede}	12	29.77±2.542 ^{ab}
3	22.30±1.555 ^{cde}	13	26.55±3.396 ^{bc}
4	20.69±3.605 ^{def}	14	33.79±2.946 ^a
5	21.03±5.207 ^{de}	15	11.84±2.079 ⁱ
6	25.98±1.899 ^{bc}	16	23.33±1.211 ^{cd}
7	28.28±1.920 ^b	17	15.86±1.379 ^{ghi}
8	18.85±1.394 ^{defgh}	18	20.69±1.034 ^{def}
9	18.51±2.107 ^{efgh}	19	22.87±1.961 ^{cde}
10	11.95±1.555 ⁱ	20	19.89±1.736 ^{defg}

at a concentration of 100 ng/ml.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $p < 0.05$.

Table 5. Cell cytotoxicity of the extracts from *Hericium erinaceus* in RAW264.7 cells

Fraction No.	Cell viability (%)		Fraction No.	Cell viability (%)	
	10 µg/ml	100 µg/ml		10 µg/ml	100 µg/ml
Control (-LPS)	100.00±3.883		Control (+LPS#)	99.31±6.786	
1	104.95±8.309	98.10±9.351	11	103.74±2.200	91.10±4.759
2	105.06±3.989	124.38±4.738	12	94.25±3.267	109.27±3.135
3	96.86±8.250	114.80±3.585	13	102.38±4.185	101.19±6.951
4	99.18±3.211	120.79±9.537	14	103.44±4.448	96.63±0.858
5	88.22±11.396	111.76±6.606	15	100.22±6.481	91.07±10.067
6	105.92±5.866	96.54±1.985	16	101.04±8.049	97.30±2.254
7	103.54±7.821	96.61±5.426	17	98.51±4.247	100.63±0.846
8	90.40±5.022	116.77±9.133	18	104.36±9.733	104.19±5.996
9	99.03±4.601	85.32±5.603	19	100.35±16.981	93.15±2.544
10	102.57±8.572	102.22±3.135	20	103.63±12.173	90.60±4.741

at a concentration of 100 ng/ml.

Values not sharing common letter in column were significantly different at $p < 0.05$.

optionization된 효모 세포벽 구성성분인 zymosan을 대식세포가 포식하는 과정에서 발생한 ROS를 정량함으로써 측정하는 방법이 있으나, 포식작용과 ROS의 생성은 별개의 반응일 뿐 아니라,⁷⁾ 이미 수행한 실험의 결과와 같이 시료가 강력한 항산화성 화합물이거나 포식작용에 필요한 대식세포 항원수용체와 연관된 세포 신호전달경로의 저해제인 경우, 포식작용과 관계없이 ROS의 생산이 억제되는 경우가 발생할 가능성이 높다. 따라서 추출분획이 대식세포의 포식작용에 미치는 정확한 효과를 평가하기 위하여 지시세포인 RAW264.7 세포가 인체감염 효모로 알려진 *Candida albicans*를 직접 포식한 정도를 포식반응 후 남아있는 효모의 수를 colony assay로 측정하였다. Table 4에서 보듯이 14번 분획의 효모살해능이 33.8%로 가장 높았고 그 다음으로 12번 분획(29.8%) > 7번 분획(28.3%) > 13번 분획(약 26.6%)과 6번 분획(26.0%)의 순서로 활성이 낮아졌다. 이 결과는 microwave 추출이 노루궁뎅이버섯에서 대식세포의 포식능력을 유도하는 물질의 추출에 매우 유효한 방법이라는 사실을 보여주었다.

추출분획별 세포독성의 측정. 이상 기술한 실험에서 나타난 억제 및 증진효과가 노루궁뎅이버섯 추출분획을 첨가함으로써 발생하는 지시세포의 사멸이나 증식에 의한 것인지 여부를 알

아보기 위하여 지시세포인 RAW264.7에 각 추출분획을 처리한 결과 나타나는 세포의 생존율을 MTT assay에 의하여 측정하였다. Table 5에 정리된 것처럼, 9번 분획을 100 µg/ml로 처리했을 때 약 85%의 생존율이 나타난 것을 제외하고는 모든 분획에서 90% 이상의 생존율을 보였다. 또한 2번 및 4번 분획의 처리로 약간의 세포증식이 일어난 것을 제외하고는 특별히 추출분획이 RAW264.7 세포의 증식을 촉진한 증거를 얻을 수 없었다.

본 연구의 결과, 대식세포의 NO 생산을 유도하는 효과는 4번과 12번 추출분획이, 그리고 ROS의 소거효과는 4번, 5번, 12번 및 15번 추출분획이 높았고, 대식세포의 포식작용에 대한 증진효과는 7번, 12번 및 14번 추출분획이 우수하다는 결론을 얻었다. 그러나 이와 같은 대식세포에 대한 기능항진 효과가 추출물 안에 혼입된 endotoxin 유사물질에 의하여 나타날 가능성을 배제할 수 없기 때문에, 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 endotoxin의 양을 정량하였으며, 7번 분획을 제외한 나머지 추출분획의 endotoxin 양은 0.015 EU/m³이하로 실험상 무시할 수준으로 판명되었다(미발표 결과). 특히, 12번 추출분획은 NO 생산, ROS 소거 및 미생물 포식과 같은 대식세포의 기능 전반을 효과적으로 활성화시키는 것이 나타났고, 반복 실험의 결과

에서도 동일한 활성화 효과를 확인할 수 있었다. 본 실험에서 사용한 추출과정은 천연물에서 단백당류의 조추출분획의 제조에 이용되는 것이기 때문에, 결과에서 나타난 RAW264.7 세포의 활성화에 단백당류 관련 성분이 관여했을 가능성이 높다. 그러나 생물활성과 단백당류의 관련성을 정확히 구명하기 위해서는 gel filtration 및 이온교환 chromatography를 통하여 단백당의 분리와 더불어 화학적, 생물학적 확인이 진행될 필요가 있다. 본 실험에 의하여 50% 에탄올을 추출용매로 사용한 microwave법이 노루궁뎅이버섯의 대식세포 기능증진 물질의 농화에 유용하게 이용될 수 있는 가능성이 제시되었으나, 조추출물의 활성도를 유지하면서 회수율을 높이기 위하여 추출법의 개선 필요성이 대두되고 있어, 현재 연구를 진행 중이다.

초 록

다양한 추출공정에 의하여 제조된 노루궁뎅이버섯의 열수 및 50% 에탄올 추출분획이 대식세포의 활성화에 미치는 효과를 마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포를 사용하여 측정하였다. 실험 결과, NO 생산능은 2시간 열수추출한 분획과 60 W에서 50% 에탄올로 3분간 microwave로 추출한 분획이 높았고, 활성산소종(ROS)에 대한 소거활성은 2시간 또는 3시간 열수추출한 분획과 60 W에서 50% 에탄올로 3분간 microwave로 추출한 분획 및 0.5% HCl로 추출한 분획에서 높게 나타났다. 50% 에탄올 추출에 있어서 60 W, 80 W 및 120 W에서 3분간 microwave로 추출한 분획들이 RAW264.7 세포의 *Candida albicans*에 대한 포식활성을 크게 유도한다는 사실을 알았다. 특히 50% 에탄올을 용매로 사용하여 60 W에서 3분간 microwave로 추출한 분획은 NO 생산, ROS 소거 및 *C. albicans*에 대한 포식활성의 전반적인 대식세포의 활성화를 유도하였다. 이 사실은 노루궁뎅이버섯에 있어서 60 W에서 3분간 microwave에 의한 50% 에탄올 추출조건이 함유된 다당류가 관련된 대식세포 활성화 성분의 농화에 유용하게 사용될 수 있음을 보여주었고, 단백당류가 활성성분으로서 관련되었을 가능성을 시사하였다.

Key words: 노루궁뎅이버섯, 추출공정, 대식세포, 일산화질소, ROS 소거, 포식작용

감사의 글

본 연구는 농림기술개발과제의 연구비 지원(과제번호: 204009-2)에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Wasser, S. P. and Weis, A. L. (1999) Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycete mushroom: current perspectives. *Int. J. Med. Mushrooms* **1**, 31-62.
2. Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nankinishi, M. and Fukoka, F. (1969) Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res.* **29**, 734-735.
3. Reshetnikov, S. V., Wasser, S. P. and Tan, K. K. (2001) Higher basidiomycetes as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int. J. Med. Mushrooms* **3**, 361-394.
4. Kidd, P. M. (2000) The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Med. Rev.* **5**, 4-27.
5. White, R. E. D., Hackman, R. M., Soares, S. E., Beckett, L. A. and Sun, B. (2002) Effects of mushroom mycelium extract on the treatment of prostate cancer. *Urology* **60**, 640-644.
6. Jong, S. C. and Donovick, R. (1989) Antitumor and antiviral substances from fungi. *Adv. Applied Microbiol.* **34**, 183-261.
7. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2001) In *Immunobiology: The immune system in health and disease* (5th ed.) Garland Publishing, New York.
8. Choi, W.-S., Kim, C.-J., Park, B.-S., Lee, S.-E., Takeoka, G. R., Kim, D.-G., LanPiao, X. and Kim, J. H. (2005) Inhibitory effect on proliferation of vascular smooth muscle cells and protective effect on CCl4-induced hepatic damage of HEAL extract. *J. Ethnopharmacol.* in press.
9. Saha, S. K. and Brewer, C. F. (1994) Determination of the concentration of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glyco-proteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.* **254**, 157-167.
10. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1954) Protein measurement with Folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
11. Murakami, A., Gao, G., Kim, O. K., Omura, M., Yano, M., Ito, I., Furukawa, H., Jiwajinda, S., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. (1999) Identification of coumarins from the fruit of *Citrus hystrix* DC as inhibitor of nitric oxide generation in mouse macrophage RAW 264.7 cells. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 333-339.
12. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
13. F. Boudard, Vallit, N., Cabaner, C. and Bastide, M. (1994) Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods* **174**, 259-268.
14. Naama, H. A., Mack, V. E., Smyth, G. P., Stapleton, P. P. and Daly, J. M. (2001) Macrophage effector mechanism in melanoma in an experimental study. *Arch. Surg.* **136**, 804-809.
15. Franz, G. (1989) Polysaccharides in pharmacy: current application and future concepts. *Planta Med.* **55**, 493-497.
16. Chihara, G., Maeda, Y. and Hamuro, J. (1982) Current status and perspectives of immunomodulators of microbial origin. *Int. J. Tiss. React.* **4**, 207-225.
17. Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N. and Yamadae, Y. (1994) Enhancement of cytokine production by macrophage stimulated with (1→3)-β-glucan, Grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1554-1560.
18. Kim, G. Y., Park, S. H., Nam, B. H., Lee, S. J. and Lee, J. D. (2003) Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk & M. A. Curtis) Teng. *Biores. Technol.* **87**, 81-87.
19. Choi, M.-Y., Lim, S.-S. and Chung, T.-Y. (2000) The effects of hot water soluble polysaccharides from *Lentinus edodes* on lipid metabolism in the rats fed butter yellow. *J. Korean Soc*

- Food Sci. Nutri.* **29**, 294-299.
20. Bogdan, C., Rollinghoff, M. and Diefenbach, A. (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* **173**, 17-26.
21. Kim, G.-Y., Oh, Y.-H. and Park, Y.-M. (2003) Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 399-407.
22. Park, S.-K., Kim, G.-Y., Lim, J.-Y., Kwak, J.-Y., Bae, Y.-S., Lee, J.-D., Oh, Y.-H., Ahn, S.-C. and Park, Y.-M. (2003) Acidic polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* induce phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 449-458.
23. Guzik, T. J., Korbut, R. and Adamek-Guzik, T. (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune response. *J. Physiol. Pharmacol.* **54**, 469-487.