

영지버섯(*Ganoderma lucidum* Krast)의 순차 분획물의 산화적 스트레스 억제효과와 항돌연변이 및 암세포 증식 억제 효과

오세인 · 이미숙*
서일대학 식품영양과, *한남대학교 식품영양학과

Effects of Antioxidative stress, Antimutagenicity and Cytotoxicity of Cancer cells in Fractional Extracts from *Ganoderma lucidum* Karst

Se-In Oh, Mee-Sook Lee*
Dept. of food and nutrition, Seoil College, Seoul 131-702, Korea
*Dept. of food and nutrition, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

Abstract

This study was performed to determine the antioxidative effect of the hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol and water fractions of *Ganoderma lucidum* extracts on the inhibition of malondialdehyde(MDA) and bovine serum albumin(BSA) conjugation reaction, the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging effect on 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) radical, the antimutagenic capacity as measured by the Ames test and the inhibitory effect on cancer cell. *Ganoderma lucidum* is believed to have possible antioxidative capacities, although the results have varied according to the assay method. The most effective antioxidative capacity was inhibition of lipid peroxidation. Among the five fractions, water fraction showed strong inhibition rates on MDA & BSA conjugation reaction, and ethylacetate fractions showed the most effective inhibition rate on lipid peroxidation and scavenging effect on DPPH radical. The indirect and direct antimutagenic effects of ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* were examined by Ames test using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. Among the samples, the water fraction did not have any antimutagenic effect. The inhibition rates on mutagenicity in the presence of 2.5 mg/plate were nearly 100% for *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 except the hexane fraction of the direct mutagenicity mediated by 2-Nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA98(64.69%). Under the 2.5 mg/plate concentration, the inhibitory effects of hexane and dichloromethane fraction were superior to that of the other fractions on the direct mutagenicity for *Salmonella typhimurium* TA100 and indirect mutagenicity for *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. The inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* extracts on cell proliferation in HeLa and MCF-7 was investigated by MTT test. The dichloromethane fraction showed highly antiproliferative effect in HeLa and MCF-7(IC₅₀: 0.122 mg/mL, 0.272 mg/mL, respectively) cells while the water fraction had a weak inhibitory effect(IC₅₀: 0.691 mg/mL, 10.919 mg/mL respectively). These results suggest that *Ganoderma lucidum* may have antioxidative, antimutagenic and anticancer capacities and may be a candidate of the prevention and dietetic treatment of chronic diseases and the development of antioxidative, antimutagenic and anticancer functional food.

Key words : *Ganoderma lucidum*, MDA & BSA conjugation reaction, lipid peroxidation, DPPH radical scavenging effect, antimutagenicity

1. 서 론

Corresponding author: Mee-Sook Lee, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea
Tel : 042) 629-7494
Fax : 042) 629-7490
E-mail : meesook@hannam.ac.kr

만년버섯 또는 불로초라고도 불리는 구멍장이 버섯과 영지속에 속하는 영지버섯은 옛부터 한방에서 건위, 건뇌, 강장, 강심, 이뇨, 해독, 항균, 면역, 진해, 진

통, 신경쇠약, 불면증, 급·만성 간염, 위궤양, 혈압강하 등에 효과가 있는 약용버섯으로서 이용되어 왔으나 최근 드링크제를 비롯한 식품으로서의 이용이 증대되고 있다.

산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxy radical, singlet oxygen 및 H₂O₂ 등을 포함한 활성산소는 생체 내에서 산화를 촉진시키는데(Comporti M 1993) 특히, 생체막 구성성분인 인지질의 불포화지방산의 과산화반응을 일으켜 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유도한다(Meneghini R 등 1993). 버섯류의 항산화 활성은 *Lentinus edodes*(Cheung LM 등 2003), 및 *Dictyophora indusiata*(Mau JL 등 2002), *Pleurotus ostreatus*(Yang JH 등 2002)의 경우 추출물의 폴리페놀 함량에 따라 프리라디칼 제거 활성, 환원력, Fe²⁺ 이온의 chelating effect 등이 농도 의존적으로 증가하며 *Coriolus versicolor* 등 8종의 버섯(Lie F 등 1997) 및 *Grifola frondosa*(Lee BC 등 2003)으로부터 추출한 단백 다당체에 대한 프리라디칼 제거활성도 보고되었다.

암화 과정의 개시단계에서 발생하는 세포돌연변이는 DNA의 산화적 손상에 의해 초래된다. 그 원인물질은 친전자성을 띤 활성산소인데 이 활성산소는 세포 내 DNA의 친핵성 부위와 결합함으로써 세포변이를 일으킴으로서 세포의 암화과정에 관여한다(Comporti M 1993, Meneghini R 등 1993). 버섯류의 항암활성으로는 *Phellinus linteus*, *Coriopolus hirsutus*, *Ganoderma applanatum* 등의 열수 추출물이 항암활성이 있다고 보고되었고(Chihara G 등 1970), Kwon 등은 영지버섯, 아가리쿠스, 표고버섯, 운지버섯, 상황버섯의 단백다당체에서 7종류의 암세포의 생존율을 조사하였다(Kwon SH 등 2003).

따라서 본 연구에서는 영지버섯 분획별 추출물, 즉 hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 물 분획에서 MDA에 대한 단백질 보호효과, 지질과산화 저해효과와 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical 소거효과를 측정하여 산화적 스트레스 억제효과를 알아 보았다. 또한 Ames test를 이용하여 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100균주에서 영지버섯 분획별 추출물의 직접 및 간접 돌연변이 유발 억제능을 탐색하였다. 또한 MTT assay로 영지버섯 분획별 추출물의

자궁경부암세포(HeLa)와 유방암세포(MCF-7)의 증식저해 정도를 측정하여 영지버섯의 생리적 기능에 대한 활성을 탐색하고 그 효용가치를 극대화시킬 수 있는 방안을 마련하기 위한 기초자료를 얻고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

영지버섯(*Ganoderma lucidum* Krast)을 구입하여 수세하여 동결건조하고 분쇄한 후 밀봉·냉동보관(-20℃)하여 시료로 사용하였다.

2. 시료의 추출 및 순차분획

영지버섯의 분획별 추출물은 건조시료 일정량(5 g)에 20배의 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 동안 추출한 후 여과하는 과정을 2회 반복하였다. 여과액을 회전 진공증발기(EYELA, Rotary vacuum evaporator N-N series)로 농축한 후 영지버섯의 에탄올 추출물을 적당량의 물에 분산시킨 후 극성에 따라 hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 물 분획의 순으로 separatory funnel을 이용하여 순차용매 분획하였다. 각 용매 분획물은 rotary evaporator로 농축된 후 최소량의 0.1M PBS(sodium phosphate buffer, pH 7.4)에 녹여 MDA & BSA (Sigma, Bovine serum albumin) conjugation 반응을 위한 시료로 사용하였고, DMSO(dimethyl sulfoxide)를 가해 녹여 지질과산화억제활성, DPPH 라디칼 소거활성, Ames tes를 위한 시료로 사용하였고, 70% 분획별에 녹여 MTT assay를 위한 시료로 사용하였다.

3. 항산화효과 측정

1) MDA와 BSA conjugation 반응 억제효과 측정

Park YH(2000)의 방법에 따라 Bovine serum albumin(BSA, 2 mg/mL), Malondialdehyde(MDA, 20 mM), 영지버섯의 각 용매 추출물, 0.1M PBS를 혼합하여 37℃에서 24시간 반응시켰다. 이때 BSA 단백질정량은 Bradford법을 사용하였고(Bradford M 1970) MDA는 Gomez-Sanchez의 방법에 따라 제조하였다(Gomez-Sanchez A 등 1990). 반응시킨 시료 500 μL를 Centricon(Amicon, Centricon YM-10)에 넣고 1,400 × g에서 2시간 동안 원심분리하여(Beckman, Model J2-21 centrifuge)

MDA와 BSA의 결합물을 분리한 후, 증류수 700 μL 를 넣고 $1,400 \times g$ 에서 2시간 동안 원심분리하여 여분의 염 등을 세척하였다. 세척은 동일한 방법으로 3회 실시하였다. 세척한 시료를 분리하여 12% SDS-PAGE (polyacryl-amide gel electrophoresis)를 120V에서 3시간 동안 실시한 후, gel을 Coomassie 염색하여 MDA와 BSA 결합물 band를 Densitometer(Vilber Lourmat, BIO-1D Image Analysis)로 정량하여 지질과산화물과 단백질의 결합 억제율(Inhibition rate, %)을 계산하였다.

2) 지질과산화 억제효과 측정

Saija A 등(1995)과 Haase G와 Dunkley WL(1969)의 방법에 따라 Fe^{2+} 에 의해 유도된 Linoleic acid의 과산화에 대한 억제활성을 TBA(Thiobarbituric acid, Sigma)로 발색시켜 측정하였다. 10 mL의 10 mM Linoleic acid 용액에 시료 20 μL 를 가하고 37°C shaking incubator에서 1시간 동안 shaking 시킨 후, 0.05 M iron sulfate($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)를 20 μL 를 첨가한 다음 다시 37°C 에서 2시간 동안 shaking시켜 과산화를 유발시켰다. 처리된 Linoleic acid 용액 800 μL 를 4°C 에서 10 min 동안 tempering시키고, 400 μL 의 TBA를 첨가한 다음 잘 혼합한 후 boiling water bath에서 15 min 동안 처리한 후 흐르는 물에 냉각시켰다. 냉각된 용액에 n-butanol 1,120 μL 가하고 잘 섞은 다음 $250 \times g$ 로 20 min 동안 원심분리하여(Hanil, Union 5KR) butanol 층을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정(Molecular Devices, SpectraMAX 340pc)하여 지질과산화물 생성 억제율을 산출하였다. Fe^{2+} 에 의해 유도된 Linoleic acid의 과산화에 대한 억제활성을 TBA로 발색시킨 것을 100%로 가정하였을 때, 영지버섯 분획별 추출물을 각각 첨가하여 50%로 감소시킬 수 있는 농도를 IC_{50} 으로 나타내었다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{(\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리군의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3) DPPH 라디칼 소거활성

Chen HM 등(1998)의 방법에 따라 DMSO 10 μL (대조구)와 DMSO에 녹여 농도별로 희석한 시료 10 μL 에 200 μM DPPH/ethanol 190 μL 를 가한 후, 37°C 에서 30 min 동안 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(Molecular Devices, SpectraMAX 340pc). 대조구에

대해 시료를 넣었을 때의 흡광도의 감소 정도를 측정하여 대조구의 흡광도를 100% 하였을 때 영지버섯 분획별 추출물을 첨가하여 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 시료의 농도를 IC_{50} 으로 하여 결과를 나타내고, 저해율(%)을 산출하였다.

4. 항돌연변이능 측정

Salmonella typhimurium TA98, TA100 균주를 이용하여 항돌연변이능을 측정하였다. 정기적으로 이들 균주의 histidine 요구성, deep rough(*rfa*) 돌연변이, *uvrB* 돌연변이와 R factor 등의 유전형질을 확인하였다. 이들 균주는 nutrient broth(Difco)에 접종, 배양하여 현탁액 1 mL당 DMSO 90 μL 를 가하여 냉동보관용 tube에 채워 액체질소(Thermolyne, Bio Cane™ 20)에 보관하면서 사용하였다. Master plate에 배양한 균주를 nutrient broth에 접종하여 37°C 에서 14~16시간 동안 진탕배양(Vison Scientific CO., KMC-8480S)한 후 $1 \sim 2 \times 10^9$ cells/mL의 밀도가 되도록 하여 실험에 사용하였다.

돌연변이 유발물질로는 간접 또는 직접돌연변이 물질을 사용하였는데 간접돌연변이 물질로는 환경성 돌연변이 물질인 2-AA(Anthramine, Sigma)를 사용하였고, 직접돌연변이 물질로는 2-NF(2-Nitrofluorene, Aldrich)와 Sodium azide phosphate(Sigma)를 사용하였다. 2-AA와 2-NF는 DMSO에 녹여 사용하였고, Sodium azide phosphate는 증류수에 녹여 사용하였다. 각 돌연변이 유발물질은 2-AA의 경우 TA98과 TA100에서 2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$, 2-NF는 TA98에서 4 $\mu\text{g}/\text{plate}$, Sodium azide phosphate는 TA100에서 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 농도로 사용하였다.

Ames의 방법에 의한 항돌연변이 유발실험을 위한 배지 및 시약의 조제는 Maron DM와 Ames BN (1983)의 방법에 따라 행하였으며 Matsushima T 등(1980)의 방법에 따라 실험을 행하였다. 모든 실험은 ice bath상에서 행하였고 중복 실험하였다. 대사활성 물질이 필요한 간접돌연변이 물질을 사용할 때는 S9 mix(Moltox, 11-01L RAT LIVER LS-9)를 첨가하였다. DMSO에 녹인 시료 90 μL 와 배양한 실험균주 0.1 mL, 돌연변이 유발물질 10 μL , 직접돌연변이원에는 0.5 mL의 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를, 간접돌연변이원에는 0.5 mL의 S9 mix를 멸균된 시험관에 첨가한 후 가볍게 vortex하여 37°C shaking water bath(Vison CO., KMC-1205SW1)에서 30분 동안 예비 배양하였다. 0.5

mM histidine/biotin 용액을 100 mL당 10 mL 첨가한 45 °C 정도의 Top agar를 2 mL씩 각 시험관에 붓고 3초간 vortex한 후 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 한 후 굳게 하였다. 그 다음 plates를 뒤집어 37°C incubator (Vison scientific CO., VS-1203P3)에서 48시간 배양한 후 각각의 복귀돌연변이주(revertant colonies)를 계수하였고 돌연변이 억제율(Inhibition rate, %)을 구하였다.

5. 암세포 증식 억제능 측정

인체 자궁경부암세포인 HeLa(uterus adenocarcinoma, 10002), 유방암 세포인 MCF-7(breast adenocarcinoma, 30022)을 분양받아 각각 5% fetal bovine serum(FBS)와 항생제가 포함된 DMEM 배양액과 RPMI-1640 배양액에서 배양하였다. 영지버섯추출물의 암세포 증식 억제능은 MTT assay(Denizot F와 Lang R 1966)로 실험하였다. 즉, 암세포를 1×10^4 cells/well 농도로 48 well plate에 분주 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 190 µL와 영지버섯 추출물 10 µL를 첨가하여 다시 72시간 배양하였다. 배양완료 후 배지를 제거하고 5 mg/mL의 농도로

제조한 MTT 용액 30 µL를 분주한 후 동일한 배양조건에서 4시간을 배양 후 MTT시약이 포함된 배지를 제거하고, 각 well에 DMSO 300 µL를 가한 후 ELISA reader (Molecular Devices, SpectraMAX 340pc)를 이용, 517 nm에서 흡광도를 측정하여 억제율(%)을 구하였다.

6. 통계처리

실험의 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 처리하였다. 항돌연변이능 측정은 4회 반복 실험하였으며 그 외 모든 실험은 3회 반복하여 평균과 표준 편차를 산출하였고, 각 실험군의 평균치간의 차이의 유의성은 ANOVA 실시 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 산화적 스트레스 억제효과

영지버섯 분획별 추출물을 농도별로 첨가하여 MDA-BSA의 교차결합(cross-linking) 형성을 차단하여 단백질을 보호하는 정도를 비교한 전기영동실험 결과는 Fig. 1과 같고, 이를 대조군의 저해율로 표시한 결

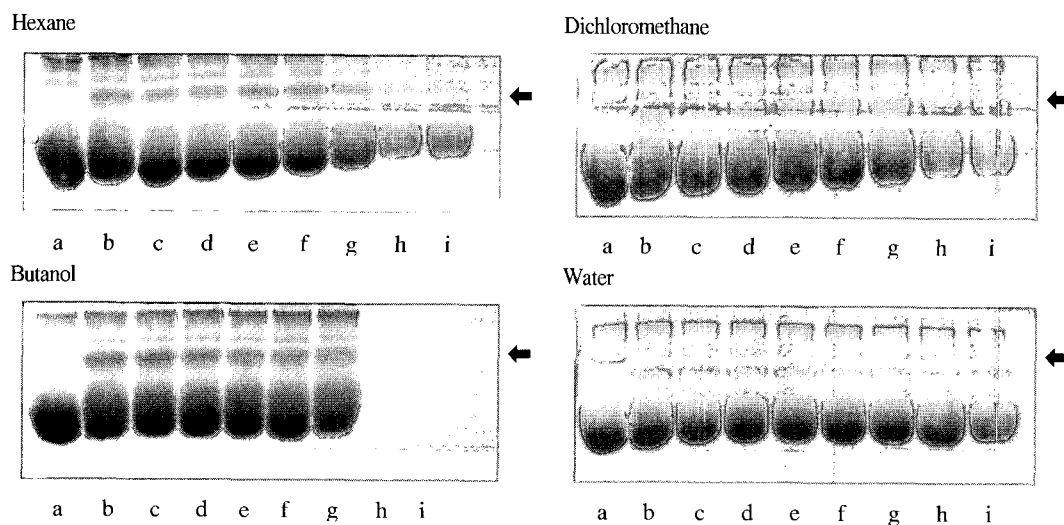


Fig. 1. Inhibitory effects of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on conjugated malondialdehyde with bovine serum albumin in 12% SDS-PAGE.

- a:BSA(100 µL)+PBS(900 µL),
- b:BSA(100 µL)+MDA(100 µL)+PBS(800 µL),
- c:BSA(100 µL)+MDA(100 µL)+sample(2.5 µL)+PBS(797.5 µL),
- d:MDA(100 µL)+sample(5 µL)+PBS(795 µL),
- e:MDA(100 µL)+sample(10 µL)+PBS(790 µL),
- f:BSA(100 µL)+MDA(100 µL)+sample(20 µL)+PBS(780 µL),
- g:BSA(100 µL)+MDA(100 µL)+sample(40 µL)+PBS(760 µL),
- h:BSA(100 µL)+MDA(100 µL)+sample(80 µL)+PBS(720 µL),
- i:BSA(100 µL)+MDA(100 µL)+sample(100 µL)+PBS(700 µL)

과는 Fig. 2, Table 1과 같다. 영지버섯 분획별 추출물의 농도가 40 mg/mL이었을 때 MDA-BSA의 교차결합의 저해율과 IC₅₀을 살펴보면 물 분획물(33.30%, 159.24 mg/mL)에 의해 가장 높았으며 hexane 분획물(27.06%, 168.32 mg/mL), butanol 분획물(23.49%, 4256.09 mg/mL), dichloromethane 분획물(18.14%, 2568.93 mg/mL) 순이었다. 또한 각 분획물은 추출물의 농도가 증가할수록 저해율이 높아져 농도 의존적인 효과가 있었으며 단백질 산화에 대한 영지버섯의 저해율은 물 분획물이 가장 효과적이었다. 이에 반해 Butanol 분획물 40 mg/mL이상 농도에서와 Ethylacetate 분획물에서는 저해율이 나타나지 않아 단백질 산화에 대한 효과가 없었다.

지질과산화에 대한 영지버섯 추출물의 농도별 저해율(Inhibition rate, %)을 살펴보면(Fig. 3, Table 1) 분획별 추출물의 농도가 증가할수록 지질과산화 저해율이 증가하였음을 알 수 있었으며 시료 농도 0.1 mg/mL시 저해율과 영지버섯 분획별 추출물을 첨가하여 50%의 지질과산화를 감소시킬 수 있는 농도(IC₅₀)를 각각 살펴보면 dichloromethane 분획물이 62.73%, 0.05 mg/mL, hexane 분획물 58.14%, 0.10 mg/mL, ethylacetate 분획물

53.07%, 0.02 mg/mL, butanol 분획물 45.80%, 0.15 mg/mL, 물분획물 12.39%, 무한대로, IC₅₀으로 볼 때 ethylacetate 분획물과 dichloromethane 분획물의 지질과산화 억제능이 가장 우수했으며 물 분획물은 가장 낮았다.

영지버섯 분획별 추출물의 항산화능을 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability) 즉, DPPH 라디칼 소거능으로 측정된 결과는 Fig. 4, Table 1과 같이 영지버섯 분획별 추출물의 처리농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거활성이 증가함을 알 수 있었다. 영지버섯 분획별 추출물 시료농도 2.5 mg/mL에서 영지버섯 분획별 추출물을 첨가하여 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 시료의 농도(IC₅₀)를 각각 살펴보면 ethylacetate 분획물이 69.21%, 0.67 mg/mL, butanol 분획물이 48.51%, 2.80 mg/mL, dichloromethane 분획물이 37.58%, 8.39 mg/mL, hexane 분획물이 19.55%, 1570.85 mg/mL, 그리고 물 분획물은 18.46%, 367.96 mg/mL이었다. DPPH 라디칼 소거능은 ethylacetate 분획물이 가장 우수하였으며 물과 hexane 분획물은 상대적으로 낮은 소

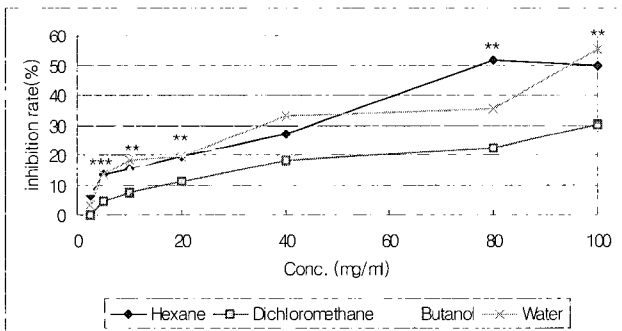


Fig. 2. Inhibition rate of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on conjugated malondialdehyde with bovine serum albumin.

Values are means±SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

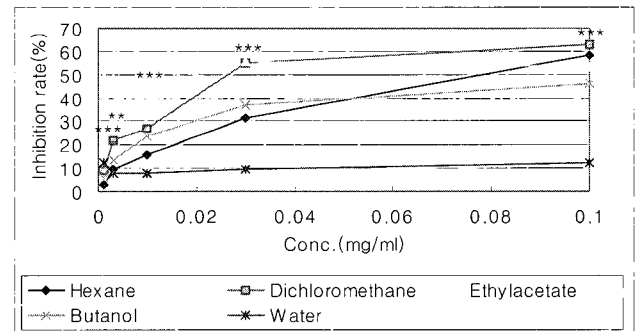


Fig. 3. Antioxidative effects of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on lipid peroxidation.

Values are means±SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Table 1. IC₅₀ values of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* for antioxidative effects

IC ₅₀ ¹⁾ (mg/mL)	Hexane	Dichloromethane	Ethylacetate	Butanol	Water
Inhibition of the conjugated MDA with BSA	168.32	2568.93	ND ²⁾	4256.09	159.24
Inhibition of lipid peroxidation	0.10	0.05	0.02	0.15	∞
Scavenging effects of DPPH radical	1570.85	8.39	0.67	2.80	367.96

¹⁾Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve

²⁾Not detected

거능을 보여 주었다.

영지버섯 분획별 추출물의 MDA와 BSA conjugation 반응, 지질과산화 억제활성, DPPH 라디칼 소거활성을 측정하여 항산화활성을 상대적으로 살펴보았을 때 영지버섯 분획별 추출물은 지질과산화를 억제하는 활성이 가장 우수하였고 그 다음은 DPPH 라디칼 소거활성이었으며 단백질의 산화를 억제하는 효과가 가장 적었음을 알 수 있었다. 또한 영지버섯 분획별 추출물별로도 항산화효과의 차이가 있었다. 단백질 산화에 대한 영지버섯 분획물의 저해율은 물 분획물에서 가장 효과적이었고, 지질과산화 저해율과 DPPH 라디칼 소거능은 ethylacetate 분획물이 가장 우수하였다.

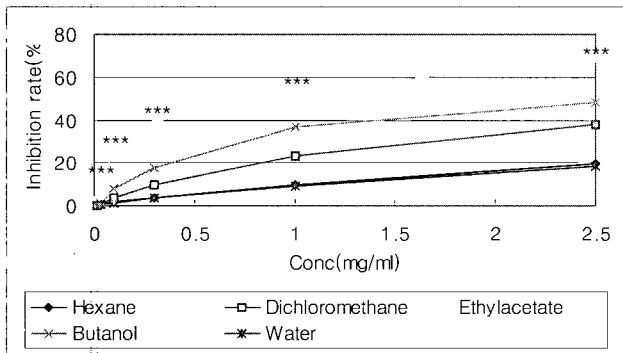


Fig. 4. Scavenging effects of DPPH radical by fractional extracts from *Ganoderma lucidum*.

Values are means±SD, n=3. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

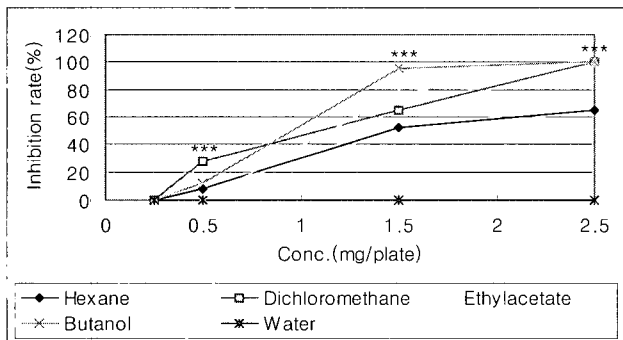


Fig. 5. Effects of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on direct mutagenicity mediated by 2-Nitrofluorene in *Salmonella typhimurium* TA98.

Values are means±SD, n=4. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

2. 항돌연변이능

Ames test로 영지버섯 분획별 추출물의 직접작용 항돌연변이능을 직접돌연변이 물질인 2-Nitrofluorene(4 µg/plate)를 틀변경 변이주인 *Salmonella typhimurium* TA98에, Sodium azide(2 µg/plate)를 사용하여 염기쌍 치환 변이주인 *Salmonella typhimurium* TA100으로 실험한 결과는 Fig. 5와 Fig. 6과 같다. *Salmonella typhimurium* TA98와 TA100에서 물 분획물은 항돌연변이 효과가 전혀 없었다. *Salmonella typhimurium* TA98에서 직접작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 영지버섯 분획별 추출물 농도 1.50 mg/plate에서 항돌연변이능을 보면 butanol 분획물(95.13%), ethylacetate 분획물(77.03%), dichloromethane 분획물(64.67%), hexane 분획물(52.30%) 순서였다. 추출물 농도 2.50 mg/plate에서는 butanol 분획물, ethylacetate 분획물, dichloromethane 분획물은 100%의 돌연변이 저해율을 보여 주었으며, hexane 분획물은 68.14%의 저해율을 보여 주었다.

Salmonella typhimurium TA100에서는 각 영지버섯 분획물의 농도가 0.5 mg/plate일 때 돌연변이 저해율은 ethylacetate 분획물, dichloromethane 분획물이 hexane 분획물에서 99~100%였으며, butanol 분획물은 54.23%였다. 또한 항돌연변이능이 전혀 없었던 물 분획물을 제외하고는 영지버섯 분획별 추출물 농도가 증가할수록 항돌연변이능도 증가함을 알 수 있었다.

영지버섯 분획별추출물의 간접작용 항돌연변이능을 환경성 돌연변이 물질인 2-Anthramine(2.5 µg/plate)을 사용하여 *Salmonella typhimurium* TA98과 *Salmonella*

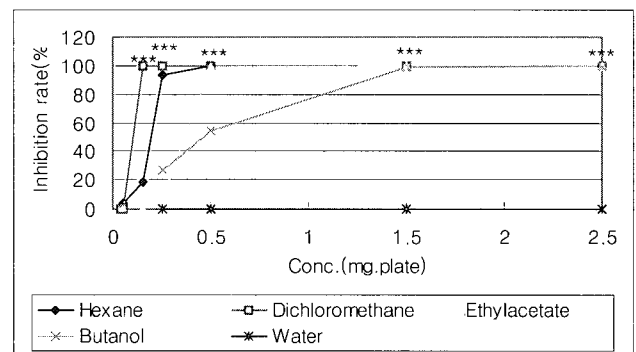


Fig. 6. Effects of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on direct mutagenicity mediated by sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA100.

Values are means±SD, n=4. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

typimurium TA100으로 측정된 결과는 Fig. 7과 Fig. 8과 같다. 물 분획물은 직접작용 항돌연변이에서와 마찬가지로 *Salmonella typimurium* TA98와 TA100에서 모두 항돌연변이 효과가 전혀 없었다.

간접작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 *Salmonella typimurium* TA98에서 각 영지버섯 분획물의 농도가 0.5 mg/plate일 때 돌연변이 저해율은 ethylacetate 분획물, dichloromethane 분획물이 hexane 분획물에서 99~100%였으며, butanol 분획물은 76.09%였다. 또한 *Salmonella typimurium* TA100에서 간접작용 돌연변이능에 대한 저해 효과는 각 영지버섯 분획물의 농도가 0.5 mg/plate일 때 돌연변이 저해율은 dichloromethane 분획물과 hexane 분획물에서 99~100%였으며, ethylacetate 분획물은 66.30%였으며 butanol 분획물은 45.78%였다.

영지버섯류의 항돌연변이능 측정 결과, 직접, 간접 항돌연변이 효과가 전혀 없었던 물 분획물을 제외하고는 영지버섯 분획별 추출물의 농도가 증가할수록 항돌연변이능이 증가하는 경향을 보여주었다. 영지버섯 분획별 추출물의 농도가 2.5 mg/plate일 때 직접돌연변이 물질인 2-Nitrofluorene를 처리한 *Salmonella typimurium* TA98에서 hexane 분획물의 항돌연변이 효과(64.69%)를 제외하고는 모든 조건에서 100%에 가까운 아주 탁월한 항돌연변이능을 보여주었다. 2.5 mg/plate 이하는 농도에서 항돌연변이능을 살펴보면 각 분획물별로 차이가 있었는데 *Salmonella typimurium* TA100에서의 직접 돌연변이능과 *Salmonella typimurium* TA98과 TA100에서의 간접 항돌연이능에서는 상대적으로 hexane 분획

물과 dichloromethane 분획물의 효과가 우수하였고 butanol 분획물이 저조하였다. 이와는 다르게 직접돌연변이 물질인 2-Nitrofluorene를 처리한 *Salmonella typimurium* TA98의 항돌연변이 효과에서는 butanol 분획물의 항돌연변이능이 가장 우수하였고, hexane 분획물의 효과가 적었다.

3. 암세포증식 억제효과

인체 자궁경부암세포인 HeLa에 영지버섯 분획별 추출물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식억제 정도를 알아본 결과는 Table 2와 같다. 자궁경부 암세포인 HeLa 세포의 경우 영지버섯 hexane 분획물(농도 1.67 mg/mL)과 dichloromethane 분획물(농도 0.50 mg/mL)에서 82~83%의 세포 증식억제효과가 있었고, ethylacetate 분획물(농도 0.50 mg/mL), butanol 분획물(농도 1.67 mg/mL), 물 분획물(농도 0.50 mg/mL)에서 43~60%의 증식억제 효과가 있었다. 영지버섯 분획별 추출물을 첨가하여 자궁경부 암세포 증식을 50%로 감소시킬 수 있는 농도(IC₅₀)는 dichloromethane 분획물이 0.122 mg/mL로 가장 낮은 농도였고, hexane 분획물(0.418 mg/mL), ethylacetate 분획물(0.420 mg/mL), butanol 분획물(0.661 mg/mL), 물 분획물(0.691 mg/mL) 순이었다.

Song JH 등(2003)의 연구에 의하면 절제 영지버섯 추출물로 자궁암 세포주인 HeLa의 경우 5 mg/mL 이하의 농도에서는 억제율이 16%이하로 낮았으나 50 mg/mL에서는 45%로 증가하였으며 100 mg/mL의 농도처리 시에는 오히려 증식 억제율이 감소하였다고 보고하였

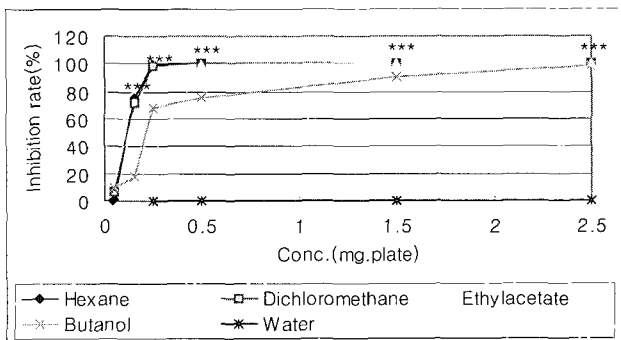


Fig. 7. Effects of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on indirect mutagenicity mediated by 2-Anthramine in *Salmonella typimurium* TA98 with S9mix. Values are means±SD, n=4. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

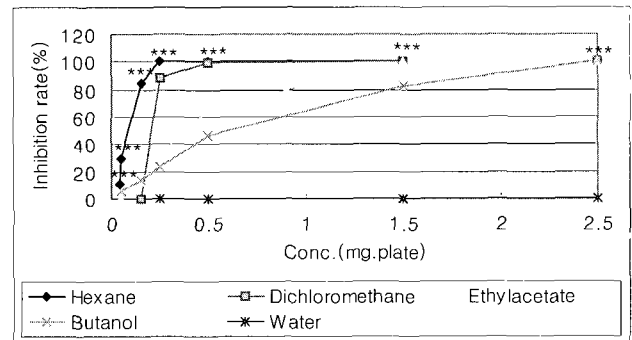


Fig. 8. Effects of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on indirect mutagenicity mediated by 2-Anthramine in *Salmonella typimurium* TA100 with S9mix. Values are means±SD, n=4. Asterisk means a significant difference by ANOVA test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

다.

인체 유방암 세포인 MCF-7에 영지버섯 분획별 추출물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식억제 정도를 알아본 결과는 Table 3와 같다. 유방암 세포인 MCF-7의 경우 영지버섯 hexane 분획물(농도 5.00 mg/mL)에서는 82.16%, dichloromethane 분획물(농도 0.50 mg/mL)에서 62.31%의 세포 증식억제효과가 있었다. Ethylacetate 분획물(농도 0.50 mg/mL), butanol 분획물(농도 1.67mg/mL), 물 분획물(농도 1.67 mg/mL)에서 42~48%의 증식 억제효과가 있었다. 영지버섯 분획별 추출물을 첨가하여 유방암 세포인 MCF-7의 증식을 50%로 감소시킬 수 있는 농도(IC₅₀)는 dichloromethane 분획물이 0.272 mg/mL로 가장 낮은 농도였고, ethylacetate 분획물(0.471 mg/mL), butanol 분획물(3.940 mg/mL), hexane 분획물(0.498 mg/mL), 물 분획물(10.919 mg/mL) 순이었다.

따라서 자궁경부 암세포인 HeLa 세포와 유방암 세포

인 MCF-7에서 IC₅₀으로 살펴보았을 때 dichloromethane 분획물이 두 세포에서 항암효과가 가장 컸으며 그 다음은 hexane 분획물과 ethylacetate 분획물이었으며 물 추출물이 가장 효과가 적었다. 또한 영지버섯 분획물 별로 유사한 암세포 증식억제 증감 경향을 보여 주었다.

영지버섯을 마우스에 식이로 투여하였을 때 벤조피렌으로 유발된 폐선종 발생률이 억제되었으며(Yun TK와 Kim SH 1988, Yun TK와 Lee YS 1993) 영지버섯의 분자량 40,000이상의 다당체 분획이 sarcoma 180 암세포를 이식한 마우스에서 항종양 효과가 있었으며(Miyasaki T와 Nishijima M 1981, Kim JS와 Lee YS 1989) diethyl nitrosamine 투여에 의해 유도되는 간의 GST-P positive foci를 관찰함으로써 영지버섯 수용성 추출물의투여가 간의 발암 전 병변진행을 억제한다고 보고되었다(Kim JS와 Lee YS 1989) 영지버섯의 새로

Table 2. Inhibitory effect of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on cell proliferation in HeLa

Conc. (mg/mL)	Inhibition rate (%)				
	Hexane	Dichloromethane	Ethylacetate	Butanol	Water
0.05	11.49±0.63 ^{1,a)}	18.03±2.55 ²⁾	15.22±2.56 ³⁾	19.70±3.41 ³⁾	14.14±0.92 ³⁾
0.15	29.37±4.49 ³⁾	66.33±8.96 ⁴⁾	28.10±6.04 ³⁾	36.67±7.68 ³⁾	36.62±3.57 ³⁾
0.50	56.98±0.63 ³⁾	82.22±0.98 ³⁾	55.15±1.41 ⁴⁾	45.92±4.47 ³⁾	43.45±1.86 ³⁾
1.67	82.93±1.39 ³⁾	43.63±2.62 ³⁾	33.11±1.36 ³⁾	59.76±4.45 ³⁾	39.42±2.54 ³⁾
3.33	83.26±1.19 ³⁾	24.97±2.00 ³⁾	27.64±2.15 ³⁾	54.19±1.84 ³⁾	38.75±4.86 ³⁾
5.00	83.46±1.29 ³⁾	16.48±2.42 ³⁾	20.58±0.57 ³⁾	38.42±2.69 ³⁾	33.01±3.38 ³⁾
6.67	82.67±1.35 ³⁾	15.20±2.03 ³⁾	15.59±0.52 ³⁾	21.46±1.72 ³⁾	26.12±3.45 ³⁾
IC ₅₀ ³⁾ (mg/mL)	0.418	0.122	0.420	0.661	0.691

¹⁾Values are means±SD, n=3

²⁾Values followed by different letters are significantly different at p<0.001

³⁾Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve

Table 3. Inhibitory effect of fractional extracts from *Ganoderma lucidum* on cell proliferation in MCF-7

Conc. (mg/mL)	Inhibition rate (%)				
	Hexane	Dichloromethane	Ethylacetate	Butanol	Water
0.05	21.06±2.24 ^{1,a)}	14.44±1.23 ²⁾	18.08±0.81 ³⁾	11.31±1.53 ³⁾	11.36±0.97 ³⁾
0.15	35.87±0.23 ³⁾	37.73±0.85 ³⁾	40.42±0.76 ³⁾	23.12±1.87 ³⁾	19.20±2.93 ³⁾
0.50	40.25±1.48 ³⁾	62.31±2.31 ⁴⁾	48.35±2.01 ¹⁾	23.13±2.81 ³⁾	23.36±2.44 ³⁾
1.67	68.51±2.17 ³⁾	33.02±1.74 ³⁾	25.70±2.16 ³⁾	47.16±2.01 ³⁾	41.50±1.15 ³⁾
3.33	77.27±0.56 ³⁾	26.33±2.73 ³⁾	17.20±2.17 ³⁾	25.34±1.80 ³⁾	42.38±1.30 ³⁾
5.00	82.16±1.02 ³⁾	22.77±1.87 ³⁾	12.94±1.51 ³⁾	9.94±1.37 ³⁾	44.06±1.13 ³⁾
6.67	82.87±0.99 ³⁾	16.70±1.34 ³⁾	8.43±0.80 ³⁾	0.0±0.0 ³⁾	44.52±1.27 ³⁾
IC ₅₀ ³⁾ (mg/mL)	0.498	0.272	0.471	3.940	10.919

¹⁾Values are means±SD, n=3

²⁾Values followed by different letters are significantly different at p<0.001

³⁾Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve

은 약효성분의 개발에 관한 연구(Bok JW 등 1994)에서 간암세포 SK-Hep-1에 대한 MTT assay 결과 0.1 mg/mL의 농도에서 중성분획인 클로로포름층이 세포증식 억제효과가 90.4%로 가장 높다고 보고되었다. 본 연구에서 IC₅₀으로 살펴보았을 때 HeLa와 MCF-7에서 모두 dichloromethane 분획물이 세포증식억제효과가 가장 높았다.

IV. 요약 및 결론

영지버섯의 생리적 기능에 대한 활성을 탐색하기 위하여 영지버섯(*Ganoderma lucidum* Krast) 분획별 추출물의 MDA에 대한 단백질 보호효과, Linoleic acid를 이용한 지질과산화억제활성 그리고 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하여 항산화 효과를 측정하였다. 또한 Ames test로 영지버섯 분획별 추출물의 돌연변이유발 억제능을 탐색하였으며 인체 자궁경부암 세포인 HeLa와 유방암 세포인 MCF-7 증식억제 정도를 알아본 결과는 다음과 같다.

1. MDA와 BSA conjugation 반응, 지질과산화 억제활성, DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과, 위의 모든 측정방법에서 영지버섯 분획별 추출물은 항산화 효과가 있었다. 측정방법에 따라 항산화효과의 정도 차이가 있었는데 이를 상대적으로 살펴보았을 때 영지버섯 추출물은 지질과산화 억제 활성이 가장 우수하였고 그 다음은 DPPH 라디칼 소거활성이었으며 단백질 산화를 억제하는 효과가 가장 적었다. 또한 영지버섯 분획별 추출물에 따라 항산화능이 달랐다. 단백질 산화에 대한 영지버섯 분획별 저해율은 물 분획물(IC₅₀, 159.24 mg/mL)이 가장 효과적이었고, 지질과산화 저해율과 DPPH 라디칼 소거능은 ethylacetate 분획물(각각 IC₅₀, 0.018mg/mL, 0.67 mg/mL)이 가장 우수하였다.
2. 영지버섯류의 항돌연변이능 측정 결과, 영지버섯 분획별 추출물의 농도가 증가할수록 항돌연변이능이 증가하는 경향을 보여주었으며 물 분획물은 직접·간접 항돌연변이 효과가 전혀 없었다. 영지버섯 분획별 추출물의 농도가 2.5 mg/plate일 때 직접돌연변이 물질을 처리한 *Salmonella typimurium* TA98에서 hexane 분획물의 항돌연변이 효과(64.69%)를 제외하고는 모든 조건에서 100%에 가까운 아주 탁월한

항돌연변이능을 보여주었다. 2.5 mg/plate 이하의 농도에서 항돌연변이능을 살펴보면, 각 분획물별로 차이가 있었다. *Salmonella typimurium* TA100에서의 직접 돌연변이능과 *Salmonella typimurium* TA98과 TA100에서의 간접 항돌연변이능에서는 상대적으로 hexane 분획물과 dichloromethane 분획물의 효과가 우수하였고 butanol 분획물이 저조하였다. 이와는 다르게 직접돌연변이 물질인 2-Nitrofluorene를 처리한 *Salmonella typimurium* TA98의 항돌연변이 효과에서는 butanol 분획물의 항돌연변이능이 가장 우수하였고, hexane 분획물의 효과가 적었다.

3. 영지버섯 분획별 추출물을 첨가하여 자궁경부 암세포 증식을 50%로 감소시킬 수 있는 농도(IC₅₀)는 dichloromethane 분획물이 0.122 mg/mL로 가장 낮은 농도였고, hexane 분획물, ethylacetate 분획물, butanol 분획물, 물 분획물 순이었다. 유방암 세포인 MCF-7의 IC₅₀은 dichloromethane 분획물이 0.272 mg/mL로 가장 낮은 농도였고, ethylacetate 분획물, hexane 분획물, butanol 분획물, 물 분획물 순이었다. 따라서 자궁경부 암세포인 HeLa 세포와 유방암 세포인 MCF-7에서 dichloromethane 분획물이 두 세포에서 항암효과가 가장 컸으며 그 다음은 hexane 분획물과 ethylacetate 분획물이었으며 물 추출물이 가장 효과가 적었다.

본 연구의 결과로 영지버섯은 항산화성, 항돌연변이성, 항암성이 있음을 알 수 있었고 이를 토대로 영지버섯을 상용함으로써 광범위하게는 만성 성인병의 예방 및 치료에 효과가 있으리라 사료된다. 또한 본 연구의 결과는 영지버섯 기능성 식품을 개발할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있으리라 본다.

감사의 글

본 연구는 2001년 농림부 농림기술개발연구과제(201052-03-HD110) 연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Bok JW, Lee SK, Kim BK. 1994. Studies of development

- of new pharmacologically active components of *Ganoderma Lucidum*. *J Korean Biochem* 27:149-153
- Bradford M. 1970. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:240-254
- Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agricultural & Food Chem* 46:49-53
- Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 80:1-7
- Chihara G, Hamuro J, Maeda YY, Arai A, Fukuoka F. 1970. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Phellinus linteus* (Berk) Sing (an edible mushroom). *Res Cancer* 30:2776-2781
- Comporti M. 1993. Lipid peroxidation: An overview. pp. 65-79. In: Free Radicals: From Basic Science to Medicine: Molecular and cell biology updates. Poli G, Albano E, Dianzani MU (eds). Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland
- Denizot F, Lang R. 1966. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277
- Gomez-Sanchez A, Hermonsin I, Mayo I. 1990. Cleavage and oligomerization of malondialdehyde under physiological conditions. *Tetrahedron Letters* 28:4077-4080
- Haase G, Dunkley WL. 1969. Ascorbic acid and copper in linoleate oxidation. I. Measurement of oxidation by ultraviolet spectrophotometry and the thiobarbituric acid test. *Journal of Lipid Research* 10:555-560
- Kim JS, Lee YS. 1989. Effects of *Ganoderma lucidum* extract on the development of rat liver preneoplastic lesions. *Korean J Toxicol* 5:135
- Kwon SH, Kim CN, Kin CY, Kwon ST, Park KM, Hwangbo S. 2003. Antitumor activities of protein-bound polysaccharide extracted from Mycelia of mushroom. *Korean J Food & Nutr* 16(1): 15-21
- Lee BC, Bae JT, Pyo HB, Choe TB, Kim SW, Hwang HJ, Yun JW. 2003. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enz Microb Technol* 6274:1-8
- Lie F, Ooi VEC, Chang ST. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci* 60:763-771
- Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113:173-215
- Mau JL, Lin HC, Song SF. 2002. Antioxidant properties of several speciality mushroom. *Food Res Int* 35:519-526
- Meneghini R, Martins EAL, Calderaro M. 1993. DNA damage by reactive oxygen species: The role of metal. pp. 102-112. In: Free Radicals: From Basic Science to Medicine: Molecular and cell biology updates. Poli G, Albano E, Dianzani MU (eds). Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland
- Miyasaki T, Nishijima M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XV II. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull* 29:3611
- Mutsushima T, Sugimura T, Nagao M, Yahagi T, Shirai A, Sawamura M. 1980. Factors modulating mutagenicity in microbial test. p. 273. In: Short-term test, systems for detecting carcinogens. Norphth KH, Garner RC (eds). Springer. Berling
- Park YH. 2000. Effect of polyamine on modification of biomodics by aldehyde. *PhD in Medicine Thesis*. Seoul National University
- Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. 1995. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology & Medicine* 19(4): 481-486
- Song JH, Lee HS, Hwang JK, Chung TY, Hong SR, Park KM. 2003. Physiological activities of *Phellinus ribis* Extracts. *Korean J. Food Sci Technol* 35(4):690-695
- Yang JH, Lin HC, Mau JL. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushroom. *Food Chem* 77:229-2357
- Yun TK, Kim SH. 1988. Inhibition of development of benzo(a) pyrene-induced mouse pulmonary adenoma by several natural products in medium-term bioassay system. *J Korean Cancer Res Assoc* 20:133
- Yun TK, Lee YS. 1993. Effects of *Ganoderma lucidum* on mouse pulmonary adenoma induced by benzo(a) pyrene. *J Korean Cancer Assoc* 25(4):531-538

(2005년 2월 4일 접수, 2005년 11월 7일 채택)