

# 상황버섯 균사체를 이용한 전통주의 추출물이 HepG2 세포의 염증관련 단백질 발현에 미치는 영향

이수진 · 한민호<sup>1</sup> · 이용태<sup>2</sup> · 허만규<sup>3</sup> · 정경태<sup>4</sup> · 정영기<sup>5</sup> · 최영현<sup>1</sup> · 최병태\*

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 생화학교실, 2: 생리학교실,  
3: 자연과학대학 분자생물학과, 4: 생명응용과학과, 5: 동아대학교 생명자원과학대학 생명공학과

## Effects of Traditional Wine by using Mycelium of *Phellinus linteus* on the Expression of Inflammation-Related Proteins in HepG2 Cells

Su Jin Lee, Min Ho Han<sup>1</sup>, Yong Tae Lee<sup>2</sup>, Man Kyu Huh<sup>3</sup>, Kyung Tae Chung<sup>4</sup>,  
Young Kee Jeong<sup>5</sup>, Yung Hyun Choi<sup>1</sup>, Byung Tae Choi\*

Departments of Anatomy, 1: Department of Biochemistry, 2: Department of Physiology, College of Oriental Medicine,  
3: Department of Molecular Biology, 4: Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University,  
5: Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University

It was examined that the effect of fermented traditional wine made by using mycelium of *Phellinus linteus* on the expression of inflammation-related proteins in HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with or without extract of traditional wine (ETMP), then analyzed by microscopic observation, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. The results of RT-PCR and Western blot analyses showed that the level of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-2 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  was induced by LPS, but the treatment of ETMP inhibited the expression of these proteins and its mRNAs. Besides, the results of Western blot analyses showed that the expression of nuclear factor- $\kappa$ Bp65 and inhibitory- $\kappa$ B $\alpha$  were also slightly affected by ETMP treatment. These results suggest that ETMP alleviate the expression of inflammation-related protein expressions and thus may be used as a functional alcoholic beverage.

Key words : *Phellinus linteus*, mycelium, inflammation, iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$

### 서 론

한의학에서 버섯은 식용뿐만 아니라 약으로 취급해왔으며, 주로 사용하고 있는 버섯은 복령, 저령, 상황, 영지, 동충하초 등이 있다. 이 중 목질진흠버섯으로 알려진 상황버섯은 동의보감 탕액편에 桑木耳라는 이름으로 기재되어 있으며 최근 체내의 면역력 증대를 통해 각종 암에 대한 효능이 입증되고 있다. 상황버섯은 기원이 다양하고 종류가 많으나 탁월한 효능을 인정받고 있는 것은 *Phellinus linteus*로 부터 분리한 단백질단체로서 뽕나무에 이의 균사를 이식하여 재배한 것을 말하며 여성의 자궁 질환 특히 자궁의 종양이나, 장의 염증, 종양 질환 및 숙취 등에 효능이 있다<sup>1,2)</sup>.

상황버섯은 자연 상태에서 매우 희귀하여 실험에 사용하기 어려웠으나 최근 균사체 대량 배양기술을 통해 이에 대한 연구가 용이해졌으며 상황버섯 균사체에 대한 항암 및 항염증 작용에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다<sup>3,4)</sup>. 버섯의 자실체나 균사체에서 추출된 다당류는 면역을 강화시켜 질병예방 효과를 높일 뿐만 아니라 항암작용이 뛰어나 암의 예방과 치료에 기여한다. 본 연구진은 상황버섯 균사체 배양 중 이 균사체가 alcohol dehydrogenase를 가지며 알코올을 생성하는 것을 발견하였다.

염증반응은 필수적인 숙주방어체계로 lipopolysaccharide (LPS)를 포함한 다양한 외부 및 내부 자극에 의해 유도된다<sup>5)</sup>. 염증 유발 물질에 의해 활성화되는 다양한 염증성 유전자들의 대부분은 프로모터 영역에 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)가 결합할 수 있는 자리를 가진다<sup>6)</sup>. 상황버섯 균사체를 이용한 주류 역시 인체에 해를 주는 알코올을 가진다는 한계를 벗어나지 못하므로 알

\* 교신저자 : 최병태, 부산시 진구 양정 2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학  
· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8653  
· 접수 : 2006/05/20 · 수정 : 2006/07/05 · 채택 : 2006/07/26

코울에 의해 손상되는 일차 기관인 간의 세포에 대한 연구가 필요하다. 본 연구는 상황버섯균사체를 이용한 전통주가 상황버섯 균사체와 유사한 기능성을 나타내는지를 알아보기 위해 LPS에 유도된 HepG2 세포내 염증관련 단백질 발현을 NF- $\kappa$ B 및 하위 염증관련 유전자 및 단백질 발현을 중심으로 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료준비

ETMP I은 상황균사체로 만든 전통주 1  $\ell$ 를 70~80 $^{\circ}$ C로 증탕 여과 후 동결건조 (수득율 8.7 g)하여 100 mg/ml 농도로 만들었다. ETMP II는 상황균사체로 만든 전통주 500 ml을 2,500 rpm의 속도로 10분간 원심분리하여 맑은 상등액 부분만 분리하여 (수득율 75 ml) 4배로 농축하여 사용하였다.

### 2. 세포 배양

Rat hepatocellular carcinoma 세포인 HepG2 세포를 90% DMEM에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함되어 있는 성장배지를 이용하여, 5%의 CO<sub>2</sub>와 37 $^{\circ}$ C가 유지되는 humidity incubator 내에서 배양하였다.

### 3. 세포의 성장

6 well plate에 배양 중인 HepG2 세포를 일정 수만큼 넣고, 24시간 안정화 시켜 ETMP를 1-20 mg/ml까지의 농도로 각각 처리한 뒤, 24시간 후 0.5 mg/ml의 농도로 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue (MTT)를 넣고, 2-4시간 정도 암상태로 37 $^{\circ}$ C에 두었다. MTT 시약을 제거하고, 1 ml의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)를 넣은 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 세포의 형태적 관찰

HepG2 세포를 24시간 동안 안정화 시킨 뒤, 각각의 시료를 처리하고, 24시간 후에 200배율의 위상차 현미경으로 세포의 형태를 관찰하고 사진을 촬영하였다. 세포핵의 염색을 위해 우선 찬 PBS 용액으로 세포를 수세한 뒤, 3.7% paraformaldehyde (Sigma)로 실온에서 10분간 고정시켰다. 고정된 세포를 다시 PBS로 수세하고, 4,6-diamidino-2-phenylidile (DAPI, Sigma)로 10분간 실온에서 염색시키며 PBS로 2번 이상 수세한 뒤 형광현미경으로 검경하였다.

### 5. RNA extraction 및 RT-PCR

TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)를 이용하여, total RNA를 세포로부터 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리된 total RNA를 정량한 뒤, 다음과 같은-inducible nitric oxide synthase (iNOS, sense: 5'-AGA GAG ATC CGG TTC ACA-3'; antisense: 5'-CAC AGA ACT GAG GGT ACA-3'), cyclooxygenase (COX)-2 (sense: 5'-TTC AAA TCA ACT TGT GGG AAA ATT GCT-3'; antisense: 5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (sense:

5'-CAA GGA GGA GAA GTT CCC AA-3'; antisense: 5'-CGG ACT CCG TGA TGT CTA AG-3'), GAPDH (sense: 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'; antisense: 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GAA GAC-3')-네 종류의 primer를 이용하여 RT-PCR를 실시하였다.

### 6. SDS-PAGE 및 Western blot

HepG2 세포를 lysis하여 단백질을 얻은 후, Bradford's protein assay법으로 단백질을 정량하였다. 동일량의 단백질을 취해 SDS-polyacrylamide gel상에 전기영동을 수행한 후, nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Keene, NH)로 gel상에 있는 단백질을 옮겼다. Membranes상으로 단백질이 옮겨지면, 순차적으로 일차항체, 이차항체와 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence method로 발색정도를 확인하였다.

## 결과

### 1. 세포 성장 및 형태 변화에 대한 영향

시료들이 HepG2 세포의 성장에 미치는 영향에 관해 조사한 결과, ETMP I은 1-10 mg/ml에서 ETMP II는 2-10 mg/ml 농도에서 시료를 처리하지 않은 대조군과 유사한 세포성장을 보이며 생존율도 80% 이상이었다 (Fig. 1).

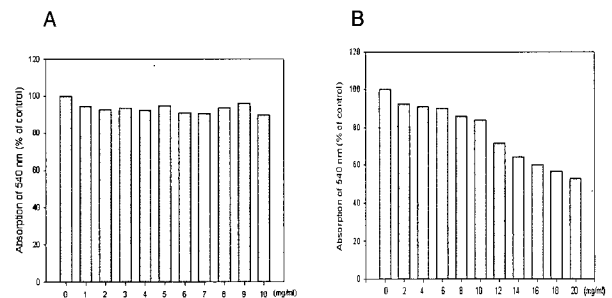


Fig. 1. Effect of ETMP on the cell growth (A, ETMP I; B, ETMP II).

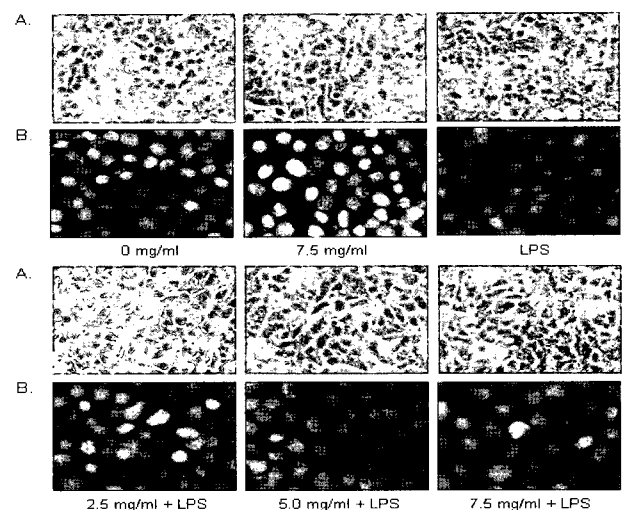


Fig. 2. Morphological changes (A) and DAPI staining (B) in HepG2 cells following incubation with LPS and ETMP I. Cells were treated with or without LPS and various ETMP I concentrations for 24 h, subsequently, photographed by microscope (X200).

이를 바탕으로 ETMP I은 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml, 7.5 mg/ml의 농도로 처리하여 세포의 형태에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 대조군과 유사하여 형태적 변화를 유발하지 않았다. 이는 10 µg/ml의 LPS (Sigma)와 다양한 농도의 ETMP I을 함께 처리한 실험군에서 유사한 결과를 보였다(Fig. 2). ETMP II도 LPS와 함께 1 mg/ml, 5mg/ml, 10 mg/ml로 처리 했을 때도 ETMP I과 유사한 결과를 보였다.

2. 염증관련 단백질의 mRNA 발현에 대한 영향

ETMP I을 처리한 HepG2 세포의 mRNA 수준에서 염증유발과 관련 있는 iNOS, COX-2, TNF-α의 발현정도를 RT-PCR로 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. LPS를 처리 했을 때 iNOS, COX-2, TNF-α의 발현은 대조군에 비해 현저히 증가하였다. 그러나 ETMP I와 LPS를 동반 처리한 경우 LPS를 단독처리한 군에 비해 농도 비례적으로 mRNA 발현이 감소하였다. ETMP II를 처리한 HepG2 세포의 mRNA 수준도 ETMP I과 유사하게 농도 비례적으로 감소하며 특히 10 mg/ml의 ETMP II를 처리하였을 때 현저하였다(Fig. 4).

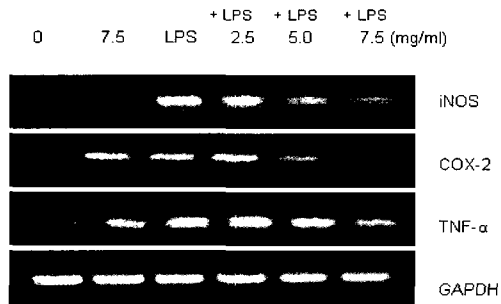


Fig. 3. Effects of ETMP I on the expression of inflammation-related mRNAs. HepG2 cells were incubated with or without LPS and ETMP I for 24 h. The expression levels of iNOS, COX-2 and TNF-α mRNA were examined by RT-PCR as detailed in Materials and Methods.

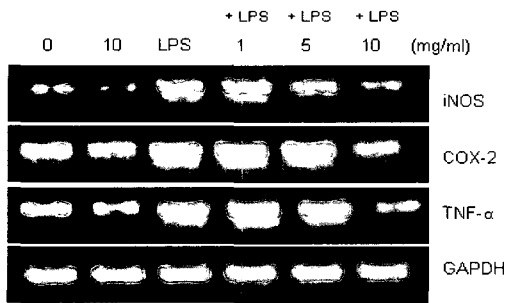


Fig. 4. Effects of ETMP II on the expression of inflammation-related mRNAs in HepG2. Cells were incubated with or without LPS and ETMP I for 24 h. The expression levels of iNOS, COX-2 and TNF-α mRNA were examined by RT-PCR as detailed in Materials and Methods.

3. 염증관련 단백질의 발현에 대한 영향

ETMP I과 10 µg/ml의 LPS를 동반 처리했을 때 Fig. 5와 같이 mRNA 수준에서의 발현 양상과 유사하게 iNOS, COX-2와 TNF-α 등의 발현은 농도 비례적으로 발현이 감소하였다. 반면 NF-κBp65와 I-κBa는 ETMP I과 LPS를 동반처리 했을 때 LPS단독처리에 비해 다소 증가하나 현저하지 않았다. 본 실험의 NF-κBp65 발현은 nuclear extract가 아닌 전세포의 발현으로 I-κBa의 발현으로 보아 기타 염증관련 단백질의 발현 억제기능을 간접적으로 알 수 있다.

ETMP II는 LPS에 의한 iNOS와 COX-2의 발현을 저해하며 특히 5 및 10 mg/ml 농도에서 현저하였다. NF-κBp65의 발현은 10 mg/ml의 농도에서 LPS에 의한 발현을 억제하며 I-κBa는 현저하지 않으나 LPS단독처리에 비해 ETMP II에 의해 발현이 다소 증가하여 ETMP II의 염증관련 단백질의 발현 억제를 알 수 있다.

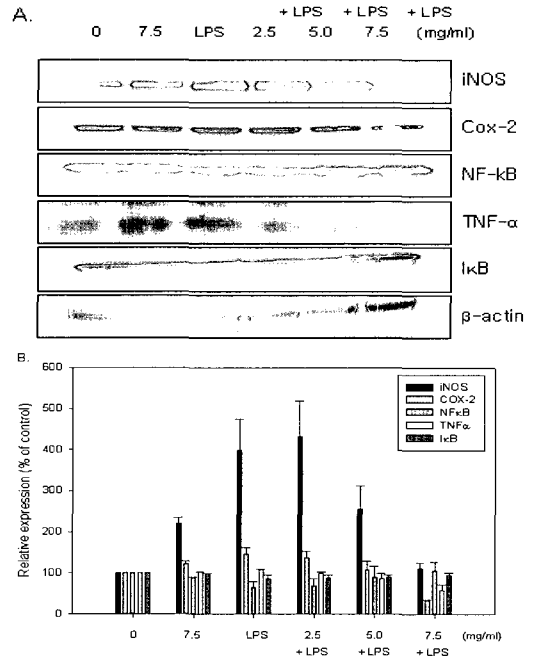


Fig. 5. Effect of ETMP I on the expression of inflammation-related protein in HepG2. Cells were pretreated with or without ETMP I and incubated 24 hours, subsequently, analyzed by Western blot (A). Protein expression density was determined by densitometer and each point represents the mean±SE of three independent experiments (B).

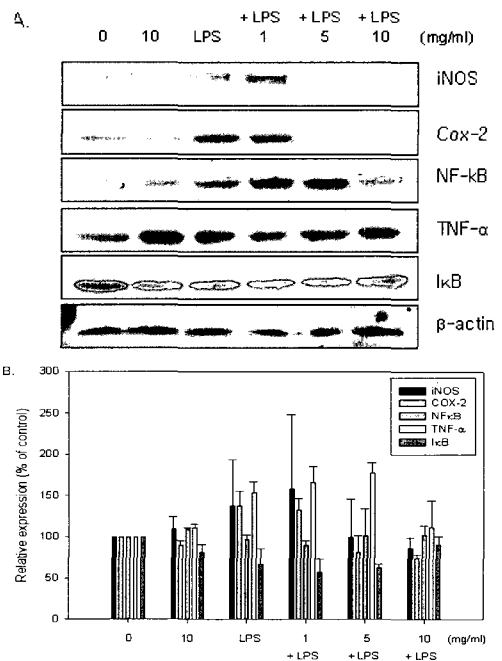


Fig. 6. Effect of ETMP II on the expression of inflammation-related protein in HepG2. Cells were pretreated with or without ETMP II and incubated 24 hours, subsequently, analyzed by Western blot (A). Protein expression density was determined by densitometer and each point represents the mean±SE of three independent experiments (B).

## 고찰

본 연구에서 상황버섯의 균사체를 이용하여 만든 전통주의 추출물이 LPS에 의한 인체 간암세포의 염증 반응에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. 먼저 추출물이 세포 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위해 각 농도에 따른 추출물을 처리하여 MTT assay를 실시한 결과 10 mg/ml 같은 높은 농도의 추출물 처리에도 80% 이상 세포 성장을 보여 세포 성장에 미미한 영향을 줄 수 있다. 또한 acetaldehyde 등에 의한 HepG2의 형태 변화를 보면 세포사이의 대표적인 tight junction과 adherent junction의 연결이 해제되는 양상을 보이는데<sup>7)</sup>, 본 연구에서 10 mg/ml 농도에 이르기까지 세포의 형태 변화에 영향을 미치지 않으며 DAPI 염색에 의한 특이적 핵형변화도 관찰되지 않았다.

iNOS는 neuronal NOS, endothelial NOS 등과 더불어 NOS family의 한 종류로 다른 NOS와 달리 세포내에서 많은 양이 발현되지 않으며, 염증성 자극이 주어질 때 유도되는 것으로 알려져 있다. NOS는 L-arginine, O<sub>2</sub>, NADPH-derived electron으로부터 L-citrulline, NADP, 그리고 nitric oxide (NO)를 생성시킨다<sup>8)</sup>. NO는 생체내 면역체계에서 활성산소종 또는 그 중간매개물로 작용하여 감염된 세포가 자체 방어기전을 나타낼 때 생성된다.

COXs는 세포내에서 항상 발현되는 형태로 존재하는 COX-1과 세포외 특이 자극에 의해 발현되는 COX-2 두 가지 형태가 존재하며, 염증과 각종 암에서 과다 발현되는 것은 COX-2로 알려져 있다<sup>9)</sup>. COX-2는 아라키돈산 대사 작용에서 중요한 역할을 수행하는 효소로서 염증성 자극 등에 의해 유도된다. 아라키돈산은 세포막의 인지질로부터 phospholipase A2의 작용에 의해 생성되며, COX, lipoygenase 등에 의해 prostaglandin, leukotrien 등과 같은 물질로 전환된다<sup>10)</sup>. COX에 의해 생성되는 prostaglandin은 많은 유도체를 가지고 있으며, 그 중 COX-2에 의해 생성되는 prostaglandin E2는 염증반응에 다양한 영향을 미친다. COX-2를 특이적으로 억제하여 염증성 질환의 치료와 항암제로 개발하려는 노력이 전 세계적으로 활발히 진행 중이며 대표적인 약물로는 non-steroidal anti-inflammatory drugs의 일종인 NS-398, celecoxib 등이 개발되어 있다<sup>11,12)</sup>.

TNF- $\alpha$ 는 암포를 사멸 시키는 프로그램인 apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 대표적인 물질로 세포내 단백질 분해기구의 또 다른 축인 caspases cascade를 활성화시켜 apoptosis를 유도한다<sup>13)</sup>. 그러나 최근 TNF- $\alpha$ 가 세포 증식 및 생존에 관여하는 신호전달경로의 활성화에도 관여하는 것으로 알려져 있어 염증성 자극에 의해 생성되는 TNF- $\alpha$ 는 후자의 경로를 이용할 것으로 추측된다<sup>14)</sup>.

본 실험에서 HepG2 세포에 LPS를 처리했을 때 나타나는 염증관련 인자 중 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현을 살펴보았다. 모두 LPS에 의해 증가하는 경향을 보였으나 이에 ETMP를 동시에 처리하였을 때 그 발현이 농도 비례적으로 감소하였다. 이를 Western blot 분석으로 살펴보았을 때도 그 발현이 저하되어 ETMP에 의한 염증 반응의 억제 작용을 알 수 있다.

정상적인 조건에서 NF- $\kappa$ B는 그 억제 조절 단백질인 I- $\kappa$ B와

결합되어 세포질에 존재하며, 세포외부의 특이적인 신호물질에 의해 여러 신호전달경로를 거쳐 I- $\kappa$ B kinase의 활성화가 일어나면 연속적으로 일어나는 I- $\kappa$ Ba의 인산화와 분해로 인해 자유롭게 되고, 핵 속으로 이동하여 여러 염증관련 유전자의 프로모터에 결합하여 전사를 유도한다<sup>15)</sup>. NF- $\kappa$ B에 의해 활성화되는 대표적인 염증 유전자는 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  등이며, 이들은 이차적인 염증반응을 세포내에서 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>16)</sup>.

본 실험에서 NF- $\kappa$ Bp65와 I- $\kappa$ Ba의 단백질 발현에 대한 ETMP의 영향을 살펴보았다. 두 단백질 모두 LPS와 ETMP 동반 투여에 대해 현저한 변화를 보여 주지 않았다. 그러나 본 실험의 NF- $\kappa$ Bp65 발현은 핵 자체의 발현이 아니므로 ETMP 투여에 의한 I- $\kappa$ B의 증가로 간접적으로 그 관여 여부를 알 수 있었다. 이상의 결과로 보아 ETMP는 인체 간암세포인 HepG2세포에서 LPS에 의한 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  유전자 및 단백질 발현을 저해하는 것을 알 수 있으며 이에 NF- $\kappa$ B가 관여할 개연성을 갖고 있다. 이는 알코올에 의해 가해지는 간세포에 대한 염증성 반응에 대해 상황버섯균사체를 이용한 발효주가 다른 주정에 비해 낮게 나타날 가능성을 시사한다.

## 결론

상황버섯균사체를 이용한 전통주의 추출물이 HepG2세포의 10  $\mu$ g/ml LPS에 의해 유발되는 염증관련 유전자 및 단백질의 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 추출물을 농도별로 처리하여 세포 성장과 형태의 변화를 살펴보았으나 10 mg/ml 농도에 이르기까지 대조군과 유사한 세포 성장 및 형태를 보여 주었다. 또한 LPS와 추출물을 동시에 처리하였을 때 추출물 농도 비례적으로 iNOS, COX-1 및 TNF- $\alpha$ 의 유전자 및 단백질의 발현이 억제되었다. 추출물에 의해 NF- $\kappa$ Bp65는 현저한 변화를 보이지 않았으나 I- $\kappa$ Ba는 다소 증가하였다. 이로 보아 상황균사체를 이용한 전통주의 추출물에는 LPS에 의해 유도되는 염증성 단백질의 발현을 저해하는 기능을 가짐을 알 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 (현장적용기술개발)의 연구비 지원에 의해 이루어 졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Choi, J.H., Ha, T.M., Kim, Y.H., Rho, Y.D. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor J Mycol*, 24, 214-222, 1996.
2. Ji, J.H., Kim, M.N., Chung, C.K., Ham, S.S. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J Kor Soc Food Sci Nutr*, 29, 322-328, 2000.
3. Kim, G.Y., Han, M.G., Song, Y.S., Shin, B.C., Shin, Y.I., Lee, H.J., Moon, D.O., Lee, C.M., Kwak, J.Y., Bae, Y.S., Lee, J.D.,

- Park, Y.M. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF-kappaB. *Biol Pharm Bull*, 27, 1656-1662, 2004.
4. Choi, Y.H., Huh, M.K., Ryu, C.H., Choi, B.T., Jeong, Y.K. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of *Phellinus linteus* in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Med*, 14, 227-232, 2004.
  5. Rastogi, D., Ratner, A.J., Prince, A. Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. *Paediatr Respir Rev*, 2, 245-252, 2001.
  6. Marra, F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosci*, 7, 899-914, 2002.
  7. Ramanathan, R., Wilkemeyer, M.F., Mittal, B., Perides, G., Charness, M.E. Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *J Cell Biol*, 133, 381-390, 1996.
  8. Nathan, C.F., Xie, F. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269, 13725-13728, 1994.
  9. Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W.G., Isaacs, W.B., De Marzo, A.M. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett*, 215, 1-20, 2004.
  10. Brash, A.R. Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J Clin Invest*, 107, 1339-1345, 2001.
  11. Roberts, E.G., Vona-Davis, L., Riggs, D.R., Jackson, B.J., Hohseni, H., Kandzari, S.J., McFadden, D.W. COX-2 inhibition and cancer: experimental findings and clinical correlates. *W V Med J*, 100, 96-101, 2004.
  12. Abou-Issa, H., Alshafie, G. Celecoxib: a novel treatment for lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 4, 725-734, 2004.
  13. Menon, R., Lombardi, S.J., Fortunato, S.J. TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet*, 19, 201-204, 2002.
  14. Gupta, S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J Clin Immunol*, 22, 185-194, 2002.
  15. Aggarwal, B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, 6, 203-208, 2004.
  16. Senftleben, U., Karin, M. The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med*, 30, S18-S26, 2002.