

아가리쿠스 버섯 균사체 추출물 및 분획물의 항돌연변이원성 및 세포 독성 효과

오현택 · 김수현 · 유수정 · 함승시[†]

강원대학교 바이오산업공학부 식품생명공학과

The Antimutagenic Effects and Cytotoxic Activities of *Agaricus blazei* Murill Mycelium Extracts and Fractions

Hyun-Taek Oh, Soo-Hyun Kim, Su-Jung Yoo and Seung-Shi Ham[†]

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

This study was performed to observe the antioxidative effects, antimutagenic capacity, and cytotoxic activity of the 70% ethanol extract, and fractions, of *Agaricus blazei* Murill mycelium, using DPPH free radical scavenging ability, the Ames test, and SRB assay, respectively. Among the fractions, ethyl acetate showed the most effective antioxidative capacity according to the RC₅₀(73.6 μ g/mL) of the scavenging effect on the DPPH radical. The inhibition rate of both the aqueous fraction and 70% ethanol extract(200 μ g/plate) toward the *Salmonella typhimurium* TA100 strain was 94.6%, and it was 89.4% against the mutagenesis induced by MNNG(0.4 μ g/plate). In addition, an identical concentration of the 70% ethanol extract in the TA98 strain, and the ethyl acetate fraction in the TA100 strain, showed inhibition rates of 80.3% and 76.9%, respectively, the highest activities against the mutagenesis induced by 4NQO(0.15 μ g/plate). The cytotoxic effects of the 70% ethanol extract and its fractions increased with increasing sample concentration against human cervical adenocarcinoma(HeLa), human hepatocellular carcinoma(Hep3B), human breast adenocarcinoma(MCF-7), human stomach adenocarcinoma(AGS), and human lung carcinoma(A549). A 1 mg/mL concentration of the ethyl acetate fraction showed cytotoxicities of 77%, 83.8%, 82.1%, 83.1%, and 92.6% against HeLa, Hep3B, MCF-7, AGS and A549, respectively.

Key words : *Agaricus blazei* Murill, mycelium, SRB assay, DPPH, Ames test.

서론

현대에 들어서 급격히 발달된 산업으로 인해 생활 수준의 향상과 더불어 식생활 습관의 서구화가 이루어지고 있다. 이로 인해 심장병, 고혈압, 뇌혈관계 질환 등의 순환기계 질병과 더불어 비만, 당뇨 및 암에 이르기까지 성인병 관련 질환이 증가하고 광범위해져 가는 추세이며 더불어 한국인의 건강과 참살이에 대한 관심 또한 높아져 가고 있는 실정이다. 특히 평균 수명의 연장으로 인해 노령 인구가 급속히 증가하고 있으며, 질병 양상도 과거 영양 결핍으로 인한 감염성 질환에서 현재에 이르러서는 영양 과잉 또는 영양 불균형으로 인한 퇴행성 질환으로 변화하고 있다(Kim & Han 1998, Choi *et al* 2000). 이러한 만성 성인병의 예방과 치료를 위하여 독성이 없는 것으로 밝혀진 천연 식물 및 전통 식품 등을 대상으로 생리활성 성분의 탐색이 활발히 이루어지고 있으며, 이는 지난 오랜 세월동안 유용한 기능성과 인체에 무해하다는 것이

검증되었기 때문이다(Suh YJ 1997). 특히, 버섯류는 최근 질병의 치료와 예방에 효과가 있는 천연물질 중 가장 주목받고 있으며 함유된 각종 영양 성분과 광범위한 약리 작용으로 예로부터 전통 식품이나 인체에 대한 민간 의약용으로 널리 활용되어 왔다(Chang & Miles 1989, Berry DR 1988). 최근 여러 종류의 버섯에 대하여 항암 작용에 대한 과학적인 연구가 이루어져 항암 효능을 나타내는 주요 성분은 버섯에 존재하는 다양한 다당류라고 보고되었다(Kim *et al* 1982, Hirokazu *et al* 1989, Mizuno T 1990a). 이러한 버섯 다당류들은 암세포에 직접적으로 작용하지 않고 숙주의 면역계를 활성화하는 방법으로 생체 방어력을 증가시켜 암세포의 생물학적 변화를 유도해 치료 효과를 나타내므로 독성, 유전자 돌연변이, 알레르기 등의 부작용을 거의 보이지 않아 새로운 신약 개발의 신소재로 많은 관심과 주목을 받고 있다(Sugihara *et al* 1972, Kweon *et al* 1998, Franz G 1989).

이러한 버섯류 중에서 가장 뛰어난 항암 효과를 가지고 있다고 알려져 있는 아가리쿠스 버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 분류학적으로 주름버섯목 주름버섯과 주름버섯속에 속하며,

[†] Corresponding author : Seung-Shi Ham, Tel : +82-33-250-6453, Fax : +82-33-250-6453, E-mail : hamss@kangwon.ac.kr

국내에서는 신령버섯이나 흰들버섯이라고 알려져 있다. 미국의 플로리다와 중남미의 중원 지대에 자생하는 버섯으로 브라질 동남부 상파울로 피에다테 산지에서 원주민들에 의해서 식용되어 왔으며, 국내에서는 자생하지 않지만 인공 재배되고 있다. 성상은 양송이 버섯(*Agaricus bisporus*)과 유사하지만 대가 두껍고 길며 향이 강하고 육질에도 감미가 있다 (Sung *et al* 1998, Foon KA 1989, Lee *et al* 1998). 이용 범위로는 식용으로도 사용되지만 항암 작용, 항종양 작용, 혈당 강하, 혈압 강하, 콜레스테롤 저하 등의 약리 작용이 있기 때문에 약용으로도 이용된다(Fujimiya *et al* 1998, Regina *et al* 2001, Hirokazu *et al* 1988, Itoh *et al* 1994, Mizuno *et al* 1990b, Kawagishi *et al* 1989). 또한, 추출 후 에탄올 침전을 통해 분리·정제할 수 있는 단백단당체는 항바이러스 단백질인 인터페론을 활성화해서 암 세포를 억제하고 제거하는 효과가 탁월하다고 알려져 있다(Yoshiko *et al* 1994, Qun *et al* 2002). 특히 이러한 고분자 단백단당체는 버섯의 자실체(fruit body) 보다는 균사체(mycelium)에 다량 함유되어 있다고 밝혀졌다(Tsunoda A 1969). 아가리쿠스 버섯 균사체뿐만 아니라 표고버섯, 구름버섯, 영지버섯 및 잎새버섯을 액체 배양하여 추출된 균사체 배양물에서 항암 성분이 확인되었으며, 항암 활성도 높은 것으로 보고되었다(Lew *et al* 1996, Hyun *et al* 1994, Lee *et al* 1992, Suzuki *et al* 1989). 또한, 아가리쿠스 버섯의 대표적인 생리활성 성분은 β -(1-3)-glucan으로 면역계의 활성화 및 대식세포를 통한 돌연변이의 억제 효과가 있다고 보고되었다(Mizuno M *et al* 1998, Nakajima A *et al* 2002). 아가리쿠스 버섯 균사체에 대한 여러 가지 생리 활성 연구가 오래전부터 이루어지고 있으며, 또한 세포의 돌연변이에서 암의 발생에 이르는 일련의 과정에 대한 생리 활성 연구가 이루어지고 있는 추세이다. 이에 본 실험에서는 항암 소재로서의 개발을 목적으로 아가리쿠스 버섯 균사체 추출물의 항돌연변이원성과 항암 활성에 대한 구체적이고 객관적인 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료의 추출 및 분획

액상 상태인 아가리쿠스 버섯 균사체를 환류 냉각기를 부착시킨 플라스크에 시료 중량의 10배인 70% ethanol을 첨가하고, 80℃에서 8시간 동안 3회 추출한 후 뜨거운 상태에서 감압여과를 거쳐 감압 농축기를 사용하여 추출 용매를 제거한 후 동결 건조하였다. 분획물의 제조는 동결 건조물로부터 용매의 극성에 따라 분별 깔대기로 분별 분리를 행하여 hexane, ethyl acetate, butanol 및 aqueous 순으로 네 가지 분획물을 분리하여 각각 감압 농축 후 동결 건조하였다. 모든 시

료는 -20℃에서 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 재료

항돌연변이원성 실험에서 필요한 직접 변이원(direct mutagen)으로서 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO), *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG)은 Sigma사(U.S.A.)로부터 구입하였고, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Junsei Chemical(Japan)의 특급 시약을 구입하였다. 또한 세포 배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 및 Hepes buffer, Fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA는 Hyclone사(U.S.A.)로부터 구입하였다. 그 외 추출 용매인 ethanol, hexane, ethyl acetate 및 butanol 등의 유기 용매는 특급 시약을 사용하였다.

실험에 사용한 암세포주인 인간 자궁경부암세포 HeLa(cervical adenocarcinoma, human), 인간 간암세포 Hep3B(hepatocellular carcinoma, human), 인간 유방암세포 MCF-7(breast adenocarcinoma, human), 인간 위암세포 AGS(stomach adenocarcinoma, human), 인간 폐암세포 A549(lung carcinoma, human) 그리고 인간 신장정상세포인 293(human transformed primary embryonal kidney)은 Korea Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하여 사용하였으며 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine 영양요구성 변이주(auxotroph)는 TA98, TA100의 두 종류로, 미국 California 대학의 B.N. Ames로부터 제공받았다.

3. DPPH 소거능(DPPH Scavenging Activity)에 의한 항산화 활성

수소 전자 공여능에 의해 항산화 활성을 측정하였다(Choi *et al* 1993). 시험관에 methanol로 녹인 여러 농도의 시료를 4 mL의 methanol과 함께 넣고 1.5×10^{-4} M 농도의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl solution(in methanol, DPPH)을 1 mL 첨가한 후, 30분간 암소에서 방치한 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 소거능은 3회 반복하여 측정하였으며 RC_{50} (restri-tion concentration)은 대조구의 흡광도를 1/2로 감소시키는 시료의 농도로 표시하였다. 이는 검체의 농도에 따른 수소 전자 공여능 검정(standard curve)을 통해 결정하였다.

4. 돌연변이원성 실험

아가리쿠스 버섯 균사체 추출물의 돌연변이원성 실험은 *S. typhimurium*의 변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation 법(Yahagi *et al* 1975)으로 실시하였다. 아가리쿠스 버섯 균사체 추출물을 미리 진열 멸균시킨 glass cap tube에 각각 50 μ L씩 가하고 여기에 미리 TA culture 배지에서 12시간 배양시킨 균액 100 μ L를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 μ L가 되도록

하였다. 이것을 30분간 preincubation한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀 돌연변이(his⁺ revertant colony)수를 측정하여 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

5. 항돌연변이원성 실험(Antimutagenicity Test)

Ames test를 개량한 preincubation법(Yahagi *et al* 1975)에 따라 항돌연변이원성 실험을 실시하였고, 실험에 사용한 변이원물질은 직접 변이원으로 널리 알려져 있는 4NQO와 MNNG를 사용하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 아가리쿠스 버섯 균사체 추출물 및 분획물을 각각 50 μ L씩 첨가하고 변이원 물질을 각각 50 μ L씩 첨가하였다. 여기에 전배양시킨 균액을 100 μ L씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종 부피가 700 μ L가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕 배양한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 실험하고, 생성된 복귀돌연변이 수를 측정하여 시료의 항돌연변이 활성을 판정하였다. 각 시료와 변이원 물질의 농도는 예비 실험을 통하여 결정하였으며, 항돌연변이 활성은 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition ratio, %)로 나타내었다. 결과에서 나타난 억제율은 3회 반복 실험을 실시하여 평균치를 나타내었다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [(M - S_i) / (M - S_0)] \times 100$$

M : 돌연변이 물질만 존재한 경우의 복귀 돌연변이 수

S_0 : 자연 복귀 돌연변이 수

S_i : 시료를 첨가하였을 때의 복귀 돌연변이 수

6. 세포 독성의 측정(SRB Assay)

세포 단백질 염색을 이용하여 세포 증식이나 독성을 측정하는 SRB(sulforhodamine B) assay(Martin & Martin 1997)를 시료의 항암 활성을 알아보는 방법으로 사용한다. 즉, 10% fetal bovine serum과 각각의 암세포들인 인간 자궁경부암세포(HeLa), 인간 간암세포(Hep3B), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 위암세포(AGS), 인간 폐암세포(A549)와 인간 신장정상세포(293)를 함유하는 RPMI 1640 배지 또는 DMEM 배지를 5×10^4 cells/mL 농도로 100 μ L씩 각 well에 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)한 후 각 well당 시료를 0.25, 0.5, 0.75 및 1 mg/mL의 농도가 되도록 100 μ L씩 첨가하여 다시 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 냉장 보관한 10% (w/v) TCA를 100 μ L 첨가하고 1시간 동안 4°C에서 방치한 뒤 증류수로 다섯번 행구었다. Plate를 저온 건조기에서 건조시킨

후 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액 100 μ L를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 결합하지 않은 SRB 염색액을 제거하기 위해 1%(v/v) acetic acid 용액으로 네 번 세척하였다. 건조기에서 건조된 plate는 10 mM Tris buffer 100 μ L로 염색제를 충분히 녹인 후 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 3회 반복하여 실험하였으며 평균값을 결과에 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 항산화 활성

아가리쿠스 버섯 균사체 추출물과 극성에 따른 분획물의 항산화 효과가 있는지를 규명하기 위하여 실시한 DPPH free radical 소거 활성의 결과는 Table 1에 나타내었다. 시료의 항산화 효과는 ethyl acetate 분획물에서 RC₅₀ 값이 73.6 μ g으로서 가장 높은 항산화능을 나타내었으며, 70% ethanol과 butanol 분획물에서의 DPPH 소거능 역시 각각 170.7과 137.7 μ g으로 시료의 ethyl acetate 분획물보다 낮은 활성을 나타내었다.

2. 돌연변이원성 실험

시료의 돌연변이원성을 확인해 보고자 70% ethanol 추출물에 대한 돌연변이원성 실험을 실시하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 음성 대조군의 복귀 돌연변이 집락수가 TA 98에서 20±2, TA100에서 176±6이었고, 70% ethanol 추출물을 50, 100, 150 및 200 μ g/plate의 여러 농도로 첨가하여 실험한 결과, 집락수가 음성 대조군에 비하여 농도 의존성을 나타내지 않으므로 아가리쿠스 버섯 균사체 추출물은 돌연변이원성을 나타내지 않는 것으로 판단되었다.

Table 1. Electron donating ability(EDA) of 70% ethanol extract and each fractions from *Agaricus blazei* Murill mycelium

Sample	RC ₅₀ ¹⁾ (μ g)
70% ethanol extract	170.7
Hexane fraction	471.3
Ethyl acetate fraction	73.6
Butanol fraction	137.7
Aqueous fraction	315.1
α -Tocopherol	13.5
BHT ²⁾	16.8

¹⁾ Amount required for 50% reduction of DPPH after 30 min

²⁾ Dibutyl hydroxy toluene.

Table 2. Mutagenicity of 70% ethanol extracts from *Agaricus blazei* Murill mycelium on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	his ⁺ revertants/plate	
	TA98	TA100
Spontaneous	20 \pm 2 ¹⁾	176 \pm 6
50	21 \pm 2	182 \pm 4
100	22 \pm 3	179 \pm 6
150	19 \pm 2	163 \pm 5
200	18 \pm 1	169 \pm 4

¹⁾ Each value represents the mean \pm SD of three plates.

3. 항돌연변이원성 실험

아가리쿠스 버섯 균사체 추출물 및 각 분획물의 항돌연변이원성 실험은 *S. typhimurium* TA98과 TA100을 이용하였으며, 변이원으로는 돌연변이원성 실험에서 양성 반응을 나타내며, 물질 그 자체로서 돌연변이를 유발하는 직접 변이원 물질인 4NQO와 MNNG를 사용하였다. 돌연변이원성 억제 작용을 검토하기 위한 항돌연변이원성 실험에 있어서는 *S. typhimurium* TA100 균주에 직접 변이원인 MNNG(0.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$)를 이용하여 돌연변이를 유발하였을 때 시료 농도 증가에 따라 억제 활성도 증가하였으며 이는 Fig. 1에 나타내었다. 시료 농도 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 ethanol 추출물을 비롯한 각 분획물의 돌

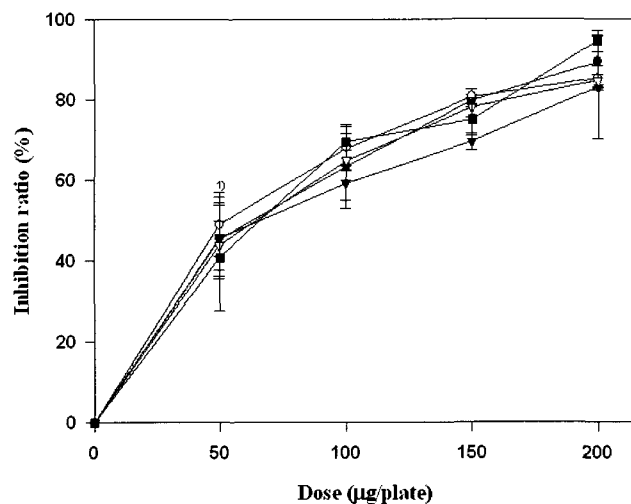


Fig. 1. The antimutagenic effects of ethanol extract and each fraction from *Agaricus blazei* Murill mycelium on the mutagenicity induced by MNNG(0.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$) in *Salmonella typhimurium* TA100.

● : Ethanol ext., ○ : Hexane fr., ▼ : Ethyl acetate fr., ▽ : Butanol fr., ■ : Aqueous fr.

¹⁾ Each value represents the mean \pm SD of three plates.

연변이 억제 효과가 모두 80% 이상을 나타냈으며, 특히 aqueous 분획물과 ethanol 추출물은 각각 94.6%와 89.4%의 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. MNNG와 더불어 강력한 직접 변이원으로 알려진 4NQO(0.15 $\mu\text{g}/\text{plate}$)에 의해 돌연변이가 유발된 *S. typhimurium* TA98과 TA100에 대한 시료의 항돌연변이 활성을 Fig. 2에 나타내었다. TA98 균주에 대한 실험 결과, 시료 농도 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 70% ethanol 추출물이 80.3%로 다른 분획물군에 비해 높은 돌연변이 억제 효과를 나타내었으며, 분획물 중에서는 ethyl acetate 분획물이 77.1%의 항돌연변이 활성을 보여 각각 56.0%, 65.6%와 55.0%의 돌연변이 억제 효과를 나타낸 hexane, butanol 및 aqueous 분획물보다 비교적 높은 활성을 나타내었다. *S. typhimurium* TA100 균주의 경우 ethyl acetate 분획물과 70% ethanol 추출물의 농도가 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 일 때 각각 76.9%와 71.6%의 항돌연변이 활성을 나타내었다. 특히 ethyl acetate 분획물의 경우에는 150 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 의 시료 농도에서도 70% 이상의 항돌연변이 활성을 나타내었으며, 다른 분획물의 경우 시료 농도 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 hexane, butanol 및 aqueous 분획물의 돌연변이 억제 효과는 각각 65.0%, 53.3% 및 68.3%를 나타내었다. 또한 모든 실험에서 추출물과 분획물의 농도가 증가함에 따라 변이원인 MNNG와 4NQO에 따른 TA98과 TA100 균주의 돌연변이 억제 효과도 증가하였다. 이상의 결과에서 나타나듯이 항돌연변이원성에 있어서 70% ethanol 추출물의 경우 다른 분획물과 비교하여 높은 돌연변이 억제 효과를 나타내었으며, 돌연변이원성은 발견되지 않았

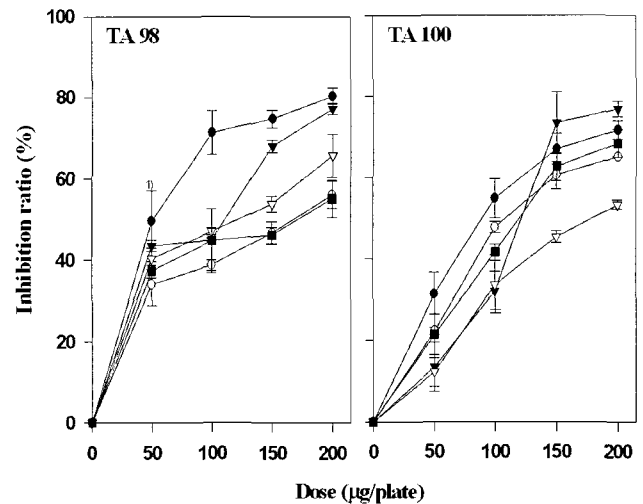


Fig. 2. The antimutagenic effects of ethanol extract and each fraction from *Agaricus blazei* Murill mycelium on the mutagenicity induced by 4NQO(0.15 $\mu\text{g}/\text{plate}$) in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100.

● : Ethanol ext., ○ : Hexane fr., ▼ : Ethyl acetate fr., ▽ : Butanol fr., ■ : Aqueous fr.

¹⁾ Each value represents the mean \pm SD of three plates.

다. Ji *et al*(2000)의 아가리쿠스 버섯 methanol 추출물에 대한 연구에서 시료 농도 200 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 일 때 모든 분획물에서 60% 이상의 돌연변이 억제 효과를 나타낸다는 결과와 비교하였을 때 본 실험의 70% ethanol 추출물이 더 높은 항돌연변이 효과를 나타내었다. Lee & Oh(2005)의 영지버섯의 순차 분획물의 항돌연변이 효과에 대한 연구에서 aqueous 분획물의 항돌연변이능이 전혀 없다는 보고와 비교하여 본 실험에서 MNNG에 의해 돌연변이가 유발된 TA100 균주에서 aqueous 분획물의 돌연변이 억제 효과가 94.6%로 매우 높은 항돌연변이능을 나타내어 상반된 결과를 보여주었다. 이와 같이 아가리쿠스 버섯 균사체 추출물 및 각 분획물은 직접 변이원에 대해 높은 돌연변이 억제 효과를 나타내었으며, 이는 암의 초기화 단계에서 일어날 수 있는 돌연변이 유발에 대한 억제 효과를 나타낸다고 사료된다. 아가리쿠스 버섯 균사체의 함유되어 있는 β -(1-3)-glucan이 면역계의 활성을 극대화 시켜 돌연변이 발생을 억제하기 때문인 것으로 보인다(Mizuno M *et al* 1998, Nakajima A *et al* 2002).

4. 암세포 성장 억제 효과

암 유발 초기단계에서 돌연변이가 매우 중요한 작용을 하고 대부분의 발암 물질이 돌연변이원이라는 공통점은 항돌연변이원성을 나타내는 물질이 항암 활성을 가질 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 본 실험에서는 각종 암세포에 대한 세포 독성을 규명하기 위해 암세포로 인간 자궁경부암세포(HeLa), 인간 간암세포(Hep3B), 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 위암세포(AGS), 인간 폐암세포(A549)와 인간 신장정상세포(293)를 이용하여 아가리쿠스 버섯 균사체 70% ethanol 추출물과 각 분획물들에 대하여 SRB assay를 실시하였다. HeLa의 경우, 시료 농도 1 mg/mL일 때 ethyl acetate와 hexane 분획물에서 각각 77.0%와 75.6%의 암세포 성장 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). Aqueous, butanol 분획물 및 70% ethanol 추출물에서 세포 독성 역시 각각 74.9%, 74.5% 및 71.7%를 나타내어 추출물과 모든 분획물에서 70% 이상의 높은 암세포 성장 억제 효과가 있는 것을 확인하였다. 마찬가지로 인간 간암세포인 Hep3B에서도 같은 시료 농도인 1 mg/mL일 때 ethanol 추출물과 각 분획물의 세포 독성 효과가 70% 이상이었으며, 특히 ethyl acetate와 butanol 분획물은 각각 83.8%와 80.4%의 높은 세포 성장 억제율을 나타내었다(Fig. 4). 인간 유방암세포인 MCF-7에서 hexane, butanol 및 ethyl acetate 층은 각각 88.3%, 85.5% 및 82.1%의 억제 효과를 나타내었다. 80% 이상의 억제 효과를 나타내지는 않았지만 70% ethanol 추출물과 aqueous 분획물에서도 각각 76.6%와 75.7%의 비교적 높은 세포 독성 효과가 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). AGS에 대한 각 시료의 성장 억제 효과를 Fig. 6에 나타내었다. 가장 높은 억제 효과를 나타낸 ethyl acetate 분획물은 83.1%를 나타내었으며,

70% ethanol 추출물, hexane, butanol, 그리고 aqueous 분획물 순으로 각각 77.2%, 76.1%, 71.2% 및 67.1%의 억제 효과를 나타내었다. 또한, ethyl acetate 분획물은 인간 폐암세포인 A549에 대한 세포 독성이 92.6%로 뛰어난 것으로 나타났으며, 70% ethanol 추출물과 hexane 분획물 역시 각각 88.4%와 86.9%로 높은 세포 독성을 나타내었다(Fig. 7). 또한, 여러 암세포에 대한 성장 억제 효과는 모든 분획물 농도의 증가에 따라 의

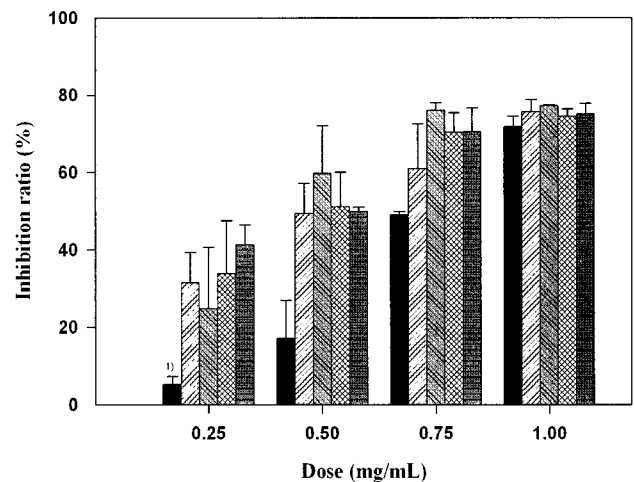


Fig. 3. Growth inhibitory effects of ethanol extract and each fraction from *Agaricus blazei* Murill mycelium on human cervical adenocarcinoma(HeLa).

■ : Ethanol ext., ▨ : Hexane fr., ▩ : Ethyl acetate fr., ▤ : Butanol fr., ▥ : Aqueous fr.

¹⁾ Each value represents the mean \pm SD of three plates.

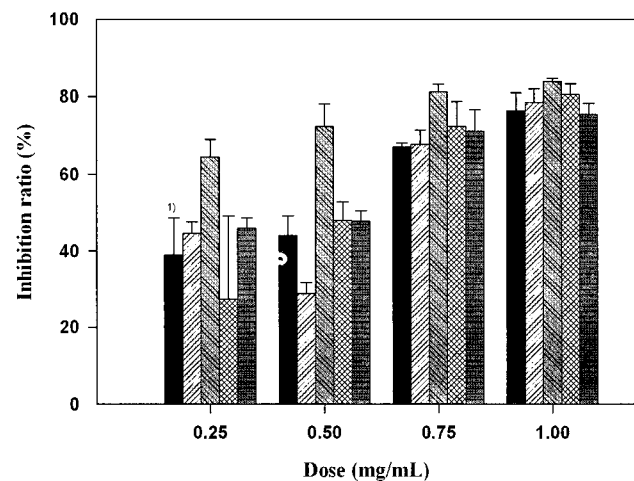


Fig. 4. Growth inhibitory effects of ethanol extract and each fraction from *Agaricus blazei* Murill mycelium on human hepatocellular carcinoma(Hep3B).

■ : Ethanol ext., ▨ : Hexane fr., ▩ : Ethyl acetate fr., ▤ : Butanol fr., ▥ : Aqueous fr.

¹⁾ Each value represents the mean \pm SD of three plates.

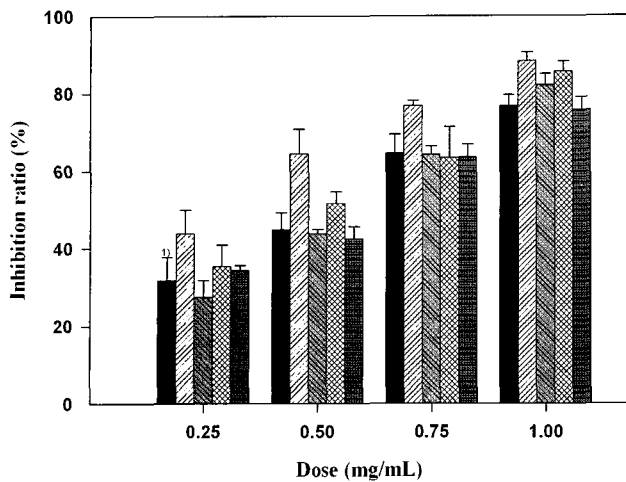


Fig. 5. Growth inhibitory effects of ethanol extract and each fraction from *Agaricus blazei* Murill mycelium on human breast adenocarcinoma(MCF-7).

■ : Ethanol ext., ▨ : Hexane fr., ▩ : Ethyl acetate fr., ▤ : Butanol fr., ▥ : Aqueous fr.
¹⁾ Each value represents the mean±SD of three plates.

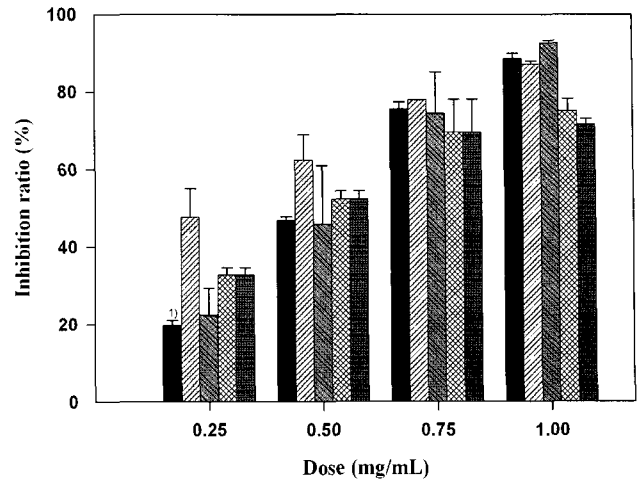


Fig. 7. Growth inhibitory effects of ethanol extract and each fraction from *Agaricus blazei* Murill mycelium on human lung carcinoma(A549).

■ : Ethanol ext., ▨ : Hexane fr., ▩ : Ethyl acetate fr., ▤ : Butanol fr., ▥ : Aqueous fr.
¹⁾ Each value represents the mean±SD of three plates.

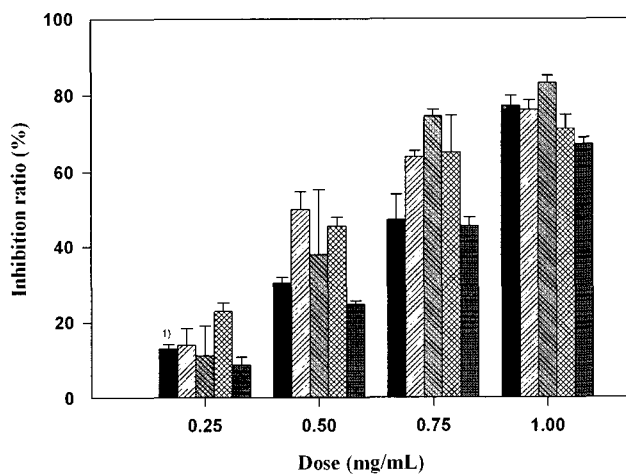


Fig. 6. Growth inhibitory effects of ethanol extract and each fraction from *Agaricus blazei* Murill mycelium on human gastric carcinoma(AGS).

■ : Ethanol ext., ▨ : Hexane fr., ▩ : Ethyl acetate fr., ▤ : Butanol fr., ▥ : Aqueous fr.
¹⁾ Each value represents the mean±SD of three plates.

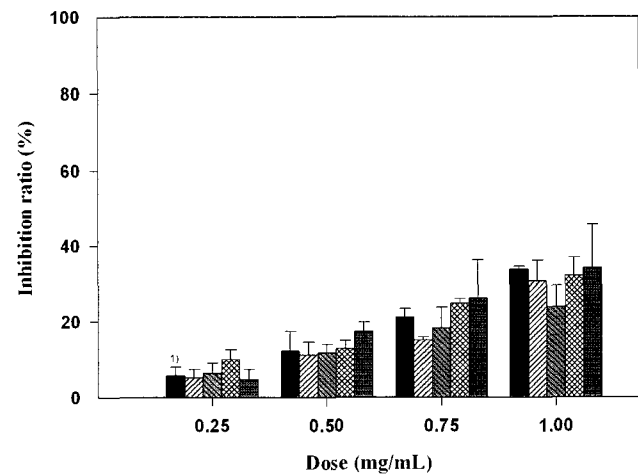


Fig. 8. Growth inhibitory effects of ethanol extract and each fraction from *Agaricus blazei* Murill mycelium on human transformed primary embryonal kidney(293).

■ : Ethanol ext., ▨ : Hexane fr., ▩ : Ethyl acetate fr., ▤ : Butanol fr., ▥ : Aqueous fr.
¹⁾ Each value represents the mean±SD of three plates.

존적으로 증가하였다. 시료 자체의 정상세포에 대한 세포 독성을 알아보기 위하여 인간 신장 정상세포인 293에 대한 성장 억제 효과를 실험한 결과 40% 미만의 낮은 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 찔레 영지버섯 추출물로 HeLa에 대한 세포 독성을 연구한 Song *et al*(2003)의 경우 5 mg/mL의 시료 농도에서 16% 이하의 낮은 억제 효과는 나타낸 반면에 본 실험에서 HeLa에 대한 추출물과 각 분획물의 세포 성장 억제

효과가 비교적 높게 나타났다. 아가리쿠스 버섯 자실체 추출물의 암세포 성장 억제 효과를 연구한 Ji *et al*(2000)의 연구에서 ethyl acetate 분획물의 시료 농도가 1 mg/mL일 경우, Hep3B, MCF-7과 A549에 대한 성장 억제 효과가 각각 89.1%, 96.7% 및 86.1%를 나타낸다고 보고하였으며, 본 실험에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 이는 아가리쿠스 버섯 자실체와 균사체의 단백질대체가 가지고 있는 대식세포 활성화 효과가

각 인간 암세포에도 영향을 나타낸 것으로 보인다.

요약 및 결론

아가리쿠스 버섯의 균사체에 대한 생리 기능 활성을 탐색하기 위하여 70% ethanol 추출물과 hexane, ethyl acetate, butanol 및 aqueous 분획물을 극성의 차이를 이용해 분리하였으며, 이를 실험에 사용하였다. 항산화 활성은 DPPH를 이용하여 EDA를 RC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)값으로 나타내었다. 실험 결과 ethyl acetate 분획물의 RC_{50} 값이 73.6 μg 을 나타내 가장 뛰어난 DPPH free radical 소거능을 보였다. Ames test를 이용해 확인한 돌연변이원성과 항돌연변이원성에 대해 실험한 결과, 시료자체의 돌연변이원성은 없었으며 시료 농도 증가에 따라 항돌연변이원성도 증가하였다. 직접 변이원인 MNNG에 의해 돌연변이가 유발된 TA100 균주에 대하여 시료 농도 200 $\mu\text{g/plate}$ 에서 모든 분획물의 억제 효과가 80% 이상으로 나타났으며, aqueous 분획물의 경우에는 94.6%로 각 분획물 중 가장 뛰어난 항돌연변이원성을 나타내었다. 변이원으로 4NQO를 사용하여 TA98과 TA100에 돌연변이를 유발하였을 때 ethyl acetate 분획물은 각 균주에 대하여 77.1%와 76.9%의 돌연변이 억제 효과를 나타내었고, 70% ethanol 추출물은 각각 80.3%와 71.9%의 각 균주에 대한 항돌연변이원성을 나타내어 분획물 중에서 뛰어난 활성을 보였다. 여러 인간 암세포에 대한 시료의 세포 독성을 실험한 결과 시료 농도 1 mg/mL에서 ethyl acetate 분획물의 세포 성장 억제 효과는 각 분획물에 비해 뛰어났으며, HeLa를 제외한 암세포에 대해서 80% 이상의 세포 독성을 나타내었다. 특히 A549에 대한 세포 독성은 92.6%로 높은 활성을 나타내었다. 각 분획물에 비하여 암세포 성장 억제 효과가 낮게 나타난 aqueous 분획물도 AGS를 제외한 모든 암세포에 대해서 70% 이상의 세포 독성을 나타내었다. 또한 인간 정상 세포에 대한 성장 억제율이 40% 미만으로 나타났기 때문에 암세포에 대한 높은 억제 효과에 비해 정상 세포에 대해서는 낮은 독성 효과를 가진다는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 아가리쿠스 버섯 균사체 추출물 및 각 분획물에 대한 항산화능, 항돌연변이원성 및 항암 효과에 대해서 실험을 하였으며, 그 결과 아가리쿠스 버섯 균사체는 뛰어난 생리 활성이 있는 것으로 나타났다. 이 실험 결과를 토대로 항암 효과가 뛰어난 아가리쿠스 버섯은 *in vitro*에서 암세포 발생을 예방하고 억제하였으며, 동물 실험을 비롯한 다양한 *in vivo*에서의 실험이 이루어져야 할 것이다. 특히, 자실체보다 더 많은 영양 성분이 있다고 알려진 균사체의 성분에 대한 연구가 더욱 활발히 이루어져 표고버섯의 렌티닌이나 구름버섯의 크레스틴의 경우와 같은 항암제로서의 이용이 요구되어지는 바이다.

문헌

- Berry DR (1988) Physiology of industrial fungi. Balckwell Scientific Publications, Oxford. pp 130-161.
- Chang ST, Miles PG (1989) Edible mushroom and their cultivation. CRC press, New York. pp 27.
- Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, Mun SI (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor J Pharmacol* 24: 299-303.
- Choi JW, Ryu DY, Kim YK, Hong EG, Kwun MS, Han JS (2000) Extraction and purification of bioactive materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Kor J Biotechnol Bioeng* 15: 293-298.
- Foon KA (1989) Biological response modifiers, the new immunotherapy. *Cancer Res* 49: 1621-1639.
- Franz G (1989) Polysaccharides in pharmacy. In: Current applications and future concepts, *Planta Medica* 55: 493-497.
- Fujimiya Y, Kobori H, Oshiman K, Soda R, Ebina T (1998) Tumoricidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kai-shi* 45: 246-252.
- Hirokazu K, Aya N, Takayuki Y, Takashi M (1988) Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydr Res* 183: 150-154.
- Hirokazu K, Ryuichi I, Teturo K, Takashi M (1989) Fractionation and antitumor activity of the water-in-soluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res* 186: 267-273.
- Hyun JW, Lim KH, Shin JE, Sung MS, Won YJ, Kim YS, Kang SS, Chang IM, Woo WS, Paik WH, Kim HJ, Woo ER, Park HK, Park JG (1994) Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants. *Kor J Pharmacology* 25: 171-177.
- Itoh H, Amano H, Noda H (1994) Inhibitory action of a (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan-protein complex isolated from *Agaricus blazei* Murill on meth a fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol* 66: 265-271.
- Ji JH, Kim MN, Choi KP, Chung CK, Ham SS (2000) Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Agaricus blazei* Murill extracts. *Kor J Food Sci Technol* 32: 1371-1378.
- Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T (1989) Fraction and antitumor activity of the water insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res* 186: 267-273.

- Kim BK, Robbers JE, Chung KS, Chung HS, Choi EC (1982) Antitumor components of *Cryptoporus volvatus*. *Kor J Mycol* 10: 111-117.
- Kim GH, Han HK (1998) The effect of mushroom extracts on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 27: 326-332.
- Kweon MH, Lim EJ, Sung HJ (1998) Studies on biological polysaccharides isolated from *Agaricus bisporus* (in Korean). *Kor J Agric Chem Biotechnol* 41: 60-66.
- Lee BW, Lee MS, Park KM, Kim CH, Ahn PU, Choi CU (1992) Anticancer activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 20: 311-315.
- Lee MH, Lee HJ, Cho IS (1998) Chemical compositions of *Agaricus blazei* Murill fruiting bodies cultivated in a Korean local farm. *J Food Hyg Safety* 13: 94-98.
- Lee MS, Oh SI (2005) Effects of antioxidative stress, antimutagenicity and cytotoxicity of cancer cells in fractional extracts from *Ganoderma lucidum* Krast. *Kor J Food Cookery Sci* 21: 759-768.
- Lew JW, Chaung CH, Jeong HJ, Lee KH (1996) Anticomplementary and antitumor activities of the alkal extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY-105. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 18: 571-579.
- Martin A, Martin C (1997) Comparison of 5 microplate colorimetric assay for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11: 49-54.
- Mizuno M, Morimoto M, Minate K, Tsucjida H (1998) Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 434-437.
- Mizuno T (1990a) Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem* 54: 2889-2896.
- Mizuno T, Inagaki O, Kanao T, Hagiwara T (1990b) Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himematsutake" the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric Biol Chem* 54: 2897-2905.
- Nakajima A, Ishida T, Koga M, Takeuchi M (2002) Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol* 2: 1205-1211.
- Qun K, Jian Y, Xiao Y, Jinian F (2002) Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydr Res* 337: 1417-1421.
- Regina CR, Notoya M, Mario SM (2001) Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutation Res* 496: 5-13.
- Song JH, Lee HS, Hwang JK, Chung TY, Hong SR, Park KM (2003) Physiological activities of *Phellinus ribis* extracts. *Kor J Food Sci Technol* 35: 690-695.
- Sugihara T, Yoshioka Y, Nishioka K (1972) Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biol* 238: 59-60.
- Suh YJ (1997) Cancer chemoprevention by food. *Food Science and Industry* 30: 59-63.
- Sung JM, Yoo YB, Cha DY (1998) Mushroom. Kyohaksa, Seoul. pp 3-10.
- Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, Sato K, Osawa M, Yadomae T (1989) Antitumor and immunomodulating activities of a β -glucan obtained from liquid cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* 37: 410-413.
- Tsunoda A (1969) A mushroom extract as an interferon inducer. *Ann NY Acad Sci* 173: 719-725.
- Yahagi T, Degawa M, Seino Y, Matsushima T, Nagao M, Sugimura T, Hashimoto Y (1975) Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Letter* 1: 91-97.
- Yoshiko O, Tetsuta K, Kazuko Y, Junya O, Toshio M (1994) Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*. *Yakugaku Zasshi* 114: 342-350.

(2007년 4월 19일 접수, 2007년 6월 11일 채택)