

상황버섯 추출물의 항산화 효과

류동영, 김민석, 민오진, 김동욱*

목포대학교 자연과학대학 생명과학부 생약자원전공

Antioxidative Effects of *Phellinus linteus* Extract

Dong Young Rhyu, Min Suk Kim, Oh Jin Min and Dong Wook Kim*

Department of Medical Plant Resources, Mokpo National University, Muan 534-729, Korea

Abstract - Reactive oxygen species (ROS) or free radical-mediated oxidative stress plays an important role in the pathophysiologic process of disease state. This study investigated antioxidative effects of *Phellinus linteus* extract on the generation of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, superoxide anion radical (O_2^-), hydroxyl radical ($\cdot OH$), nitric oxide (NO), and peroxynitrite ($ONOO^-$) radical and free radical-mediated protein oxidation under *in vitro* assay systems. This results showed that *Phellinus linteus* extract effectively inhibited the generation of free radicals in the all assay system with dose-dependent manner and also significantly reduced the protein oxidative level. Thus, the present study indicates that *Phellinus linteus* extract possesses a potent antioxidant activity and plays a beneficial role against free radical-induced oxidative injury.

Key words - Antioxidant, Free radical, Oxidative stress, *Phellinus linteus*, Reactive oxygen species (ROS)

서 언

생체 내에서 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 또는 활성질소종(reactive nitrogen species; RNS)의 과도한 발생은 항산화 방어계(antioxidant defense system) 사이에 심각한 불균형을 초래하여 산화적 스트레스(oxidative stress)를 일으키고 각종 질환의 발생과 진행기전에 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Devasagayam *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007). 이러한 자유라디칼은 비공유 전자(unpaired electron)를 갖고 있는 분자이기 때문에 불안정하여 세포구성 성분들과 쉽게 반응하게 되고 지질 과산화, 단백질 변성 또는 불활성화, DNA 분절, 최종당화산물 등 비선택적이고 비가역적인 손상을 일으키므로 노화, 암, 동맥경화증, 염증, 뇌질환과 심혈관질환, 신장질환, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(Cross *et al.*, 1987; Maeda and Akaike, 1998; Halliwell and Gutteridge, 1999). 그러므로 활성산소종으로 인한 생체내 병리적인 현상을 직·간접적으로 조절할 수 있는 항산화제(antioxidant)의 개발 연구가 활발하게 진행되고 있으며 정상적인 생체내 방어기구로서 superoxide dismutase

(SOD), catalase, glutathione reductase(GSH) 등의 항산화 효소(antioxidative enzyme) 활성을 증강시키는 물질의 탐색, 천연자원으로부터 유래한 항산화제인 tocopherol, vitamin C, polyphenols, flavonoids 성분과 합성 항산화제인 BHA, BHT 성분들의 항산화 효과에 관한 세포와 동물실험 및 임상연구 결과들이 보고되어져 있다(Diplock *et al.*, 1998; Higdon and Frei, 2003). 그러나 합성 항산화제인 BHA와 BHT 성분은 항산화 효능은 뛰어나지만 발암성, 독성 및 용도의 한계성 등의 문제로 인하여 사용이 제한을 받고 있으므로 차, 채소류 같은 식용 자원과 약용자원로부터 안전하고 강력한 생리적 효능을 갖는 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있다(Saito *et al.*, 2003).

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 분류학상 민주름버섯목(*Aphylliphorales*), 소나무비늘과(*Hymenochaetales*), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 버섯으로 뿔나무 줄기에 자생하며 삿갓표면을 제외하고는 모두 황색이므로 상황(桑黃)이라 불려졌으며 허준의 동의보감(東醫寶鑑)에는 상목이(桑木耳), 상이(桑耳), 상황(桑黃) 등으로 분류하여 부인병인 생리불순, 붕루(崩漏), 대하(帶下) 등 주로 혈이 멎친 곳을 풀어 주는 증상에 활용되었다(동의과학연구소, 2002). 최근까지 밝혀진 약리작용으로는 상황버섯 자실체 열수 추출물과 다당류 성분의 항암 효과

*교신저자(E-mail) : dbkim@mokpo.ac.kr

(Ikekawa *et al.*, 1968), 항보체 활성 및 체액성과 세포성 면역 반응의 증강작용(Kim *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996), CCl₄ 또는 과산화 유발제를 이용한 생체내 실험에서 다당류 성분의 지질과산화 억제능과 간보호 작용(강 등, 2001), 전자공여능에 따른 항산화 활성효과(Park *et al.*, 2004) 등이 알려져 있다. 그러나 상황버섯의 항산화 효과는 *in vitro* 실험계를 이용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical과 지질 과산화 억제효과에 대해서만 보고되어져 있고 다양한 자유라디칼 억제 효과와 관련된 실험결과는 미비한 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 세포의 손상 및 노화 등 각종 질병의 원인이 되는 자유라디칼(superoxide, O₂⁻; hydroxyl radical, ·OH; nitric oxide, NO; peroxynitrite, ONOO⁻)을 유발시키는 다양한 *in vitro* 실험계와 자유라디칼에 의한 형광단백질 allophycocyanin 물질의 산화정도를 측정하는 방법을 이용하여 상황버섯 열수 추출물의 항산화 효과를 규명하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료와 시료 추출물의 제조

상황버섯은 광주시 소재의 한약상에서 구입하여 중량의 2배 증류수를 첨가하여 1시간 열탕 추출한 후, 45℃ 이하의 수욕상에서 감압 농축하여 동결 건조시킨 후에 분말시료를 제조하였다.

시약

3-Morpholinopyrrolidine(SIN-1), dihydrorhodamine123(DHR123), phenazine methosulfate(PMS), ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid(EDTA), allophycocyanin, N-acetylcysteine(NAC), ascorbic acid(AA), curcumine, trolox 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), sodium nitroprusside(SNP), nitro blue tetrazolium(NBT), β-nicotineamide adenine dinucleotide disodium salt reduced form(β-NADH), D-L-penicillamine, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO), naphthylethylene diaminedihydrochloride, sulfanilamide, diethylenetriaminepenta acetic acid(DTPA), 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH) 등은 Wako사(Osaka, Japan)의 제품을 이용하였다.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능

150μM DPPH 용액과 시료를 각 농도별로 조제한 후에 96-

well plate에 각 well당 100μl씩 넣은 다음에 실온에서 30분 동안 차광상태로 방치하고 ELISA reader(Immuno Mini NJ-2300)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물로는 ascorbic acid 성분을 이용하였다.

Superoxide anion radical(O₂⁻) 소거능

96-well plate에 각 well당 50mM phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 반응액(0.125mM EDTA, 62μM NBT, 98μM NADH)과 시료 용액을 넣은 다음에 곧 바로 50mM phosphate buffer에 녹인 33μM PMS 용액을 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, Tecan SPECTRA Fluor 장비를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물로는 ascorbic acid 물질을 이용하였다.

Nitric oxide(NO) 소거능

50mM phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 SNP 용액과 시료 용액을 25℃에서 150분 동안 반응시킨 후, 96-well plate에 각 well당 반응액 150μl와 Griess 시약 100μl씩을 넣고 5분 후에 각 well에 생성된 nitrite양을 ELISA reader(Immuno Mini NJ-2300)로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조물로는 NO 억제효과를 갖는 curcumin 성분을 이용하였다.

Peroxynitrite(ONOO⁻) radical 소거능

시료를 농도별로 희석하여 96-well plate에 각 well당 10μl씩 넣고 90mM sodium chloride와 5mM potassium chloride가 포함된 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 5mM DTPA 4μl와 5mM DHR123 0.2μl 용액을 첨가한 다음에 200μM SIN-1 시약을 첨가하여 차광상태로 실온에서 10분 동안 반응시킨 후, fluorescence spectrophotometer(DEKAN SPECTRFlour Plus)로 excitation 485nm, emission 535nm에서 형광도를 측정하였다. 양성 대조물로는 D-L-penicillamine 물질을 이용하였다.

Hydroxyl(·OH) radical 소거능

Fenton 반응에 의해 생성되어지는 ·OH radical은 spin-trapping제인 DMPO 용액과 빠르게 반응하여 생성되는 DMPO-OH adduct를 electron spin resonance(ESR) spectrometer 기기로 측정하고자 microtube에 10% DMPO (v/v), 0.2mM FeSO₄, 1 mM DTPA를 첨가한 후 시료와 1mM hydrogen peroxide(H₂O₂)를 넣고 잘 혼합하여 ESR spectrometer(JEOL FESX, Tokyo, Japan)를 이용하여 spin spectrum을 측정하였다. ESR spectrometer 조건은 micro-wave power 1.02mW, modulation frequency 9.4201 GHz,

field modulation 339.853mT, sweep width 5.000mT time constraint 0.03sec의 조건에서 측정하였다.

Allophycocyanin assay

Allophycocyanin은 자유라디칼과 반응을 하면 쉽게 형광이 소멸되는 형광단백질로서 자유라디칼에 의한 단백질의 변성 억제효과를 측정하는데 이용되는 단백질이다. 96-Well plate에 각 well당 75mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 시료용액 20μl와 37.5nM allophycocyanin 용액 200μl를 빠르게 첨가한 후, 3 M AAPH 20μl를 넣은 후부터 90분 동안 일정한 간격으로 fluorescence spectrophotometer(DEKAN SPECTRFlour Plus)로 excitation 598nm, emission 651nm에서 allophycocyanin의 형광도를 측정하였으며, 양성 대조물로는 trolox 물질을 이용하였다.

결과 및 고찰

DPPH radical 생성 억제효과

DPPH radical은 비교적 안정한 자유라디칼로서 천연자원의 항산화 활성을 검색하는데 일반적으로 이용되는 실험방법으로 상황버섯 물 추출물의 DPPH radical 생성 억제효과의 결과는 Table 1과 같다. 상황버섯 물 추출물의 모든 농도에서 양성 대조군 AA 물질보다 DPPH radical 생성 저해효과가 낮게 나타났으나 농도 의존적으로 DPPH radical 소거효과를 나타냈으며, 대조군에 비해 50% 흡광도 감소를 나타내는 시료의 농도는 50μg/ml이었다. 현재까지 보고된 상황버섯 추출물에 대한 DPPH radical 소거효과를 보자면, 상황버섯 열수 추출물보다 에탄올 추출물에서 활성이 높게 나타났다(권 등, 2006).

O₂⁻, NO, ONOO⁻ radical 생성 억제효과

생체내에서 다양한 전자전달 시스템에서 발생하는 O₂⁻는 활성산소종 생성의 주요한 원인인자이며, NO는 급만성 염증 반응에서 생성이 증가되어 조직 손상에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근에 NO와 O₂⁻의 반응에 의해 생성되는 ONOO⁻는 강력한 산화제로서 DNA와 단백질 산화, 지질과산화

를 유발시키는 독성물질로 동맥경화증을 비롯한 뇌와 심혈관질환, 당뇨병, 염증질환 등 각종 질병과 연관되어 있으며, 자연 발생적인 반응에 의해 연차적으로 강력한 산화 작용을 갖는 nitrogen dioxide(·NO₂)와 ·OH radical을 발생시킴으로서 세포와 조직의 손상 및 사멸을 야기시킨다고 알려져 있다(Ohs-hima *et al.*, 1990; Beckman *et al.*, 1990). 구체적으로 Fig. 1

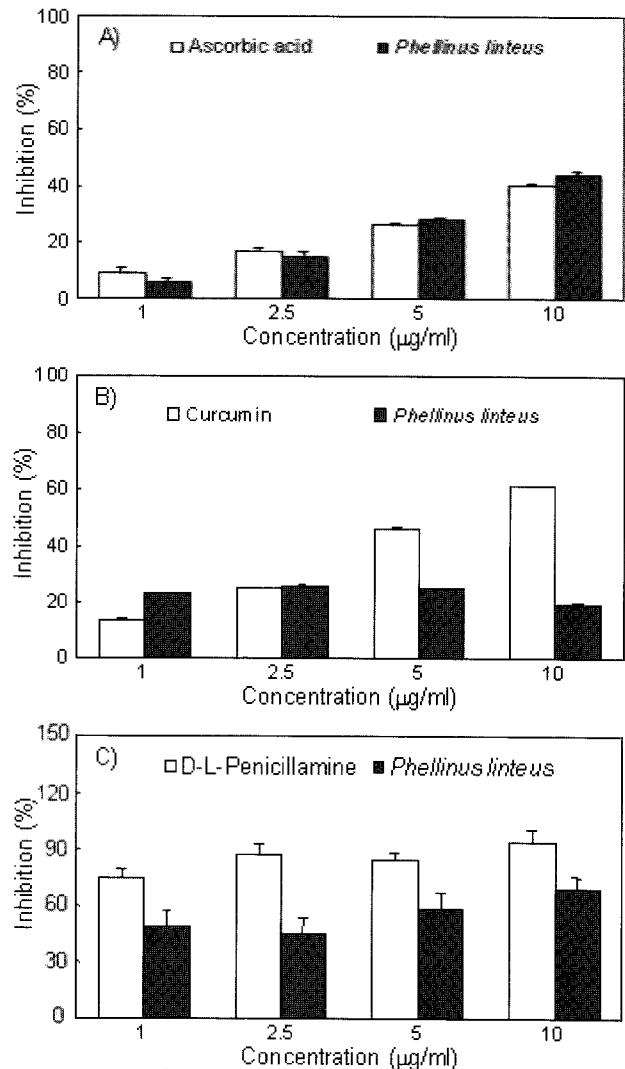


Fig. 1. Effect of *Phellinus linteus* extract on O₂⁻, NO, and ONOO⁻ radical. Ascorbic acid, curcumin and D-L-phenicillamine are positive control.

Table 1. Effect of *Phellinus linteus* extract on DPPH radical

Sample	Concentration (μg/ml)	Scavenging activity
<i>Phellinus linteus</i>	5	4.2 ± 4.0
	25	23.4 ± 7.8
	50	54.0 ± 0.9
Ascorbic acid	5	46.6 ± 1.5
	25	95.1 ± 0.9
	50	99.2 ± 0.5

Ascorbic acid is positive control.

의 실험결과를 설명하자면, 상황버섯 물 추출물의 O_2^- 생성 저해효과는 양성 대조물인 AA와 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않지만 농도 의존적으로 활성이 증가하여 5 또는 $10\mu\text{g/ml}$ 에서 28%와 44%로 AA 성분 26%와 41%보다 약간 높게 억제효과가 나타났다. NO 생성 억제효과는 양성 대조물인 curcumin 성분보다 낮게 나타났으나 상황버섯 물 추출물 $1.0\mu\text{g/ml}$ 농도에서 curcumin 성분 13%보다 높은 23% 정도의 NO 생성 억제효과를 나타냈다. ONOO⁻ 생성 저해효과는 상황버섯 물 추출물이 모든 농도에서 양성 대조물로 이용된 D-L-penicillamine 성분보다 소거능이 낮았지만 농도 의존적으로 소거 활성이 증가하여 $10\mu\text{g/ml}$ 에서 69%의 ONOO⁻ 소거 활성효과를 나타냈다.

·OH radical 생성 억제효과

·OH radical은 반응성이 크고 반응속도가 매우 빠른 자유라디칼이므로 ESR을 이용하여 측정하였다(Li *et al.*, 2003). Fig. 2와 Fig. 3의 결과에 따르면 대조군의 signal peak/Mn peak에 비하여 상황버섯 물 추출물 1과 $10\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 억제효과가 나타나지 않았지만 100, 200, $300\mu\text{g/ml}$ 농도에서는

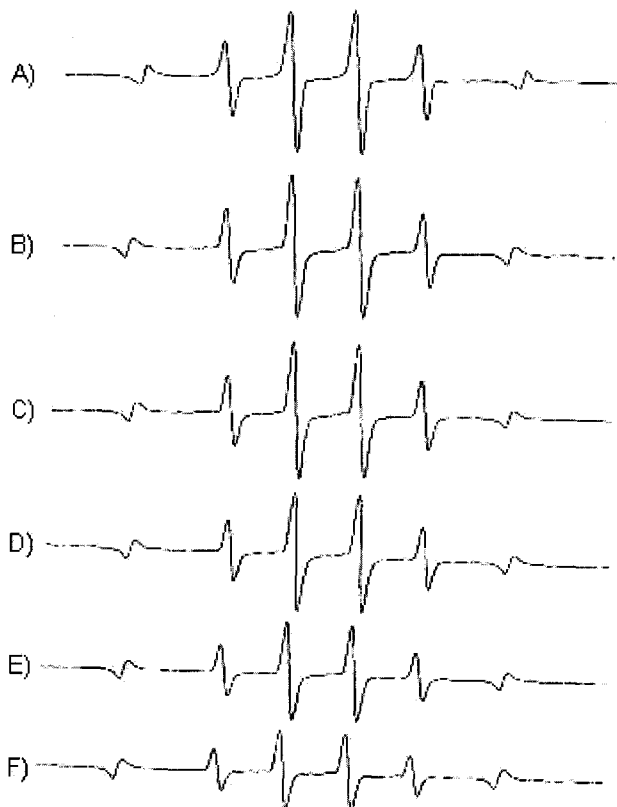


Fig. 2. Hydroxyl radical (·OH) scavenging activity of *Phellinus linteus* extract on the ESR spectrum of DMPO-OH. A; control, B; *Phellinus linteus* $1\mu\text{g/ml}$, C; *Phellinus linteus* $10\mu\text{g/ml}$, D; *Phellinus linteus* $100\mu\text{g/ml}$, E; *Phellinus linteus* $200\mu\text{g/ml}$, F; *Phellinus linteus* $300\mu\text{g/ml}$.

유의하게 농도 의존적으로 ·OH radical 생성 억제효과를 나타냈다.

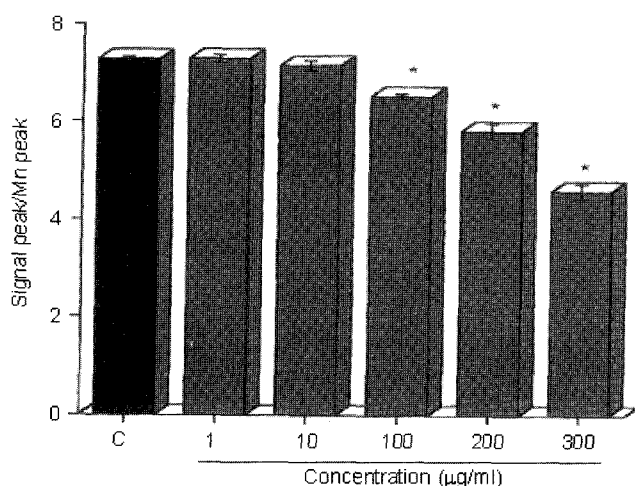


Fig. 3. Hydroxyl radical (·OH) scavenging activity of *Phellinus linteus* extract on the signal peak/Mn peak in ESR spectrum. *P<0.001 vs control value.

Allophycocyanin assay

Allophycocyanin는 형광단백질로서 자유라디칼로 인한 단백질 산화능을 평가하는데 활용되는 단백질이다(Courderot-Masuyer *et al.*, 1999). Fig. 4의 결과를 보면, 대조군은 자유라디칼을 유발시키는 AAPH 물질을 첨가한지 30분부터 약 50% 정도 allophycocyanin 단백질의 형광도가 낮아져 60분후에는 거의 0%에 가까운 형광도를 나타냈다. 그러나 상황버섯 물 추출물은 5, 10, 25, $50\mu\text{g/ml}$ 모든 농도에서 산화적 스트레스에 의한 단백질 손상을 억제하는 것으로 나타났으며 25, $50\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 양성대조물 trolox $10\mu\text{g/ml}$ 농도와 비슷한 항산화 효과를 나타냈다.

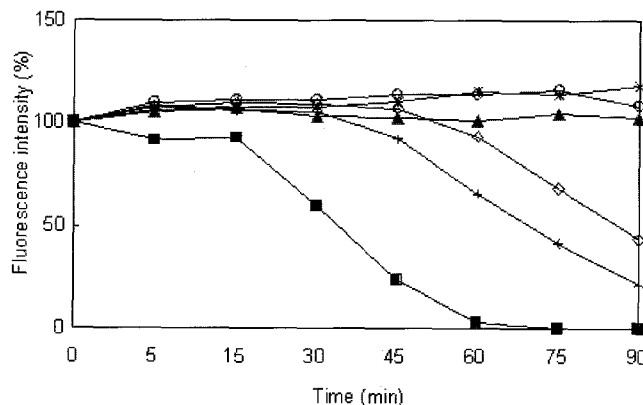


Fig. 4. Time-response curve of trolox $10\mu\text{g/ml}$ (▲), *Phellinus linteus* extract $5\mu\text{g/ml}$ (+), $10\mu\text{g/ml}$ (◇), $25\mu\text{g/ml}$ (○), and $50\mu\text{g/ml}$ (*) on allophycocyanin quenching induced by AAPH. Trolox is positive control.

적 요

본 연구에서는 O_2^- , $\cdot OH$ radical, NO, ONOO⁻ 자유라디칼을 유발시키는 *in vitro* assay system과 free radical-induced oxidative stress에 의한 단백질 손상에 대한 진흙버섯속에 속하는 상황버섯 물 추출물의 항산화 효과를 측정하였다. 상황버섯 물 추출물의 O_2^- , $\cdot OH$ radical, NO, ONOO⁻ 자유라디칼 억제효과에서는 실험에 사용된 양성 대조물 보다는 낮게 나타났으나 모든 실험계에서 대조군에 비해 뚜렷하게 자유라디칼 소거효과를 나타냈다. 또한 상황버섯 물 추출물은 산화적 스트레스에 의한 단백질 손상 억제효과에서도 대조군에 비해 명확한 저해효과를 나타냈다. 그러므로 상황버섯의 항산화 효과는 상황버섯의 약리학적 효능을 설명하는데 중요한 기초 자료라고 사료된다.

인용문헌

- Beckman, J.S., T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall and B.A. Freeman. 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87(4): 1620-1624.
- Courderot-Masuyer, C., F. Dalloz, V. Maupoil and L. Rochette. 1999. Antioxidant properties of aminoguanidine. Fundam. Clin. Pharmacol. 13(5): 535-540.
- Cross, C.E., B. Halliwell, E.T. Borish, W.A. Pryor, B.N. Ames, R.L. Saul, J.M. McCord and D. Harman. 1987. Oxygen radicals and human disease. Ann. Intern. Med. 107(4): 526-545.
- Devasagayam, T.P., J.C. Tilak, K.K. Bloor, K.S. Sane, S.S. Sane and R.D. Lele. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J. Assoc. Physicians India 52: 794-804.
- Diplock, A.T., J.L. Charleux, G. Crozier-Willi, F.J. Kok, C. Rice-Evans, M. Roberfroid, W. Stahl and J. Vina-Ribes. 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. Br. J. Nutr. 80(1): S77-S112.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1999. Free radicals in biological and medicine. 3rd Edn. Clarendon press, Oxford.
- Higdon, J.V. and B. Frei. 2003. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 43(1): 89-143.
- Ikekawa, T., M. Nakanish, N. Uehara, G. Chihara and F. Fukuoka. 1968. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially Phellinus linteus. Gann. 59: 155-157.
- Kim, H.M., S.B. Han, G.T. Oh, Y.H. Kim., D.H. Hong., N.D. Hong and I.D. Yoo. 1996. Stimulation of Humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom Phellinus linteus. Int. J. Immunopharm. 18: 295-303.
- Lee, J.H., S.M. Cho, K.S. Song, N.D. Hong and I.D. Yoo. 1996. Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immuno-stimulating activity from mycelium of Phellinus linteus. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 44(5): 1093-1095.
- Li, L., Y. Abe, T. Mashino, M. Mochizuki and N. Miyata. 2003. Signal enhancement in ESR spin-trapping for hydroxyl radicals. Anal. Sci. 19(7): 1083-1084.
- Maeda, H. and T. Akaike. 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. Biochemistry (Mosc). 63(7): 854-865.
- Ohshima, H., M. Friesen, I. Brouet and H. Bartsch. 1990. Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins. Food Chem. Toxicol. 28(9): 647-652.
- Park, I.H., S.K. Chung, K.B. Lee, Y.C. Yoo, S.K. Kim, G.S. Kim and K.S. Song. 2004. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of Phellinus linteus. Arch. Pharm. Res. 27(6): 615-618.
- Saito, M., H. Sakagami and S. Fujisawa. 2003. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). Anticancer Res. 23(6C): 4693-4701.
- Valko M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39(1): 44-84.
- 강일준, 정명은, 함승시, 남상명, 김수진, 정차권. 2001. 상황버섯이 사염화탄소와 고지방을 투여한 흰쥐의 간지질 대사에 미치는 생화학적, 형태학적 연구. 한국식품영양과학회지 30(2): 331-337.
- 권대준, 윤선주, 조준구, 최웅규, 강선철. 2006. 추출방법에 따른 상황버섯 추출물의 항산화활성 및 생물학적 특성. 한국응용생명화학회지 49(2): 91-96.
- 동의과학연구소. 2002. 동의보감 내경편. 휴머니스트. 서울. pp. 1436.

(접수일 2008. 2. 5 ; 수락일 2008. 2. 15)