

바우미 상황버섯 추출물의 항염증 효과에 관한 연구

김혜민 · 이동희*

서울시립대 생명과학과

Characterization of Anti-inflammation Effect of Aqueous Extracts from *Phellinus baumii*

Hyemin Kim and Dong Hee Lee*

Department of Life Science, University of Seoul, 13 Siripdae-Gil, Jeonnong-Dong,
Dongdaemun-Gu, Seoul, Korea 130-743

(Received December 10, 2010. Accepted December 23, 2010)

ABSTRACT: This study is to characterize the postulated anti-inflammatory effect of the hot water extracts from the *Phellinus baumii*. RAW264.7, macrophage cell line, was activated by lipopolysaccharide (LPS) and, further, treated with *Phellinus baumii*'s aqueous extract. When the cultured macrophage cells were treated with LPS, they show typical signs of endoplasmic reticulum stress (ERS) and an increment in secretion of inflammatory cytokine compared to the non-treated control: The expression of glucose-regulated protein78 (Grp78), Grp94, and C/EBP homologous protein/GADD 153 (CHOP) increased along with augmented secretion of interleukin-6. Cellular nitric oxide content also significantly went up in comparison to the non-LPS treatment. When the LPS-treated RAW264.7 was treated with the aqueous *Phellinus baumii* extracts, however, the expression of ERS markers markedly reduced and the release of nitric oxide declined. Also, the expression of induced nitric oxide synthase (iNOS) notably diminished similarly as the NO content. In conclusion, this study strongly indicated that aqueous *Phellinus baumii* extract can be utilized directly as anti-inflammation agent and serves as a source of functional ingredient to lessen the inflammation.

KEYWORDS : Anti-inflammation, ER stress, Functional ingredient, Macrophage activation, *Phellinus baumii*

서 론

전 세계적으로 상황버섯은 약 280여 종류가 존재한다. 대부분의 상황버섯은 노란색을 띠며 나이트 무늬를 형성하며 성장하는데, 현재 가장 널리 인공 재배 되는 버섯 품종 중의 하나이다. 상황버섯 중 대표적인 것은 목질진흠버섯으로 *Phellinus linteus*라는 학명으로 알려져 있다. 그러나, 한국의 경우 대표적인 재배종은 바우미 상황버섯(*Phellinus baumii*)으로 전체 상황 재배 농가의 98% 이상을 차지하고 있으며, 참나무를 배양원목으로 사용한다. 매우 특이하게 바우미 상황버섯이 식용으로 허용되고 건강증진 식품으로 활용되는 곳은 한국이 유일한 것으로 알려져 있다. 이러한 상황에도 불구하고 바우미 상황버섯의 효능과 기능에 대한 연구는 미미하고 한국의 식품안전청 (KFDA)등 관계기관에 의해 효능에 관해 정식으로 인정받은 바 없다. 반면, 목질상황버섯(*Phellinus linteus*)이 개별인정형으로 인가를 받은바 있어 바우미 상황버섯의 기능식품으로서 효능의 규명은 시급한

실정이다. 이러한 현실은 바우미상황버섯 재배의 활성화와 시장개척에 많은 문제점을 야기하여 전반적으로 바우미상황버섯을 이용한 기능성식품 산업의 심대한 위축을 초래하고 있다.

상황버섯은 기능성 성분으로서 여러 가지를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 상황버섯에는 포함된 ergosterol은 신생혈관의 형성을 억제하여 성장하는 암의 영양 공급을 차단하여 암의 부피 성장을 억제하는 효능이 있다고 알려져 있다. 한방의약에 의하면 활성산소를 제거해 주는 성분과 노화를 방지해 주고 아토피 질환을 포함한 피부병의 개선 및 치료에 효능이 있는 성분이 포함되어 있다고 한다. 그러나, 상황버섯의 효능은 다당체에 있다는 것이 공통된 결론이다. 일반적으로 버섯에 포함된 다당체란 glucans, schizophyllan, heteroglycan, lentinan, krestin 및 galactomannan인데 이들 성분의 상대적 함유량에 따라 버섯의 상대적 효능의 다양성이 있다할 것이다 (Chang *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2001). 이중 베타 glucan은 항암, 면역 증강 및 항염증효과를 나타내는 핵심성분으로 알려져 있다 (Jeoung *et al.*, 2009). 베타글루칸은 D-glucose의 중합체로 250,000정도의 분자량을

*Corresponding author <E-mail:leedh@uos.ac.kr>

가지며, glucan의 기본 골격 단위로 β -(1,6)-glycosyl 분자를 가진 β -(1,3)-glucan을 가지는 것으로 알려져 있다. 이러한 베타글루칸을 중심으로 상황버섯류에 포함된 다당체의 함유량은 상황버섯의 실질적 효능에 많은 영향을 줄 것으로 예측되고 있으며 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

상황버섯의 추출물의 항염증 기능은 다양한 잠재적 효능 중 가장 잘 알려져 있으며, 이에 대한 구체적인 메커니즘의 규명이 활발히 진행되고 있다(Lim *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007). 염증반응이란 세포 및 생체 조직에 물리 화학적으로 부정적 변화나 세균 감염 등의 위해로부터 해당 부위를 보호하는 생물 조직적 차원의 순기능을 가지고 있으나, 과도한 염증반응은 손상을 가속화하며 계속될 경우 암으로 진행되는 역기능을 보인다. 최근의 연구를 통하여 염증의 발생과 진행은 소포체 스트레스와 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다(Mosser와 Edwards, 2008; Bird, 2006). 염증 발생 시 소포체 스트레스의 표지 단백질의 과다발현을 수반하며 사이토카인 및 산화질소(nitric oxide, NO)의 생성의 과다 발현이 함께 나타나는 것으로 알려져 있다(Volman *et al.*, 2010).

본 연구는 활성산소 부류에 포함되며, 염증 유발 경로를 활성화하는 것으로 알려진 nitric oxide의 농도 저감을 통한 바우미 상황버섯에서 추출물의 항염증적 효능을 규명하고자 한다. NO의 생성은 생체조직의 손상 복원의 매개적 지위 보다는 유해한 혈관 확장 및 세포독성을 초래하는 부정적 신호 전달자의 역할이 더 크다. 바우미 추출물이 염증 반응과 이에 수반되는 소포체 스트레스의 경감 효과와 염증발생의 경로에 있어 신호전달자인 NO와 소포체 스트레스 표지단백질의 발현에의 영향도를 정량화하였다. NO는 iNOS(inducible nitric oxide synthase)라는 산화 환원 효소에 의해 N-hydroxy-L-arginine과 citrulline을 중간체로 하여 생성된다는 점에서 착안하여 iNOS의 발현을 NO의 생성과 비교하였다. 염증진행의 척도인 NO의 발생량과 iNOS의 발현도를 측정하여 바우미 상황버섯의 항염증에 관한 작용을 종합적으로 검증하였다.

재료 및 방법

바우미 상황버섯의 열수 추출

상황버섯 10 g를 정량하여 기계적으로 파쇄한 후, 100 ml의 증류수를 넣고 섭씨 95도에서 30분간 가열하였다. 액상 추출물은 건조한 후 분말로 실험시까지 보관하였다. 대식세포의 활성화를 위한 lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포주 배양 및 독성 검사

RAW264.7를 표준 조건에서 배양하여 80% 정도 자랐을 때 LPS 및 바우미 추출물을 각각 100 ng/ml 또는 10 μ g/ml의 농도를 기준으로 5-24시간 처리한 후 세포 생존성과 세포 독성을 MTT 염색기법을 이용하여 확인하였다.

Western blotting 및 ELISA를 이용한 스트레스 표지 단백질의 발현도 측정

LPS와 바우미 추출물을 12시간 동안 처리한 후 배양된 세포를 수집한 후, 3회 정도 인산생리식염수(PBS)로 세척한 후 1 ml의 cell lysis buffer(150 mM sodium chloride, 1.0% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0)을 첨가하여 30분간 세포를 파쇄 배양한 후, 5분의 원심 분리를 거쳐 상등액을 취한 후, 10% 아크릴아마이드 겔에서 전기영동을 실시하였다. SDS-PAGE 종료 후 반건조식으로 단백질을 membrane(polyvinylidene difluoride, PVDF)에 옮긴 후(150 mA, 30분), 5%의 탈지분유 blocking 완충용액에서 2시간을 배양한 후, Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입한 각각의 일차항체로 6시간 배양 후)에서 구입한 각각의 일차항체(Santa Cruz Biotechnology, CA)로 6시간 배양 후, ECL LUMINOL KIT을 이용하여 밴드 시그널을 검출하였다. IL-6의 분비량은 ELISA 기법에 의거 실시하였다. eBioscience (San Diego, CA)에서 구입한 마우스 일차항체를 각 well에 100 μ l을 넣은 후 섭씨 4도에서 15시간을 배양하였다. 배양이 완료된 후 생리식염수로 세척한 후 streptavidin-HRP와 한 시간을 배양하였다. TMB peroxidase substrate와 배양한 후, MBX200(BioTech Instrument) 기기를 이용하여 IL-6의 분비량의 변화를 측정하였다.

Nitric Oxide의 농도 측정

Nitric oxide(NO)의 농도 측정은 RAW264.7 세포를 100 mm culture dish에서 배양 후, LPS를 농도별로 처리한 후 실시하였다. 세포 배양액과 동량의 Griess reagent(GR, 40 mg/ml)와 혼합 후 96 well plate에서 15분간 반응시켰다. FBS(fetal bovine serum)를 10% 포함하는 DMEM을 96 well plate 세포를 넣고 overnight 배양 후 실시하였다. NO의 측정은 안정된 형태의 질소 화합물인 nitrite로 NO의 양을 측정하였다. 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여, sodium nitrite standard curve로부터 nitrite의 농도를 결정하였다. LPS 처리후, 바우미 상황버섯의 추출물이 NO 발생억제에 관여하는 실험은 시료를 96-well plate에 처리 후에 상등액을 취하여, 새로운 well에 옮겨준 후 상등액에 동일한 GR을 혼합하여 처리하였다. GR은 N-1-Naphthylethylenediamine 및 Sulfanilamide를 동일한 양을 혼합하여 조성하였다(Ryu *et al.*, 2003).

iNOS의 발현도 측정을 위한 PCR 실시

바우미 추출물에 의한 iNOS발현에의 영향도를 측정하기 위해 다음의 프라이머를 이용한 연쇄중합반응을 실시하였다. iNOS sense primer는 5'-GAT CAA TAA CCT GAA GCC CG-3'를 iNOS antisense primer는 5'-GCC CTT TTT TGC TCCATA GC-3'를 이용하였다. Actin의 sense primer는 5'-TTG TAA CCA CCT GGG ACG ATA TGG-3' 이용하였으며, antisense primer는 5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3'를 이용하였다. 본 연쇄중합반응의 반응액은

actin의 경우 최종 부피 20 μ l에 10 \times Taq buffer 5 μ l; 25 mM MgCl₂ 5 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l; anti-sense primer(10 mM) 0.5 μ l; sense primer(10 mM) 0.5 μ l; Taq polymerase(5 unit/ml) 0.5 μ l; cDNA 2 μ l로 조성하였다. 반면 iNOS는 10 \times Taq buffer 5 μ l, 25 mM MgCl₂ 2.5 μ l; 10 mM dNTP 0.5 μ l, iNOS sense primer 2 μ l, iNOS antisense primer(10 mM) 2 μ l, Taq polymerase 0.25 μ l, cDNA 2.5 μ l를 넣어 조성하였다. PCR실험이 종료된 후, 이에 대한 반응 및 분석은 다음과 같이 실시하였다: 95°C에서 5분간 반응시키고, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 26 cycle을 수행 후, 2% agarose gel에서 전기영동 수행 후, 예상되는 PCR 산물의 크기인 GAPDH와 iNOS (576 bp)의 밴드의 발현을 정량화하였다.

결과 및 고찰

RAW264.7세포주의 생존률에 미치는 LPS와 바우미 추출물 영향

RAW264.7 세포주에 LPS 또는 바우미 상황버섯 추출물을 단독으로 처리하거나 복합적으로 처리한 후 세포의 생존률을 MTT 기법으로 검증하였다. 본 실험에서 표준적으로 사용된 LPS의 100 μ g/ml의 실험 농도의 범위 내에서 생존률은 무처리의 대조군에 비해 차이가 없었다. 아울러 바우미 추출물의 경우도 본 논문에서 사용된 처리농도인 10 mg/ml의 범위 내에서 생존률의 차이는 무처리 대조군에 비해 차이가 없었다. 아울러, LPS를 처리하여 대식세포주가 활성화 된 후에 바우미 추출물을 처리하였을 때도 RAW264.7의 생존률에는 차이는 없는 것으로 나타났다 (data not shown). 이 결과는 바우미의 추출물이 활성화 또는 염증 반응이 유도된 대식세포의 생존률에 영향을 주어 항염증의 효능을 보이는 것이 아니라는 것을 의미한다.

소포체 스트레스 표지 인자의 발현 억제 효과

바우미 상황버섯의 소포체 스트레스 표지 인자의 발현을

western blotting을 이용하여 측정하였다. RAW264.7세포주가 LPS에 의해 활성화된 경우 전형적인 소포체 스트레스를 동반하였다(Fig. 1). Grp78, Grp94, 및 CHOP의 발현이 증가하였다. CHOP단백질의 경우도 LPS 처리후 발현이 현저히 증가됨을 알 수 있었다. 그러나, 바우미 추출물을 처리한 경우 이들의 발현은 감소됨을 알 수 있었다(Figs. 1). Raw264.7이 LPS에 의하여 활성화된 경우 소포체 스트레스가 수반됨을 알 수 있었다. IL-6의 경우도 분비가 증진됨을 알 수 있었다. 사이토카인의 분비량을 ELISA 기법에 의해 측정한 결과, IL-6의 분비량은 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2). IL-6의 증가는 LPS의 처리에 따라 대식세포주는 소포체 스트레스와 염증의 증상이 복합적으로 나타난다는 것을 알 수 있었다. LPS를 처리한 후 나타난 소포체 스트레스의 증상은 바우미 상황버섯 추출물을 처리한 후, 완화 되는 것을 알 수 있었다. 바우미 상황버섯 추출물의 처리후, 소포체 스트레스 표지 단백질의 유의적으로 감소 하는 것을 알 수 있었다. 이결과는 바우미의 추출물이 배양중인 대식세포주의 소포체 스트레스의 레벨을 유의적으로 낮추는 것으로 나타났다.

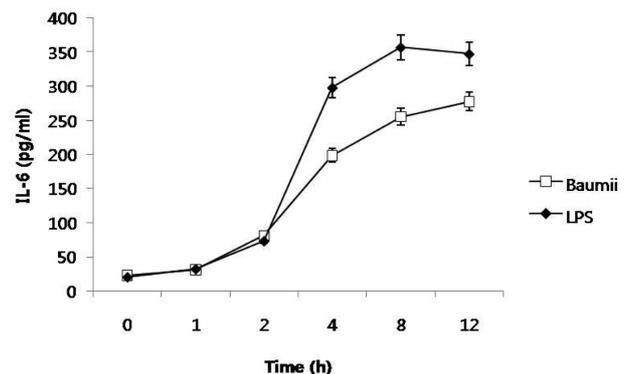


Fig. 2. Effect of *Phellinus baumii* extract on IL-6 secretion. RAW264.7 cells were treated with 100 ng/ml LPS from 1 to 12 h. Protein samples from the LPS treatment were analyzed by ELISA for IL-6 expression.

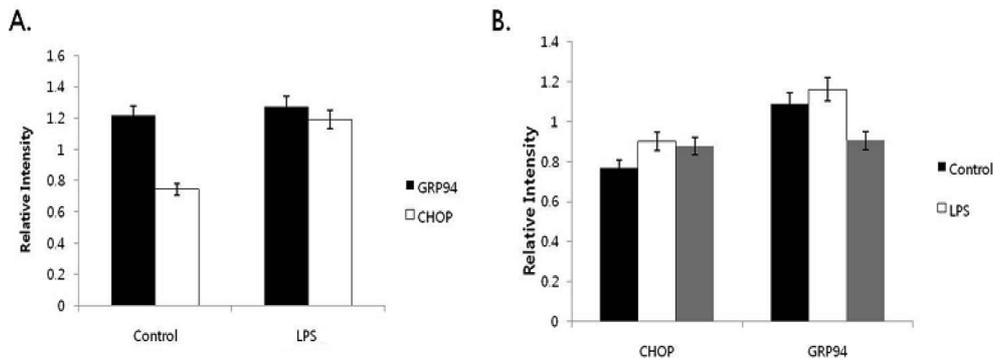


Fig. 1. Expression of ER stress marker under *Phellinus baumii* extract treatment. (A) RAW264.7 cells treated with LPS (lipopolysaccharide, 100 ng/ml) for 5 h. Cell lysates were analyzed for the expression of GRP94 (94 KDa) and CHOP/GADD153 (30 KDa) by western blotting using respective antibodies. (B) RAW264.7 cells were treated with LPS or pretreated with 100 ng/ml LPS for 1 h and further treated with 10 μ g/ml *Phellinus baumii* extract for 5 h. Protein samples after *Phellinus baumii* extract were analyzed by western blotting for CHOP expression.

Nitric oxide (NO) 농도 및 iNOS 발현의 변이

LPS에 의한 활성화는 NO의 생성을 촉진하는 것으로 판단되었다(Fig. 3). 그런데, 바우미 추출물을 LPS로 활성화된 세포주에 처리한 경우, 소포체 스트레스 표지 단백질의 발현이 현저히 줄었고 NO의 생성이 억제되었다(Fig. 3). 염증 유발의 신호전달 물질인 NO의 감소가 유도된 것인지를 파악하기 위하여, iNOS의 발현을 유전자 전사차원에서 검증하기 위하여 역전사 연쇄증합반응을 실시하였다.

상황버섯 추출물은 NO농도에 비하여 iNOS의 발현을 현저히 억제시키는 것으로 나타났다. 바우미 상황버섯의 열수추출물을 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포를 5시간 동안 처리한 후 NO의 양을 측정된 결과, NO의 생성억제효과의 유의성을 검증할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 관측에 의거하여 동일한 조건에서 실시된 iNOS 발현도 측정을 위한 RT-PCR 실험 결과에서도 NO 측정과 유사한 농도의존적인 유형이 관찰되었다(Fig. 4). NO의 직접적인 측정과 iNOS 발현유형을 비교한 결과 후자의 경우가 더 큰 차이를 보임을 알 수 있었다. 이결과는 NO의 생성 억제가 바우미 추출물에 의해 유도된 것이며, NO 생성의 변화는 iNOS의 발현 변화의 차이에 비하여 완만하게

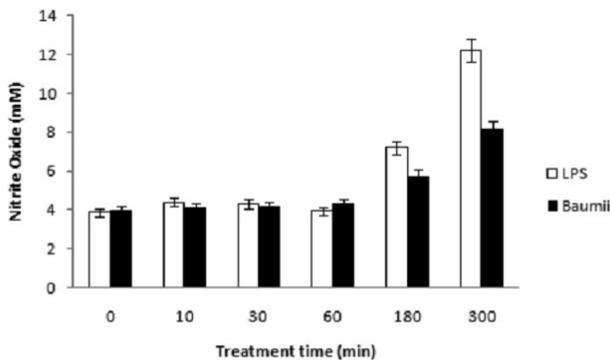


Fig. 3. Reduction of NO by *Phellinus baumii* extracts. RAW264.7 cells were pretreated with 100 ng/ml LPS for 1 h, and treated with 10 µg/ml *Phellinus baumii* extract from 10 to 300 min. Samples from the *Phellinus baumii* extract treatment were analyzed by Griess reagent for NO production.

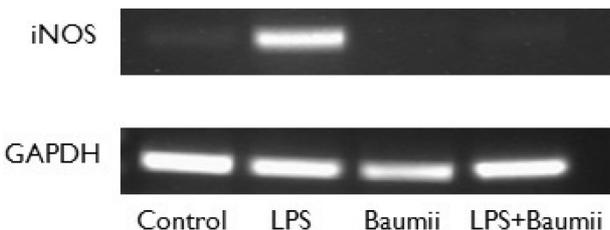


Fig. 4. Reduced expression of iNOS under *Phellinus baumii* treatment. RAW264.7 cells were treated LPS (100 ng/ml) and *Phellinus baumii* extract(10 µg/ml) for 5 h. Total RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen). RT-PCR was performed for detection of iNOS mRNA expression. The expression of GAPDH was analyzed for control.

세포내 NO 농도의 변화에 반영된다는 것을 추론할 수 있다.

지금까지의 연구 결과를 종합적으로 판단할 때, 바우미 상황버섯의 열수 추출물은 소포체스트레스가 유도된 상태에서 스트레스의 수위를 낮추고 LPS등에 의해 유발된 염증반응의 역기능을 저감시키는 효능을 가진 것으로 보인다. 위의 연구자료를 바탕으로 바우미 상황버섯도 목질진흙버섯에 버금가는 기능을 가질 것으로 보인다.

적요

본 연구에서는 바우미 상황버섯의 열수 추출물의 항염증 기능에 관한 연구를 수행하였다. 대식세포주인 RAW264.7을 lipopolysaccharide (LPS)로 활성화 시킨 후, 바우미 상황버섯에서 복수의 조건에서 추출한 추출물을 처리하여 면역 및 염증 발생 경로의 활성도를 측정하여 바우미 상황버섯의 면역증강기능 및 항염증기능을 검증하였다. RAW264.7을 LPS로 처리하였을 때 전형적인 소포체 스트레스를 수반한 염증 반응이 시현되었다. 전형적인 마커인 Grp78, Grp94 및 CHOP의 과발현을 시현하였고, 인터루킨 6 (IL-6)과 염증발현의 표지자인 nitric oxide(NO) 발현을 증진한 것으로 나타났다. 위와 같이 처리된 세포에 바우미 상황버섯의 추출물을 처리하였을 때, 전반적으로 소포체 스트레스는 경감된 것으로 나타났으며, 특히 염증유발의 신호인자인 NO의 발생량과 이를 생성하는 효소인 iNOS의 발현량이 현격하게 감소한 것으로 나타났다. 이를 종합적으로 분석하면 바우미 상황버섯의 추출물은 유도된 소포체스트레스를 경감하는 효능을 보임과 동시에 항염증의 기능을 보이는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 농림수산식품 연구개발사업으로 수행된 연구결과임.

참고문헌

Bird, L. 2006. ER stress induces systemic inflammation. *Nature Rev. Immunol.* 6:170-171.
 Chang, Z. Q., Oh, B. C., Rhee, M. H., Kim, J. C., Lee, S. P. and Park, S. C. 2007. Polysaccharides isolated from *Phellinus baumii* stimulate murine splenocyte proliferation and inhibit the lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 murine macrophages. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:723-727.
 Chang, Z. Q., Oh, B. C., Lee, S. P., Rhee, M. H. and Park, S. C. 2008. Comparative Immunomodulating Activities of Polysaccharides Isolated from *Phellinus* spp. on Cell-Mediated Immunity. *Phytother. Res.* 22:1369-1399.
 Jang, B. S., Kim, J. C., Bae, J. S., Rhee, M. H., Jang, K. H., Song, J. C., Kwon, O. D. and Park, S. C. 2004. Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. *Biotechnol. Lett.* 26(1):31-33.

- Jeoung, Y. J., Choi, S. Y., An, C. S., Jeon Y. H., Park, D. K. and Lim, B. O. 2009. Comparative Effect on Anti-Inflammatory Activity of the *Phellinus linteus* and *Phellinus linteus* Grown in Germinated Brown Rice Extracts in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 17:97-101.
- Kim, B. C., Jeon, W. K., Hong H. Y., Jeon, K. B., Hahn, J. H., Kim, Y. M., Numazawa, S., Yosida, T., Park, E. H. and Lim, C. J. 2007. The anti-inflammatory activity of *Phellinus linteus* is mediated through the PKCdelta/Nrf2/ARE signaling to up-regulation of heme oxygenase-1. *J. Ethnopharmacol.* 113(2):240-247.
- Lim, J. H., Kim, S. H., Park, N. H., Moon, C., Kang, S. S., Kim, S. H., Shin, D. H. and Kim, J. C. 2010. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Phellinus linteus* water extract in rats. *J. Biomedical Research* 11(1):27-35.
- Mosser, D. M. and Edwards, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 12:958-508.
- Mu, M. M., Chakravorty D., Sugiyama T., Koide N., Takahashi K., Mori, I., Yoshida, T. and Yokochi, T. 2001. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cells. *J. Endotoxin Research* 7:431-438.
- Ryu, J. H., Ahn, H., Kim, J. Y. and Kim, Y. K. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother. Research.* 17:485-489.
- Volman J. J., Helsper J. P., Wei S., Baars J. J., van Griensven L. J., Sonnenberg A. S., Mensink, R. P. and Plat, J. 2010. Effects of mushroom-derived β -glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor- κ B transactivation in Caco-2 reporter cells: Can effects be explained by structure? *Mol. Nutr. Food. Res.* 54(2):268-276.
- Yang, J. L., Jang, J. H., Radliakrishnan, V., Kim, Y. H. and Song, Y. S. 2008. β -Glucan suppresses LPS-stimulated NO production through the down-regulation of iNOS expression and NF- κ B transactivation in raw 264.7 macrophages. *Food Sci. Biotech.* 17:106-113.