

연구노트

## 장수상황버섯과 마황을 이용한 고체발효 추출물로부터 항아토피 활성의 분석

신용규 · 허진철<sup>1</sup> · 이진형 · 이상한<sup>1\*</sup>

(주)바이온 부설연구소, <sup>1</sup>경북대학교 식품생물산업연구소 및 식품공학과

### Analysis of the Anti-Allergic Activities of Active Components Produced by Solid Fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica*

Yong-Kyu Shin, Jin-Chul Heo<sup>1</sup>, Jin-Hyung Lee and Sang-Han Lee<sup>1\*</sup>

Research Institute of Biotechnology, Bion Co., Ltd., Andong 760-380, Korea

<sup>1</sup>Food & Bio-Industry Research Institute, and Department of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

#### Abstract

To evaluate whether active components produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica* have potential in ameliorating allergic symptoms in mice, we tested anti-allergic activities in a dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced allergic mouse model. DNFB-induced allergic symptoms were reduced to about 50% of control levels by active components produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica*, as evaluated by measuring the width of epidermal swelling. H&E staining also revealed that these active components markedly reduced allergic symptoms in the epidermis of the ear. The results indicate that active components produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica* have the potential to ameliorate allergic symptoms, and may be useful biomaterial(s) in the nutraceutical or cosmeceutical industry.

**Key words :** Allergy, active components, *Phellinus baumii*, *Ephedra sinica*, solid fermentation

#### 서 론

Allergy란 선천적 또는 후천적으로 면역기능의 현상으로 서, allergen이라 불리는 외부 물질과의 접촉에 의하여 과민 반응을 나타내는데, 이에 대한 질환으로는 anaphylaxis, allergic rhinitis, asthma, atopic dermatitis, 곤충/식품/약품 알러지 및 두드러기(urticaria) 등이 있다(1,2). Allergen이 IgE에 의해 인식되면 Langerhans cell 표면 IgE부착 Fc수용체에 부착되어 T림프구에 항원을 전달함으로써 T림프구가 활성화되게 된다. 이는 아토피 피부염의 피부병변에 침윤되는 염증세포는 주로 Th2세포로서 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인을 과다하게 생성하여 혈중 IgE의 상승을 촉진하고 eosinophil의 증가를 유도한다. 이 외에도 cAMP phosphodiesterase가 상승되어 있는 아토피 피부염의 비정

상적인 monocyte에 의해 prostaglandin E의 생성이 증가하게 되고, 이로 인해 Th1 림프구의 침윤이 억제된다. 또한 Th1 림프구는 아토피 피부염에서 쉽게 활성화되는 spleen cell로부터 유리된 TNF (tumor necrosis factor)에 의해서도 억제된다. 결국 아토피 피부염에서 Th1 세포의 증식을 억제하고, 세포매개성 면역의 저하를 초래한다. 각종 사이토카인(cytokine)은 혈관 내피세포를 활성화하여 여러 세포유착 분자의 발현을 유도하거나 증가시켜 기억 T림프구의 복귀를 촉진시킴으로서 습진성 병변을 유발한다(3,4).

DNFB (dinitrofluorobenzene)는 지연형 접촉성 피부염을 일으키는 물질로 반복 노출시 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포 매개성 염증세포의 침윤(infiltration)에 의한 피부 부종과 피부 조직의 비후가 나타나며, 이를 이용하여 DNFB 유발 접촉성 피부염 동물모델로서 가장 널리 이용되고 있는 알러지 동물 모델 중 하나이다(5).

장수상황버섯(*Phellinus baumii*)의 효능은 종양세포의 억제효과, 항암활성, 면역기능 향상 등 많은 생리학적 활성이

\*Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr  
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

최근 보고되고 있다. 또한 마황(*Ephedra sinica*)은 오랜 역사를 가진 한의학의 전통약물로서 강한 발한 작용을 가지고 있어서 오한, 발열 등 감기에 사용되며, 기관지 평활근의 경직을 막아주며, 초기 관절염에 주로 사용된다. 본 연구는 장수상황버섯과 마황의 고체발효 추출물로부터 항아토피 활성 효과를 DNFB 유발 접촉성 피부염 동물모델을 이용하여 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 추출액 제조

본 실험에 사용한 고체 발효 추출물(SM)은 장수상황버섯(*Phellinus baumii*)과 마황(*Ephedra sinica*)을 이용한 것으로 (주)바이온에서 Potato dextrose agar (Difco Co., USA) 배지에서 25℃에서 20일 배양하여 사용하였다. 한약재는 2007년 대구 한약재 시장에서 구입하여 사용하였다. 장수상황버섯 균사체 고체평판(1 cm × 1 cm, 3개)을 500 mL 플라스크에 100 mL의 배지에 접종한 후 회전형 진탕배양기 (Daihan Labtech Co. Korea, 25±1℃, 130 rpm)에서 10일간 배양하여 이를 액체중균으로 사용하였다. 마황 100 g을 1 L 플라스크에 넣고, 이를 121℃에서 20분간 고압멸균한 후 상온에서 냉각하였다. 멸균된 한약재는 10배 부피의 메탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 각각 3회 반복 추출하였으며, 추출액은 Whatman No.2 filter paper로 filtration 후 감압하에서 농축하여 분말로 조제하였다. 장수상황버섯 액체중균 20 mL씩을 멸균된 마황 100 g에 무균적으로 접종하였으며, 접종 이후에는 멸균마개를 고정시켜 오염을 방지하고, 발효는 25℃, 상대습도 90%의 배양기에서 20일 동안 진행하였다. 발효 후 10배 부피의 메탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 추출하였으며, 이를 3회 반복 후 추출액을 감압 하에서 농축하여 분말로 조제하였다.

### DPPH 활성 측정

1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)의 환원력을 이용하는 Blois의 방법으로 측정하였다. 시료 1~10 µL에 DPPH 용액(DPPH 12.5 mg을 에탄올 100 mL에 용해) 200 µL를 가한 후 10분간 반응시키고 525 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 한약재 발효 시료(SM)를 농도별로 처리하여 무첨가 대조구와 활성을 비교하였다(6).

$$\text{활성(\%)} = (1 - \text{시료의 흡광도/대조구의 흡광도}) \times 100 (\%)$$

### FRAP 활성 측정

Benzie 등 (1996)의 방법을 변형하여 실험에 이용하였다. C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>와 acetic acid (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)를 이용하여 acetate buffer (pH 3.6, 23 mM)를 만들고 40 mM HCl과 TPTZ(2,4,6-

tripiryridyl-s-triazine)를 이용하여 10 mM TPTZ solution을 만들었다. 실험을 위한 반응용액은 acetate buffer (pH 3.6, 23 mM), 10mM TPTZ(2,4,6-tripiryridyl-s-triazine) 및 20 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 만든 후, 실험 전까지 37℃를 유지하여 사용하였다. 96 well 마이크로 플레이트(well volume=200 µl)에 한약재 발효 시료(SM)를 농도별로 처리한 다음 약 30분 간 암소에서 방치 후, 590 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 비교하였다(7).

### 실험동물 준비 및 관리

4~5 주령 된 C57BL/6 마우스를 샘타코(주)에서 공급받아 마우스용 케이지 (220 x 200 x 145 mm)에 넣어 약 1주간 순화과정을 거친 후 사용하였다. 동물실험실의 환경은 온도 22℃ (2℃ 오차), 상대습도 55% (5% 오차), 환기횟수 12 회/시간, 조명주기 12시간, 조도 200 lux로 조절되었다. 실험동물용 pellet형 고형사료인 Purina Rat Chow를 Nestle Purina PetCare Korea Ltd. (Seoul, Korea)로부터 공급받아 급여하였으며, 음수는 멸균정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 동물실험은 본 대학 실험동물 윤리규정을 준수하였다.

### 알러지 실험

1주간 순화과정을 거친 C57BL/6 마우스를 0일 0.5% DNFB (50 µL)를 이용하여 복가에 감작 후 6일차부터 0.2% DNFB (20 µL)를 1~3일 간격으로 6회 귀에 처리하였으며, 상황 마황 발효 추출액(20 µL)을 1~2일 간격으로 6회 처리하였다. 실험 19일차에 귀를 절개하여 사진 촬영 후 10% 포름알데하이드에 고정하였으며, 수세, 탈수, 파라핀 포매 과정을 거쳐 5~6 µm로 절편을 제작하였다. Hematoxylin-Eosin (HE)을 이용하여 염색을 실시 후 현미경관찰을 실시하였다(5).

### 통계학적 분석

실험결과에 대한 분산의 동질성을 비교하기 위해 Levene's test를 실시하고, 분산이 동질성을 갖는 경우 one-way analysis of variance, ANOVA를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과의 유의적인 차이가 있는 시험군을 알아내기 위해 Dunnett t-test를 실시하여 유의차가 5% 미만 (p<0.05)일 때 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

장수상황버섯(*Phellinus baumii*)과 마황(*Ephedra sinica*)은 예로부터 한약재에서 주로 사용되고 있으며, 마황의 경우 그 독성이 커서 사용에 다소 제약이 있는 것으로 알려져 있다(8). 본 연구는 장수상황버섯과 마황을 이용하여 이의

발효를 통해 항산화(antioxidant) 활성 및 아토피 동물모델을 이용한 항염증(anti-inflammation) 활성을 알아보려 하였다. 산화물(oxidant)은 각종 질병을 일으키는 대표적인 물질로 현대사회의 공업화에 따라 그 생산량이 증가되고 있는데, 산화물에 의한 대표적인 질환 중의 하나가 염증반응을 수반하는 자가면역반응(autoimmune disease)이다(9,10).

장수상황버섯과 마황의 고체발효 추출물의 DPPH와 FRAP 항산화 활성은 시료의 처리 농도에 따라 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 마황의 항산화 활성은 많이 알려져 있는데, 마황의 에탄올 추출물에서 DPPH 활성과 과산화지질을 감소 및 다양한 항산화 활성이 보고되어 있으며(11,12), 상황버섯 자실체 추출물의 항산화 활성 등 다수의 보고가 있다(13,14,15). 본 연구는 장수상황버섯과 마황의 고체 발효 추출물을 이용하여 항산화 활성을 확인한 것으로 각각의 항산화 활성을 가진 장수상황버섯과 마황이 발효과정을 거치더라도 항산화 활성을 유지하는 것을 알 수 있었다.

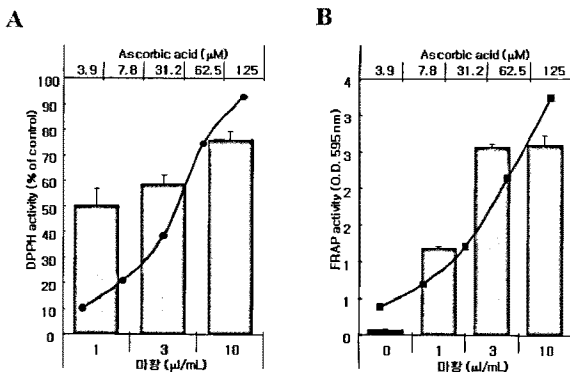


Fig. 1. Total antioxidant activity during solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica* (SM) in comparison with L-ascorbic acid (3.9-125 μM) measured by DPPH (A) and FRAP (B) assay.

장수상황버섯과 마황의 고체발효 추출물을 이용하여 C57BL/6 마우스를 이용한 동물모델에 적용한 결과 아토피를 억제하는 효과가 탁월한 것을 알 수 있었다. 아토피를 유도하게 되면 그렇지 않은 군에 비해 귀의 형태가 찌그러지게 되며, 윤기가 사라지고 귀의 외부에 부종(edema)이 생기는 것을 알 수 있다. 또한 HE 염색을 통한 사진판독 결과 귀의 두께가 약 3배 정도 증가한 것을 알 수 있으며, 조직 내로 세포의 침윤현상(infiltration)이 크게 증가하는 것을 알 수 있다. 또한 면역세포인 eosinophil 이 다수 관찰되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2g, box). 반면 장수상황버섯과 마황의 고체발효 추출물을 처리한 경우 귀에 형성되는 부종, 귀의 형태 등에 대한 손상이 크게 감소한 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이와 더불어 세포의 침윤현상이 50% 이상 감소한 것을 알 수 있으며, 귀의 두께 또한 약 60% 정도 감소한 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

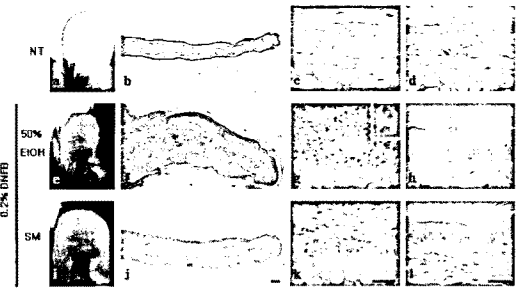


Fig. 2. Amelioration of the ear epidermis swelling by active components produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica* (SM) in a DNFB-induced allergic mouse model.

(Not treated, a-d; atopy induced model, e-l; SM treated, i-l; scale bar=100 μm (b, f, j), 25 μm (c, d, g, h, k, l)). NT, not treated.

상황버섯은 이전에 각종 항염증 효과가 알려져 있는데, RAW 264.7 (murin macrophage cell line) 세포에서 항염증 반응을 비교한 결과 염증성 사이토카인(cytokine)을 억제하는 것을 알 수 있었으며(16) 사염화탄소로 염증이 유발된 흰쥐에서 면역조절 효과가 있는 것으로 나타났다(17). 또한, 마황은 LPS shock을 이용하여 흰쥐에서 급성염증반응을 유도한 후 마황을 처리하면 이의 처리군에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 및 IL-10의 농도를 감소시켜 염증을 억제한다는 보고가 있으며(18), OVA 유도 천식모델에서 마황 처리군이 기도협착과 염증성 세포의 침윤을 억제하며, 염증성 사이토카인 IL-4, IL-5, IL-13을 억제하는 것을 보고하였다(19,20). 본 연구에서는 장수상황버섯과 마황의 고체발효 추출물을 이용한 아토피 억제실험을 수행한 결과 아토피 억제 활성이 탁월한 것으로 나타났다. 천식과 아토피는 발병메커니즘이 유사한 것으로 알려져 있는데, 본 실험 결과는 장수상황버섯과 마황의 염증 억제활성이 동시에 작용된 것으로 판단된다.

이 결과로, 마황 추출액의 장수상황버섯 고체발효의 시너지 효과는 기능성 활성물질을 가지는 것으로 이들의 최적 조건을 확립한다면 향장소재 또는 이의 조성물로 유용하게 이용될 수 있다고 판단된다.

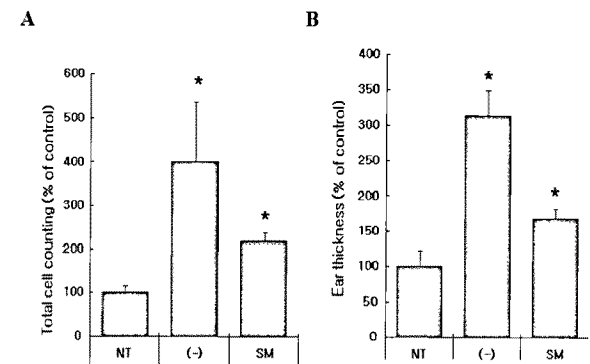


Fig. 3. Effects of solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica* (SM) inhibited cells infiltration (A) and ear thickness (B) in DNFB-induced atopy model.

\*p < 0.05 in comparison to the atopy induced group. NT, not treated.

## 요 약

여러 가지 한약재의 추출물의 항알러지 활성을 증진시키기 위하여 장수상황버섯의 고체발효 중 시너지 효과를 확인하여 보았다. 그 결과 마황이 좋은 활성을 나타내어 DNFB (dinitrochlorobenzene)에 의해 유발된 접촉성 피부염 알려지 질환 동물모델에서 피부상피조직의 비후정도를 약 50% 정도의 수준으로 완화시키며, 이는 면역조직화학적 방법으로 확인하였다. 이 결과로, 마황 추출액의 장수상황버섯 고체발효의 최적 조건을 확립한다면 향장소재 또는 이의 조성물로 유용하게 이용될 수 있다고 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 중소기업청 기술혁신개발사업의 지원에 의하여 수행되었기에 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Hoffman, H.M. (2009) Therapy of autoinflammatory syndromes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 124, 1129-1138
- Maguire, T. (2009) Autoimmune progesterone dermatitis. *Dermatol. Nurs.*, 21, 190-192
- van Oosterhout, A.J. and Bloksma, N. (2005) Regulatory T-lymphocytes in asthma. *Eur. Respir. J.*, 26, 918-932
- Trottein, F., Mallevaey, T., Faveeuw, C., Capron, M. and Leite-de-Moraes, M. (2006) Role of the natural killer T lymphocytes in Th2 responses during allergic asthma and helminth parasitic diseases. *Chem. Immunol. Allergy*, 90, 113-127
- van der Kleij, H.P., Kraneveld, A.D., van Houwelingen, A.H., Kool, M., Weitenberg, A.C., Redegeld, F.A., and Nijkamp, F.P. (2004) Murine model for non-IgE-mediated asthma. *Inflammation*, 28, 115-25
- Heo, J.C., Woo, S.U., Kweon, M.A., Park, J.Y., Lee, H.K., Son, M., Rho, J.R. and Lee, S.H. (2008) Aqueous extract of the *Helianthus annuus* seed alleviates asthmatic symptoms in vivo. *Int. J. Mol. Med.*, 21, 57-61
- Heo, J.C., Park, C.H., Lee, H.J., Kim, S.O., Kim, T.H. and Lee, S.H. (2010) Amelioration of asthmatic inflammation by an aqueous extract of *Spinacia oleracea* Linn. *Int. J. Mol. Med.*, 25, 409-414
- Choi, D.G., Shim, K.J., Choi, B.J., Park, S.Y., Chang, M.S. and Park, S.K. (2008) Subacute oral toxicity of Ephedrae Herba extract in SD rats. *Korea J. Herbol.*, 23, 1-7
- Ma, A., Qi, S. and Chen, H. (2008) Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, 6, 20-43
- Sukkar, S.G. and Rossi, E. (2004) Oxidative stress and nutritional prevention in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun. Rev.*, 3, 199-206
- Lim, H.H., Kwon, K.R., Lim, T.J. and Song, Y.K. (2007) Effects of Ephedrae Herba on the activity of antioxidant. *J. Korean Pharmacol. Inst.*, 10, 57-65
- Moon, B.S., Son, G.Y., Choi, J.K., Seo, D.W. and Lee, K.D. (2007) Research of antioxidant activity from plant resources using proton beam(I). *J. Life Sci.*, 17, 1100-1103
- Kim, J.H., Son, I.S., Kim, J.S., Kim, K.H. and Kwon, C.S. (2008) Lipase-inhibitory and anti-oxidative activity of the methanol extract and the powder of *Phellinus linteus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 37, 154-161
- Kim, J.O., Jung, M.J., Choi, H.J., Lee, J.T., Lim, A.K., Hong, J.H. and Kim, D.I. (2008) Antioxidative and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus linteus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 37, 684-690
- Kim, I.H., Jin, E.J. and Lee, J.H. (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of Cambodian mushroom, *Phellinus linteus*. *Environ. Muta. Carcinog.*, 26, 41-44
- 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. Med. Crop Sci.*, 17, 97-101
- An, C.S., Choi, S.Y., Jin, H.L., Jeon, Y.H., Hur, S.J., Kim, I.H., Park, G.D., Jeoung, Y.J. and Lim, B.O. (2009) Immunomodulatory effects of *Phellinus linteus* extracts on liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *Korean J. Med. Crop Sci.*, 17, 217-222
- Lee, E. (2009) Effect of Ephedrae Herba on immunomodulatory activity in lipopolysaccharide-exposed rats and Raw 264.7 cells. *Korean J. Plant Resour.*, 22, 431-437
- Lee, S.C., Park, S.J., Seo, S.W., Hwang, S.W., Kim, Y.W., Song, D.S., Chae, Y.S., Shin, M.K. and Song, H.J. (2005) Effect of *Herba Ephedrae* on airway hyperreactivity. *Korean J. Herbol.*, 20, 69-76
- Song, H.G. and Lee, H. (2006) The Effect of EH-HA (*Ephedrae Herba Herbal Acupuncture*) at ST36 on OVA-induced asthma in mice. *J. Korean Acupun. Moxibustion Soc.*, 23, 1-14

(접수 2009년 12월 14일, 채택 2010년 3월 19일)