

영지버섯 균주별 균사체 추출물의 항염, 항산화 및 항알러지 효능 비교 분석

박영진¹ · 남재영¹ · 윤대은¹ · 권오철¹ · 김홍일¹ · 유영복² · 공원식² · 이창수^{1*}

¹건국대학교 글로벌캠퍼스 의생명대학 의생명화학과, ²국립원예특작과학원 버섯과

Comparison of anti-inflammatory, antioxidant and anti-allergic effects of *Ganoderma* species mycelial extracts

Young-Jin Park¹, Jae-Young Nam¹, Dae-Eun Yoon¹, O-Chul Kwon¹, Hong-Il Kim¹,
Young-Bok Yoo², Won-Sik Kong² and Chang-Soo Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Chemistry, Konkuk University, Chung-Ju 380-701, Republic of Korea

²Mushroom Research Division, Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 404-707, Korea

(Received June 3, 2013. Accepted June 19, 2013)

ABSTRACT – This study was carried out to compare the medicinal effects of various *Ganoderma* species mycelial extracts. Among 6 *Ganoderma* species mycelial extracts by using 100% MeOH, *G. lucidum* ATCC64251 (Taiwan) mycelia extracts most effectively inhibited NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells and β -hexosaminidase release. In addition, the treatment of all 6 *Ganoderma* species mycelial extracts were not affect on RAW264.7 cell viability. Although this preliminary research has thrown up many questions in need of further investigation, it will serve as a base for further studies of medicinal effects of various *Ganoderma* species.

KEYWORDS – Anti-inflammatory, Anti-allergy, Antioxidant, *Ganoderma* species

서 론

*Ganoderma lucidum*을 포함한 영지 속 (*Ganoderma*)은 열대, 아열대 및 온대 지방을 포함한 아시아, 유럽 북미주 등 전 세계적으로 널리 분포한다. 영지버섯은 오래 전부터 한국과 중국, 일본 등 아시아에서 약용 버섯으로 취급되고 있다. 현재, 항암, 항종양, 고혈압 및 당뇨 등과 관련된 여러 약효와 유효성분이 과학적으로 규명되고 있다 (Chen 등, 1980; Furusawa 등 1992). 또한 영지버섯은 영양공급 뿐만 아니라 약리 효과도 가지고 있어, 오랜 시간 동안 건강보조식품으로 여겨졌다. 특히 아시아 대부분의 나라에서 약용식품으로 받아들여지고 있다 (조 등, 2012b). 그리고 영지버섯에는 polysaccharide이외에 triterpene, nucleoside, steroid, fatty acid, alkaloid, 단백질, 아미노산, 무기염류 등 다양한 물질들이 함유되어 있고 이 중 고분자 물질 (polysaccharide 등)과 저분자물질(triterpene 등)이 다양하다. 저분자물질은 항염증, 항산화, 간세포

보호, 항알레르기, 항고혈압, 콜레스테롤 저하 및 혈소판 응집 저해 등의 활성이 있다. 고분자물질에 포함된 혈압강하, 정혈, 고지혈증 개선, 혈당강하, 면역, 그리고 항종양 등의 효과가 보고되었다 (Shiao 등 1994). 특히 polysaccharide의 면역조절 작용에 대한 연구가 많이 이루어져, polysaccharide는 lymphocytes의 interferon-gamma (IFN-gamma)와 interleukin-12 (IL-12) 생산을 증가시키고 IL-4의 생산에는 영향이 없는 것으로 보고되었다 (Kohguchi 등 2004). 또한, 영지버섯에서 추출한 polysaccharide는 IL-1, Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) 및 nitric oxide 생산을 현저히 증가시켜, Th1 반응을 유도하는 효과가 보고되었다 (Jiang 등 2003; Zhang 등 1999; Tang 등 2004). 그러나 알레르기 질환에 대한 연구보고는 활발하지 못한 실정이다 (Liu 등 2003). 영지버섯은 동일한 종이라도 재배지역과 생육환경에 따라 2차 대사산물 및 생리활성 물질의 함량 차이를 보이는 것으로 보고되고 있다 (조 등, 2012a, 2012b). 따라서 본

*Corresponding author: cslee@kku.ac.kr

Table 1. Tested *Ganoderma* species

| Species | Collectionsites | Collection ID | Origin |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------|---------|
| <i>Ganoderma lucidum</i> | Mushroom Division at RDA | ASI-7071 | Korea |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | The American Type Culture Collection | ATCC46755 | Canada |
| <i>Ganoderma lucidum</i> | The American Type Culture Collection | ATCC64251 | Taiwan |
| <i>Ganoderma neo-japonicum</i> | Mushroom Division at RDA | ASI-7032 | unknown |
| <i>Ganoderma</i> species | Mushroom Division at RDA | ASI-7150 | unknown |
| <i>Ganoderma</i> species | Mushroom Division at RDA | ASI-7151 | unknown |

연구에서는 다양한 균주의 균사체 추출물을 사용하여 항염, 항산화 및 항알러지 효능을 비교 분석하였다. 이 같은 분석으로 영지버섯 간의 약리효능차이를 규명함으로써, 영지버섯연구의 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 조제

본 시험에서는 Table 1 같이 농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과에 보존중인 영지버섯균주를 공시하였다. 영지의 균사체 배양은 먼저 감자배지 (Potato Dextrose Agar)에 접종한 후 암상태인 30°C 항온기에서 배양하였다. 15일간 배양 후 균사체를 다시 4 l의 PDB배지에 접종하여 30°C에서 120 rpm으로 10일간 진탕배양 하였다. 배양된 균사체는 2겹의 Miracloth (CalBiochem Co.)로 걸러 배지를 제거하였다. 그 후 액체질소를 이용하여 마쇄하고 25°C의 dry oven에서 3일간 건조하였다. 건조된 균사체 시료를 10배의 100% MeOH으로 80°C에서 3시간 환류추출 하였다.

세포배양

RAW264.7 세포의 배양은 10% FBS와 1% Penicillin-Streptomycin가 함유된 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 culture dish에 80~90% 증식 하였을 때, trypsin처리 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하여 회수하고 1/10을 계대하는데 사용되었다.

항산화 활성 측정

각 영지버섯 균사체로부터 추출된 추출물의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical-scavenging법 (Choi 등, 2003)에 의하여 측정되었다. DPPH 라디칼 소거활성은 DPPH 용액 (100 µM in ethanol, Sigma-Aldrich Co) 900 µL에 농도가 다른

시료 용액 100 µL를 각각 가하여 혼합 후, 암소에서 10분간 반응시킨 뒤 517 nm에서 흡광 SC₅₀ (50% scavenging concentration)으로 측정하였다.

NO 저해능 측정

각 영지버섯 균사체 추출물의 항염활성을 nitric oxide (NO) 생성 저해 효과로 확인하였다. 분석은 다음과 같은 방법으로 진행되었다. RAW264.7 세포를 48 well plate에 1×10⁵ cell/well로 분주하여 24시간 배양 후 lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/ml와 영지버섯 균사체 추출물 100 µg/ml로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액에서 분비된 NO의 생성량은 Griess reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 상층액을 1:1 비율로 반응 시켜 측정하였다. 그리고 OD를 540nm에서 microplate reader으로 측정하였다. 염증반응에서 과도하게 생성된 NO는 염증 유발 인자의 생성을 더욱 촉진시켜 염증성 질환의 원인이 된다. 그러므로 염증반응에서 NO의 조절은 매우 중요하다 (Cirino 등, 2006).

세포독성 측정

각 영지버섯 균사체 추출물이 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay 방법으로 조사되었다. 96 well plate에 3×10³ cells/well 농도로 100 µl씩 분주하고 세포 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 24시간동안 배양하였다. 그 후에 배양액을 제거하고, phosphate buffered saline (PBS)로 배양세포 표면을 세척 한 뒤, 같은 양의 배지와 시료를 각 well에 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 3시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT (Sigma, USA)를 100 µl씩 각 well에 처리한 후 암상태의 조건으로 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 100 µl의 DMSO로 현탁한다. 그리고 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

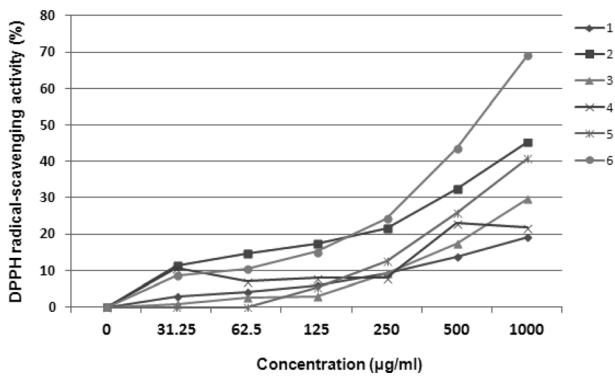


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of methanol extracts of *Ganoderma* species mycelia. 1, *G. lucidum* ASI-7071; 2, *G. lucidum* ATCC 46755 (Canada); 3, *G. lucidum* ATCC 64251 (Taiwan); 4, *G. neo-japonicum* ASI-7032; 5, *G. species* ASI-7151; 6, *G. species* ASI-7150.

탈과립화억제 측정

각 영지버섯 균사체 추출물의 항알리지 효과를 분석하기 위하여, RBL-2H3 세포를 15% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 DMEM배지로 현탁 시켰다. 이후 24 well plate에 2x10⁵/well로 분주 한 뒤 각 well당 0.5 g/ml DNP-IgE를 감작시키고 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 각 well을 Siraganian Buffer (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH7.2)로 2회 세척한 후 37°C에서 10분간 Siraganian Buffer로 전 반응시켰다. 대조군과 시료를 100 µg/ml의 농도로 각각 첨가한 후 동일한 조건으로 10분간 다시 반응시켰다. 이후 세포를 antigen (DNP-HSA, 10 µg/ml)로 37°C에서 30분간 처리하여 탈 과립상태로 만든 후, 4°C에서 10분간 배양한 뒤 반응을 정지 시켰다. 반응이 정지된 시료의 상층액을 취하고 12,000 rpm에서 90초간 원심분리 한 후, 다시 20 µl의 상층액을 새로운 96well plate에 분주하였다. 그 후 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG)를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 뒤, 반응 정지액 (0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃)을 첨가하였다. 그리고 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

영지버섯 추출물의 항산화 활성

DPPH radical scavenging을 통한 영지버섯 균사체 MeOH 추출물의 항산화활성 측정 결과는 Fig. 1과 같다. 모든 영지버섯의 균사체 추출물들은 농도 의존

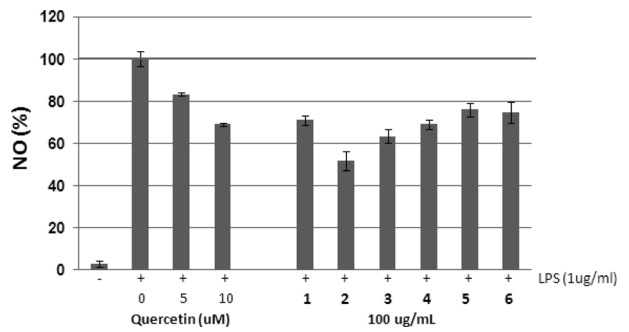


Fig. 2. The effect of *G. species* mycelial extracts on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. 1, *G. lucidum* ATCC 46755 (Canada); 2, *G. lucidum* ATCC 64251 (Taiwan); 3, *G. species* ASI-7150; 4, *G. species* ASI-7151; 5, *G. neo-japonicum* ASI-7032; 6, *G. lucidum* ASI-7071.

적으로 DPPH radical scavenging 활성이 증가하였다. 이 중 *G. species* ASI-7150 (흑영지)의 활성이 가장 높으며, *G. lucidum* ATCC46755 (Canada), *G. species* ASI-7151 (흑룡), *G. lucidum* ATCC64251 (Taiwan), *G. neo-japonicum* ASI-7032 순으로 활성이 높았다. *G. lucidum* ASI-7071 (영지2호)은 그 활성이 가장 낮았다.

또한 각 영지버섯 균사 추출물의 항산화 효과에 대한 SC₅₀ (mg/ml)은 *G. species* ASI-7150 (흑영지) 0.63, *G. lucidum* ATCC46755 (Canada) 2.91, *G. species* ASI-7151 (흑룡) 3.35, *G. lucidum* ATCC64251 (Taiwan) 25.3, *G. neo-japonicum* ASI-7032 1,132 그리고 *G. lucidum* ASI-7071 (영지2호) 1,162로 측정되었다.

영지버섯 추출물의 NO 저해능 및 세포생존율에 미치는 영향

영지버섯 균사체 추출물을 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 cell에 처리하였을 때, NO 저해능을 측정 한 결과 Fig. 2와 같이 NO 생성이 감소되었다. 이 중 *G. lucidum* ATCC64251 (Taiwan)의 균사체 추출물을 처리 하였을 때 NO 생성 저해능이 가장 좋았고, *G. neo-japonicum* ASI-7032의 균사추출물을 처리 하였을 때는 NO 생성 저해능이 가장 낮았다 (Fig. 2).

RAW 264.7 세포에 처리한 각 영지버섯 균사체 추출물 (100 µg/ml)의 세포 성장 저해도 (MTT assay)를 측정한 결과, 모든 처리군에서 특징적인 세포 생존율 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 3).

영지버섯 추출물의 탈과립화억제 능

RBL-2H3 cell에서 누출된 β-hexosaminidase의 양

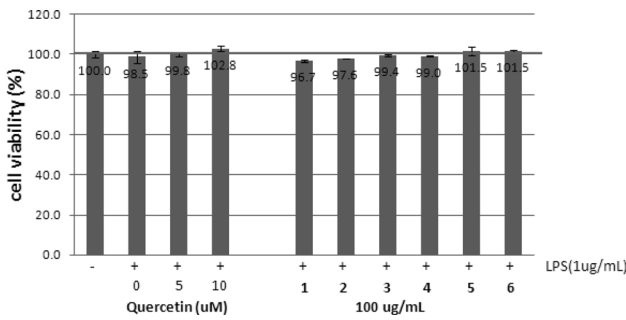


Fig. 3. Cytotoxicity of *G. species* mycelial extracts in RAW264.7. The cells were treated with *G. species* mycelial extracts at the concentration of 100 µg/ml. After incubation, *G. species* mycelial extracts-treated cells were reacted with MTT assay. 1, *G. lucidum* ATCC 46755 (Canada); 2, *G. lucidum* ATCC 64251 (Taiwan); 3, *G. species* ASI-7150; 4, *G. species* ASI-7151; 5, *G. neo-japonicum* ASI-7032; 6, *G. lucidum* ASI-7071.

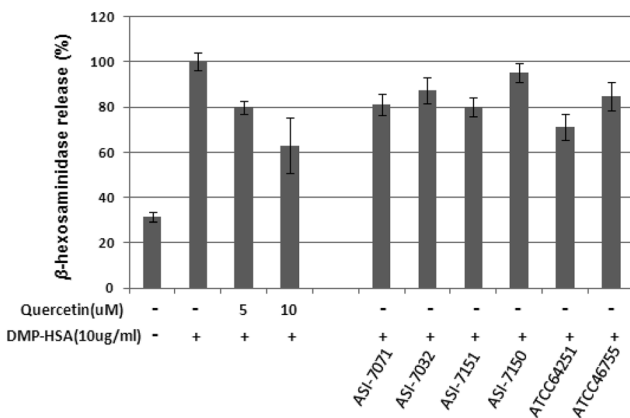


Fig. 4. Effects of *G. species* mycelial extracts on b-hexosaminidase release from RBL-2H3 cell. 1, *G. lucidum* ASI-7071; 2, *G. neo-japonicum* ASI-7032; 3, *G. species* ASI-7151; 4, *G. species* ASI-7150; 5, *G. lucidum* ATCC 64251 (Taiwan); 6, *G. lucidum* ATCC 46755 (Canada).

은 아무런 처리를 하지 않은 세포에서 31.45±2.1%이 었으나, DNP-HSA로 자극한 후 대조군인 quercetin 으로 처리한 시료는 농도 의존적으로 감소하였다. 또 한 각 영지버섯 균사체 추출물을 처리하였을 때, 이 중 *G. lucidum* ATCC64251 (Taiwan)의 β-hexosaminidase 생성 억제율이 71±5.8로 가장 좋았다. 그 다음으로는 *G. species* ASI-7151 (흑룡) 80±4.3, *G. lucidum* ASI-7071(영지2호) 81±4.8, *G. lucidum* ATCC46755 (Canada) 84.7±6.4, *G. neo-japonicum* ASI-7032 87.3 ±5.9 그 리고 *G. species* ASI-7150 (흑영지) 95.2±4 순이었다 (Fig. 4).

적 요

본 연구는 다양한 영지버섯 균주의 균사체 메탄을 추출물을 이용한 항염, 항산화 및 항알러지 효능을 비교 분석하기 위해 수행되었다. *G. species* ASI-7150 (흑영지), *G. lucidum* ATCC46755 (Canada), *G. species* ASI-7151 (흑룡), *G. lucidum* ATCC64251 (Taiwan), *G. neo-japonicum* ASI-7032, 및 *G. lucidum* ASI-7071 (영지2호)의 균사체 추출물 항산화 효과를 분석한 결과 *G. species* ASI-7150 (흑영지)의 균사체 추출 물에서 DPPH radical scavenging 활성이 가장 높았다. 항염활성 분석에서는 *G. lucidum* ATCC64251 (Taiwan)의 균사체 추출물을 처리하였 때 NO 생성 저해능이 가장 좋았다. 또한 *G. lucidum* ATCC64251 (Taiwan)의 균 사체 추출물을 처리하였을 때, β-hexosaminidase 생성 억제율이 가장 좋았다. MTT assay를 통하여 각 영지 버섯 균사체 추출물은 세포 생존율에는 영향이 없는 것으로 확인 되었다. 이러한 선행 연구결과는 추후에 국내 및 국외 품종 등 다양한 영지버섯 균사체의 약 리효과 분석에 기초자료로 사용될 것이다.

감사의 글

본 연구는 2013년 농촌진흥청 공동연구사업 (과제 번호: PJ907021)에 의하여 수행한 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

조재한, 노형준, 강돈호, 이지영, 이민정, 박혜성, 성기호, 전 창성. 2012a. 영지버섯의 항산화 효능과 암세포 성장저해 도. 한국버섯학회지 **10** : 203-207.
 조재한, 노형준, 강돈호, 이지영, 이민정, 박혜성, 성기호, 전 창성. 2012b. 영지버섯 균주별 자실체의 아미노산함량 비 교 분석. 한국버섯학회지 **10** : 208-215.
 Chen, J. H. and Jiang, R. L. 1980. A pharmacological study of the Chinese drug lingzhi (*ganoderma*). Yao Hsueh Hsueh Pao - Acta Pharmaceutica Sinica. **15** : 234-244 (in Chinese).
 Choi Y., Kim, M. H., Shin, J. J., Park J. M. and Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. J Korean Soc Food Sci Nutr **32** : 723-727.
 Cirino, G., Distrutti, E. and Wallace, J. L. 2006. Nitric oxide and inflammation, Inflamm. Allergy. 115-119.
 Furusawa, E., Chou, S. C., Furusawa, S., Hirazumi, A. and Dang, Y. 1992. Antitumour activity of *Ganoderma lucidum*, an edible mushroom, on Intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in synergetic mice. Phytotherapy Research. **6** : 300-304.
 Jiang, Z. Y. and Lin, C. 2003. Study of *Ganoderma lucidum*

- polysaccharide on effects of cellular immune function in mice. *J Microbiol.* **23** : 51-54.
- Kohguchi, M., Kunikata, T., Watanabe, H., Kudo, N., Shibuya, T., Ishihara, T., et al. 2004. Immunopotentiating effects of the antlershaped fruiting body of *Ganoderma lucidum* (Rokkaku-Reishi). *Biosci Biotechnol Biochem.* **68** : 881-887.
- Liu, Y. H., Tsai, C. F., Kao, M. C., Lai, Y. L., and Tsai, J. J. 2003. Effectiveness of Dp2 nasal therapy for Dp2-induced airway inflammation in mice: using oral *Ganoderma lucidum* as an immunomodulator. *J Microbiol Immunol Infect.* **36** : 236-242.
- Shiao, M. S., Lee, K. R., Lin, J. J. and Wang, C. T. 1994. Phytochemicals for Cancer Prevention II, p.342. In C.T. Ho(eds), *Teas, Spices and Herbs*. American Chemical Society, Washington.
- Tang, Q. J., Zhang, J. S., Pan, Y. J., Werner, R. and Fan, H. 2004. Activation of mouse macrophages by the alkali-extracted polysaccharide from spore of *Ganoderma lucidum*. *Chin J Cell Mol Immunol.* **20** : 142-144.
- Zhang, Q. H. and Lin, Z. B. 1999. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides B on $TNF\alpha$ and $INF\gamma$ production and their mRNA expression. *J Beijing Med Univ.* **31** : 179-183.