

들송이(*Agrocybe cylindracea*)와 말뚝진흙버섯(*Phellinus igniarius*)을 배양한 대두추출물의 암예방 효과

김소연 · 손준호¹ · 하효철 · 이항우² · 이재성*

영남대학교 식품가공학과, ¹한국식품연구소, ²계명대학교 전통미생물 자원센터

Chemopreventive Effects of the Extracts from Soybean Fermented with Basidiomycetes

So-Yeun Kim, Jun-Ho Son¹, Hyo-Cheol Ha, Hang-Woo Lee² and Jae-Sung Lee*

Dept. Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

¹Korea Advanced Food Research Institute, Seoul 1002-6, Korea

²T. M. R. center, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

(Received March 18, 2002)

ABSTRACT: The inductions of phase II enzymes, such as NAD(P)H : quinone reductase (QR), glutathione S-transferase (GST), glutathione (GSH) level and the inhibition of polyamine metabolism were tested for the chemopreventive potentials of the extracts from the soybean fermented with *Agrocybe cylindracea* (AC) or *Phellinus igniarius* (PI). The soybean fermented with AC or PI was potent inducer of QR activity in murine hepatoma Hepal1c7 cells. GST activities of the extracts from soybean fermented with AC or PI were higher than that of the extract from soybean not fermented with basidiomycetes. In addition, GSH levels of the extracts from soybean fermented with AC or PI were increased about 1.2 fold or 1.4 fold, respectively. In addition, proliferation of *Acanthamoeba castellanii* in a broth medium was inhibited by the extracts from soybean fermented with AC or PI at the both concentration of 20 and 40 mg/3 ml. These results suggest that soybean fermented with AC or PI may have chemopreventive potentials by inducing QR activity, increasing GSH and GST levels and inhibiting polyamine metabolism.

KEYWORDS: *Agrocybe cylindracea*, Chemoprevention, Phase II enzymes, *Phellinus igniarius*, Polyamine metabolism

버섯은 균사체의 영양대사로 얻어지는 대사산물이 축적된 자실체의 형태로 나타나게 되는데, 향미와 영양이 풍부하여 널리 이용되어져 왔다. 최근에 와서 자실체 및 균사체의 추출물이나 균사체의 배양물이 다양한 약리작용 및 효능이 있는 것으로 밝혀져 건강식품이나 의약품으로서의 용도가 크게 증가하고 있다.

이러한 버섯이 갖는 생물학적인 활성은 항암 활성 외에도 항알레르기 효과(Yiu and Ushio, 1989), 혈압강하 효과(Morigiwa *et al.*, 1986), 항세균성 효과(Yoon *et al.*, 1995), 항바이러스 효과(Yamamura and Cochran, 1976), 혈소판 응집저해 효과(Shimizu *et al.*, 1985), 면역증강 효과(Choi *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1995) 등의 효능이 보고되고 있다.

한편, 암예방(Chemoprevention)은 기존의 항암제를 이용한 암세포의 치료라는 개념과는 전혀 다른 것으로 미국이나 일본에서도 최근에 시작된 연구분야이며, 초기단계에서 발암물질로부터의 노출을 막거나 암발생(carcinogenesis)을 예방하며, 암으로 진행되는 과정을 억제하는 것을 의미한

다(Sharma *et al.*, 1994). 최근에 와서 암예방 물질에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 이러한 암예방 물질은 최종 발암대사물질 활성을 줄이거나 형성을 차단하고, 또한 표적조직에서 발암물질의 활성을 감소시킴으로써 암발생을 억제할 수 있다. 한편, quinone reductase(QR)나 glutathione S-transferase(GST)와 같은 phase II 효소의 유도는 화학적인 스트레스와 암 발생과정 중의 개시(initiation) 단계에서 돌연변이물질, 발암물질로부터 세포의 보호작용을 하는 주요 대사로 여겨진다(Prochaska and Santamaria, 1988). Glutathione(GSH)는 다단계 발암과정 중 개시(initiation)와 촉진(promotion)단계에서 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다. 즉, 개시단계에서는 발암물질 분자의 전자친화적 부위와 작용하여 독성이 강한 물질에 의한 DNA의 공격을 저해하는 역할을 하며, 촉진(promotion) 단계에서는 산화적 유리 라디칼의 공격을 제한함으로써 세포를 보호하는 역할을 한다(Mitchell *et al.*, 1976). 또한, 발암과정시 polyamine은 비정상적으로 생합성되고 종양세포의 증식에도 관여하게 되어 발암과정에 영향을 미치게 되므로(Bull *et al.*, 1984), polyamine의 대사 억제는 다단계 발암과정 중 촉진(promotion) 단계에서 암 발

*Corresponding author <E-mail: jslee@yu.ac.kr>

생 억제정도를 관찰하는데 이용되는 생물학적 지표로 사용된다.

본 연구에 사용된 버들송이의 경우 향미가 뛰어나고 균사체 성장이 빨라서 본 연구실에서 다양한 기능성을 검정하고자 하는 기능성균주로 연구되어져 왔으며, 말뚝진흙버섯의 경우 다양한 약리작용을 갖는 약용버섯으로 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서 지향하고자 하는 목적은 자실체의 식용이 불가능한 약용버섯이나 향기가 매우 뛰어난 식용버섯의 균사체를 식품으로 섭취할 수 있도록 고체재료인 콩에 각종 담자균 균사체를 배양한후 고체배양물 전체를 이용하여 기능성 식품으로서의 활용 가능성을 검토하고자 함이다. 즉, *Agrocybe cylindracea*(버들송이)와 *Phellinus igniarius*(말뚝진흙버섯)를 배양한 대두 추출물에 대하여 *in vitro*상에서의 암발생 억제물질(chemopreventive agent) 연구에 널리 이용되고 있는 기작인 항산화 phase II enzyme을 중심으로 한 암예방 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 균주로 *Agrocybe cylindracea*(버들송이)는 본 연구실 보관용이며, *P. igniarius*(말뚝진흙버섯)는 농업과학기술원 응용미생물과에서 분양받은 것으로 본 연구실에서 계대배양하면서 공시균주로 사용하였다.

배지

균의 보존용 배지로는 MYG 배지(malt yeast glucose medium : malt extract 1%, yeast extract 0.4% glucose 0.4%)를 사용하였고, 액체배지로는 버들송이의 배양에는 ACM 배지(Lee *et al.*, 1989), 말뚝진흙버섯의 배양은 MYG 배지를 각각 사용하였다. 고체배지의 원료로는 백태(충북 청주산)를 대구 서문시장 의성상회에서 구입하여 이용하였다.

액체배양

균사체 배양은 버들송이는 ACM 고체배지, 말뚝진흙버섯은 MYG 고체배지에 각각 접종하여 28°C에서 일정기간(버들송이는 7일, 말뚝진흙버섯은 8일) 평판배양하였다. 배양된 균사의 가장자리 일정부위를 5 mm cork borer로 절단하여 액체배양의 접종원으로 사용하였다. 액체배양은 각각의 액체배지에 접종원을 접종하여 28°C, 125 rpm에서 버들송이는 18일, 말뚝진흙버섯은 10일간 진탕배양하였다. 진탕배양된 액체배양물을 homogenizer(Nissei AM-11, Japan)로 균질화한 후, 2%(v/v)의 비율로 액체배지에 접종하여 28°C, 125 rpm에서 버들송이는 8일, 말뚝진흙버섯은 6일간 진탕배양한 후 각각 1일간 정치배양한 것을 고체배양시 접종원으로 사용하였다.

고체배양

고체배양은 먼저 대두를 세척하여 10배량의 냉수(18°C)에 침지시키고 12~14시간 정도 불린 후 체에 받쳐 대두 표면의 수분을 제거하였다. 이를 플라스틱 배양병(1000 ml)에 500 g씩 담아 121°C에서 60분간 고압살균하여 실온에서 냉각하였다. 여기에 homogenizer로 균질화한 액체접종원을 2%(v/w)의 비율로 접종하여 28°C에서 버들송이는 12일, 말뚝진흙버섯은 10일간 정치배양하였다. 그리고, 60°C에서 송풍건조 후 4°C에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

담자균을 배양한 대두 추출물의 제조

담자균을 배양한 대두 추출물은 Kim 등(2000)의 방법에 따라 담자균류의 생리활성물질로 알려져있는 다당류(polysaccharide)를 추출하는 방법으로 실시하였다. 즉, 담자균이 배양된 대두에 10배량의 증류수를 가하여 100°C에서 3시간 동안 추출하여, 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상정액을 다시 여과하였다. 여과액은 감압농축기(EYELA N-N형; Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축한 다음 3배량의 95% 에탄올을 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후, 생성된 침전물을 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 회수하고, 이를 일정량의 증류수에 녹여 다시 8,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상정액을 회수하였다. 이 상정액을 동결 건조하여 각종 활성의 시료로 사용하였다.

세포내 Quinone Reductase(QR) 생성 측정

QR assay: QR 활성 유도 측정은 Prochaska 등(1988)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 1×10^4 개의 Hepalcl1c7 세포를 200 μ l의 MEM배지(FBS 100 ml, antibiotics 10 ml, NaHCO₃ 0.22%, distilled water 890 ml)에 부유시켜 96-well microtiter plate에 접종시키고 CO₂ incubator에서 24시간 배양 후, MEM배지를 제거하였다. 여기에 새로운 MEM배지 200 ml에 녹인 버들송이와 말뚝진흙버섯이 각각 배양된 대두 추출물 시료를 각 well에 첨가하였다. 시료가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액은 제거하고 3회의 freeze-thaw cycles에 의해 세포를 용해시켰다. 여기에 reaction mixture[증류수에 녹인 0.5 M Tris-HCl(pH 7.4), 100 mg의 bovine serum albumin, 1.5% tween-20, 7.5 mM FAD, 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP, 300 unit의 yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, 45 mg의 dimethylthazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), 50 mM menadione] 200 μ l를 각 well에 넣고 5분간 반응하였다. 반응 후, 0.5% DMSO에 녹인 0.3 mM dicumarol과 5 mM potassium phosphate가 함유된 용액 50 μ l를 첨가하여 반응을 중지시켰으며, microplate reader(Boehringer EL 311, Germany)를 이용하여 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 독성 측정(Crystal violet staining): 세포수에 대한 QR 생성량 측정은 QR 활성 유도를 위한 앞 실험과 동일하게 96 well plate에 Hepa1c1c7 세포를 접종하여 24시간 배양한 후 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양한 후 배지를 제거하고, 2% 에탄올에 녹인 0.2%(w/v) crystal violet에 10분간 담근 다음 2분간 흐르는 물에 씻었다. 50% 에탄올에 녹인 0.5%(w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS)를 200 μ l씩 각 well에 첨가하고 37°C, CO₂ incubator에서 1시간 반응시킨 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

QR 활성 유도: QR 활성은 환원된 MTT와 crystal violet에 의한 흡광도로 산정하였고, QR 활성유도는 담자균을 배양한 대두 추출물을 처리하지 않은 대조군의 QR 활성에 대한 시료를 처리한 QR 활성의 비로 나타내었다. QR 활성 유도 계산식은 다음과 같다.

Specific activity

$$= \text{absorbance change of MTT/min} \times 3,345 \text{ nmol/mg} \\ \text{absorbance of crystal violet}$$

세포내 Glutathione S-Transferase(GST) 생성량 측정

GST 활성은 Hepa1c1c7 세포를 사용하여 Habig 등 (1974)의 방법을 변형하여 측정하였다. QR 활성 유도를 위한 앞 실험과 동일하게 Hepa1c1c7 세포를 접종하여 24시간 배양한 후 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양한 후 배지를 제거하고 세포를 용해시켰으며, 여기에 GST 활성 측정을 위한 reaction mixture[0.1 M potassium phosphate buffer에 녹인 2.5 mM GSH과 1 mM 1-chloro-2,3-dinitro benzene(CDNB), pH 6.5] 100 μ l을 첨가하고 1분간 plate shaker에서 shaking한 다음, 405 nm에서 3분간 흡광도의 증가를 microplate reader에서 측정하였다. 단백질 함량은 GST 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 binchinchonic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다. GST 활성은 slope/min/mg protein으로 계산하여 담자균을 배양한 대두 추출물을 처리하지 않은 대조군의 GST 활성에 대한 시료를 처리한 GST 활성의 비로 나타내었다.

세포내 Glutathione(GSH) 생성량 측정

세포내 총 GSH 함량은 Griffith(1980)의 방법을 96-well microtiter plate에서 사용할 수 있게 변형하여 측정하였다. Hepa1c1c7 세포를 QR 활성 유도를 위한 앞 실험과 동일하게 96 well plate에 접종하여 24시간 배양한 후, 시료를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양한 후 배지를 제거하고 세포를 용해시켰으며, 여기에 stock buffer[125 mM sodium phosphate와 6.3 mM ethylenediaminetetraacetic acid(Na-EDTA), pH 7.4] 40 μ l와 stock buffer에 녹인 6 mM 5-5'-dithiobis-(2-nitro-benzoic acid)(DTNB),

glutathione reductase 용액(stock buffer 10 ml 당 50 unit), 그리고 NADPH-generating system[0.5 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP⁺, and glucose-6-phosphate dehydrogenase in distilled water] 170 μ l를 첨가하여 상온에서 5분간 shaking한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, 단백질 함량은 GSH 활성 측정을 한 plate와 같이 처리한 plate에서 binchinchonic acid solution protein kit를 사용하여 측정하였다. 한편, GSH 함량은 GSH 표준 곡선에 의하여 산출하였고, nmol/mg protein으로 계산하여 담자균을 배양한 대두 추출물을 처리하지 않은 대조군의 GSH 생성량에 대한 시료를 처리한 GSH 생성량의 비로 나타내었다.

Polyamine metabolism 측정

Polyamine metabolism 측정은 *Acanthamoeba castellanii*의 증식을 측정하는 방법으로 실시하였다(Kim *et al.*, 1987). 즉, 3×10^4 cells의 *A. castellanii*을 OGM 배지(Byers *et al.*, 1980) [yeast extract-proteose peptone(7.5 g/l), 2,000 \times vitamins(0.2 g thiamine HCl, 40 mg biotin, 200 μ g vitamin B₁₂/100 ml의 95% ethanol), 100 \times salt I(ferric citrate, CaCl₂ · H₂O, MgSO₄ · 7H₂O/250 ml의 증류수), 30% glucose, 100 \times KH₂PO₄(13.6 g/l, pH 7.0)] 2.5 ml에 부유시켜 T-25 tissue culture flask에서 24시간 배양하였다. 그 후, OGM 배지 0.5 ml에 녹인 담자균을 배양한 대두 추출물을 각 flask에 첨가한 뒤 각 시간별로 hemocytometer를 이용하여 세포수를 계수하였다.

결과 및 고찰

세포내 QR 활성 유도

QR은 cytosol속에 다량 포함된 플라보노이드로서 생체 내에 유입되는 다양한 quinone과 그 대사산물인 quinone-imine을 환원시켜 신진대사 단계의 세포독성(cytotoxicity)으로부터 세포를 보호하는 역할을 담당하고 있다. 또한, 이 효소는 GST 및 UDP-glucuronosyltransferase와 같은 phase II enzymes으로서 돌연변이 유발억제와 발암물질에 의해 유발된 종양세포로부터 정상세포를 보호하는 작용을 하며, 그 분포활성은 간에서 가장 높게 나타나며 신장과 뇌에서도 비교적 높게 나타난다(Prochaska *et al.*, 1985; Wattenberg, 1985).

본 연구에서는 버들송이와 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 암예방 효과를 측정하기 위하여 Hepa1c1c7 murine hepatoma cell의 배양에서 QR 활성 유도 효과를 측정하였다. 그 결과, QR 활성 유도는 대조군과 비교할 때, 담자균을 배양하지 않은 대두 자체에서는 1.3~1.9배의 증가를 보였으며, 버들송이를 배양한 대두 추출물은 대조군과 비교하여 1.8~2.6배의 활성 유도를 나타냈다(Fig. 1). 특히, 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 경

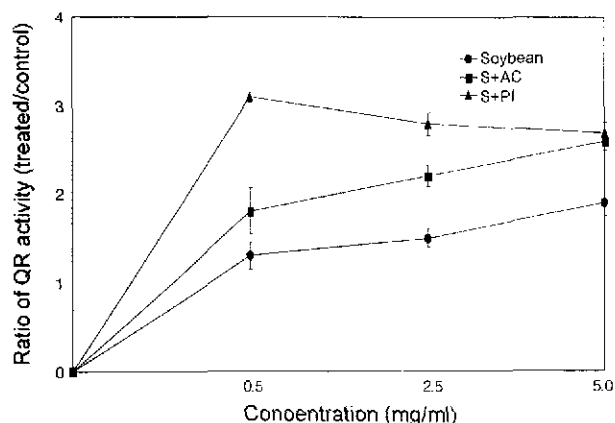


Fig. 1. Effect of the extracts from soybean fermented with *Agrocybe cylindracea* (S + AC) or *Phellinus igniarius* (S + PI) on induction of quinone reductase (QR) activity in mouse hepatoma Hepal1c7 cells. Cells were treated with samples for 48 hrs, and the change in the levels of QR was measured. Each point represents the mean \pm SD (standard deviation) of three separate experiments.

우에는 0.5 mg/ml 농도에서 3.1배의 유도를 보여, 버들송이보다 많은 QR 생성을 유도하는 것으로 나타났다. 한편, Benson 등(1985)은 식품첨가물로 사용되는 항산화제는 QR 활성 증가를 통하여 암 발생 및 세포독성이 억제된다고 하였다. Shon과 Nam(2001)은 버들송이와 말뚝진흙버섯의 균사체 및 배양액에서의 QR 활성이 증가되었으며, 이는 균사체 및 배양액으로부터의 추출물 중의 많은 화합물의 복합적인 효과에 의한 것으로 보고한 바 있다. 따라서 본 연구의 결과, 담자균을 배양한 대두 추출물은 돌연변이 물질이나 발암물질에 의한 세포내의 독성을 제거하며 DNA 손상에 의한 돌연변이 유발을 억제하여 암으로 진행되는 과정을 억제하는 암 억제 효과가 있을 것으로 사료된다.

세포내 GST 활성 유도

본 연구에서는 버들송이와 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 암예방 효과를 측정하기 위하여 Hepal1c7 세포를 이용하여 GST 활성을 측정하였다. 담자균을 배양하지 않은 대두 자체의 GST 활성은 0.5~5.0 mg/ml의 농도에서 대조군과 비교하여 약간의 증가를 보였다. 한편, 버들송이를 배양한 대두 추출물의 경우에는 0.5 mg/ml의 농도에서 40% 증가를, 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 경우 5.0 mg/ml의 농도에서 50%의 증가를 나타내었다 (Fig. 2).

Kim 등(1999a)은 *Ganoderma lucidum*에서 20~30%의 GST의 활성 증가가 일어났다고 보고하였다. GST는 외부 물질의 대사 과정 중 생성된 친전자성 대사산물을 GSH와 결합하여 용해되기 쉬운 수용성 물질로 만들어 배설시키는 효소로서(Bora *et al.*, 1989), 세포질내에 다량으로

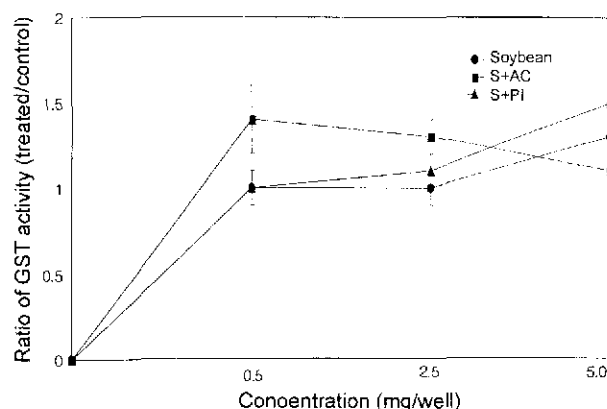


Fig. 2. Effect of the extracts from soybean fermented with *A. cylindracea* (S + AC) or *P. igniarius* (S + PI) on induction of glutathione S-transferase (GST) activity in mouse hepatoma Hepal1c7 cells. Cells were treated with samples for 48 hrs, and the change in the levels of GST was measured. Each point represents the mean \pm SD (standard deviation) of three separate experiments.

존재하며 여러종류의 isozyme이 밝혀져 있다(Wattenberg and Bueding, 1986). 또한, 이 효소는 생체내의 GSH를 기질로 이용하여 발암의 직접적인 원인이 되는 활성중간 대사산물을 제거함은 물론 항산화 활성의 역할도 한다. 따라서, 암예방 물질을 검색하는 데 있어서 GST는 phase II enzyme 중의 하나로서 개시단계의 생물학적 지표 (biomarker)로 이용되고 있다.

본 연구 결과, 담자균을 배양한 대두 추출물의 GST 활성은 대조군과 비교하여 증가된 것으로 보아 발암물질이나 돌연변이 물질에 의해 유도되는 발암과정에서 체내 대사산물인 친전자 화합물이 GST에 의해 체내에서 신속히 배설됨으로서 암 발생이 억제될 것으로 사료된다.

세포내 GSH 생성 촉진

GSH는 GSH-Px와 GST의 기질로 사용되며, 독성이 있는 친전자성 대사산물과 직접 반응을 함으로서 세포내에서 중요한 암억제 기능을 한다. 본 연구에서 버들송이와 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 암예방 효과를 측정하기 위하여 Hepal1c7 세포를 이용하여 GSH 생성량을 측정하였다. 그 결과(Fig. 3), 담자균을 배양하지 않은 대두 자체의 GSH 생성은 0.5~5.0 mg/ml의 농도에서 대조군과 비교하여 거의 유도효과가 없었다. 버들송이를 배양한 대두 추출물의 경우는 농도가 증가함에 따라 20%까지, 그리고 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 경우 최고 40%까지 GSH의 생성이 증가되었다.

한편, 체내 GSH 함량 저하는 간 세포내 단백질 분비의 손상과 지방간, 간 괴사, 섬유아 증식과 같은 간질환을 일으킨다. 또한, 세포내 GSH가 고갈되면 독성이 강한 대사산물이 생성되어 세포내 손상과 암의 발생이 일어난다(Michell *et al.*, 1976). Sulfur를 포함한 화합물 등은 체내

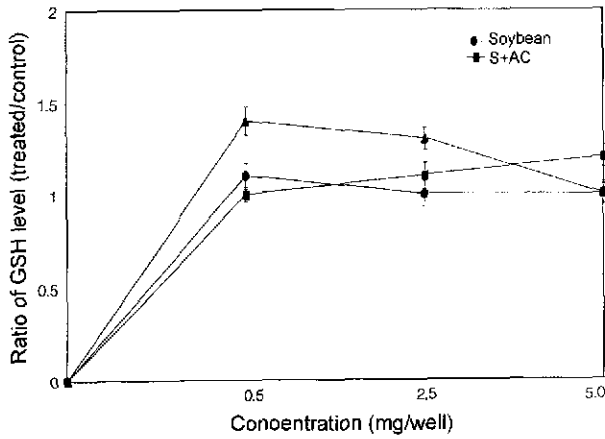


Fig. 3. Effect of the extracts from soybean fermented with *A. cylindracea* (S + AC) or *P. ignirius* (S + PI) on induction of glutathione (GSH) levels in mouse hepatoma Hepa 1c1c7 cells. Cells were treated with samples for 48 hrs, and the change in the levels of GSH was measured. Each point represents the mean \pm SD (standard deviation) of three separate experiments.

GSH 함량을 증가시켜 GST나 QR과 같은 독성억제 효소의 활성을 증가시키고, 발암물질의 생성을 억제시키는 것으로 Benson 등(1985)에 의해 보고되었다. 따라서 본 연구의 결과, 담자균이 배양된 대두 추출물은 대조군과 비교하여 GSH 생성량이 증가한 것으로 보아 독성억제 효소의 활성을 증가시켜 세포내 독성물질 및 발암물질 생성을 억제하는 데 기여할 것으로 판단된다.

Polyamine metabolism 억제 효과

세포내의 polyamine의 함량은 정상세포 및 종양세포의 증식과 관련이 있다. Polyamine 생합성을 억제하는 것은 암 발생이나 종양의 성장을 억제하는 물질을 탐색하는 데 있어서 아주 중요하다. Polyamine은 원생동물 세포의 증식과 분화에 관여한다고 알려져 있다(Pegg, 1988). 원생동물의 polyamine 생성의 억제는 암세포의 성장을 저해할 수 있으므로 암발생을 억제하는 촉진단계의 기작으로써 이용될 수 있다(Kim et al., 1987). 따라서, 본 연구에서는 원생동물 중 *A. castellanii*의 증식을 이용하여 polyamine metabolism의 억제에 의한 암 발생 예방 효과를 측정하였다(Fig. 4A). 즉, 3×10^4 개의 *A. castellanii*를 접종한 24시간 후 시료, 즉 담자균을 배양하지 않은 대두 자체와 버들송이와 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물을 처리하였다. 이 때의 세포수는 6.7×10^4 개이었다. 각 시료를 well당 20 mg씩(20 mg/3 ml) 처리하여 시간별로 세포수를 측정된 결과, 시료 처리 후 24시간에는 대조군이 12.8×10^4 개, 대두 자체 추출물 처리군이 11.9×10^4 개, 버들송이를 배양한 대두 추출물을 처리한 경우 7.7×10^4 개, 그리고 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물을 처리한 경우 8.1×10^4 개로 세포증식이 둔화되었다. 48시간에도 대

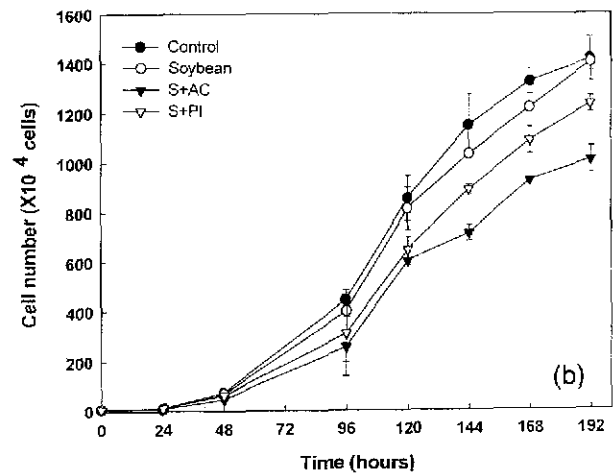
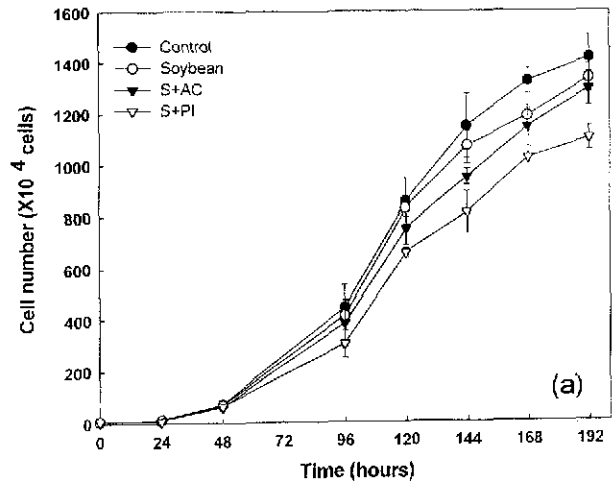


Fig. 4. A. Inhibition of the growth of the *Acanthamoeba castellanii* by the extracts from soybean fermented with AC (S + AC) or PI (S + PI) at the concentration of 20 mg/3 ml. *A. castellanii* was incubated with samples for each time. Each point represents the mean \pm SD (standard deviation) of three separate experiments. B. Inhibition of the growth of the *Acanthamoeba castellanii* by the extracts from soybean fermented with AC (S + AC) or PI (S + PI) at the concentration of 40 mg/3 ml. *A. castellanii* was incubated with samples for each time. Each point represents the mean \pm SD (standard deviation) of three separate experiments.

조군과 비교하여 다소 낮은 증식억제효과를 보였으며, 담자균이 배양되지 않은 대두 자체와 비교해 보면 *A. castellanii*의 증식 억제효과와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 시료 처리 후 96시간에서는 대조군이 444.2×10^4 개, 대두 자체의 경우 412.5×10^4 개로 증식되었으며, AC를 배양한 대두 추출물은 383.2×10^4 개, PI를 배양한 대두 추출물은 303.0×10^4 개로 증식되었다. 즉, 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물을 처리 한 경우 다른 시료보다 세포의 증식이 가장 많이 억제된 것으로 나타났다. 시료 처리 한 120시간 이후에도 세포의 증식이 계속되었으며, 담자균을 배양한 대두 추출물에서는 대조군과 비교

하여 증식이 억제됨을 확인하였다. 168시간에서의 세포수를 보면 대조군에서는 $1,322.5 \times 10^4$ 개, 대두 자체의 경우 $1,185.0 \times 10^4$ 개, 버들송이를 배양한 대두 추출물의 경우 $1,143.8 \times 10^4$ 개, 말뚥진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 경우 $1,023.0 \times 10^4$ 개로 나타나 시료처리를 하지 않은 대조군과 비교하여 증식이 다소 억제되었다(Fig. 4A). 각 시료를 40 mg/3 ml 의 농도로 처리한 후 아메바의 세포수를 측정된 결과(Fig. 4B)에서도 앞의 실험결과와 동일한 경향으로 대두 자체를 처리한 경우보다 담자균을 배양한 대두 추출물을 처리한 경우 세포의 증식 억제효과가 높게 나타났으며, 특히 말뚥진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 경우 가장 많은 증식 억제효과가 나타났다. 이 때, 아메바의 세포수는 처리한 시료의 농도가 높을수록 감소하였고, 이러한 세포의 증식 억제는 시료의 독성에 의한 세포수 감소가 아니라, 시료에 의해 polyamine의 생합성이 억제됨으로 인해 *A. castellanii*의 성장이 억제된 것으로 추측된다. 현재, polyamine metabolism의 억제효과에 관한 연구가 한방의 약침액으로 이용하는 약초에 대한 것(Kim *et al.*, 1999b)은 있으나, 아직 그 연구가 미비하다.

한편, polyamine의 생합성 경로는 ornithine decarboxylase(ODC)에 의해 조절되며, 이 효소는 ornithine을 putrescine, spermidine, spermine과 같은 polyamine으로 전환시키는 효소이다. ODC의 유도과 암촉진과는 밀접한 관계가 있는 것으로 종양조직에서 ODC의 활성이 높게 나타나는 경우가 있다. 따라서 이 효소의 활성을 저해함으로써 polyamine 생합성이 억제되고, 종양세포의 증식에도 영향을 미치게 된다. Polyamine 생합성을 저해하는 억제제로서 잘 알려진 difluoromethylornithine(DFMO) 등은 ODC의 활성을 저해시키며, 종양세포의 증식 억제를 일으켜 암 발생을 억제한다(Rozhin *et al.*, 1984; Kingsnorth *et al.*, 1983). 따라서, 본 연구 결과 버들송이와 말뚥진흙버섯을 배양한 대두 추출물은 polyamine metabolism의 억제효과가 있는 것으로 나타나, 종양세포의 증식을 억제하여 암발생을 억제할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 버들송이(*Agrocybe cylindracea*)와 말뚥진흙버섯(*Phellinus igniarius*)을 배양한 대두 추출물의 암예방 효과를 검토하기 위하여 *in vitro*상에서 암발생 억제물질 연구에 널리 이용되고 있는 기작 즉, Quinone reductase(QR), glutathione S-transferase(GST)의 활성 유도, glutathione(GSH)의 생성 촉진 그리고, polyamine 합성대사의 억제능을 측정하였다. 그 결과, 버들송이와 말뚥진흙버섯을 배양한 대두 추출물이 마우스 hepatoma Hepal1c7 cell 배양에서 QR과 GST 유도활성이 있음이 확인되었다. 또한, GSH 생성량은 버들송이를 배양한 대두 추출물에서 20%, 말뚥진흙버섯을 배양한 대두 추출물

에서 40%로 증가하였다. 한편, 버들송이와 말뚥진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 polyamine 합성대사의 억제효과를 검토하기 위해 *Acanthamoeba castellanii*의 증식을 측정하였다. 그 결과, 버들송이와 말뚥진흙버섯을 배양한 대두 추출물 20 mg/3 ml 와 40 mg/3 ml 를 처리할 경우 *A. castellanii*의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과 담자균을 배양한 대두 추출물은 *in vitro*상에서 나타난 암과 관련된 각종 활성으로부터 암예방 효과가 있는 것으로 나타나 기능성 식품으로서의 가능성을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 선도기술개발사업비의 지원에 의하여 수행된 결과의 일부로서 이를 수행할 수 있도록 지원하여 주신 것에 감사드립니다.

참고문헌

- Benson, A. M. and Barretto, P. B. 1985. Effects of disulfiram, diethyldithiocarbamate, bisethylxanthogen, and benzyl isothiocyanate on glutathione transferase activities in mouse organs. *Cancer Res.* **45**: 4219-4223.
- Bora, P. S., Spilburg, C. A. and Lange, L. G. 1989. Metabolism of ethanol and carcinogens by glutathione transferases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 4470-4473.
- Bull, A. W., Nigro, N. D., Golembieski, W. A., Crissman, J. D. and Marnett, L. J. 1984. *In vivo* stimulation of DNA synthesis and induction of ornithine decarboxylase in rat colon by fatty acid hydroperoxides, autoxidation products of unsaturated fatty acids. *Cancer Res.* **44**: 4924-4928.
- Byers, T. J., Akins, R. A., Maynard, B. J., Lefken, R. A. and Martin, S. M. 1980. Rapid growth of *Acanthamoeba* in defined media; Induction of encystment by glucose-acetate starvation. *J. Protozool.* **27**: 216-219.
- Choi, M. S., Lee, J. H., So, J. N. and Kim, J. M. 1990. Effect of lentinan on the immune function. *Kor. J. Immunol.* **12**: 235-249.
- Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**: 207-212.
- Habig, W. H., Pabst, M. H. and Jacoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferase: the first enzymatic step mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7139.
- Kim, B. G., McCann, P. P. and Byers, T. J. 1987. Inhibition of multiplication in *Acanthamoeba castellanii* by specific inhibition of ornithine decarboxylase. *J. Protozool.* **34**: 264-266.
- Kim, H. S., Kacew, S. and Lee, B. M. 1999a. *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriaria versicolor*). *Carcinogenesis* **20**: 1637-1640.
- Kim, J. W., Choi, H. K., Shon, Y. H., Lim, J. K., Lee, H. W. and Nam, K. S. 1999b. Chemopreventive potential of *Lonicerae flos* aqua-acupuncture solution. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 261-268.
- Kim, S. Y., Shon, Y. H., Lee, J. S., Kim, C. H. and Nam, K. S. 2000. Antimutagenic activity of soybeans fermented with

- basidiomycetes in Ames/Salmonella test. *Biotech. Letters* **22**: 1197-1202.
- Kingsnorth, A. N., King, W. W. K., Diekema, K. A., McCann, P. P., Ross, J. S. and Malt, R. A. 1983. Inhibition of ornithine decarboxylase with 2-difluoromethylornithine : Reduced incidence of dimethylhydrazine-induced colon tumors in mice. *Cancer Res.* **43**: 2545-2549.
- Lee, J. S., Park, S. and Park, G. S. 1989. Optimization of media composition and cultivation for the mycelial growth of *Agrocybe cylindracea*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **21**: 399-403.
- Mitchell, J. R., Hinson, J. A. and Nelson, S. D. 1976. Glutathione and drug induced tissue lesions: metabolism and function. Pp. 357-367. In : Arias, I. M. and Jakoby, W. B. Eds. Glutathione. Raven Press, New York.
- Morigiwa, A., Kitabatake, K., Fujimoto, F. and Ikekawa, N. 1986. Angiotensin converting enzyme inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 3025-3028.
- Pegg, A. E. 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.* **48**: 759-774.
- Prochaska, H. J., Talalay, P. and Sies, H. 1987. Direct protective effect of NAD(P)H : quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of postmitochondrial fractions of mouse liver. *J. Biol. Chem.* **262**: 1931-1934.
- _____ and Santamaria, A. B. 1988. Direct measurement of NAD(P)H : Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* **169**: 328-336.
- Rozhin, J., Wilson, P. S., Bull, A. W. and Nigro, N. D. 1984. Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res.* **44**: 3226-3230.
- Sharma, S., Stutzman, J. D., Kelloff, G. J. and Steele, V. E. 1994. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.* **54**: 5848-5855.
- Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y. and Inada, Y. 1985. Isolation of an inhibitors platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 3012-3015.
- Shon, Y. H. and Nam, K. S. 2001. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J. Ethnopharmacol.* **77**: 103-109.
- Yamamura, Y. and Cochran, K. W. 1976. A selective inhibitor of myxoviruses from shiitake (*Lentinus edodes*). *Mushroom Sci.* **9**(part 1): 495.
- Yiu, T. C. and Ushio, S. 1989. Screening of antiallergic effect in traditional medicinal drugs and active constituents of *Aurantii fructus Immaturus*. *Shoyakugaku Zasshi* **43**: 314.
- Yoon, J. O., Min, T. J. and Yoon, H. S. 1995. An antibacterial lectin from *Lamptermyces japonicus*. *Kor. J. Micol.* **23**: 46-52.
- Wang, H. X., Liu, W. K., Ng, T. B., Ooi, V. E. C. and Chang, S. T. 1995. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from a mycelial culture of *Tricholoma* sp., a local edible mushroom. *Life Sci.* **57**: 269-281.
- Wattenberg, L. W. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* **45**: 1-8.
- _____ and Bueding, E. 1986. Inhibitory effect of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione(oltipraz) on carcinogenesis induced by benzo(a)pyrene, diethylnitrosamine, and uracil mustard. *Carcinogenesis* **7**: 1379-1381.