

상황버섯 균사체를 이용한 발효주가 흰쥐의 위점막에 미치는 영향

이수진¹ · 최영현^{2,5} · 이용태³ · 정경태⁴ · 정영기⁴ · 최병태^{1,5*}

동의대학교 한의과대학 1: 해부학교실, 2: 생화학교실, 3: 생리학교실,
4: 자연과학대학 생명응용과학과 5: 대학원 바이오물질제어학과

Effects of Fermented Rice Wine Using Mycelium of *Phellinus linteus* on the Gastric Mucosa of Rat

Soo Jin Lee¹, Yung Hyun Choi^{2,5}, Yong Tae Lee³, Kyung Tae Chung⁴, Young Kee Jeong⁴, Byung Tae Choi^{1,5*}

Departments of 1: Anatomy, 2: Biochemistry, 3: Physiology, College of Oriental Medicine,
4: Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science,
5: Department of Biomaterial Control, Graduate School, Dong-eui University

It was examined the effect of fermented rice wine using mycelium of *Phellinus linteus* (FWPL) on the gastric mucosa of rat. The gastric mucosal lesions were not seen macroscopically in normal, but ethanol-administrated rats produced congestion and edema with a few local lesions. The administration of FWPL showed a similar pattern as like normal except trace histopathological changes. The results of Western blot analyses showed that the higher expression of inducible nitric oxygenase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, tumor necrosis factor- α and c-fos, especially COX-2, in the ethanol-administrated rat compared with normal rat. But FWPL-administrated rat showed a trace increase of these expression compared to normal rat. About immunohistochemical observations, weaker iNOS reactions were detected in mucous cells of epithelium of ethanol administrated rat compared with normal and FWPL-administrated rat. These results suggested that FWPL-administrated rat showed a trace changes on the mucus barrier-related protein expression compared with ethanol-administrated rat and thus FWPL may be use to develop a functional alcoholic beverage.

Key words : *Phellinus linteus*, gastric mucosa, alcohol, inducible nitric oxygenase, cyclooxygenase

서 론

상황버섯으로 알려진 *Phellinus linteus*는 체내 면역력의 증대를 통해 각종 염증성 질환과 암에 사용되고 있다^{1,2)}. 현재 상황버섯의 자실체와 균사체 추출물에 대한 연구는 주로 항암 및 항염증 효과에 치중되어 있다^{2,3)}. 그러나 상황버섯은 자연 상태에서 매우 희귀하여 실험에 사용하기 어려웠으나 최근 균사체 대량 배양기술을 통해 이에 대한 연구가 용이해졌다.

본 연구진은 상황버섯 균사체 배양 중 이 균사체가 alcohol dehydrogenase를 가지며 알코올을 생성하는 것을 발견하였다. 버섯의 자실체나 균사체에서 추출된 다당류는 면역을 강화시켜

질병예방 효과를 높일 뿐만 아니라 항암작용이 뛰어나 암의 예방과 치료에 기여한다^{2,3)}. 만약 상황버섯균사체를 이용한 발효주가 상황버섯 자실체 또는 균사체와 유사한 기능을 나타낸다면 다양한 파생 상품 개발이 가능하다.

상황버섯균사체를 이용한 발효주 (fermented rice wine using mycelium of *P. linteus*, FWPL)는 14%의 알코올을 포함하고 있어 알코올에 의한 간 및 위장의 장애를 예견할 수 있다. 버섯이 함유한 다당류는 항암효과 외에 각종 궤양성 동물 모델에서 항 궤양효과를 나타낸다⁴⁾. 아직 상황버섯이 위궤양에 미치는 효능에 대한 연구는 없다.

본 연구는 상황버섯균사체를 이용한 발효주를 흰쥐에 장기간 투여하였을 때 위에 나타나는 변화를 병리조직학적 관찰과 더불어 위점막 유지에 관련한 inducible nitric oxygenase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-1, COX-2 및 관련 염증성 단백질 발현에 대해 살펴보았다.

* 교신저자 : 최병태, 부산시 진구 양정2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8653

· 접수 : 2005/10/28 · 수정 : 2006/01/16 · 채택 : 2006/02/07

재료 및 방법

1. 상황버섯 균사체 발효주 (FWPL)

알코올 수득율을 높이기 위해 쌀을 기초로 한 배지를 사용하였으며 *Aspergillus oryzae*와 *P. linteus*의 균사체를 함께 배양하였다. 우선 *A. oryzae*를 1.2 kg의 멸균된 쌀에 접종하여 충분한 균체를 형성시킨 후 3 kg의 멸균된 쌀과 90 g의 *P. linteus* 균사체를 혼합하였으며, 이어 멸균한 물을 총 5 L가 되도록 부가하여 25°C에서 11일 간 발효시켰다. 이를 통해 얻은 발효주를 0.22 µm pore size를 가진 여과지로 여과하여 알코올 농도 14%의 주류를 얻었다.

2. 실험동물 및 처치

8 주된 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 효창 (주)로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였으며 기능성 규명을 위해 14% 알코올 농도의 발효주를 5 mL를 1일 2회 나누어 10일간 경구 투여하였다. 대조군으로 동일농도의 ethanol을 동일기간 투여하였다.

3. Western blot 분석

흰쥐를 10% chloral hydrate (350 mg/kg i.p.)로 마취하여 위를 적출하여 HEPES buffer (0.5% Triton X-100, 1 mM DTT, 5 mM sodium orthovanadate, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin and 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) 수세 후 동일 용액으로 마쇄하였다. 30분동안 4°C 14,000 rpm에서 원심 분리하여 세포내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 8-12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 실온에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 iNOS, COX-1, COX-2, tumor necrosis factor (TNF)-α, c-fos 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL (Enhanced ChemiLuminescence) 용액을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다.

4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

동일한 조건에서 준비된 위를 대상으로 RNAzol B를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 조사할 유전자들을 PCR방법으로 증폭시켰으며 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하였고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

5. 조직병리학적 및 면역조직화학적 검색

위를 절취하여 4% paraformaldehyde에 4°C 12시간 고정하여 순차적인 탈수와 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6 µm 연속절편을 얻었다. 위장의 조직병리학적 관찰을 위하여 연속절편을 탈 파라핀한 후 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff염색을 실시하였다. 면역조직화학적 관찰을 위해 탈파라핀한 후 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 95°C 5분간 처리하고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum (Vector Lab.)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 iNOS, COX-1 및 COX-2, 항체를 200:1로 희석하여 4°C 습실에서 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Lab.)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit (Vector Lab.)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit (Vector Lab.)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차항체 대신 10% BSA/PBS를 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

결과 및 논의

1. 위점막의 병리조직학적 관찰

육안적으로 ethanol을 투여한 대조군의 위는 장기간의 알코올 섭취로 인해 정상군에 비해 팽대되어 있었으며 일부 출혈성 궤양의 흔적이 관찰되었다. 정상군에서 정연한 자유표면상피세포와 소화상피세포를 볼 수 있었으나 대조군에서는 표면상피세포가 탈락되어 내강에서 관찰되었다. 또한 위점막의 울혈과 부종과 더불어 일부 위소와 및 위선이 손상된 출혈성 궤양이 관찰되었다(Table 1).

이에 비해 FWPL투여군은 미약한 병리학적 변화가 관찰되거나 정상군과 유사한 형태를 나타내었다. 위의 점액장벽을 관찰하기 위한 PAS반응에서 정상군의 정연한 상피세포에 강한 반응을 보인 반면 대조군의 궤양부위에서 손상된 상피세포에 미약한 반응을 보여 주었다. 이에 비해 FWPL투여군은 정상군과 유사한 반응을 보여 주었다 (Fig. 1).

Table 1. Histopathological findings for the effect of FWPL on the stomach of rat

| Group | Congestion | Edema | Hemorrhage | Necrosis |
|---------|------------|-------|------------|----------|
| Normal | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ethanol | ++ | ++ | + | + |
| FWPL | 0+ | 0+ | 0+ | 0+ |

0-+++ indicated relative intensity of the reaction: 0, no effect; +, mild effect; ++, appreciable effect; +++, severe effect.



Fig. 1. PAS reaction in the stomach of normal (A), ethanol-administrated (B) and FWPL-administrated rats (C). Note destructive surface epithelium of the stomach showing weak red color in ethanol-administrated rats compared with normal and FWPL-administrated rats. Scale bar = 50 µm

전통적으로 위궤양은 위점막내 방어인자와 공격인자의 불균형에 의해 형성되는 것으로 알려져 있다. 소화성궤양은 위산과 펩신복합체는 공격인자로 mucin-bicarbonate분비 점액층, 지질층 등은 방어인자로 보고 있다⁵⁾. Ethanol유발 위궤양모델에서 ethanol은 위점막에 대해 공격인자로 작용한다. 본 실험 결과에서 ethanol을 투여한 대조군에 비해 동일농도의 알코올을 가진 FWPL투여군이 울혈, 부종 및 출혈 등 병리학적 변화가 현저히 적어 ethanol에 의한 위장 손상이 적음을 알 수 있다.

점액세포에서 분비되며 당과 단백질 결합을 총칭하는 당단백질로 구성된 물질인 점액질은 위궤양 형성과정에 매우 중요한 인자로 위장관내 물리·화학적 보호, 유통작용, 세포막 근접 영역의 환경조성에 관여한다⁶⁾. 표면점액세포에서 점액질 장벽을 알아보기 위해 PAS반응을 실시한 결과 대조군은 표면상피의 점액세포가 매우 낮은 반응을 보인 반면 FWPL투여군은 정상군과 유사한 성상을 보여 방어인자로서 점액장벽이 유지됨을 알 수 있다.

2. 위점막의 iNOS 및 COX발현의 변화

Western blot분석에 의한 nitrix oxide (NO)형성에 관여하는 iNOS단백질은 ethanol투여에 의해 증가하는데 비해 FWPL투여 시에는 나타나지 않았다. Prostaglandins (PGs)생성에 관여하는 COX-1 및 COX-2발현도 ethanol투여에 의해 발현이 증가하나 COX-1에 비해 COX-2가 현저한 증가를 보였다. 이들 발현은 FWPL투여군에서 대조군보다 낮게 나타나며 COX-2가 더 낮게 나타났다. 출혈성 궤양에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있는 TNF- α 및 c-Fos 역시 ethanol처리에 의해 증가하나 FWPL투여군에는 관찰되지 않았다 (Fig. 2A).

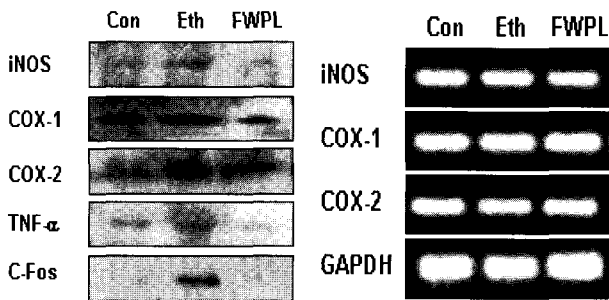


Fig. 2. Effects of ethanol and FWPL on the expression of iNOS, COX-1, COX-2, TNF- α and c-fos proteins (A) and mRNA (B) in rat stomach. Rats were administrated with 14% ethanol and FWPL (14% alcohol content) twice a day for 10 days and examined by Western blot and RT-PCR analysis.

그러나 RT-PCR을 통한 COX-1, COX-2의 mRNA발현을 비교해 보면 ethanol투여와 FWPL투여군 간의 차이를 보여 주지 않았다 (Fig. 2B). iNOS, COX-1 및 COX-2에 대한 면역조직화학적 검색에서 COX-1과 COX-2반응은 각 군에 따른 차이를 보여 주지 않았으나 iNOS반응은 표면과 위선상피의 점액세포에서 반응을 나타내나 ethanol을 투여한 대조군의 손상된 표면상피세포에서는 반응이 관찰되지 않았다. 이에 비해 FWPL투여군은 정상군과 유사한 반응을 보여 주었다 (Fig. 3).

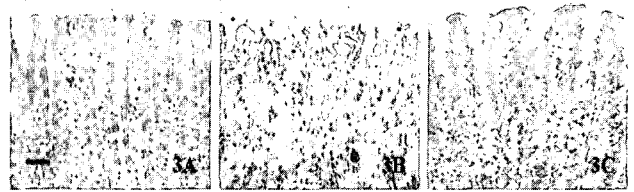


Fig. 3. iNOS immunoreaction in the stomach of normal (A), ethanol-administrated (B) and FWPL-administrated rats (C). Note a significant decreased immunoreaction in the ethanol-administrated group. Scale bar = 50 μ m

iNOS는 염증성 자극이 주어질 때 발현이 유도되며 L-arginine, O₂, NADPH-derived electron으로부터 L-citrulline, NADP, NO를 생성시키며 NO는 생체내 면역체계에서 활성산소종 또는 활성산소중간매개물로 작용하여 박테리아 등에 감염된 세포가 자체 방어기전을 나타낼 때 생성된다⁷⁾. 그러나 위장에서 NOS는 위점막 유지와 보호에 관여하는데 이는 주로 endothelial NOS (eNOS)이 관여하며 iNOS는 위보호 작용보다는 위손상과 관련 있다⁸⁾. 본 실험 결과 ethanol에 의해 iNOS발현의 증가를 보여 주고 있어 ethanol같은 공격인자에 의한 iNOS의 발현으로 볼 수 있으며 FWPL투여군의 발현이 되지 않는 것으로 보아 위장 손상이 적음을 알 수 있다. 그러나 면역조직화학적 반응에서 손상된 표면상피세포에서 반응이 감소하는데 이는 점액장벽의 손상에 의한 반응의 감소로 보여 진다.

염증관련 인자로 잘 알려진 PGs 중 PGE₂는 생리적으로 위장의 혈류량을 증가시키고 위산분비를 저해하여 위장관 점막보호와 위장관 점막 손상이나 궤양의 회복에 관여한다^{9,10)}. PGs는 COX에 의해 arachidonic acid로부터 형성되며 COX-1이 구조적 성분임에 비해 COX-2는 염증과 관련한 유도성 효소로 과도한 PGs형성에 관여한다¹¹⁾.

COX-1은 혈소관, 전립선 및 위장에서 현저히 발현되며 COX-2는 위장에서 보통 관찰되지 않으나 Helicobacter pylori 감염, 위궤양, 암형성, 스트레스에 노출될 때 증가한다^{9,10)}. 그리고 COX-2저해제 투여시 위궤양 회복이 저해되는 것으로 보아 위궤양회복에 관여한다¹²⁾. COX-1에 의해 생성되는 PGs는 위장 점막의 유지 등 일반적인 생리작용에 관여하며 COX-2에 의해 생성되는 PGs는 위장관 염증을 포함한 병리적 환경에서 기능을 한다¹³⁾. COX-1과 COX-2 모두를 저해하는 nonsteroidal anti-inflammatory drugs는 심한 위장 손상을 나타내나 선택적인 COX-2저해제는 손상이 경미하다. COX-1은 대조군에 비해 ethanol투여에 의해 증가하나 현저히 보이지 않으며 FWPL투여에 의해서도 유사한 발현을 보여 구조적 성분으로 COX-1의 발현으로 생리적 위장 점액장벽의 유지를 알 수 있다. COX-2의 발현은 ethanol투여에 의해 정상군에 비해 현저히 증가하는데 COX-2가 위궤양 수복에 관여하나 기본적으로 병리적 유발인자로 ethanol에 의한 위궤양 형성 과정에 유발되는 것으로 보여 진다. 이에 비해 FWPL투여군은 대조군에 비해 낮은 발현을 보여 위장 손상이 적음을 알 수 있다.

염증관련인자인 TNF- α 와 전사인자가 AP-1이며 c-jun의 활성화 및 밀접한 연관성을 가지는 c-fos의 발현 또한 ethanol투여에 의해 증가하였다. 이는 염증성 자극에 의해 TNF- α 가 생성되며¹⁴⁾, 스트레스 유발 위궤양에서 c-fos mRNA가 증가하는 보고¹⁵⁾와 일

치하고 있으며 FWPL투여군은 정상군과 유사한 발현을 보여 ethanol에 의한 위장 손상에 대한 보호 기능을 유추할 수 있다.

이상의 결과로 보아 동일한 농도의 ethanol을 장기간 투여한 군에 비해 FWPL을 투여한 군에서 보다 완화된 병리조직학적 소견과 더불어 점막 장벽의 유지에 관여하는 iNOS 및 COX의 발현이 저하되어 ethanol에 의해 가해지는 위장 손상이 FWPL투여에서 낮게 나타남을 알 수 있다. 이는 FWPL내에 동일 농도의 ethanol에 의한 위장 손상에 대해 보호 기능을 유효인자를 함유함을 유추할 수 있으며 이에 심도 있는 연구가 요구된다.

결 론

병리조직학적 소견을 보면 정연한 점막구조를 가진 정상군에 비해 ethanol을 투여한 대조군은 표면상피세포의 손상이 심하여 내강에서도 관찰되며 위점막의 현저한 울혈, 부종과 함께 일부 출혈성 궤양이 관찰되었다. 이에 비해 FWPL투여군은 미약한 병리학적 변화를 나타낼 뿐 정상군과 유사한 소견을 보여 주었다. Western blot분석에서 iNOS는 ethanol투여에 의해 증가하나 FWPL투여에서는 발현되지 않았다. COX발현은 ethanol투여에 의해 모두 증가하나 COX-1에 비해 COX-2의 발현이 현저하였으며 FWPL투여에 의한 COX-2발현도 대조군에 비해 현저히 낮았다. Ethanol투여에 의해 TNF- α 와 c-Fos발현이 유도되나 FWPL투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 이로 보아 FWPL에는 ethanol에 의한 위점막손상으로부터 보호 기능을 가진 성분이 함유할 가능성을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 (첨단기술개발분야) 연구비 지원에 의해 이루어 졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Nakamura, T., Matsugo, S., Uzuka, Y., Matsuo, S., Kawagishi, H. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 868-872, 2004.
2. Kim, S.H., Lee, H.S., Lee, S., Cho, J., Ze, K., Sung, J., Kim, Y.C. Mycelial culture of *Phellinus linteus* protects primary cultures rat hepatocytes against hepatotoxins. *J. Ethnopharmacol.* 95, 367-372, 2004.
3. Choi, Y.H., Huh, M.K., Ryu, C.H., Choi, B.T., Jeong, Y.K. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of *Phellinus linteus* in human neuroblastoma cells. *Int. J. Mol. Med.* 14, 227-232, 2004.
4. Gao, Y., Tang, W., Gao, H., Chan, E., Lan, J., Zhou, S. *Ganoderma lucidum* polysaccharide fractions accelerate

- healing of acetic acid-induced ulcers in rats. *J. Med. Food* 7, 417-421, 2004.
5. Goel, R.K., Bhattacharya, S.K. Gastroduodenal mucosal defence and mucosal protective agents. *Indian J. Exp. Biol.* 29, 701-714, 1991.
6. Neutra, M.R., Forstner, J.F. Gastrointestinal mucus, synthesis, secretion and function. In *Physiology of the gastrointestinal tract*, ed. Johnson LR, Raven Press, New York. pp. 975-1009, 1987.
7. Nathan, C.F., Xie, F. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269, 13725-13728, 1994.
8. West, S.D., Helmer, K.S., Chang, L.K., Cui, Y., Greeley, G.H., Mercer, D.W. Cholecystokinin secretagogue-induced gastroprotection: role of nitric oxide and blood flow. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G399-410, 2003.
9. Brzozowski, T., Konturek, P.C., Konturek, S.J., Schuppan, D., Drozdowicz, D., Kwiecien, S., Majka, J., Nakamura, T., Hahn, E. Effect of local application of growth factors on gastric ulcer healing and mucosal expression of cyclooxygenase-1 and -2. *Digestion* 64, 15-29, 2001.
10. Konturek, P.C., Brzozowski, T., Kwiecien, S., Drozdowicz, D., Harsch, I.A., Meixner, H., Stachura, J., Hahn, E.G., Konturek, S.J., Effect of *Helicobacter pylori* on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 451, 191-202, 2002.
11. Peleg, I.I., Wilcox, C.M. Role of eicosanoids, cyclooxygenases, and nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal tumorigenesis and chemoprevention. *J. Clin. Gastroenterol.* 34, 117-125, 2002.
12. Tsuji, S., Sun, W.H., Tsujii, M., Kawai, N., Kimura, A., Kakiuchi, Y., Yasumaru, S., Komori, M., Murata, H., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M. Lansoprazole induces mucosal protection through gastrin receptor-dependent up-regulation of cyclooxygenase-2 in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 1301-1308, 2002.
13. Komori, M., Tsuji, S., Sun, W.H., Tsujii, M., Kawai, N., Yasumaru, M., Kakiuchi, Y., Kimura, A., Sasaki, Y., Higashiyama, S., Kawano, S., Hori, M. Gastrin enhances gastric mucosal integrity through cyclooxygenase-2 upregulation in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G1368-1378, 2002.
14. Menon, R., Lombardi, S.J., Fortunato, S.J. TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 19, 201-204, 2001.
15. Wang, J.Y., Johnson, L.R. Expression of protooncogenes c-fos and c-myc in healing of gastric mucosal stress ulcers. *Am. J. Physiol.* 266, G878-886, 1994.