

# 영지버섯의 항산화 효능과 암세포 성장저해도

조재한<sup>1\*</sup>, 노형준<sup>2</sup>, 강돈호<sup>1</sup>, 이지영<sup>1</sup>, 이민정<sup>1</sup>, 박혜성<sup>1</sup>, 성기호<sup>1</sup>, 전창성<sup>1</sup>

<sup>1</sup>국립원예특작과학원 버섯과, <sup>2</sup>국립원예특작과학원 인삼특작이용팀

## Antioxidant activity and Cancer cell growth inhibition of *Ganoderma lucidum*

Jae-Han Cho<sup>1\*</sup>, Hyung-Jun Noh<sup>2</sup>, Don-Ho Kang<sup>1</sup>, Jee-Young Lee<sup>1</sup>, Min-Jung Lee<sup>1</sup>, Hye-Sung Park<sup>1</sup>,  
Gi-Ho Sung<sup>1</sup> and Chang-Sung Jhune<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA Chungbuk Eumseong 369-873, Korea

<sup>2</sup>Division of Herbal Crop Utilization Research, RDA Chungbuk Eumseong 369-873, Korea

(Received November 5, 2012, Revised November 12, 2012, Accepted November 18, 2012)

**ABSTRACT:** The fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* extracted by water and ethanol extraction. we are analyzed antioxidant effects and cancer cell growth inhibition rate. ASI 7004, 7014 was higher antioxidant effects than Trolox, BHA as control. Generally, the rest of strains was higher antioxidant effects than ABTs as control. Water extracts and ethanol extracts was treated to the Liver cancer cell(HepG2) and stomach cancer cell(AGS). Inhibition activities of Liver cancer cell(HepG2) is a high in D.W. extracts of ASI 7002, 7011, 7014, 7020. Inhibition activities of Liver cancer cell(HepG2) is a high in EtoH extracts of ASI 7011, 7019. Inhibition activities of Stomach cancer cell(AGS) is a high in D.W. extracts of ASI 7001, 7002, 7019, 7020. Inhibition activities of Stomach cancer cell(AGS) is a high in EtoH extracts of ASI 7001, 7002

**KEYWORDS :** DPPH, *Ganoderma lucidum*, MTT assay

## 서론

식품은 항산화, 항암, 항염증, 항당뇨, 항고혈압, 항바이러스 등 여러 가지 기능성을 지닌 다양한 물질들을 포함하고 있으며, 항암 물질의 경우 암세포에 직접 작용하는 화학적 합성 치료제와는 달리 독성이 적어 인체에 악영향을 주지 않는다는 점에서 천연소재로부터의 물질 분리와 그 기능성 연구에 대한 중요성이 부각되고 있다(Moon 등, 1996). 버섯은 이러한 기능성 식품 소재 중 하나로써, 분류학상 진균류에 속하며 담자균과 자낭균종의 고등균류이다. 다양한 약리학적 성분 때문에 식용과 약용으로 널리 이용되고 있으며 그 중에서도 버섯의 항암효과는 버섯에 다량 포함 되어있는  $\beta$ -1,3-D-glucan에 의한 종양 억제작용으로 동물실험 임상연구를 통해 확인되었다(Park 등, 1998). 버섯은 식품적 가치가 우수하고 독특한 향과 맛을 지니고 있다(Chang과 Miles, 1989) 이미 고대로부터 식용뿐만 아니라 약용으로도 사용되어져 왔으며, 기능성 식품을 섭취하여 질병의 예방을 계획하고 건강한 생명활동을 즐기는 것에 초점이 맞춰지고 있다. 건강에 대한 관심이 증가하는 이런 추세에서 사회적으로 이슈가 되고 있는 기능성 식품으로 버섯을 꼽을 수가 있다.

식용버섯인 팽이, 표고, 새송이, 양송이 등도 기능성 성분

이 밝혀짐에 따라 더욱더 버섯에 대한 관심이 급증하고 있다. 더불어 약용버섯인 영지, 상황버섯의 기능성 성분은 더 많은 연구가 이루어지고 있다. 최근에는 각종 버섯의 항염활성과 관련된 약리학적 활성에 관한 연구(Kim 등, 2004)도 보고되었다. 따라서 본 연구는 약용버섯인 영지버섯의 항산화 효능과 각종 암세포에 대한 생장 저해도를 측정하여 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주 및 세포주와 실험재료

실험에 사용된 영지버섯균주는 Table 1과 같이 농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과에 보존되어 있는 ASI (Agricultural Sciences Institute) 균주 중 8종을 경기도 수원 에 위치한 농촌진흥청 재배사에서 재배하였다. 재배법은 영지버섯 및 상황버섯의 표준재배법에 따라 참나무 원목에 재배하여 자실체를 수확한 후, 자실체 중량이 20배의 D.W로 50℃에서 24시간 침지 후, 농축하여 열수 추출물을 만들었고, 70% EtoH를 이용하여 24시간 실온에서 추출 후, 농축하여 주정 추출물을 만들어 감압 농축하였다.

암 세포주는 Table 2와 같이 총 2가지 세포주를 사용하였다. AGS 세포는 Human stomach cancer cell line이며,

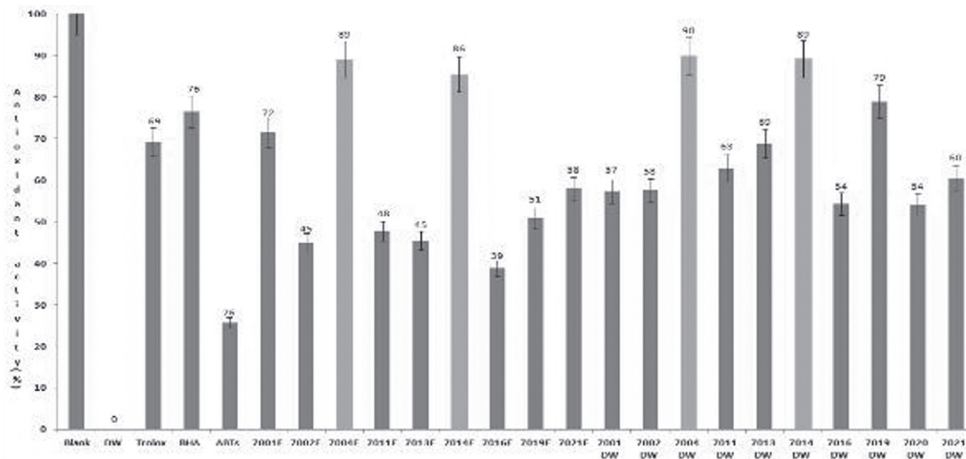
\* Corresponding author <limitcho@korea.kr>

**Table 1.** Tested *Ganoderma* strains

ASI No.	Scientific name	Collection year	Country
7001	<i>Ganoderma lucidum</i>	1982	Japan
7002	<i>Ganoderma lucidum</i>	1980	Korea
7004	<i>Ganoderma lucidum</i>	1985	Korea
7011	<i>Ganoderma lucidum</i>	1984	Japan
7014	<i>Ganoderma lucidum</i>	1984	Korea
7016	<i>Ganoderma lucidum</i>	1984	Korea
7019	<i>Ganoderma lucidum</i>	1985	Japan
7021	<i>Ganoderma lucidum</i>	1985	Korea

**Table 2.** Cancer cell line

NAME	Hystopathology	Source	Species
AGS	Adenocarcinoma	stomach	human
HepG2	Carcinoma	liver	human



**Fig. 1.** Evaluate the antioxidant effects of hot water extracts and EtoH extracts ASI 7004, 7014 was showed that high antioxidant effects

HepG2 세포는 Human liver cancer cell line으로 한국 세포주 은행(KCLB)에서 분양 받아 실험에 사용하였다.(Table 1, Table2)

**세포배양**

AGS 세포의 배양은 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin을 함유하는 RPMI(+25mM HEPES) 배지를 사용하였다. HepG2 세포와 RAW 264.7 세포의 배양은 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin을 함유하는 RPMI 배지를 사용하였다. 세포는 culture dish에 80~90% 증식 하였을 때,

trypsin처리 후 1,000rpm에서 5분간 원심분리 하여 회수하고 1/10을 계대하는데 사용하였다.

**전자공여능(DPPH) 측정**

DPPH radical에 대한 소거활성은 Blois(1958)의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 시료 0.5 mL에 60 μM DPPH 3 mL를 넣고 vortex한 후 15분 동안 실온의 명반응조건에서 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(%)은 다음 식으로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = [1 - (\text{sample O.D} / \text{control O.D})] \times 100$$

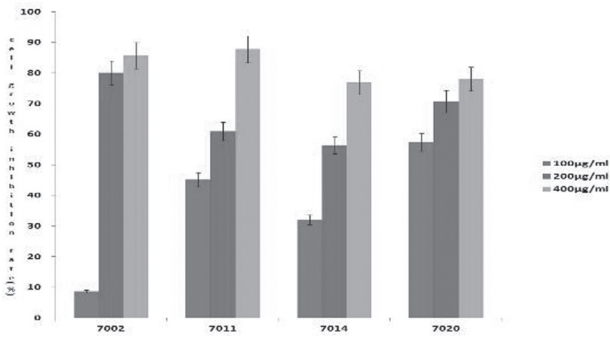


Fig. 2. Liver cancer cell(HepG2) inhibition activities of D.W. extracts. Concentration of cancer cells was  $1 \times 10^5$ cells/ml. The data presented the mean values  $\pm$  standard deviation of three independent.

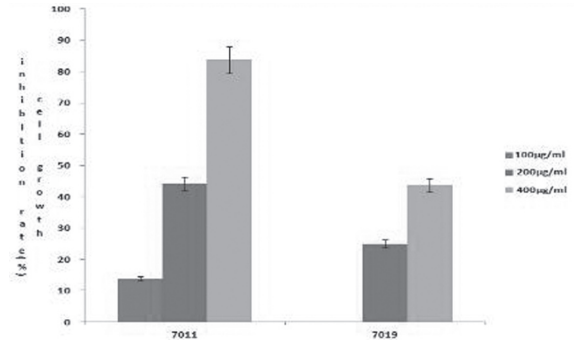


Fig. 3. Liver cancer cell(HepG2) inhibition activities of EtoH extracts. Concentration of cancer cells was  $1 \times 10^5$ cells/ml. The data presented the mean values  $\pm$  standard deviation of three independent.

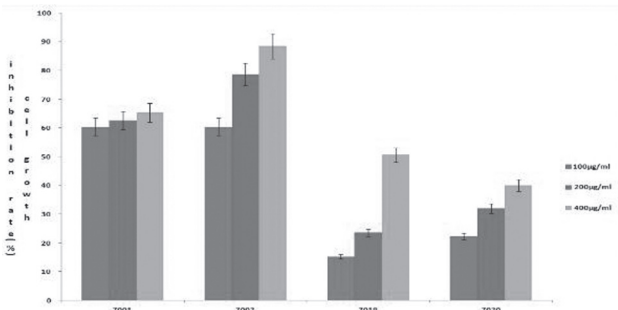


Fig. 4. Stomach cancer cell(AGS) inhibition activities of D.W. extracts. Concentration of cancer cells was  $1 \times 10^5$ cells/ml. The data presented the mean values  $\pm$  standard deviation of three independent.

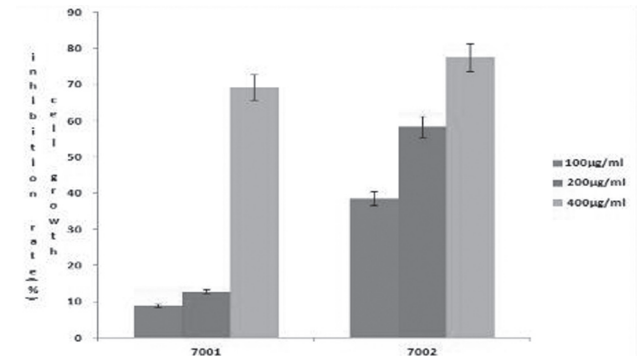


Fig. 5. Stomach cancer cell(AGS) inhibition activities of EtoH extracts. Concentration of cancer cells was  $1 \times 10^5$ cells/ml. The data presented the mean values  $\pm$  standard deviation of three independent.

**세포생존율검사 (MTT assay)**

MTT(3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay는 살아 있는 암세포 내의 탈 수소 효소작용을 이용하여, 항암 활성을 지닌 화합물을 처리 하였을 때, 세포의 사멸 또는 증식 억제 정도를 결정하는 방법이다. 노란색의 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide인 MTT는 살아있는 세포 내 Mitochondria formazan crystal로 환원되어 청자색을 띠고, 이를 DMSO로 녹여서 생성된 formazan crystal의 양을 흡광도 측정한다. 세포는 모두  $1 \times 10^6$ cells/ml의 농도로 96 well plate에 분주 한 후 16 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 배양하였다. 핑이버섯 자실체의 fraction sample을 배지 volume 1% 이내의 solvent에 1mg/ml로 조제하여 처리하고 24시간 동안 배양 하였다. sample이 포함 된 배지를 모두 제거하고, 1mg/ml 의 MTT solution을 100µl씩 분주하였다. plate는 은박지로 빛을 차단한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 배양 하였다. MTT formazan crystal이 생성되면 배지를 100µl

96well plate에 옮겨 분주하여 NO Assay를 측정한다. MTT formazan crystal이 생성된 96well plate에 DMSO를 100 µl씩 처리하여 incubator에서 10분간 완전히 용해시킨 후 ELISA plate reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 후 세포의 사멸, 증식 억제 정도를 control에 대한 백분율로 계산하였다.

$$Concentration(\%) = 1 - \left( \frac{O.D(Sample)}{O.D(Control)} \right) \times 100$$

**결과 및 고찰**

**전자공여능(DPPH) 측정**

약용버섯으로 알려져 있는 영지버섯의 균주별 항산화 효능이 다를 것으로 생각되어 각각의 영지버섯 자실체를 열수 추출물과 주정 추출물로 나뉘서 항산화 효능을 실시한 결과, 대조군인 Trolox, BHA보다 높은 항산화 활성을 보인 것은

ASI 7004, 7014이며, 이 두 균주는 열수추출물에서는 89%, 86%이었으며, 주정 추출물에서는 90%, 89%의 높은 항산화 활성을 나타냈다. 다른 균주는 대조군인 ABTs보다 대체적으로 높은 활성을 보였다. 이 실험을 통해서 용매별로 영지버섯 균주마다 추출되어지는 성분이 다르기 때문에 항산화 효능이 다르게 나타나는 것으로 사료된다. 좀더 다양한 용매를 이용하고, 여러 분획을 얻어서 실험을 진행할 필요성이 있다고 생각된다(Fig. 1).

### 간암세포(HepG2) 성장 저해도

영지버섯의 자실체를 열수 추출물과 주정 추출물로 나눠서 간암세포인 HepG2에 농도별로(100, 200, 400 $\mu$ g/ml) 처리하여, 세포 성장 저해도(MTT assay)를 측정한 결과, 열수 추출물에서는 ASI 7002, 7011, 7014, 7020이 각각 400 $\mu$ g/ml를 처리하였을때 80%가 넘는 세포성장 저해도를 보였으며, 이는 농도 의존적으로 간암세포의 성장을 저해하는 것을 알 수 있었다. 또한 주정 추출물에서는 ASI 7011, 7019가 농도 의존적으로 간암세포 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 좀더 다양한 용매를 이용하여, 용매 극성별 분획을 얻어서 실험을 진행할 필요성이 있다고 생각된다(Fig. 2, Fig. 3).

### 위암세포(AGS) 성장 저해도

영지버섯의 자실체를 열수 추출물과 주정 추출물로 나눠서 위암세포인 AGS에 농도별로(100, 200, 400 $\mu$ g/ml) 처리하여, 세포 성장 저해도(MTT assay)를 측정한 결과, 열수 추출물에서는 ASI 7001, 7002, 7019, 7020이 농도 의존적으로 위암세포의 성장을 저해하는 것을 알 수 있었다. 특히 ASI7002는 다른 균주보다 아주 높은 90%의 세포 성장 저해도를 보였다. 또한 주정 추출물에서는 ASI 7001, 7002가 농도 의존적으로 위암세포 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 좀더 다양한 용매를 이용하여, 용매 극성별 분획을 얻어서 실험을 진행할 필요성이 있다고 생각된다(Fig. 4, Fig. 5).

## 적 요

영지버섯 자실체를 열수추출과 주정추출을 하여 항산화 효능 및 간암 및 위암세포의 성장 저해도를 분석하였다. 항산화 효능을 실시한 결과, 대조군인 Trolox, BHA보다 높은 항산화 효능을 보인 것은 ASI 7004, 7014이며, 이 두 균주는 열수추출물과 주정 추출물에서 모두 높은 항산화 효능을 나타냈다. 나머지 균주는 대조군인 ABTs보다 대체적으로 높은 효능을 보였다. 또한 암세포 성장저해도를 알아보기 위해서 열수, 주정 추출물을 간암세포인 HepG2에 농도별로(100, 200, 400 $\mu$ g/ml) 처리하여, 세포 성장 저해도(MTT assay)

를 측정한 결과, 열수 추출물에서는 ASI 7002, 7011, 7014, 7020이 농도 의존적으로 간암세포의 성장을 저해하는 것을 알 수 있었다. 또한 주정 추출물에서는 ASI 7011, 7019가 농도 의존적으로 간암세포 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 위암세포인 AGS에 농도별로(100, 200, 400 $\mu$ g/ml) 처리하여, 세포 성장 저해도(MTT assay)를 측정한 결과, 열수 추출물에서는 ASI 7001, 7002, 7019, 7020이 농도 의존적으로 위암세포의 성장을 저해하는 것을 알 수 있었다. 또한 주정 추출물에서는 ASI 7001, 7002가 농도 의존적으로 위암세포 성장을 저해하는 것으로 나타났다.

## 참고문헌

- 강창울, 심미자, 최응철, 이영남, 김병각. 1981. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구-만년 버섯의 균사 배양 및 항암성분. 한국생화학회지. 14(2):101-112.
- 김병각, 정희수, 정경수, 양문식. 1980. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. 한국균학회지. 8(2):107-113.
- 김성환, 김을상, 김영식. 1995. 영지에서 분리한 항암성 다당체에 관한 연구. J Korea Soc Food Nutr. 24(1):147-153.
- 황유연, 정명수, 김혜자, 이기남. 2007. 미생물 발효 영지버섯 추출액의 다당체에 관한 연구. 21(6):1506-1512.
- Agrawal, R. C. and T. Beohar. 2010. Chemopreventive and anticarcinogenic effects of Momordica charantia extract. AsianPac. J. Cancer Prev. 11, 371-375.
- Astrup, T. and S. Mullertz. 1991. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys. 40,346-351.
- Ali, K.A., M. Abdelhak, B. George and K. Panagiotis. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic propolis. Food. Chem. 89:27-36.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. Nature 26:1198-1199.
- Boo, H.O., S.J. Hwang, C.S. Bae, S.H. Park and W.S. Song. 2011. Antioxidant activity according to each kind of natural plant pigment. Korean J. Plant Res. 24:105-112 (in Korean).
- Bidlack, W. R. and A. L. Tappel. 1973. Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. Lipids 8, 177-178.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 26, 1199-1204.

- Cabanes, J., S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 982–985.
- Cha, J. Y., B. S. Jeon, J. W. Park, G. G. Shin, B. K. Kim, H. K. Kim, and Y. S. Cho. 2004. Hypoglycemic effect of mushroom fermented milk in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Life Sci.* 14, 676–682.
- Cha, J. Y., Y. T. Kim, H. S. Kim, and Y. S. Cho. 2008. Antihyperglycemic effect of stem bark powder from paper mulberry (*Broussonetia kazinoki* Sieb.) in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *J. Med. Food* 11, 499–505.
- Cha, J. Y., H. Y. Ahn, K. E. Eom, B. K. Park, B. S. Jun, and Y. S. Cho. 2009. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. *J. Life Sci.* 19, 652–658.
- Cha, J. Y., Y. S. Kim, H. Y. Ahn, K. E. Eom, B. K. Park, and Y. S. Cho. 2009. Biological activity of fermented silkworm powder. *J. Life Sci.* 19, 1468–1477.