

Effect of *Flammulina velutipes* Extracts Cultivated with Oriental Herbal Plants on the Activation of Immune Cells

Jong-Jin Kim¹, Sang-Won Lee⁴, Kyung-Wuk Park⁵, Kwon-Il Seo² and Sung-Tae Yee^{1,3*}

¹Department of Biology, ²Department of Food and Nutrition, College of Life Science and Natural Resources, ³Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

⁴Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

⁵S&J Bio Co., Ltd, 303 Business Incubator, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

Received April 4, 2012 / Revised April 28, 2012 / Accepted May 25, 2012

The objective of the current study was to determine the effects of the extracts isolated from the fruit body of *Flammulina velutipes* cultivated with oriental herbal plants on mouse splenocytes, B cells, and macrophages *in vitro*. The ethanol extracts B (EEB) directly induced the proliferation of spleen cells in a dose-dependent manner and increased IL-6, TNF- α , and IFN- γ synthesis. The EEB also increased the proliferation of B cells in a dose-dependent manner. The production of immunoglobulin M, G1, G2a, G2b, and IgG3 in the presence of the EEB increased progressively in the culture supernatant. When the EEB were used in macrophage cell line (RAW264.7) stimulation, there was a marked induction of NO synthesis in a dose-dependent manner and an increased IL-6, TNF- α , and GM-CSF synthesis. Intraperitoneal injection with EEB showed life prolongation effect of 16.1% in mice previously inoculated with sarcoma-180, respectively. These results suggest that the capacity of the EEB isolated from the fruit body of *Flammulina velutipes* cultivated with oriental herbal plants seems to act as a potent immunomodulator causing augmentation of immune cell activity, and with the absence of notable side-effects, *Flammulina velutipes* EEB could be used as a biological response modifier having possible therapeutic effects against immunological disorders. This study also showed that functional components of *Flammulina velutipes* were possibly improved by incorporating oriental herbal plants in a growth medium.

Key words : *Flammulina velutipes*, spleen cells, B cells, macrophage, oriental herbal plants

서 론

버섯은 향기와 맛이 우수하며, 생체기능조절, 심장병 및 당뇨병 등과 같은 성인병의 개선 및 예방 효과뿐만 아니라, 암 등의 치료 및 억제효과가 뛰어나다고 알려져 있다[1]. 일반적으로 버섯에서 추출한 다당체는 유방암이나 대장암의 증식을 억제하는 등 항암효과가 우수하며, 면역기능 증강효과도 우수하다고 보고되어 있다[1,2]. 팽이버섯은 식용버섯의 일종으로 팽나무의 고목에서 기생하여 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*)이라고도 불리며, 담자균류의 주름버섯목(Agaricales) 송이과(Tricholomataceae)에 속하며 표면 점성이 강한 백색 부패균 중 하나로서, 일본에서 상업생산을 시작한 이래 생산과 소비가 확대되고 있다[5].

최근 버섯의 항암효과 및 다양한 면역기능 증강효과가 보고되고 있는데, 즉 매미눈꽃동충하초(*Paeclomyces sinclairii*)[24], 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)[25], 흰목이(*Tremella fuciformis*)[23], 팽나무버섯(*Armillaria mellea*)[12], 금목이(*Tremella*

aurantialba)[15], 장미무당버섯(*Russula rosacea*)[3], 대항고(*Lentinus giganteus*)[16] 등에서 추출한 추출물의 생쥐 복강에 투여한 복수암세포주(Sarcoma-180)에 대한 수명연장 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 특히 팽이버섯은 활성산소에 의한 흰쥐 뇌조직의 지질산화에 대해 식용식물체 68종을 대상으로 한 실험에서 버섯류 중에서 가장 높은 억제효과를 나타내었고[13], 또한 사람의 말초혈액에서 분리한 단핵구를 마이토젠으로 자극할 때 팽이버섯 추출물을 함께 첨가하면 INF- γ 생산을 억제하거나, IL-12 생산을 증가시킴으로써 면역기능 조절 효과도 우수한 것으로 나타났으며[8], 팽이버섯의 β -(1 \rightarrow 3)-D-linked glucose는 B16 흑색종에 대해 암 발생을 억제하였다[21].

팽이버섯의 생산량은 매년 증가하는 추세이지만, 여전히 버섯배지의 주재료인 톱밥 및 콘코프 등은 전량 수입에 의존하고 있는 실정이며, 원자재 가격의 지속적인 상승으로 버섯업계에서 생산비 부담을 가중시킬 뿐만 아니라 외화유출을 초래하고 있는 실정이다. 최근에는 배지에 기능성 성분을 첨가하여 배양함으로써, 버섯이 그 기능성 성분을 흡수한 기능성 버섯을 생산하는 다양한 시도가 이루어지고 있다. 즉 버섯의 성장에 미치는 효과에 대해 NaCl [9] 또는 일본잎갈나무재의 수용성 추출물[4]을 첨가한 배지를 이용하는 연구, 무기물인 칼슘

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3752, Fax : +82-61-750-3708

E-mail : sungtae@sunchon.ac.kr

[19] 또는 셀레늄[20]을 첨가하여 사실체로 이행하도록 하는 연구, 녹차분말 또는 녹차카테킨을 배지에 첨가하여 사실체로의 이행 정도와 수확량, 경도, 향기 등을 조사한 연구[18]도 보고되고 있다. 한편, 동양 의학에서 사용되는 황금, 가시오가피, 두충, 왜당귀, 천궁, 황기 등의 수많은 한약재는 탄수화물, 지방, 단백질을 비롯하여 알칼로이드(alkaloid)계, 테르페노이드(terpenoid)계, 카로티노이드(carotenoid)계, 비타민류, 스테로이드(steroid)계, 플라보노이드(flavonoid)계, 항생물질 등 여러 가지의 생리활성물질을 함유하고 있다. 따라서, 예로부터 한약재는 생체 내 적응과 방어 기작의 유지 및 작용을 위하여 한약 엑기스 형태로 이용되고 있다. 그런데, 이들 한약재를 한약 엑기스 형태로 제조한 후 남은 폐한방슬러지는 년 평균 10,000톤 이상 발생되고 있으나 거의 대부분이 쓰레기 소각장으로 보내는 실정이며, 부분적으로만 퇴비회사나 사료공장에서 이용하고 있을 뿐, 이를 체계적으로 활용하는 곳은 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구자들은 버려지는 폐한방슬러지의 활용 방안을 연구하던 중, 버섯의 재배를 위한 배지에 이용하는 경우 폐한방슬러지에 함유되어 있는 영양성분들에 의하여 버섯의 성장이 증가할 뿐만 아니라, 특히 버섯의 면역증강 활성 및 종양 억제 효과가 더욱 증가됨을 발견하고 본 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 대한실험동물센터에서 특정병원체부재(specific pathogen free) C57BL/6와 ICR 생쥐를 공급받아 실험동물 사육실에서 폴리카보네이트 사육 상자(18×20 cm)당 6개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 이들 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 생쥐는 2주일간 실온에서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 생후 8-12주 된 암컷을 사용하였다.

공시균주 및 팽이버섯 재배 조건

팽이버섯 균주는 경북 청도군 소재의 (주)그린피스 팽이버섯 재배농장의 실험실에 보관 중인 *Flammulina velutipes* Fv1-5를 분양받아 PDA (potato dextrose agar) 평판배지에 배양하여 4℃ 냉장 보존하면서 사용하였다. 시내의 한의원 등에서 수거한 폐 한방슬러지는 자연 건조시켜 저온창고에 보관해 두면서 사용할 때 80 mesh로 분쇄하여 사용하였다. 폐 한방슬러지가 첨가된 배지를 이용한 팽이버섯의 재배시험은 (주)그린피스의 팽이버섯 재배동에서 직접 수행하였다. 팽이버섯의 재배는 1,100 ml 버섯 재배용 병을 사용하였고, 대조구의 성분은 콘코프 49% (w/w), 미강 39% (w/w), 밀기울 7% (w/w) 및 폐화석 5% (w/w)를 잘 혼합하여 함유율은 66.7%, pH 6.68로 조정하여 사용하였다. 시험구인 폐 한방슬러지 첨가배지는 대조구

배지성분 중에서 콘코프의 첨가량을 10% (w/w) 줄인 대신 폐 한방슬러지를 10% (w/w) 첨가하고 그 외의 배지조성 및 조건은 동일하게 제조하였다.

실험재료

팽이버섯 A, B, C는 재배방법을 달리한 것으로 A는 기본배지+미강(10%)으로, B는 기본배지+폐 한방슬러지(10%)로, 그리고 C는 기본배지+미강(10%)+폐 한방슬러지(10%)로 각각 재배한 것이다. 세 종류의 팽이버섯(3 kg)을 추출하기 위해 70% 에탄올 18 l를 사용하여 80℃에서 환류냉각장치로 3시간 동안 2회 추출하였다. 그리고 팽이버섯 추출물을 2로 감압농축한 후 오픈 칼럼(HP-20)을 이용하여 1차로 물추출물을 통해 배양체 물질을 분리하였으며, 2차로 에탄올 95%를 사용하여 나머지 여액을 추출하였다. 최종 추출물을 다시 감압농축하였으며, 추출한 팽이버섯 물 추출물은 인산식염수(PBS)에 현탁하여 0.2 μm 필터로 무균처리한 후 사용하였고, 팽이버섯 에탄올 추출물은 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 현탁하여 사용하였다. 모든 추출물은 110℃에서 충분히 건조시킨 후 건조중량을 측정하여 사용하였다.

사용시약

세포배양에 필요한 배지 RPMI 1640과 배지에 첨가하여 항생제(antibiotic-antimycotic), fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, sodium bicarbonate (NaHCO₃), 2-mercaptoethanol (2-ME), sulfanilamide, N-1-naphthyl-ethylen-diamine은 Sigma (St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 또한 세포증식을 측정하는데 사용한 시약(Cell Counting Kit-8)은 DOJINDO (Japan) 제품을 사용하였고, cytokine 측정에 필요한 항체는 Pharmingen (San Diego, USA) 제품을 사용하였다.

비장세포 분리

면역세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 생쥐의 비장세포를 이용하였다. 생쥐를 경추탈골로 희생시킨 뒤 비장을 무균적으로 분리하여 핀셋을 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI 1640 배양액으로 3회 원심 침전하여 세척한 다음, 10% FBS-RPMI 1640 배지로 5×10⁶ cells/ml 농도가 되게 희석한 후 96 well plate에 well당 100 μl씩 첨가하였다. 이때, 실험재료를 농도별로 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양한 다음 세포증식을 측정하였다.

B세포 분리법

B세포는 비장세포 부유액을 10 ml의 10% FBS-RPMI 1640에 희석한 후에 anti-Thy1.2 mAb ascites를 40 μl 넣고 4℃에서 60분간 incubation하였다. 그 후 rabbit complement를 첨가하여 37℃ water bath에서 45분간 incubation하여 T세포를 제거

하였다. 그 다음 Sephadex G-10 column을 이용하여 나머지 부착세포를 제거하고 B세포를 순수분리하였다.

세포증식 측정법

세포증식 측정은 분리한 비장세포 또는 B세포를 96 well plate에 넣고 여기에 추출물을 농도별로 넣어 배양한 다음 증식정도를 측정하였다. 즉 세포배양 well에 Cell Counting Kit-8 (DOJINDO, Japan)을 10 μ l 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에 4~8시간 동안 배양한 다음 Microplate reader (Titertek Multiscan Plus, Finland)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사이토카인 측정법

추출물, Con A 또는 LPS를 배양세포에 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 IL-6, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF의 양을 측정하였다. 즉 일차 항체를 coating buffer (0.1 M NaHCO₃)에 희석하여 plate에 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 다음 washing 용액(0.05% Tween 20/PBS)으로 세척한 다음, 소 혈청이 포함된 인산완충액(10% FBS/PBS)으로 blocking한 후 배양 상층액을 적절하게 희석하여 첨가한 다음, biotin과 결합한 이차 항체를 첨가하였다. 일정한 시간 후에 avidin-peroxidase를 첨가하고, 기질(2, 2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H₂O₂)을 넣어 발색시키는 효소항체법 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 이용해 Microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 각 cytokine의 측정 한계치는 10 pg/ml이었다.

면역글로블린 농도 측정

비장세포에서 분리한 B세포에 추출물 또는 LPS를 첨가하여 48시간 배양한 배양액 내의 IgM, G1, G2a, G2b, G3 농도를 효소항체법을 이용해 측정하였다.

일산화질소 측정

안정된 일산화질소 산화물인 NO₂⁻ (nitrite)는 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. 대식세포주(RAW264.7)를 추출물 또는 LPS와 함께 48시간 배양한 후 배양 상층액을 96 well plate에 100 μ l씩 넣고 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylendiamine in H₂O : 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, Microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 64 μ M에서 0.5 μ M 까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

복수암에 대한 종양억제 효과측정

복수암세포주 Sarcoma-180을 생리식염수에 5 \times 10⁶ cells/ml 이 되도록 부유시켜 생쥐 한 마리 당 0.3 ml (1 \times 10⁶ cells/

mouse) 씩 복강에 이식하여 복수암을 유발시키고, 24시간 후에 100 mg/kg body weight 농도의 에탄올 추출물 B를 생리식염수에 용해시켜 7일간 매일 1회 복강 내에 0.2 ml 씩 투여하였다. 대조군은 같은 기간 동안 동량의 생리식염수를 투여하였으며, 항종양 효과는 복수암세포주 이식 후 35일까지 관찰하여 평균 수명 일수(MST)를 계산하고 아래 식으로 연명률(ILS : increase of life span)로 평가하였다.

$$ILS = [(T-C)/C] \times 100$$

C: 대조군의 평균 수명(일)

T: 실험군의 평균 수명(일)

결과 및 고찰

비장세포의 증식반응

비장세포의 증식반응에 대한 효과를 알아보기 위하여 생쥐에서 분리한 비장세포에 팽이버섯 추출물을 농도별로 첨가하여 72시간 배양한 후에 증식반응을 측정하였다. 그 결과 B세포의 증식을 특이적으로 유도하는 LPS (lipopolysaccharide)와 T세포의 증식을 특이적으로 유도하는 Con A (concanavalin A)에 의해서 비장세포는 높은 증식반응이 일어나는 것을 확인할 수 있었고, 팽이버섯 물 추출물을 첨가하였을 때 저농도에서는 비장세포의 증식을 확인할 수 없었으나, 고농도인 100, 300 μ g/ml에서는 무처리 대조군에 비해 증식반응이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 즉 물 추출물 C와 에탄올 추출물 B에서 최대농도(300 μ g/ml)에서 최대 증식반응이 일어나는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 뽕나무버섯불이[17], 장미무당버섯[3], 대항고[16], 금목이[15], 큰느타리버섯[10]의 추출물이 비장세포의 증식반응을 유도하는 결과와 일치한다. 그러나 에탄올 추출물 A, C에서 고농도인 300 μ g/ml에서 대조군보다 증식반응이 낮은 것을 확인할 수 있는데 이는 에탄올 추출물의 세포독성이라기보다 용해하기 위해 사용한 DMSO의 독성에 의한 것으로 생각된다.

비장세포의 사이토카인 생산

비장세포 중에서 B세포의 증식을 유도하는 LPS로 자극하였을 때, 대조군에 비해 많은 양의 IL-6, TNF- α , IFN- γ 를 생산하였다(Fig. 2). 물 추출물로 자극하였을 때 소량의 IL-6, TNF- α , IFN- γ 를 생산하였지만 에탄올 추출물 B에서 IL-6는 약 27.3배, TNF- α 는 약 33배, IFN- γ 는 약 15.5배 정도 많은 양을 생산하였다. 그러나 IL-2는 무처리 대조군과 같이 분비가 유도되지 않았다(data not shown). T세포가 분비하는 사이토카인 IL-2는 항원 자극에 대해 적응면역반응에 관여하는 보조 T세포와 세포독성 T세포의 증식을 유도하는 역할을 하는 사이토카인으로 알려져 있다[7]. 그리고 IFN- γ 는 내재면역반응에 관여하는 대식세포를 활성화시키는 중요한 역할을 하는 사이토카인이다[6]. 이상의 결과 팽이버섯 물 추출물은 비장세포 중에서

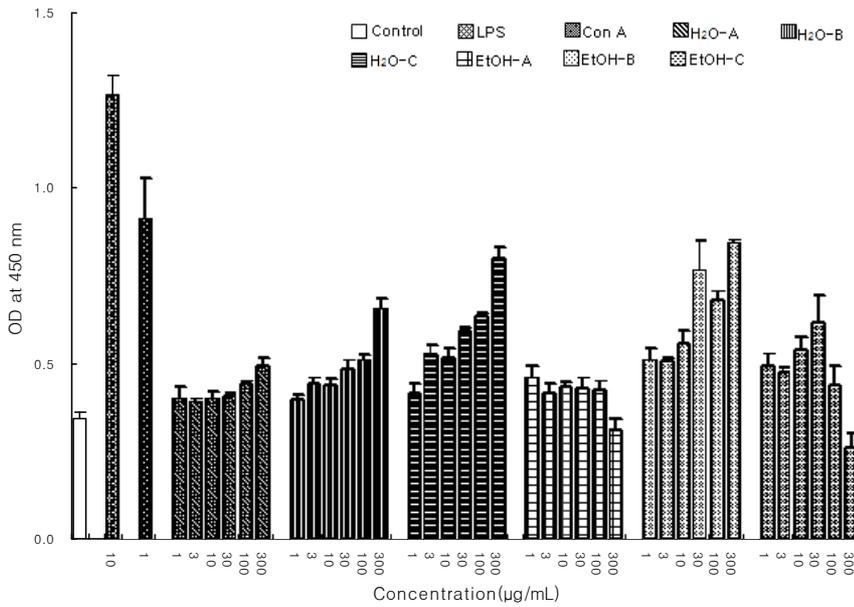


Fig. 1. The effect of crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* on the proliferation of spleen cells. The spleen cells (5×10^5 cells/well) were stimulated for 72 hr, respectively, with LPS, Con A or crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* and assayed for proliferation. Data are presented as mean \pm SD for triplicates.

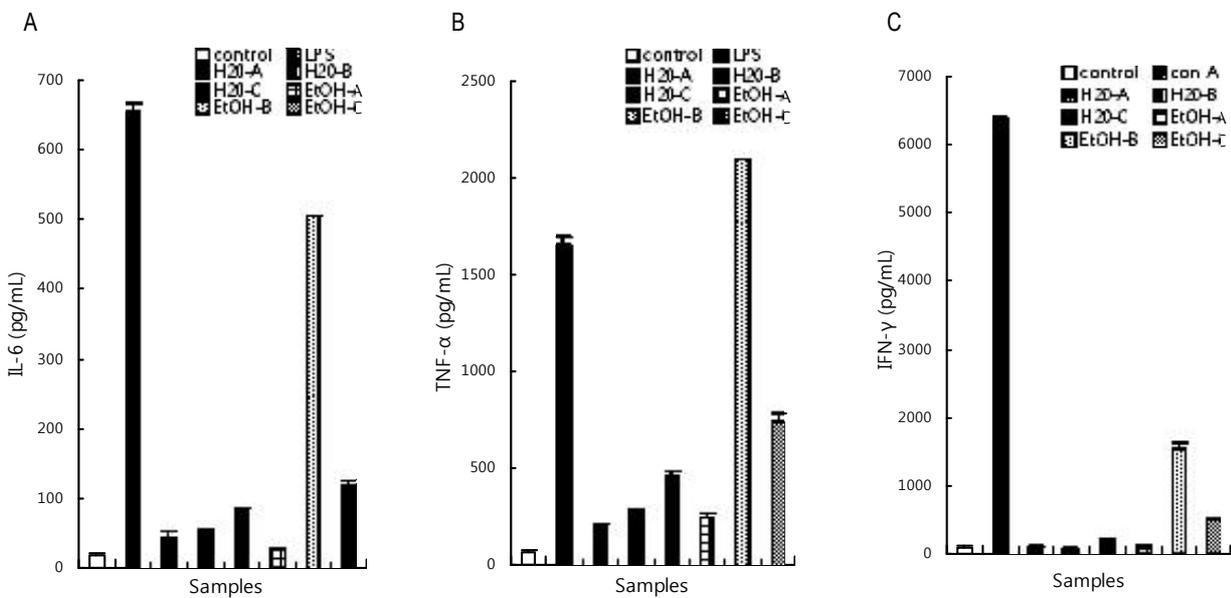


Fig. 2. Effect of crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* on the production of various cytokines in spleen cells. Spleen cells (5×10^6 cells/well) were stimulated with LPS, Con A or crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* for 24 hr and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine activities in culture supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean \pm SD for triplicates.

T세포의 증식을 유도하지는 않는 것을 간접적으로 알 수 있었고 에탄올 추출물 B를 첨가하였을 때 IL-6, TNF- α , IFN- γ 생산이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 IL-6, IFN- γ 생산을 유도하는 큰느타리버섯[10]의 결과와, 장미무당버섯[3], 뽕나무버섯불이[17] 추출물이 TNF- α 생산을 증가시키는 결과와 일치하지만, 큰느타리버섯[10], 장미무당버섯[3], 금목이[15] 추출물이 IL-2 생산을 유도한다는 결과와는 차이를 나타내었다.

B세포의 증식반응

앞 실험에서 증식하는 비장세포가 분비하는 사이토카인의 종류를 알아본 결과 배당체 추출물이 직접적으로 T세포의 증식을 유도하지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 비장세포 중에서 증식하는 세포는 B세포일 가능성이 높기 때문에 비장세포에 포함되어 있는 B세포만을 분리하여 추출물의 B세포 증식반응 유도 효과를 측정하였다. 순수 분리한 B세포에 추출물을 농도별로 첨가하여 72시간 배양한 후 증식반응을 측정하였다

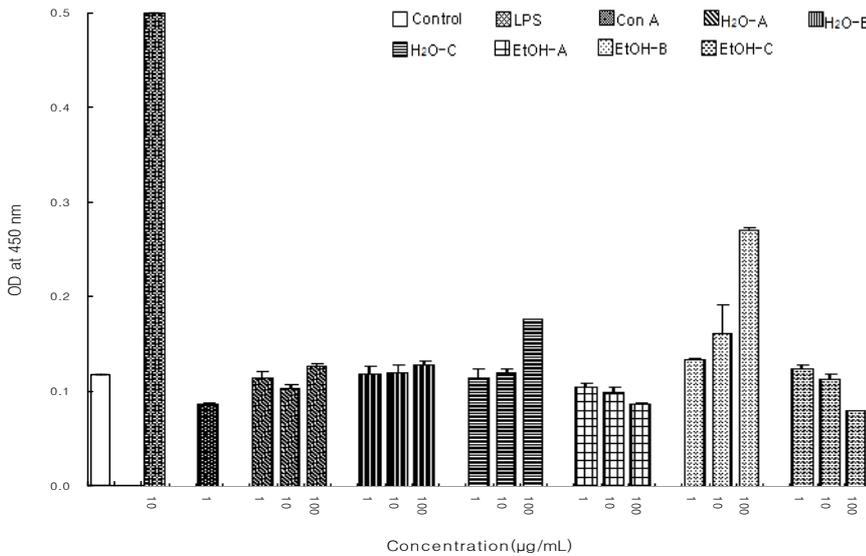


Fig. 3. The effect of crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* on the proliferation of B cells. Purified B cells (3×10^5 cells/well) were stimulated for 72 hr, respectively, with various doses of LPS, Con A or crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* and assayed for proliferation. Data are presented as mean \pm SD for triplicates.

(Fig. 3). 그 결과 T세포의 증식반응을 유도하는 Con A에 대해서는 반응하지 않고, B세포의 증식반응을 유도하는 LPS에 대해서만 증식반응이 유도되는 것으로 나타나 B세포가 순수하게 분리된 것을 알 수 있었다. 그리고 무처리 대조군에 비해 물 추출물을 처리한 실험군에서 B세포의 증식반응이 나타나지 않았으나, 에탄올 추출물 B (100 µg/ml)에서 2배 이상의 증식반응이 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 뽕나무버섯[17], 장미무당버섯[3], 대향고[16], 민진뿌리버섯[11]의 추출물이 B세포의 alkaline phosphatase의 분비를 증가시키는 결과와 큰느타리버섯[10]의 추출물이 B세포의 증식반응을 유도하는 결과와 일치한다.

B세포의 면역글로불린 생산

분열 증식하는 B세포는 면역글로불린을 생산하는데, 추출물이 B세포의 면역글로불린 생산을 유도하는 효과가 있는지 알아보았다. 비장세포에서 분리한 B세포에 추출물을 첨가하여 48시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 각각의 면역글로불린 양을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 무처리 대조군에 비해 물 추출물을 첨가하였을 때 IgG1을 제외한 나머지 면역글로불린의 생산량은 대조군과 비슷하였지만, 에탄올 추출물 B를 첨가하였을 때 5종류의 면역글로불린 양이 증가하는 것을 알 수 있었다. 즉 에탄올 추출물 B는 B세포의 증식뿐만 아니라 면역글로불린의 생산량을 증가시켜 체액성 면역반응을 유도하는 것으로 생각된다. 큰느타리버섯[10]의 추출물 역시 IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 생산을 유의하게 증가시켰다.

일산화질소 생산

대식세포는 식세포 작용으로 침입한 박테리아를 잡아먹고 살균작용으로 박테리아를 죽이기 위해 일산화질소(nitric ox-

ide)를 분비한다[27]. 따라서 추출물이 대식세포의 일산화질소 생산에 미치는 영향을 확인하였다. 대식세포주(RAW264.7)에 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 배양액 중 대식세포가 생산한 일산화질소가 산화된 형태인 NO₂⁻ 농도를 측정하였다(Fig. 5). 그 결과 무처리 대조군에 비해 물 추출물 C의 고농도에서 일산화질소 생산이 증가하였고, 에탄올 추출물 B를 첨가하였을 때 많은 양의 일산화질소를 생산하는 것으로 나타났다. 금목이[15], 대향고[16], 뽕나무버섯[7], 큰느타리버섯[10]의 추출물도 대식세포주(RAW264.7)의 일산화질소 생산을 촉진하는 효과가 보고되어 있다.

대식세포의 사이토카인 생산

대식세포가 활성화하면 IL-6, TNF- α , GM-CSF 등을 분비하여 면역반응을 조절한다. 특히 TNF- α 는 종양세포를 파괴하는 사이토카인이고[26], IL-6는 간세포가 피브리노겐과 같은 몇 가지 혈장단백질을 합성하도록 유도하며 B세포 분화를 유도하는 B세포 성장인자로 작용한다[14]. 그리고 GM-CSF는 골수 전구세포의 분화와 증식을 유도하여 과립구와 대식세포를 만드는 작용을 한다[22]. 따라서 추출물이 대식세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 확인하였다. 즉 대식세포주에 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 사이토카인의 분비량을 측정하였다(Fig. 6). 대식세포를 활성화시키는 물질인 LPS에 의해서 많은 양의 IL-6, TNF- α , GM-CSF 생산이 유도되는 것으로 나타났다. 그리고 물 추출물을 처리하였을 때 무처리 대조군에 비해 TNF- α 생산이 증가하는 것을 확인하였고, 특히 에탄올 추출물 B를 첨가하였을 때, 세 종류의 사이토카인 생산이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 큰느타리버섯 추출물은 IL-6와 TNF- α 생산을 증가시켰지만, GM-CSF 생산은 유도하지 못하였다[10].

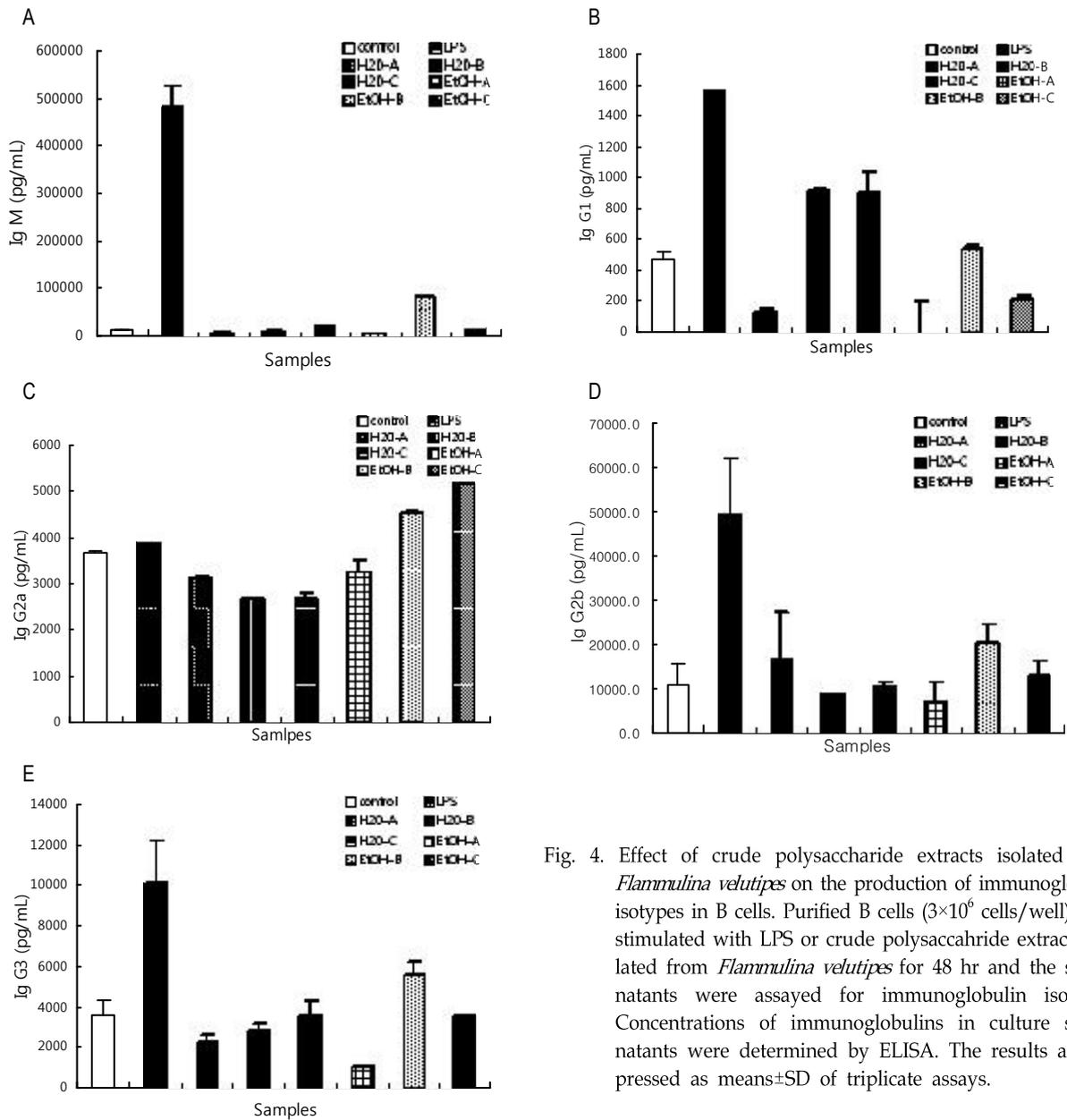


Fig. 4. Effect of crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* on the production of immunoglobulin isotypes in B cells. Purified B cells (3×10^6 cells/well) were stimulated with LPS or crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* for 48 hr and the supernatants were assayed for immunoglobulin isotypes. Concentrations of immunoglobulins in culture supernatants were determined by ELISA. The results are expressed as means \pm SD of triplicate assays.

복수암에 대한 수명 연장효과

이상의 *in vitro* 실험 결과, 팽이버섯 추출물 중에서 물 추출물보다는 에탄올 추출물이 면역세포를 활성화시키는 효과가 있으며, 특히 폐 한방슬러지 만을 10% 첨가한 배지로 재배한 팽이버섯의 에탄올 추출물이 가장 효과가 뛰어난 것으로 나타났다. 따라서 팽이버섯 에탄올 추출물 B에 대해 복수암세포주 (sarcoma-180)를 이용한 수명 연장효과를 측정하였다(Fig. 7). 팽이버섯 에탄올 추출물 B를 Sarcoma-180 접종 생쥐에 투여하고 수명 연장효과를 분석한 결과, 대조군의 평균 생존 일수는 21.1일이었으며, 에탄올 추출물 B (100 mg/kg body weight)를 투여한 실험군의 평균 생존 일수는 24.5일로 나타

나, 수명 연장효과가 16.11%로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 매미눈꽃뚱충하초(*Paecilomyces sinclairii*) [24]의 32.3%, 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*) [25]의 77.4%, 흰목이(*Tremella fuciformis*) [23]의 53%, 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*) [12]의 67.5%, 금목이(*Tremella aurantialba*) [15]의 약 11-67%, 장미무당버섯(*Russula rosacea*) [3]의 45%, 대항고(*Lentinus giganteus*) [16]의 약 14.3-67.5% 수명 연장효과에 비해 다소 효과가 적은 것으로 나타났지만, 버섯 종류에 의한 차이보다는 추출 방법, 추출물의 종류 그리고 투여량 등의 차이에 의한 것으로 생각된다.

이상의 결과로 팽이버섯을 일반 배지만으로 재배했을 때

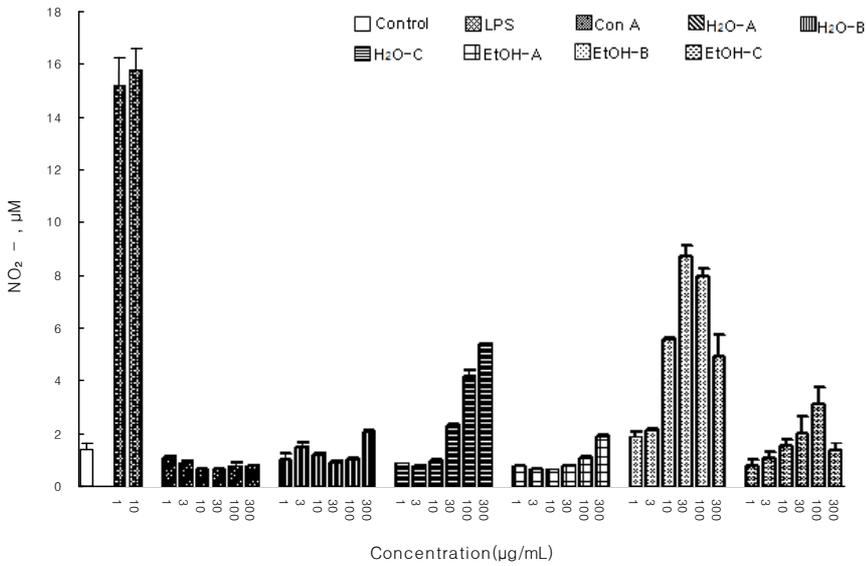


Fig. 5. Effect of crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* on the production of nitric oxide in a macrophage cell line. RAW 264.7 (5×10^4 cells/well) were cultured either in medium alone or in medium that contained LPS or crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* for the production of nitric oxide. After 48 hr of culture, the amounts of nitric oxide production were measured by the Griess method. The results are expressed as mean \pm SD of triplicate assays.

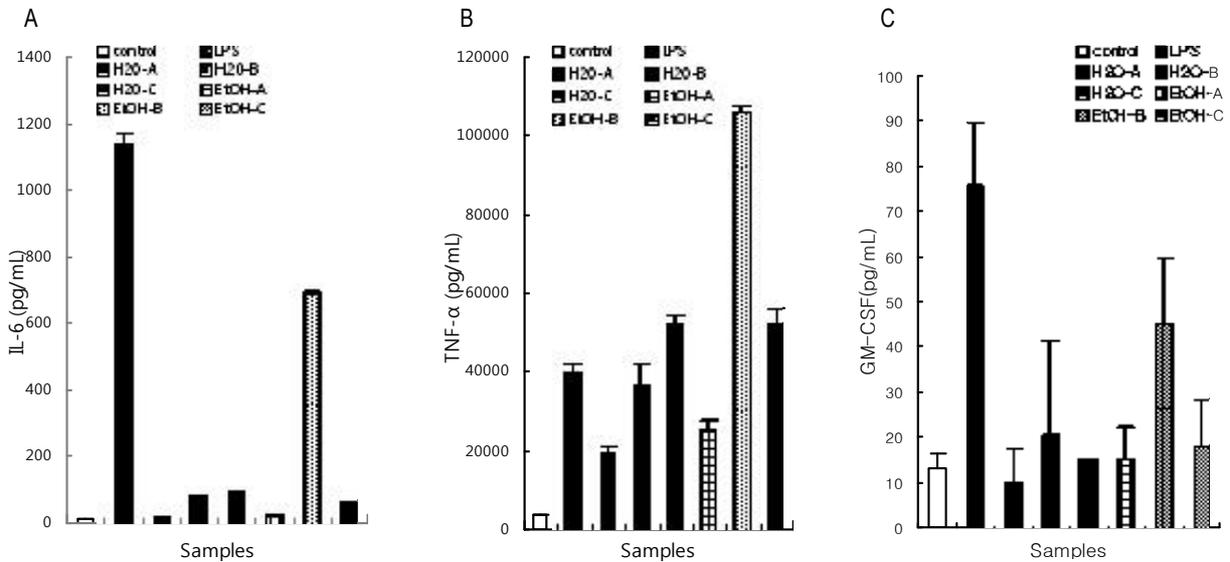


Fig. 6. Effect of crude polysaccharide extracts isolated from *Flammulina velutipes* on the secretion of various cytokines in a macrophage cell line. RAW264.7 cells (5×10^5 cells/well) were stimulated with LPS or crude polysaccharide isolated from *Flammulina velutipes* for 24 hr and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine activities in culture supernatants were determined as described under materials and methods. The results are expressed as mean \pm SD of triplicate assays.

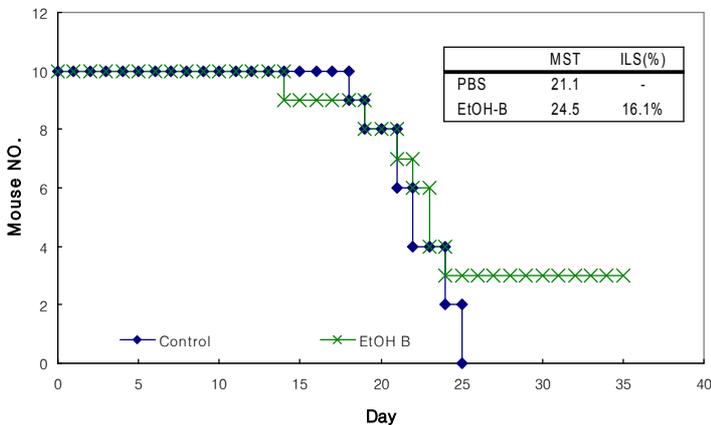


Fig. 7. Effect of ethanol extract-B isolated from *Flammulina velutipes* on the life elongation of mice inoculated with Sarcoma-180. Mice were injected Sarcoma-180 tumor cells (3×10^6 cell/mouse). After 24 hr, mice were injected ethanol extract-B (100 mg/kg body weight) or PBS for 1 weeks.

보다, 폐 한방슬리지를 10% 첨가한 배지에서 재배한 다음 에탄올로 추출한 성분이 다양한 면역세포를 활성화시키는 효과가 뛰어난 것을 확인하였고, 이는 폐 한방슬리지에 포함된 여러 가지 생리활성 물질이 자실체로 이행하여 나타나는 결과로 생각되어, 다양한 버섯 재배 배지에 폐 한방슬리지를 활용할 수 있는 가능성을 제시한 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 농림수산식품평가원의 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

References

- Bano, Z. and Rajarathnam, S. 1988. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **27**, 87-158.
- Choi, S. J., Lee, Y. S., Kim, J. K., Kim, J. K. and Lim, S. D. 2010. Physiological activation of extract from edible mushrooms. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1087-1096.
- Choi, Y. I., Lee, G. W., Hur, H., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2008. Immno-potentiating and antitumor effects against mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Russula rosacea*. *Korean J. Mycol.* **36**, 84-92.
- Cho, N. S., Kim, D. H., Chung, H. C., Lee, S. S., Ohga, S. and Leonowicz, A. 2004. Effect of water soluble fraction from Japanese Larch Wood on Sawdust Cultivation of *Lentinula edodes*. *Mokchae Konghak* **32**, 36-44.
- Han, S. Y., Shon, M. Y. and Lee, S. W. 2003. Physiological activities of mycelial *Flammulina velutipes* cultured in liquid grain media. *Food Industry Nutr.* **8**, 50-56.
- Hayward, A. R., Chmura, K. and Cosyns, M. 2000. Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J. Infect. Dis.* **182**, 1001-1004.
- Jain, J., Loh, C. and Rao, A. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 333-342.
- Jeurink, P. V., Noguera, C. L., Savelkoul, H. F. and Wichers, H. J. 2008. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 1124-1133.
- Jhune, C. S., Sul, H. J., Kong, W. S., Yoo, Y. B., Cheong, J. C. and Chun, S. C. 2006. Effects of NaCl concentration on production and yields of fruiting body of oyster mushrooms, *Pleurotus spp.* *Korean J. Mycol.* **34**, 39-53.
- Kang, H. I., Kim, J. Y., Moon, K. D., Seo, K. I., Cho, Y. S., Lee, S. D. and Yee, S. T. 2004. Effect of the crude polysaccharides of *Pleurotus eryngii* on the activation of immune cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 192-1097.
- Kim, S. B., Lee, G. W., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2007. Studies on Immuno-Modulatory and Antitumor Effects of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Oudemansiella radicata*. *Korean J. Mycol.* **35**, 109-114.
- Kim, S. B., Lee, G. W., Kim, H. Y., Shim, M. J., Rho, H. S., Lee, H. S., Lee, M. W., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2006. Inhibitive effects of mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Aranuillaria mellea*. *Korean J. Mycol.* **34**, 98-104.
- Kim, S. J. and Han, D. S. 2005. Effect of plants extracts on lipid peroxidation of rat brain tissue induced by reactive oxygen species. *Korean J. Food Sci Technol.* **37**, 976-982.
- Larssen, B. M., Larsson, K., Malmberg, P. and Plamberg, L. 1999. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human aveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* **23**, 217-230.
- Lee, G. W., Kim, H., Hur, Y. H., Lee, M. W., Shim, M. J., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2008. Antitumor and immunomodulatory effect of crude polysaccharides from fruiting body of *Tremella aurantialba*. *Korean J. Mycol.* **36**, 66-74.
- Lee, G. W., Hur, H. H., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2008. Antitumor and Immuno-Modulatory Effect Against Mouse Sarcoma 180 of Crude Polysaccharides Extracts from Fruiting Body of *Lentinus giganteus*. *Korean J. Mycol.* **36**, 75-83.
- Lee, G. W., Kim, H. Y., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2007. Antitumor and immuno-modulatory effect against mouse sarcoma 180 of crude polysaccharides extracts from fruiting body of *Armillaria tobescens*. *Korean J. Mycol.* **35**, 101-108.
- Lee, L. S., Cha, H. S., Park, J. D., Jang, D. J. and Kim, S. H. 2008. Physicochemical properties of mushroom (*Flammulina velutipes*) cultivated with green tea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 190-194.
- Lee, N. H., Im, M. H. and Choi, U. K. 2006. Calcium absorption by the fruitbody of Saesongi (*Pleurotus eryngii*) mushroom. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 308-311.
- Lee, S. H., Kwak, W. S. and Kim, W. Y. 2005. Studies on the selenium type and etabolism of selenium accumulation in the selenium-enriched mushroom *Flammulina velutipes*, and its spend mushroom composts. *J. Anim. Sci. Technol.* **47**, 305-316.
- Lee, S. R., Nam, D. Y., Lee, H. J., Park, C. H., Shim, J. C., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2009. Anti-tumor activity of flammulina velutipes extract on B16 cells. *Korean J. Food Preserv.* **16**, 599-603.
- Li, Y., Ohms, S. J., Shannon, F. M., Sun, C. and Fan, J. Y. 2012. IL-2 and GM-CSF are regulated by DNA demethylation during activation of T cells, B cells and macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 748-53.
- Oh, Y. H., Kim, S. B., Lee, G. W., Kim, H. Y., Shim, M. J., Rho, H. S., Lee, H. S., Lee, M. W., Lee, U. Y. and T. S. Lee. 2006. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Trenella Fuciformis*. *Korean J. Mycol.* **34**, 105-111.
- Shim, S. M., Im, K. H., Kim, J. W., Lee, U. Y., Shim, M. J., Lee, M. W. and T. S. Lee. 2003. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paeclomyces sinclairii*. *Korean J. Mycol.* **31**,

- 155-160.
25. Shim, S. M., Im, K. H., Kim, J. W., Lee, U. Y., Shim, M. J., Lee, M. W. and T. S. Lee. 2003. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *daedaleopsis tricolor*. *Korean J. Mycol.* **31**, 161-167.
26. Wajant, H., Grell, M. and Scheurich, P. 1999. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**, 15-26.
27. Yee, S. T., Jeong, Y. R., Ha, M. H., Kim, S. H., Byum, M. W. and Jo, S. K. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extract in mouse macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 342-348.

초록 : 폐 한방슬러지로 배양한 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) 추출물의 면역세포 활성화 효과

김종진¹ · 이상원⁴ · 박경욱⁵ · 서권일² · 이성태^{1,3,*}

(순천대학교 ¹생물학과, ²식품영양학과, ³약학과, ⁴경남과학기술대학교 제약공학과, ⁵에스엔제이바이오(주))

일반적인 버섯 배지(미강 10%), 폐 한방슬러지를 10% 첨가한 배지, 그리고 미강 10%와 폐 한방슬러지 10%를 혼합한 배지에서 재배한 팽이버섯의 면역기능 강화효과를 알아보기 위해 물 추출물과 에탄올 추출물로 분리하여 실험하였다. 그 중 폐 한방슬러지 10%를 첨가한 배지에서 재배한 팽이버섯의 에탄올 추출물을 첨가하였을 때, 비장세포의 증식을 크게 유도하였으며 또한 IL-6, TNF- α , IFN- γ 분비를 유도하였다. 그리고 B세포의 증식반응과 면역글로불린 생산도 증가하였으며, 대식세포주의 일산화질소 분비와 IL-6, TNF- α , GM-CSF 생산도 증가하였다. 또한 복수압 유발 종양세포를 이용한 항종양 효과를 측정 한 결과 대조군의 평균 21.1일보다 실험군은 24.5일로 16.1%의 수명 연장효과가 나타났다. 따라서 폐 한방슬러지를 이용하면 수입에 의존하고 있는 버섯 재배 배지 원료를 절약할 수 있으며 면역세포조절 기능을 강화시키는 기능성 버섯을 얻을 수 있다고 생각한다.