Journal of Mushroom Science and Production
©The Korean Society of Mushroom Science

한국버섯학회지
J. Mushroom Sci. Prod. 11(4):269-277(2013)

흰망태버섯 자실체의 메탄올 및 열수추출물의 항산화 및 항염증 활성

Trung Kien Nguyen[1] · 신도빈[1] · 이경림[1] · 신평균[3] · 정종천[3] · 유영복[3]
이민웅[2] · 진가헌[4] · 김혜영[5] · 임경환[1] · 이태수[1]*

[1]인천대학교 생명과학기술대학 생명과학부, [2]동국대학교, [3]원예특작과학원 버섯과, [4]신흥대학교 안경과학과, [5]신성대학교 임상병리과

Antioxidant and anti-inflammatory activities of fruiting bodies of *Dyctiophora indusiata*

Trung Kien Nguyen[1], Do Bin Shin[1], Kyung Rim Lee[1], Pyung Gyun Shin[3], Jong Chun Cheong[3], Young Bok Yoo[3], Min Woong Lee[2], Ga-Heon Jin[4], Hye Young Kim[5], Kyung Hoan Im[1] and Tae Soo Lee[1]*

[1]Division of Life Sciences, Incheon National University,(Songdo-dong) 119 Academy-ro, Yeonsu-gu, Incheon, Korea*
[2]Department of Life Sciences, Dongguk University, 30, Pildong-ro, Seoul, 100-175, Korea
[3]Mushroom Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Eumseong 369-873, Korea
[4]Department of Ophthalmic Optics, Shinheung University 95 Hoam-ro, Uijeongbu, Gyeonggi 480-701, Korea
[5]Department of Clinical Laboratory Science, Shinsung University, Danggin 343-861, Korea

(Received December 3, 2013 / Revised December 23, 2013 / Accepted December 30, 2013)

ABSTRACT − *Dictyophora indusiata* is an edible mushroom belongs to Family Phallaceae of Phallales, Basidiomycota. The purpose of this study was to investigate the antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol and hot water extracts prepared from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata*. Besides measuring of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, a reducing power and a chelating activity on ferrous ions were also measured to evaluate the antioxidant activity for those extracts. To measure the anti-inflammatory activities for the extracts, nitric oxide(NO) production from lipopolysaccharide(LPS) treated RAW 264.7 macrophage cells and carrageenan-induced acute hind paw edema of rats were investigated. The results showed that the extracts have excellent DPPH scavenging and chelating activity on the ferrous ions compared with positive control. The nitric oxide(NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells were decreased as we increased the concentration of the mushroom extracts. Significant reduction of paw edema of rats were observed at 2~6 h after treatment of methanol and hot-water extracts with 50 mg/kg concentration to the rats which are induced acute hind paw edema by carrageenan administration. Therefore, the experimental results suggested that methanol and hot-water extracts of *Dictyophora indusiata* fruiting bodies might be used for natural sources of antioxidant and anti-inflammatory agents.

KEYWORDS − Anti-inflammation, Antioxidant, *Dyctyophora indusiata*, Fruiting bodies

서 론

활성산소가 인체에서 과다 생성되면 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의해 세포 대사에 비가역적인 손상이 발생되며, 이는 돌연변이, 세포독성, 암 등의 발생을 초래하여 생체에 치명적 손상을 줄 수 있다. 건강한 삶을 위해서 체내 활성산소를 효과적으로 제거하여 건강한 삶을 살아가기 위해 항산화 효과를 나타내는 물질의 분리와 이용에 많은 노력이 경주되고 있다. 최근 식용이나 약용식물 그리고 버섯으로부터 항산화 물질을 탐색하고, 이를 이용한 인체 질환의 치료, 개선 연구가 진행되고 있다 (Weisburger, 1999). 염증(inflammation)은 생체나 조직에 물리적, 화학적 변화와 병원균에 의한 감염이 일어날 때 그 손상부위를 수복, 재생하려는 기전에 의해 발생한다(Ahn 등, 2007). 대식세포 (macrophage)는 염증 유발물질에 반응하여 tumor necrotic factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), IL-1β와 같은 염증유발인자 (pro-inflammatory cytokine)를 생성하고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 합성하여 NO를 생성한다. 생체 내에서 NO는 병원균과 종양 제거, 혈압 조절, 신경 전달 매개 등 다양한 역할을 한다. 하지만 과도한 염증 반응에 의해 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성

*Corresponding author: tslee@incheon.ac.kr

된다. 그리고 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상 등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다(Park 등, 2005). 이런 이유로 생성된 NO와 iNOS의 발현 억제로 염증 반응의 부작용을 최소화 해야 하며, 체내 항산화 능력을 증가시킴으로써 염증을 완화시킬 수 있는 천연물질 탐색이 중요하게 되었다 (Gross, 1980).

흰망태버섯 [*Dictyophora indusiata* (vent.) Desv.]은 담자균류 (Basidiomycota)의 말뚝버섯목 (Phallales), 말뚝버섯과 (Phallaceae), 망태버섯속 (Dictyophora)에 속하는 버섯이다. 우리나라를 비롯한 북반구에 속하는 중국 및 일본, 대만 등의 대나무 숲에 자생한다. 이 버섯은 대나무의 낙엽을 분해하여 영양을 얻는 부후균으로 주로 온도가 높고 강우량이 풍부한 7월에서 8월에 걸쳐 발생한다. 흰망태버섯의 자실체는 맛이 뛰어난 버섯은 아니나 색깔이 매우 희고 형태가 아름다워 중국에서 고급요리의 재료로 사용되고 있다. 또한 최근 복건성과 광동성의 일부 지역에서 인공 재배되고 있다. 흰망태버섯의 자실체에는 항산화와 항균 등을 나타내는 생리활성 물질이 많이 함유되어 있어 건강에도 좋은 식품으로 보고되어 있다 (Park and Lee, 1997). 따라서 본 연구에서는 흰망태버섯의 자실체에 함유된 물질이 어떤 생리활성 효과를 나타내는지 알아보기 위해 국내에서 채집한 흰망태버섯 자실체를 이용했다. 이 추출 물질의 항산화 및 항염증 활성에 대한 실험을 수행하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 흰망태버섯의 자실체는 전라남도 담양의 대나무 숲에서 채집되었으며, 이 자실체를 인천대학교 “버섯균주 및 DNA 은행”의 동정을 받은 후 45°C의 건조기에서 48 시간 건조하고 마쇄 후 -70°C의 저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

Shim 등(2003)의 방법에 따라 건조한 흰망태버섯 자실체의 분말에 80% 메탄올과 열수를 이용해 성분을 추출하여 실험에 사용하였다. 즉, 50 g의 흰망태버섯 자실체의 분말을 80%의 메탄올 용액(덕산약품공업, Korea) 1,000 mL에 침지하여 48시간 동안 상온에서 3회 추출하고 모은 후 여과지 (Avantec Toyo Co., No. 2, Japan)로 여과하고 40°C에서 회전 감압농축기 (N-1000, EYELA Co., Japan)을 이용하여 감압 농축하였다. 농축액내의 수분을 제거하기 위해 동결건조기 (FDU-8612, Operon Co., Korea)를 이용하여 메탄올 추출물을 얻었다. 열수추출물은 3차 증류수 5,000 mL에 50 g의 자실체 분말을 넣어 95°C에서 10시간 동안 추출하고 4°C에서 24시간 동안 정치시킨 후 여과지(Avantec Toyo Co., No. 2, Japan)로 여과하였다. 여과한 추출액은 농축 후 동결건조기 (FDU-8612, Operon Co., Korea)에서 여분의 수분을 제거하여 열수추출물을 얻었다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis을 변형한 Swain 등(1959)의 방법에 따라 측정되었다. 즉, 흰망태버섯의 추출물을 메탄올 1 mg/mL의 농도로 용해한 각 용매 별 추출액에 Folin-Ciocalteau 시약 및 10%의 NaCO3 용액을 각각 1 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 1시간 방치 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용해 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)를 0-100 μg/mL의 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선을 이용하여 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

Moreno 등 (2000)의 방법에 따라 1 mg/mL 농도의 시료액에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분 간 방치한 다음 UV/VIS Spectrophotometer(Optizen POP, Korea)를 이용해 415 nm에서 총 플라보노이드의 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 하여 얻은 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

세포배양

실험에 사용한 생쥐의 RAW 264.7 세포와 B16/F10 Melanoma 세포는 서울대학교의 한국세포주은행에서 분양받았으며 DMEM 배지와 RPMI-1640배지를 각각 기본배지로 하여 10% FBS, 100 U/mL penicillin 및 100 g/mL streptomycin을 첨가하여 배지를 조제하였고, 37°C, 5% CO_2 배양기에서 3일 배양하였다.

세포의 생존율 측정

흰망태버섯 추출물의 B16/F10 melanoma와 NIH3T3 세포에 대한 생존율은 Mosmann의 방법(1983)에 따

라 측정되었다. 지수기에 도달한 세포주를 RPMI-1640 배지가 분주된 96 plate well에 2×105 cell/mL의 농도로 분주하고 24시간 배양한 후, 배지의 상층액을 제거하고 흰망태버섯 추출물을 10, 100, 500, 1,000, 2,000 μg/mL 농도로 새로운 배지에 200 μL 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 상층액을 제거하고 각각의 well에 MTT용액(5 mg/mL in PBS) 10 μL씩을 첨가하고, 다시 37°C, 5% CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양하여 MTT를 환원시켰다. MTT의 환원에 의해 각각의 well에 생성된 보라색의 formazan 결정은 150 μL의 DMSO로 녹여 microplate reader(SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성 측정

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois(1958)의 방법으로 측정되었다. 시료를 메탄올로 녹여 최종 농도가 25, 125, 250, 500, 1,000, 1,500 μg/mL이 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100 μL를 주입하고. 동시에 0.3 mM DPPH 100 μL를넣어 총량이 200 μL가되도록하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용해 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%)
=[1−(첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)] × 100

환원력 활성 측정

흰망태버섯 추출물의 환원력 활성에 대한 실험은 Gulcin 등 (2003)의 방법에 따라 수행하였다. 시료 2.5 mL에 sodium phosphate buffer (2.5 mL, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide (2.5 mL)를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 간 incubation한 뒤 trichloroacetic acid (2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가하여 650 × g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리한 상층액 5 mL에 3차 증류수 5 mL와 1% ferric chloride 1 mL를 첨가한 후 UV/VIS-spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

철 이온 제거능

금속이온 제거능 실험은 Yena 등 (2002)의 방법에 준하여 수행하였다. 그 원리는 버섯 추출물의 항산화 성분에 의해 Fe_2^+ 이온이 제거되어 더 이상 ferrozine-Fe_2^+ 복합체를 형성하지 않는 것을 기본으로 하여 측정하였다. 먼저 각각의 농도별로 버섯 추출물을 준비하였다. 버섯 추출물 2.0 mL에 2 mM $FeCl_2$ (Sigma Aldrich Co., USA) 0.05 mL를 혼합한 후 5 mM의 ferrozine 0.2 mL를 첨가하여 반응시킨 뒤 메탄올 2.75 mL를 가하여 총용량이 5 mL가 되도록 하고 vortex mixer를 이용하여 강하게 진탕한 뒤 UV/VISspectrophotometer(Optizen POP, Korea)를 이용하여 562 nm에서 반응액의 흡광도를 측정하여 아래의 계산식에 의해 금속이온 제거능을 계산하였다. 양성대조군으로는 BHT와 tocopherol을 사용하였다.

Chelating effect on ferrous ions (%)
= [(Acontrol − Asample) / Acontrol] × 100

Nitrite(NO) 생성 저해효과 측정

NO 생성 저해효과의 측정은 Ryu 등(2003)의 방법을 방법으로 측정하였다. 즉, DMEM 배지가 들어있는 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 5×10^4 cell/well로 분주하고 12시간 배양 후 흰망태버섯 추출물을 0, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/mL의 농도로 1 시간 전 처리 한 다음 LPS를 1 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액 100 μL를 취한 후 동량의 Griess reagent(Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 μL를 넣어 총량이 200 μL가 되도록 하고 상온에서 10분간 반응시킨 후 생성된 NO의 양을 microplate reader(SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 아질산염의 표준 곡선을 이용해 구하였다.

Western blot analysis

Western blot 분석 실험은 Cho와 Ahn(2008)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 각각의 시료를 RAW 264.7 세포에 처리하고 24시간 후 수거하여, cold PBS로 2회 세척한 후 각각의 세포에 cold lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Igepal CA-630, protease inhibitor cocktail tablets complete mini(Roche, Indianapolis, IN, USA)를 첨가하여 용해시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거한 후 Bradford법으로 BSA를 표준물질로 하여 각 well 중 세포의 총 단백

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of methanol and hot-water extracts from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata*

Samples	Yeilds (% w/w)	Phenolics content (g GAEs/mg extract)	Flavonoids content (μg QEs/mg extract)
Methanol extract	36.39	1.17 ± 0.238	5.10 ± 0.857
Hot-water extract	35.63	1.21 ± 0.079	0.14 ± 0.019

Values expressed are means ± SD of three parallel measurements. GAEs, gallic acid equivalents; QEs, quercetin equivalents

질의 양을 결정하였다. 30 μg의 lysate를 8% gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)에 80 V로 90분간 transfer하였다. 그리고 membrane은 blocking buffer (5% nonfat dry milk in 1X tris buffered saline (TBS), 0.1% Tween-20)로 2시간 동안 antibody의 비 특이적 결합을 억제시키고, TBS-T용액 (0.1% Tween-20 in TBS)로 세척하였다. primary antidoby (anti-mouse iNOS, BD Biosciences)를 blocking buffer로 1:2000이 되게 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T용액으로 10분씩 3회 세척한 후 2차 항체는 goat anti-mouse IgG conjugated to phosphatase (Santa cruz biotech)를 TBS-T용액으로 1:3000이 되게 희석하고 상온에서 1시간 동안 반응을 진행하였다. 그 후 TBS-T용액으로 10분씩 3회 세척한 후, ECL western blotting detection reagent (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)로 5분간 반응시킨 후 결과를 관찰하였다.

Carrageenan에 의한 부종유발 및 소염효과의 측정

흰쥐의 급성 부종유발은 Winter 등(1962)의 방법에 따라 수행하였다. 생리식염수에 녹인 0, 5, 15, 50 mg/kg 농도의 흰망태버섯 추출물을 마리당 0.1 mL씩 오른쪽 뒷발바닥에 주사하고 30분이 지난 후 마리당 1%의 carrageenan 용액 0.1 mL를 흰쥐의 뒷발바닥에 주사하였다. 본 실험에서는 각각의 처 리 당 5마리의 흰쥐를 사용하였다. 흰망태버섯 추출물의 소염효과는 흰망태버섯 추출물과 carrageenan 주입 후 흰쥐 뒷발바닥에 생긴 부종의 용적을 plethysmometer (MK-101P, Tokyo, Japan)로 측정하여 구하였다. 즉, 흰쥐 뒷발에 기염제인 carrageenan을 주입하기 전을 0으로 하고 주입 후 2, 4, 6시간이 지난 후 증가한 뒷발의 용적을 실험군 별로 각각 측정하여 다음의 식에 의하여 부종 증가율을 산출하였다.

$$\text{부종증가율 (\%)} = (V_t - V_n)/V_n \times 100$$

V_n = 주입 직전 뒷발의 용적

V_t = 주입 후 일정시간 후의 뒷발의 용적

통계 처리

실험은 3회 이상 반복 실험을 통하여 얻은 각각의 결과를 mean ± S.D로 나타내었다. 각 시료 농도군에 대한 통계적 유의검정은 대조군과 비교하여 Student's t-test 후, $p < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의성 있는 결과로 표시하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

흰망태버섯 자실체의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 Table 1에 나타내었다. 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 각각 1.17, 5.10 μg/mg으로 나타났으며, 열수추출물에서 각각 1.21, 0.14 μg/mg으로 나타나 폴리페놀의 양은 메탄올 추출물에서 열수추출물보다 약 4배 이상 많이 추출되었고 플라보노이드의 양은 메탄올 추출물에서 열수 추출물보다 많이 추출되었다. 일반적으로 폴리페놀과 플라보노이드 화합물은 버섯에 비해 식물에 다량 존재하는 것으로 보고되었다(Leong and Shui, 2002). 본 실험의 결과는 Choi 등(2008)이 보고한 만가닥버섯의 자실체에서 추출한 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 67.40과 6.31 μg/mg에 비해 매우 낮게 나타났는데 이는 버섯이 생육한 기질과 버섯의 종이 다름에 따라 자실체에 함유된 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 다르게 나타날 수 있는 것을 나타낸 결과로 사료되었다.

세포독성 분석

흰망태버섯 자실체의 추출물이 RAW 264.7과 Melanoma B16-F10 세포의 생존율에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 자실체의 메탄올과 열수추출물을 25, 50, 100, 1,000, 2,000 μg/mL의 농도로 각각의 세포에 처리하고 배양한 후 MTT 방법을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 실험결과 RAW 264.7과 Melanoma B16-F10 세포의 생존율은 고농도인 2,000 μg/mL에서 모두 50% 이상의 생존율을 보여 흰망태버섯 자실체의 추출물은 저농도에서는 독성이 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 1).

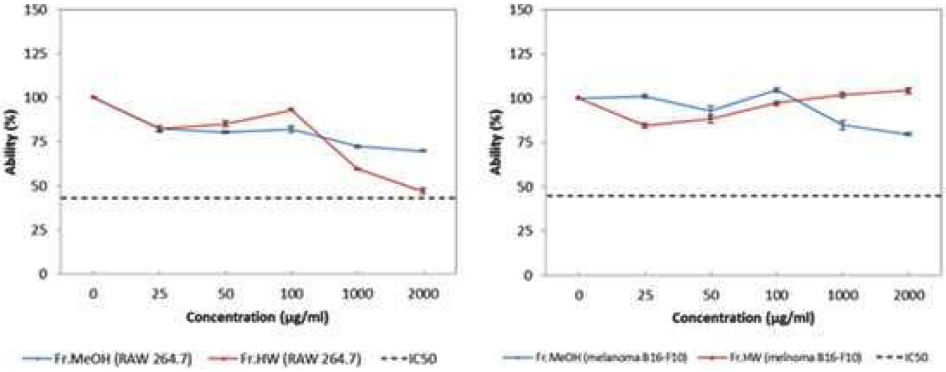

Fig. 1. *In vitro* cytotoxicity activity against RAW 264.7 and B16-F10 melanoma cell lines at different concentrations of various fractions extracted from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata*. Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Fr.MeOH, fractions extracted with 80% methanol; Fr.HW, fractions extracted with hot water.

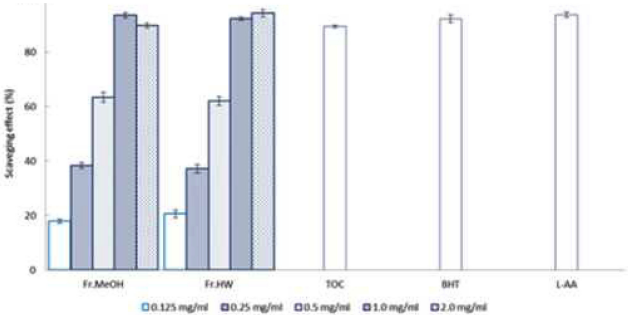

Fig. 2. Scavenging activities of methanol and hot-water extracts from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata* against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Values expressed as mean ±SD (n=3). Fr.MeOH, fractions extracted with 80% methanol; Fr.HW, fractions extracted with hot water; BHT, butylated hydroxytoluene; TOC, α-tocopherol; L-AA, L-ascorbic acid.

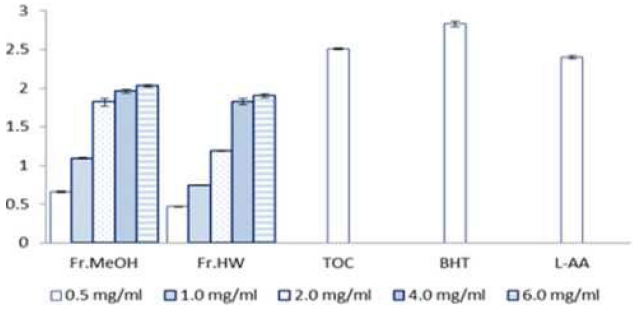

Fig 3. Reducing power of methanol and hot-water extracts from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata* at different concentrations. Values expressed as mean ±SD (n=3). Fr.MeOH, fractions extracted with 80% methanol; Fr.HW, fractions extracted with hot water; TOC, α-tocopherol; BHT, butylated hydroxytoluene; L-AA, L-ascorbic acid.

DPPH 라디칼 소거활성

흰망태버섯 자실체 추출물의 DPPH 라디칼의 소거활성을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 흰망태버섯 추출물의 DPPH 소거 활성은 0.125 mg/mL의 농도에서 메탄올과 열수 추출물이 각각 17.87%, 20.55%로 나타나 동일한 농도에서 양성대조군인 BHT, tocopherol 및 L-ascorbic acid의 92.05%, 89.27% 및 93.64%에 비해 매우 낮았다. 그러나 메탄올 추출물은 1 mg/mL의 농도에서 93.44%의 소거활성과 열수 추출물은 2 mg/mL의 농도에서 94.14%의 높은 소거활성을 나타내 낮은 0.125 mg/mL의 농도에서 BHT, tocopherol 및 L-ascorbic acid의 소거활성과 매우 유사하였다. 본 실험의 결과는 Lee 등(2007)이 보고한 노랑느타리의 자실체를 3 종류의 용매로 추출한 물질의 DPPH 라디칼 소거활성이 5 mg/mL 의 농도에서 46.6~68.4%인 것에 비해서 크게 높아서 망태버섯 추출물의 DPPH 소거활성은 양성대조군인 BHT, tocopherol 및 L-ascorbic acid에 비해 낮았지만 이미 보고된 다른 버섯에 비해 높은 것으로 나타났다.

철 이온 제거능

철 이온의 제거능은 버섯 추출물에 함유된 항산화 성분의 작용으로 인해 Fe_2^+ 이온이 제거되어 ferrozine-Fe_2^+의 복합체가 형성되지 않는다는 것에 근거해 실험을 진행하였다. 실험 결과 흰망태버섯 자실체의 메탄올과 열수추출물은 0.125~2.0 mg/mL 범위의 모든 농도에서 양성 대조군으로 사용한 BHT, tochopherol 및 ascorbic acid에 비해 철 이온을 제거하는 효율이 높게 나타났다 (Fig. 3). 또한 열수추출물은 0.1251 mg/mL 범위의 농도에서 메탄올추출물에 비해 철 이온을 보다 효과적으로 제거하는 것으로 나타났으나 2.0 mg/mL의 농도에서 메탄올 추출물의 철 이온의 제거율은 97.21%로 나타나 열수 추출물의 91.44%에 비해 높았다(Table. 2) 특히 본 실험에서 나타난 흰망

Table 2. Chelating effects of methanol and hot-water extracts from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata* at different concentrations

Samples	Concentrations (mg/ml)				
	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0
Fr.MeOH	56.85 ± 0.47	60.73 ± 2.41	81.58 ± 0.54	84.23 ± 0.45	97.21 ± 0.62
Fr.HW	57.52 ± 2.64	79.24 ± 1.11	87.89 ± 1.14	95.58 ± 0.65	91.44 ± 0.35
TOC	14.73 ± 1.24	25.95 ± 1.93	44.77 ± 0.83	57.84 ± 1.16	60.36 ± 1.69
BHT	20.81 ± 1.67	34.64 ± 1.16	39.82 ± 0.37	60.18 ± 1.06	68.87 ± 1.18
L-AA	17.97 ± 1.4	31.89 ± 0.9	49.14 ± 1.73	55.00 ± 0.96	66.67 ± 0.49

Values expressed as mean °æSD (n=3). Fr.MeOH, fractions extracted with 80% methanol; Fr.HW, fractions extracted with hot water. TOC, •-tocopherol; BHT, butylated hydroxytoluene; L-AA, L-ascorbic acid. *P<0.001

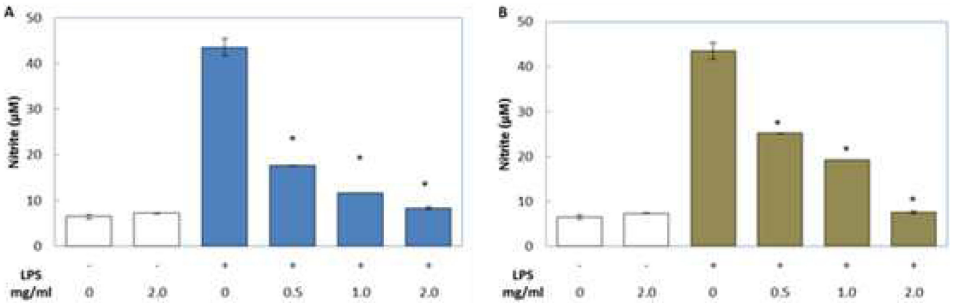

Fig. 4. Inhibitory effect of methanol extract (A) and hot-water extract (B) from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata* on LPS-induced nitrite production in RAW 264.7. cell line were incubated for 24 hours with LPS (1 μg/ml) in the presence or absence of indicated concentration of mushroom extracts. Accumulated nitrite in the culture medium was determined by the Griess reagent. The values are mean as ±SD (n=3). *P<0.001 vs. group treated with LPS alone.

태버섯의 철 이온 제거능은 Tsai 등(2006)과 Mau 등(2004)이 보고한 버들송이버섯과 잎새버섯의 열수추출물 20 mg/mL 농도에서의 철 이온 제거능 45.8%와 87.5%, 그리고 Lee 등(2007b)이 느티만가닥버섯의 자실체에서 열수로 추출한 물질의 5 mg/mL 농도에서의 철 이온 제거능 75.6%에 비해서 높게 나타나서 흰망태버섯이 철 이온을 제거하는 항산화효과는 다른 식용버섯에 비해 뛰어난 것으로 보여 진다.

환원력

흰망태버섯의 메탄올과 열수추출물의 환원력을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 메탄올과 열수추출물의 환원력은 0.6~6.0 mg/mL 범위의 농도에서 메탄올 추출물의 환원력이 열수추출물에 비해 약간 높게 나타났으나 큰 차이가 없었다. 그러나 0.5 mg/mL의 농도에서 양성대조군인 BHT, TOC 및 LAA의 2.513, 2.833, 2.404에 비해서 메탄올과 열수추출물은 각각 0.660과 0.471로 나타나 동일한 농도에서 메탄올과 열수추출물의 환원력은 양성대조군에 비해 매우 낮았다. Mau 등(2004)은 버섯의 환원력 실험에서 잎새버섯의 메탄올 추출물 5 mg/mL 농도에서의 환원력은 0.37로 나타나 본 실험의 4 mg/mL 농도에서

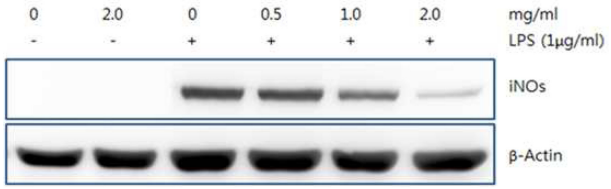

Fig. 5. Inhibitory effect of methanol extract from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata* on LPS-induced expression of nitric oxide synthase (NOs). RAW264.7. cells were incubated with LPS (1 μg/mL) in the presence or absence of indicated concentrations of mushroom extract. After 24h incubation, cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and blotted with mouse monoclonal anti-iNOs antibody (iNOs). β-Actin was used as an internal control.

의 메탄올과 열수추출물의 환원력 1.96과 1.83 비해 매우 낮았다. 따라서 흰망태버섯의 환원력은 본 실험에 사용한 양성대조군에 비해서는 매우 낮았으나 잎새버섯의 환원력에 비해서는 높은 것으로 나타났다.

NO 생성 저해 효과

NO는 생체의 염증 유발에 관여하는 활성산소의 일종으로 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine

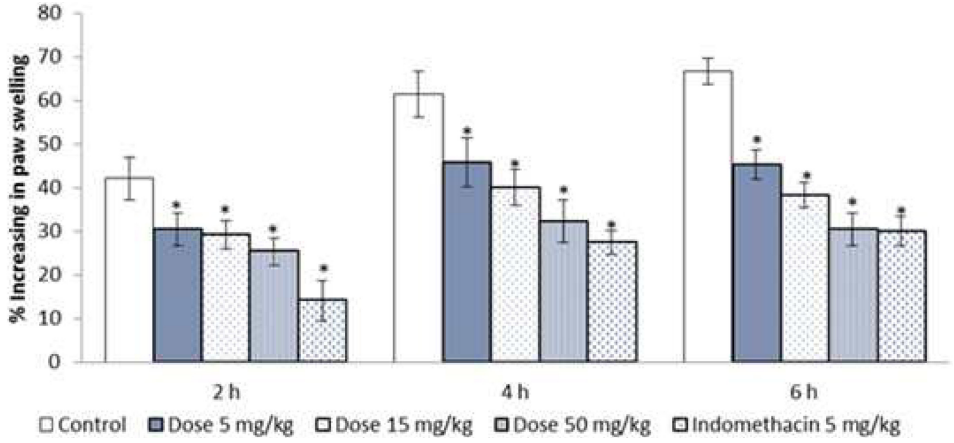

Fig. 6. Effect of methanol extract from fruiting bodies of *Dictyophora indusiata* on carrageenan-induced paw edema of rats. ±SD (n = 5). *P<0.01 vs. group treated with carrageenan alone.

으로부터 만들어진다. 본 실험에서는 흰망태버섯의 추출물을 RAW 264.7 세포에 투여하고 이어서 염증 유발물질인 LPS를 투여하여 버섯 추출물이 RAW 264.7 세포내에서의 NO의 생성을 저해하는 효과를 측정하였다. 실험 결과 RAW 264.7 세포만 배양한 대조군의 NO 농도는 6.47 μM로 낮게 측정되었으나 LPS를 처리한 군에서 NO의 농도는 43.55 μM로 약 6.73배 증가하였다. 그러나 메탄올 추출물을 2.0 mg/mL로 처리한 실험군의 NO 생성은 8.39 μM로 낮아져 메탄올 추출물이 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포내의 NO의 생성을 크게 억제하는 것을 확인할 수 있었으며 열수 추출물을 2.0 mg/mL로 처리한 실험군의 경우에도 7.61 μM의 NO가 생성되어 저해 효과가 메탄올 추출물에 비해서 높았으나 통계적인 유의성은 없었다 (Fig. 5). 강 (2012)의 연구에 의하면 팽이버섯의 열수추출물을 RAW 264.7 세포에 처리 후 LPS로 처리했을 때 RAW 264.7 세포 내의 NO의 생성은 농도 의존적으로 감소하였으며, 1.0 mg/mL의 처리에 의해 NO의 생성 저해가 유의성 있게 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서도 RAW 264.7 세포에 처리한 버섯 추출물의 농도가 높아짐에 따라 NO의 생성이 농도 의존적으로 감소하여 위에서 보고한 것과 매우 유사한 결과를 얻었다.

Western blot analysis

iNOS의 측정은 각각의 추출물을 RAW 264.7 세포를 24시간 처리한 후 cell을 용해시켜 cell 단백질을 모아 western blot analysis를 행하였다. Western blot analysis 결과 iNOS 단백질의 발현은 대조군에서는 나타나지 않았으나 LPS를 처리하였을 때 강하게 발현되었고, 흰망태버섯의 메탄올과 열수추출물을 처리한 실험군에서 iNOS 단백질의 발현이 모두 감소하였다. 또한 RAW 264.7 세포에 처리한 흰망태버섯 추출물의 농도가 높아질수록 iNOS 단백질은 감소하는 경향을 보였으며 이 결과는 앞에서의 NO의 생성 결과와 유사하게 나타났다. 그러나 RAW 264.7 세포에 흰망태버섯의 메탄올과 열수 추출물을 처리했을 때 house-keeping gene인 β-actin 단백질은 처리된 농도와 관계없이 일관되게 발현되는 것이 관찰되었다(Fig. 6). 이 결과는 흰망태버섯 추출물이 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포에서 β-actin 단백질의 생성을 저해하는 효과가 전혀 없었고, NO의 생성과 iNOS 단백질의 발현에만 특이적으로 저해하는 것이어서 앞으로 망태버섯의 추출물을 항산화 및 소염제로 이용할 수 있는 가능성을 보여준 것으로 사료된다.

Carrageenan에 의한 부종유발 및 소염효과의 측정

흰쥐의 뒷발에 Carrageenan으로 유도된 부종에 대한 흰망태버섯의 메탄올추출물의 소염효과를 Fig. 7에 표시하였다. 실험 결과 기염제인 carrageenan만을 주사한 대조군의 경우 carrageenan에 의해 유도된 흰쥐의 뒷발 부종용적은 주사 후 2~6시간에 42.15~66.71%로 증가 했으나, carrageenan 주사 후 소염제인 indomethacin을 5 mg/kg 투여한 양성 대조군은 14.16~29.96% 증가했다. 반면에 흰망태버섯의 메탄올 추출물을 5 mg/kg 주사 후 carrageenan을 투여한 군의 부종 용적은 30.52~45.21% 증가했고, 메탄올 추출물을 15 mg/kg 투여한 실험군의 부종 용적은 29.19~38.33%로 증가했으며, 50 mg/kg의 메탄올 추출물을 투여한 실험군의 부종 용적은 25.44~30.56%

로 증가했다. 따라서 흰쥐의 뒷발에 투여한 흰망태버섯 추출물은 낮은 농도나 높은 농도에 상관없이 소염효과가 있는 것으로 나타났다. 저농도인 5.0 mg/kg을 투여한 후 나타난 소염효과는 indomethacin을 5.0 mg/kg 투여한 양성대조군의 효과에 비해서는 낮았으나 고농도인 50 mg/kg의 버섯 추출물을 투여한 실험군의 소염효과는 5.0 mg/kg의 indomethacin을 투여한 양성대조군의 효과와 유사하게 높았다. 따라서 흰망태버섯 메탄올 추출물에는 소염효과를 나타내는 유효성분이 함유되어 있는 것으로 사료되었다. Lim 등(2010)은 carrageenan을 주사하여 부종이 유발된 흰쥐에 목질진흙버섯의 열수추출물을 투여한 후 소염효과를 측정한 결과 투여한 목질진흙버섯 추출물의 농도가 증가함에 따라 소염효과도 이에 비례해 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서도 carrageenan만을 처리한 대조군을 제외하고 소염제인 indomethacin을 투여한 양성대조군과 흰망태버섯 메탄올 추출물의 농도를 달리해 투여한 모든 실험군에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 소염효과도 증가하는 것을 관찰할 수 있어서 앞으로 본 실험에 사용한 추출물은 알레르기나 관절염과 같은 염증질환에 대해서 추가의 실험이 필요할 것으로 사료되었다.

적 요

본 연구에서는 흰망태버섯의 자실체에서 메탄올과 열수를 이용해 추출한 물질의 항산화 및 항염증 효과를 탐색하였다. DPPH 라디칼 소거능, 환원력 및 철 이온제거능을 이용해 항산화 효과를 측정한 결과 양성대조군으로 사용한 BHT나 토코페롤에 비해 낮았지만 다른 종류의 버섯에 비해 효과가 우수한 것을 확인하였다. 철 이온을 제거하는 항산화 실험에서 흰망태버섯의 메탄올 추출물의 효과는 양성대조군인 BHT나 토코페롤에 비해 월등하게 높아서 흰망태버섯 자실체의 추출물은 높은 항산화 효과를 지닌 것으로 나타났다. 흰망태버섯의 염증저해 효과 실험에서는 배양 중인 RAW 264.7 대식세포에 흰망태버섯 자실체의 메탄올 및 열수추출물을 각각 전 처리 한 후 염증매개 물질인 LPS를 투여하여 추출물의 NO 생성 저해효과를 조사하였다. 실험 결과, 처리한 추출물의 농도가 증가함에 따라 생성된 NO의 양이 현저하게 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 흰망태버섯의 추출물이 carrageenan에 의해 흰쥐의 뒷발에 유도된 부종 저해 실험에서는 투여한 추출물의 농도가 증가함에 따라 흰쥐의 뒷발에 유도된 부종의 용적도 농도 의존적으로 감소되었다. 따라서 흰망태버섯의 자실체에 함유된 물질은 항산화 및 소염증제로 이용이 가능하다고 사료되었다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호 : PJ006425022013 2013)의 지원에 의해 이루어진 결과이며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

Weisburger, J. H. 1999. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes, and tea. Food Chem. Toxicol. **37** : 943-948.

Ahn, E. K., Jeon H. J., Lim, E. J., Jung, H. J. and Park, E. H. 2007. Anti-inflammatory and anti-angiogenic activities of *Gastrodia elata* Blume. J. Enthnopharm. **110** : 476-482.

Park Y. M., Won, J. H., Kim, Y. H., Choi, J. W., Park, H. J. and Lee, K. T. 2005. In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. J. Ethnopharm. **101** : 120-128.

Gross R. L. and Newberne, P. M. 1980. Role of nutrition in immunologic function. Physiol. Rev. **60** : 188-302.

Park, W. H. and Lee, H. D. 1997. Illustrated book of Korean medicinal mushrooms. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd.. pp. 576. Seoul, Korea.

Shim, S. M., Im, K. H., Kim, J. W., Shim, M. J., Lee, M. W. and Lee, T. S. 2003. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. Kor. J. Mycol. **31** : 155-160.

Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several region of Argentina. J. Enthnopharm. **71** : 109-114.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Immunol. Meth. **65** : 55-63.

Gulcin, I., Buyukokuroglu, M. E., Oktay, M. and Kufrevioglu. O. I. 2003. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. Pallsiana (Lamb.) Holmboe. J. Ethnopharmacol. **86** : 51-8

Yena, G. C., Duhb, P. D. and Tsaia, L. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. Food Chem. **79** : 307-313.

Ryu J. H., Ahn H, Kim, J. Y. and Kim, Y. K. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. Phytother. Res. **17** : 485-489.

Cho, Y. J. and Ahn, B. J. 2008. Anti-inflammatory effect of extracts from Cheongmoknosang (Morus alba L.) in lipopolysaccharide stimulated Raw cells. J. Kor. Soc.

Appl. Biol. Chem. **51** : 44-48.
Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W. 1962. Carrageenan induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activit. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **111** : 544-547.
Leong, L. P. and Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chem. **76** : 69-75.
Choi, Y. M., Chang, W. B., Choi, S. Y., Choi, J. S., Noh, J. G., Song, I. K., Min, K. B. and Lee, J. S. 2008. Biological activities of *Lyophyllum ulmarium* extracts. J. Agri. Life Sci. **42** : 35-41.
Lee Y. L., Huang. G. W., Liang, Z. C. and Mau J. L. 2007a. Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. LWT-Food Sci. Technol. **40** : 823-833.
Tsai, S. Y., Huang, S. J, and Mau, J. L. 2006. Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. Food Chem. **98** : 670-677.
Mau, J. L., Chang, C. N., Huang, S. J. and Chen, C. C. 2004. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta*, and *Termitomyces albuminosus* mycelia. Food Chem. **87** : 111-118.
Lee, Y. L., Yen, M. and Mau, J. L. 2007b. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. Food Chem. **104** : 1-9.
Kang, H. W. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer. J. Kor. Soc. Food Nutr. **41** : 1072-1078.
Lim, J. H., Kim, S. H., Park, N. H., Moon, C. G., Kang, S. S., Kim, S. H., Shin, D. H. and Kim, J. C. 2010. Acute and chronic antiinflammatory effects of *Phellinus linteus* water extract in rats J. Biomed. Res. **11** : 27-35.