

석사학위논문

감귤농축액으로 배양한 운지버섯균사체 배양추출물이

알콜에 의한 신경세포의 죽음에 미치는 영향



제주대학교 대학원

의학과

현 승 돈

2007년 12월

감귤농축액으로 배양한 운지버섯균사체 배양추출물이

알콜에 의한 신경세포의 죽음에 미치는 영향

지도교수 : 이 영 기

현 승 돈

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2007년 12월

현승돈의 의학 석사학위논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2007년 12월

Effects of Culture Extracts from *Coriolus Versicolor* Mycellium Grown in Citrus Extract on Ethanol-Induced Neurotoxicity

Seung-Don Hyun

(Supervised by Youngki Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF MEDICINE

A large, faint watermark of the Cheju National University seal is centered on the page. The seal is circular and contains the text 'CHEJU NATIONAL UNIVERSITY' around the top and 'SINCE 1952' around the bottom. In the center of the seal is a shield with a crown on top and a laurel wreath at the base.

DEPARTMENT OF MEDICINE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2007. 12

ABSTRACT

Ethanol-induced neuronal death in fetal period is closely related with blood ethanol concentration and oxidative stress by reactive oxygen species(ROS) has been known to be involved in the mechanism of neuronal death in response to ethanol treatment. Recent studies have described anticancer and antioxidant activities of *Coriolus versicolor* culture extracts cultivated in citrus extracts. Therefore, we firstly screened the possibility that citrus extracts and culture extracts of *Coriolus versicolor* mycellium grown in citrus extract liquid medium could be effective in preventing ethanol-induced neurotoxicity employing the clonal hippocampal cell line HT22. Secondly, it was investigated whether the mycellium culture extracts are able to lower blood ethanol concentration in the mouse following ethanol administration. A 24hr incubation with ethanol 100-800 mM caused a dose-dependent loss of cell viability. Citrus extract of 0.1-1% and mycellium extracts of 0.5-4% did not reveal any effect on cell viability while 2-4% citrus extracts and 8% mycellium culture extracts significantly reduced the survival rate of HT22 cell. Co-incubation of citrus extract and mycellium culture extracts with ethanol resulted in a significant decrease in ethanol-induced neurotoxicity by increasing cell viability. ROS scavenging effects of citrus extracts and mycellium culture extracts at 3% concentrations were increased 38% and 27% of controls receiving only ethanol(800mM), respectively. Citrus extracts and mycellium culture extracts reduced blood ethanol concentrations in mouse administrating ethanol and the effect is more pronounced in mycellium culture extracts treated ones than in citrus extracts treated ones, 21% and 12% respectively. These results indicated that citrus and mycellium culture extracts are effective to ameliorate the ethanol-induced neurotoxicity.

Key words: Blood ethanol concentration, mycellium culture extract, cell viability, ROS, HT22 cell line

목 차

Abstract.....	i
목 차.....	ii
List of Figures.....	iii
I. 서 론	1
II. 연구재료 및 방법.....	4
1) 시 료	
2) 실험동물	
3) 세포배양	
4) 세포독성 실험	
5) 활성산소종의 측정	
6) 혈중알콜농도측정	
7) 통계처리	
III. 결 과.....	6
1) 에탄올에 의한 신경세포독성의 조사	
2) 감귤농축액 및 추출물에 의한 신경세포독성조사	
3) 감귤농축액과 버섯균사체배양추출물이 에탄올에 의한 신경세포사멸 억제효과	
4) 감귤농축액과 버섯균사체배양추출물이 에탄올에 의한 활성산소종 생성 억제효과	
5) 생체에서 혈중알콜농도의 감소효과	
IV. 고찰.....	15
V. 참고문헌.....	18

LIST OF FIGURES

Figure 1. Cell survival as assessed by MTT assay after 24hr treatment with ethanol.....	9
Figure 2. HT 22 cell survival aasay after 24 hr treatment with citrus extracts.....	10
Figure 3. HT 22 cell survival aasay after 24 hr treatment with mycellium extracts.....	11
Figure 4. HT 22 cell survival after 24 hr treatment of ethanol with or without co-incubation with citrus extracts.....	12
Figure 5. HT 22 cell survival after 24 hr treatment of ethanol with or without co-incubation with mycellium extracts.....	13
Figure 6. Effects of citrus extracts on scavenging intracellular reactive oxygen species induced by ethanol treatment.....	14
Figure 7. Effects of mycellium extracts on scavenging intracellular reactive oxygen species induced by ethanol treatment.....	15
Figure 8. Effect of citrus or mycellium extracts on blood alcohol concentration in mouse.....	16

I. 서 론

지난 10여 년 동안 세계는 교역의 자유화라는 명제 하에 자국 산업의 보호와 발달을 최우선하는 새로운 무역질서를 형성하고 있다. 즉 1993년 우루과이라운드(UR)협상이 타결되고 이어서 1994년 세계무역기구(WTO)체제가 운영되면서 농산물교역의 자유화가 급속히 진전되고 있어 이 부분에서 상대적으로 취약한 구조를 가지고 있는 우리나라에서도 제반 농업정책이 재고되어 왔다. 더구나 감귤이 최대의 주요 농산물인 제주지역에서는 이러한 새로운 무역질서에 가장 직접적인 영향을 받을 수밖에 없다. 특히 외국산 감귤류 수입의 증대, 97년 이후의 오렌지주스의 수입 완전개방은 생산과잉 및 수요 감소와 동반되어 감귤의 가격 하락을 가져왔다. 이는 감귤이 제주도에서 농업생산액 점유율 60%를 상회하고 있는 높은 지역경제비중으로 인하여 기타 산업분야에 과급효과를 가져와 전체 제주지역경제에 심각한 영향을 미치고 있는 실정이다. 이러한 국내외의 상황은 제주감귤의 새로운 방식의 소비촉진 방안이 요구되고 있는 실정이다 (강경선, 2002).

감귤은 과실로서의 가치뿐만 아니라 전통적으로 약재로서의 효능도 인정받고 있는데 특히 껍질에 함유된 플라보노이드, 알칼로이드 및 비타민 계열의 성분 등은 심장혈관질환에 대한 효과, 항산화작용, 암 예방 효과, 항알러지 효과와 같은 다양한 약리적 활성이 있는 것으로 알려져 있다 (Lee et al., 1992). 또한 감귤 농축액은 섬유질, 당분, 미네랄 등의 함유량이 높아 버섯균사체 등의 배양기질로 이용될 수 있으며 (강태수 등, 1997) 이로부터 얻은 버섯 배양물은 항산화효과 및 자궁암, 폐암, 전립선암 등에 항암효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있어 이를 이용한 기능성 식품이나 향장품의 원료로 개발되고 있다 (문상욱, 2003).

식용 및 약용으로 사용되는 버섯은 근래에 이르러 다양한 암세포주의 배양실험에서 항암효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다(Bohn and Bemiller, 1995; Chung, 1998). 특히 표고버섯 *Lentinus edodes*(Fuji et al., 1978; Lee et al., 1990), 운지버섯 *Coriolus versicolor*(Lee et al., 1992; Park et al., 1989), 갓

버섯 *Lepiota procera*(Kim et al., 1989) 등에서 항암효과를 나타내는 물질은 이들 버섯에서 함유하고 있는 단백다당류(proteoglycans)인 것으로 알려지고 있다. 그러나 이들 버섯으로부터 추출된 단백다당류의 구체적인 항암의 기작에 대해서는 잘 알려진 바가 없으며 생체의 면역력을 증가시키거나 큰 포식세포의 활성화증가 혹은 수적 증가 등에 의해 기인하는 것으로 보고되고 있다(Fuji et al., 1978). 이 중에서 운지버섯은 수십 내지 수백 개가 겹쳐서 군생하는 1년생으로서 그 자실체 혹은 균사체에서 추출한 성분이 항암효과(Lee et al., 1992; Park et al., 1977)나 동맥경화지수를 저하시키는데(고와 최, 2004) 효과가 있는 것으로 보고되고 있는 등 그 효능에 대해서 많은 연구가 진행되어 왔다.

한편 각종 Alzheimer's disease, Parkinson's disease 등과 같은 퇴행성 뇌 질환이나 허혈, 각종 약물에 의한 neurotoxicity 등은 궁극적으로 신경세포의 죽음에 의해 일어나는 것으로 알려지고 있다 (Mattson, M.P. et al., 2001; Mehler and Gokhan, 2000). 신경세포의 죽음은 전통적으로 apoptosis와 necrosis라는 두 개의 다른 방식에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며(Server and Mobley, 1991), 이 두 세포죽음의 기작은 모두 활성산소종(reactive oxygen species)의 생성과 그에 따른 신경세포의 oxidative stress와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다 (Slater et al., 1996; Gorman et al., 1997; Simon et al., 2000; Fleury et al., 2002). 특히 알콜은 사람에게서 임신후반기에 다량으로 섭취하였을 경우 소두증(microcephaly), 소뇌증(microencephaly), 정신발달장애증(mental retardation) 등을 수반하는 fetal alcohol syndrome을 유발하는 것으로 알려졌다 (West et al., 1994; Warren et al., 2001; Riley et al., 2001). 이러한 fetal alcohol syndrome의 소견들은 실험동물에서의 연구결과에 의하면 알콜투여가 대뇌피질(cerebral cortex) (Ikonomidou et al., 2000; Han et al., 2005), 소뇌(cerebellum) (Goodlett et al., 1991; Pantazis et al., 1993), 해마(hippocampus) (Bonthius and West, 1991; Moulder et al., 2002), 후각망울(olfactory bulb) (Chen et al., 1999; Maier et al., 1999) 시상(thalamus) (Mooney and Miller, 2001) 등에서 대량의 신경세포죽음에 의한 것으로 밝혀지고 있다. 알콜에 의한 신경세포의 죽음과 관련된 기작에 대해서는 다양한 연구가 진행되고 있는데 에탄올이 NMDA antagonist와 GABA agonist로

작용함으로써 NMDA glutamate 수용체의 차단과 GABA 수용체의 과활성(hyperactivation)에 의해서 세포독성을 일으키는 것으로 보고된 바 있다(Harris et al., 1995; Hoffman et al., 1989; Lovinger et al., 1989). 또한 최근의 일련의 연구결과 의하면 이러한 알콜에 의한 신경세포의 죽음은 caspase-3 활성화에 의한 세포자연사(apoptosis)에 의해 일어나는 것으로 보고되고 있으며 (Han et al., 2005; Olney et al., 2002), 이러한 세포자연사는 알콜에 의해 활성산소종이 세포내에서 생성됨으로써 유발되는 것으로 알려지고 있다(Heaton et al., 2002; Suh et al., 2001).

따라서 본 연구는 감귤농축액을 버섯균사체의 배양기질로 하여 얻은 균사체 배양추출물과 감귤농축액이 1) 에탄올에 의한 신경세포의 죽음에 미치는 영향 2) 신경세포에서 에탄올에 의한 활성산소종 생성에 미치는 영향 3) 에탄올을 투여한 생쥐에서 혈중알콜농도에 미치는 영향을 조사함으로써, 균사체배양추출물이 뇌질환의 예방과 관련된 기능성식품으로서 개발가능성을 탐색하는 것을 그 목표로 하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1) 시 료

본 연구에 사용된 감귤농축액과 균사체배양추출물은 (주)대우환경산업에서 생산된 것으로, 균사체배양추출물은 운지버섯(*Coriolus versicolor*)의 균사체를 감귤농축액을 배지로 하여 배양한 후 추출한 것을 사용하였다.

2) 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 제주대학교 의과대학 동물사육실에서 사육된 생쥐(mouse, Balb/c strain) 수컷(10-20g)이었다. 실험군은 1) 무처리군 2) ethanol 처리군 3) ethanol + 감귤농축액 처리군 4) ethanol + 균사체배양추출물 처리군으로 구분하였다. ethanol은 40%(w/v)로 희석하여 200ul를 10분 간격으로 2회 피하주사 하고, 10분 후 감귤농축액 혹은 균사체배양추출물의 200ul를 위내로(intragastric) 2회 처리하였다. 2시간 혈중알콜농도(blood alcohol concentration, BAC)의 측정을 위해 심장으로부터 혈액을 채취 하였으며 BAC 측정은 Sigma Diagnostic alcohol assay kit(Sigma Chemical Co.)를 이용하였다.

3) 세포배양

본 연구에서는 clonal mouse hippocampal cell line인 HT22를 사용하였으며, 세포는 1mM sodium bicarbonate, 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Essential Medium (D-MEM)을 사용하였으며 5% CO₂와 37°C로 유지되는 배양기에서 배양되었다. 세포는 1x10⁵cells/cm²의 밀도로 24-well culture plate에 배양하였으며, ethanol은 100, 200, 400, 600, 800mM의 농도로 처리한 후 24시간 후에 cell viability를 측정하였다. 감귤농축액과 균사체배양추출물은 ethanol처리 30분전에 처리하였다.

4) 세포독성 실험 (MTT assay)

HT22 cell의 알콜에 의한 세포독성과 알콜에 의한 세포독성에 미치는 감귤 농축액과 군사체배양추출물의 영향을 조사하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 살아있는 HT22 cell의 미토콘드리아 탈수소효소(mitochondrial dehydrogenase)에 의해 MTT가 환원되어 형성되는 자주색을 띠는 비수용성의 formazan을 microplate reader로 측정하였다. 세포배양 후 배양액과 동량의 MTT solution (Sigma Chemical Co.)을 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후 반응액을 제거하고 100 ul 의 isopropanol을 첨가하여 발색반응을 유도하고 흡광도는 570 nm에서 측정하였다.

5) 활성산소종(Reactive Oxygen Species)의 측정

세포내 활성산소종의 측정을 위해 세포막 투과성 활성산소종 탐색자(probe)인 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(H₂DCFDA)를 사용하여 세포질 내 활성산소종의 생성과 축적을 측정하였다. 배양액에 ethanol 또는 감귤농축액/버섯군사체배양추출물을 처리하고 30분 후 0.5 mM H₂DCFDA를 37°C에서 10분 동안 처리한다. multiwell 형광측정기 (Tecan, Austria)를 이용하여 485 nm/595 nm 파장에서 형광의 강도를 측정하였다.

6) 혈중알콜농도의 측정

생쥐의 심장으로 부터 혈액을 채취한 후 혈청을 얻어 혈액속의 알콜농도를 UV-method에 의한 ethanol detection kit(Boeringer Mannheim)를 사용하여 측정하였다.

7) 통계처리

실험결과는 5회 이상의 독립적인 실험을 시행하여 mean + standard error 값으로 표시하였으며 실험군 사이의 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 사용하였다.

III. 결 과

1. 에탄올에 의한 신경세포독성의 조사

배양된 HT22 세포를 에탄올에 24시간 처리한 결과 세포생존율은 100mM 부터 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였으며, 800mM의 농도에서 대조군에 비해 약 39%의 생존율을 보였다 (Fig. 1). 이러한 결과는 in vivo 실험에서 에탄올을 처리했을 경우 뇌의 hippocampus에서 신경세포의 죽음을 일으킨다는 연구 보고와 일치하는 결과이다.

2. 감귤농축액 및 추출물에 의한 신경세포독성조사

감귤농축액과 균사체배양액추출물의 처리에 의한 신경세포의 독성을 유발할 가능성 그리고 감귤농축액이 산성을 나타내므로 배양액의 pH변화 등을 유발할 수 있으므로, 이들 물질을 세포배양액에 처리할 적정농도를 찾기 위한 실험을 하였다. 즉 감귤농축액과 균사체배양액추출물을 다양한 농도별로 세포배양액에 처리한 후 세포의 생존율을 조사한 결과, 감귤농축액의 처리한 실험에서는 0.1, 0.5, 1%의 농도에서는 HT22 세포의 생존율에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으나 2% 이상에서는 농도 의존적으로 세포의 생존율이 감소하였다 (Fig. 2). 또한 균사체배양액추출액을 처리했을 경우 0.5 ~ 4% 사이에서는 생존율에 영향이 없었으나 8%에서는 감소하였다 (Fig. 3). 이러한 결과는 감귤농축액과 균사체배양액추출액이 세포배양액의 pH변화를 일으킨 결과로서 사료된다.

3. 감귤농축액과 버섯균사체배양추출물이 에탄올에 의한 신경세포사멸 억제효과

감귤농축액과 균사체배양액추출액이 에탄올에 의한 신경세포죽음의 억제효과를 가져오는가에 대한 실험에서, 감귤농축액은 0.1, 0.5, 1%의 처리농도에서 전체적으로 HT22 세포의 에탄올의 처리에 반응한 세포생존율이 대조군에 비해 증가하는 경향은 있었으나 그 정도는 10% 이하로 효과가 적은 것으로 나타났다 (Fig. 4). 균사체배양액추출물을 0.5, 1, 2%의 농도로 처리한 경우에서도 감귤농

축액보다는 효과가 조금 더 있었으나 마찬가지로 그 영향이 크지는 않았다 (Fig. 5).

4. 감귤농축액과 버섯균사체배양추출물이 에탄올에 의한 활성산소종 생성 억제 효과

에탄올에 의한 신경세포의 죽음은 세포내 활성산소종의 축적과 그에 따른 oxidative stress가 그 원인 중의 하나인 것으로 알려지고 있다. 본 연구에서 서로 다른 농도의 감귤농축액(0.5, 1, 2, 3%)과 버섯균사체배양추출물(0.5, 1, 2, 3%)을 처리한 HT22 cell에서 항산화활성(antioxidant activity)을 조사하였다. HT22 cell을 30분전에 감귤농축액과 버섯균사체배양추출물을 전처리하였으며, 그 다음 에탄올을 처리하고 10분 후에 세포내 활성산소종의 양적 변화를 측정하였다. 감귤농축액이나 버섯균사체배양추출물의 처리한 모든 농도에서 활성산소종의 감소를 가져 왔으며 이러한 감소현상은 농도의존적인 양상을 보여주었다. 이러한 활성산소종의 감소현상은 버섯균사체배양추출물을 처리했을 때보다 감귤농축액을 처리했을 경우가 보다 효과적인 것으로 나타났다. 즉 에탄올농도 800mM에서 에탄올만을 처리한 대조군에 비해서 3% 버섯균사체배양추출물을 처리했을 경우에는 약 27%의 활성산소종 제거효과를 보였으나, 감귤농축액을 처리했을 경우에는 같은 농도에서 약 38%의 활성산소종 제거효과를 보여주었다 (그림 6, 7).

5. 생체에서 혈중알콜농도의 감소효과

에탄올에 의한 신경세포의 죽음이나 음주 후의 숙취현상은 혈중에탄올농도에 의존적인 것으로 알려지고 있다. 따라서 본 실험에서는 동물실험을 통해 감귤농축액이나 버섯균사체배양추출물이 혈중알콜농도를 감소시키는 효과가 있는가를 검증하고자 하였다. 이를 위해 생쥐에 에탄올을 처리하고 동시에 감귤농축액과 버섯균사체배양추출물을 투여한 2시간 후에 혈액을 채취하여 혈중알콜농도를 측정하였다.

감귤농축액은 대조군에 비해 약 12%의 혈중알콜농도의 감소를 가져 왔으며, 버섯균사체배양추출물은 약 21%의 감소를 일으켜 균사체배양추출물이 보다 효

과적인 것으로 나타났다 (그림 8).



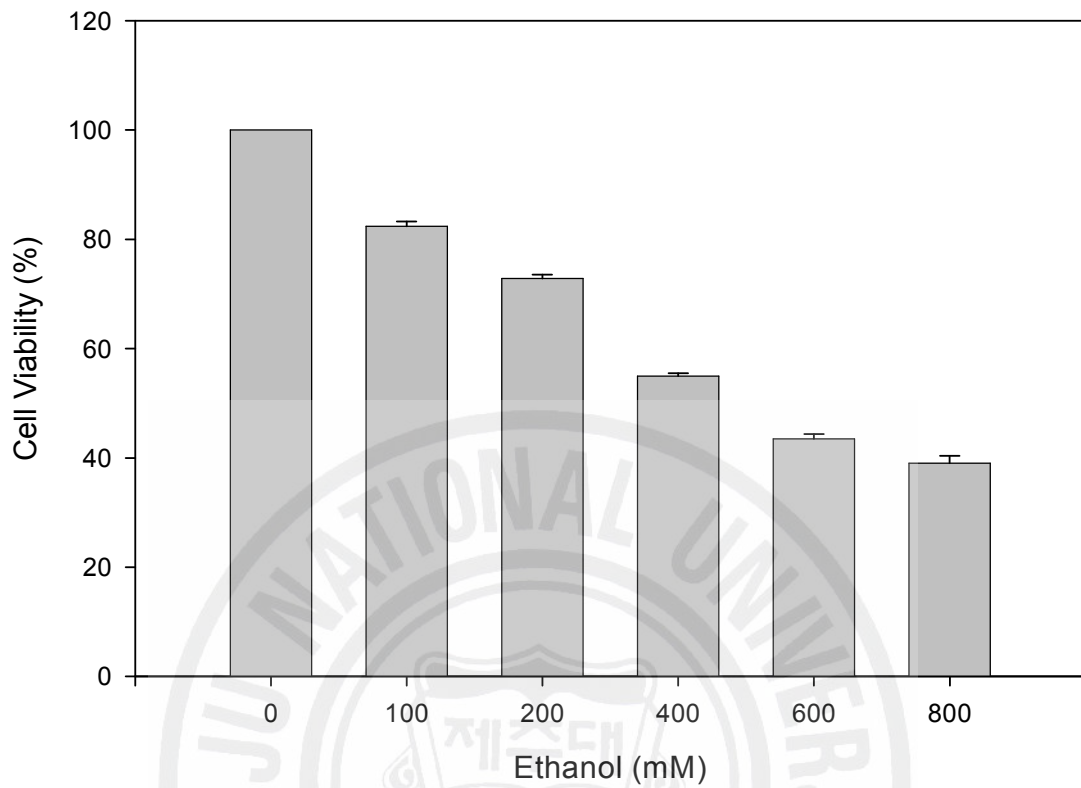


Fig. 1. Cell survival as assessed by MTT assay after 24 hr treatment with ethanol (n=7). Data are expressed as the percentage of viable cells obtained with ethanol treatment(controls).

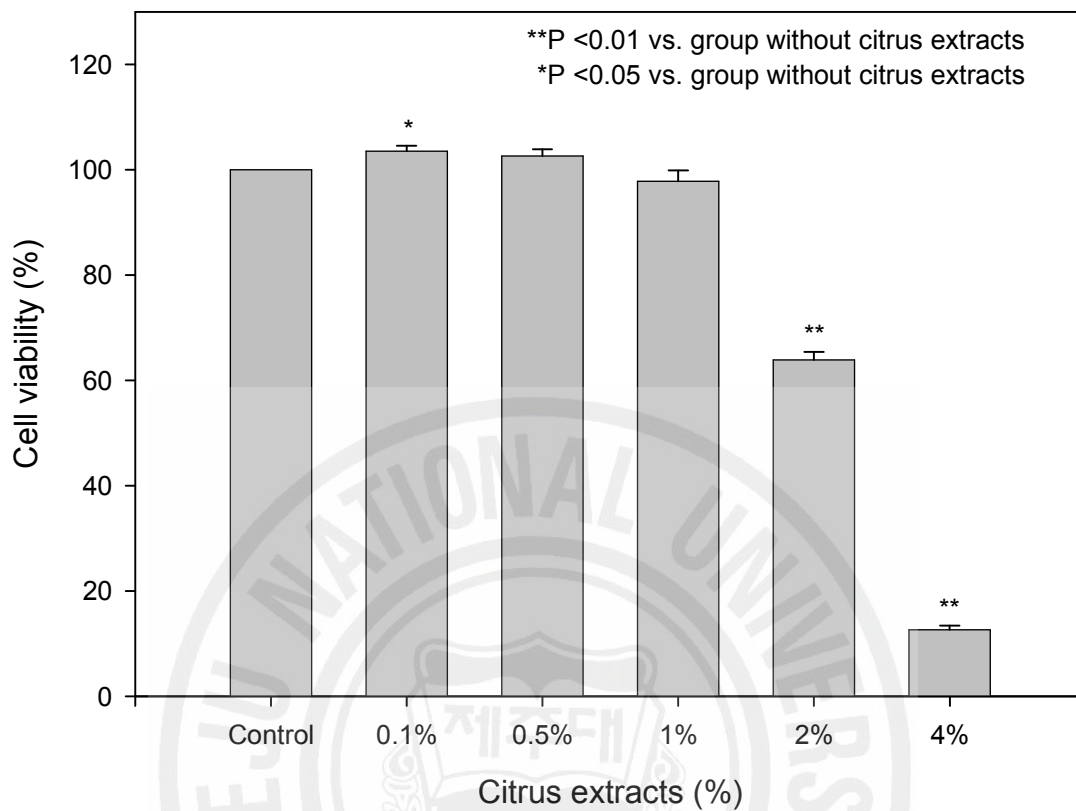


Fig. 2. HT 22 cell survival assay after 24 hr treatment with citrus extracts (n=6). The values are presented as means of \pm SEM, expressed as percentage of controls (without citrus extracts). **P < 0.01 vs. group without citrus extract; *P < 0.05 vs. group without citrus extracts.

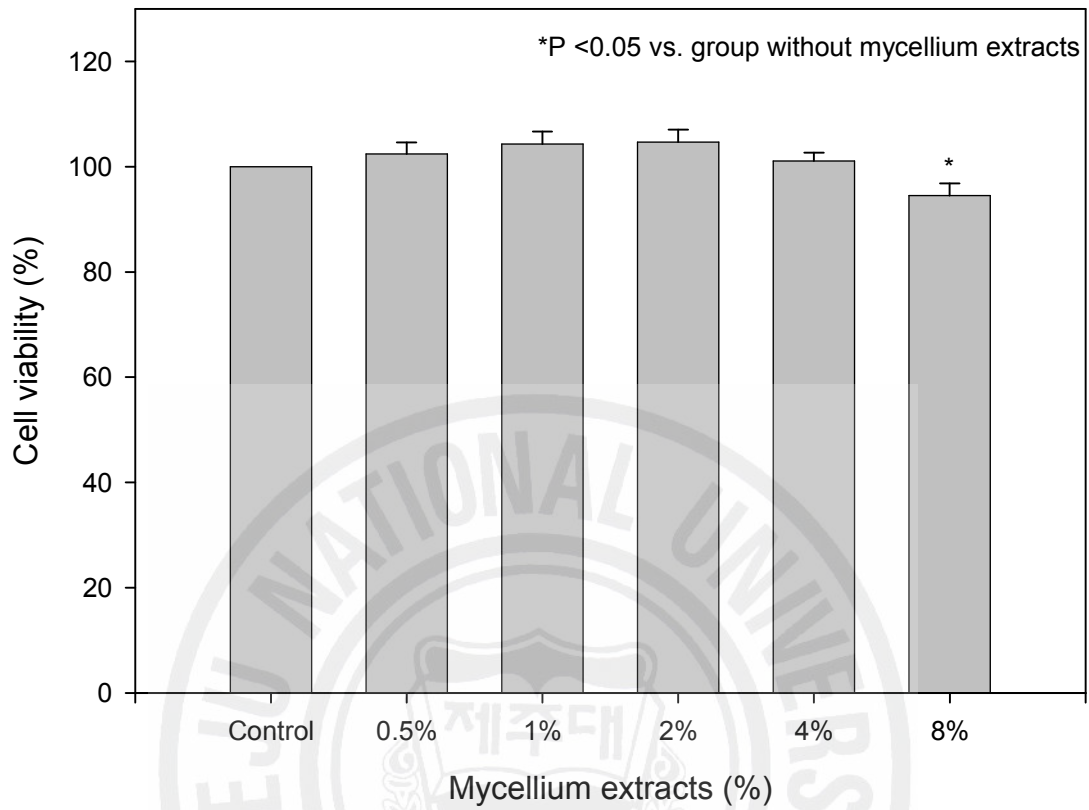


Fig. 3. HT 22 cell survival assay after 24 hr treatment with mycellium extracts (n=6). The values are presented as means of \pm SEM, expressed as percentage of controls (without citrus extracts). *P<0.05 vs. group without citrus extracts.

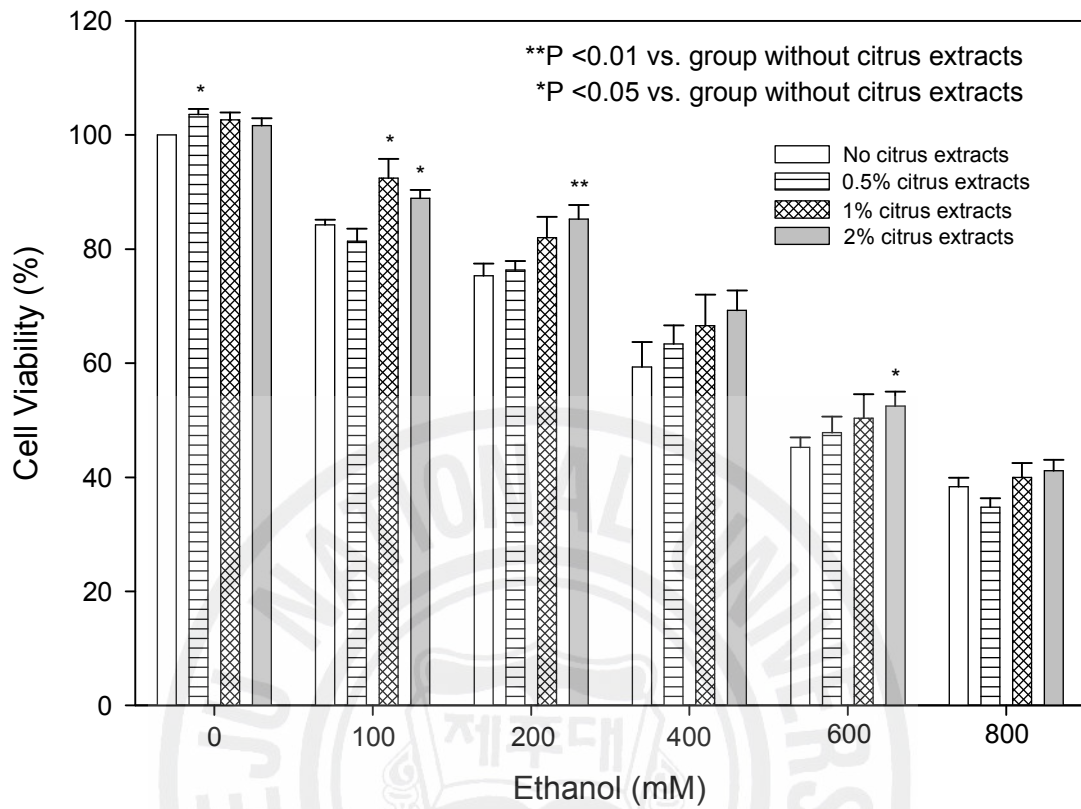


Fig. 4. HT 22 cell survival after 24 hr treatment of ethanol with or without co-incubation with citrus extracts. Data are expressed as percentage of controls (without citrus extracts) and presented as means \pm SEM. *P < 0.05 versus group without citrus extract; **P < 0.01 versus group without citrus extract.

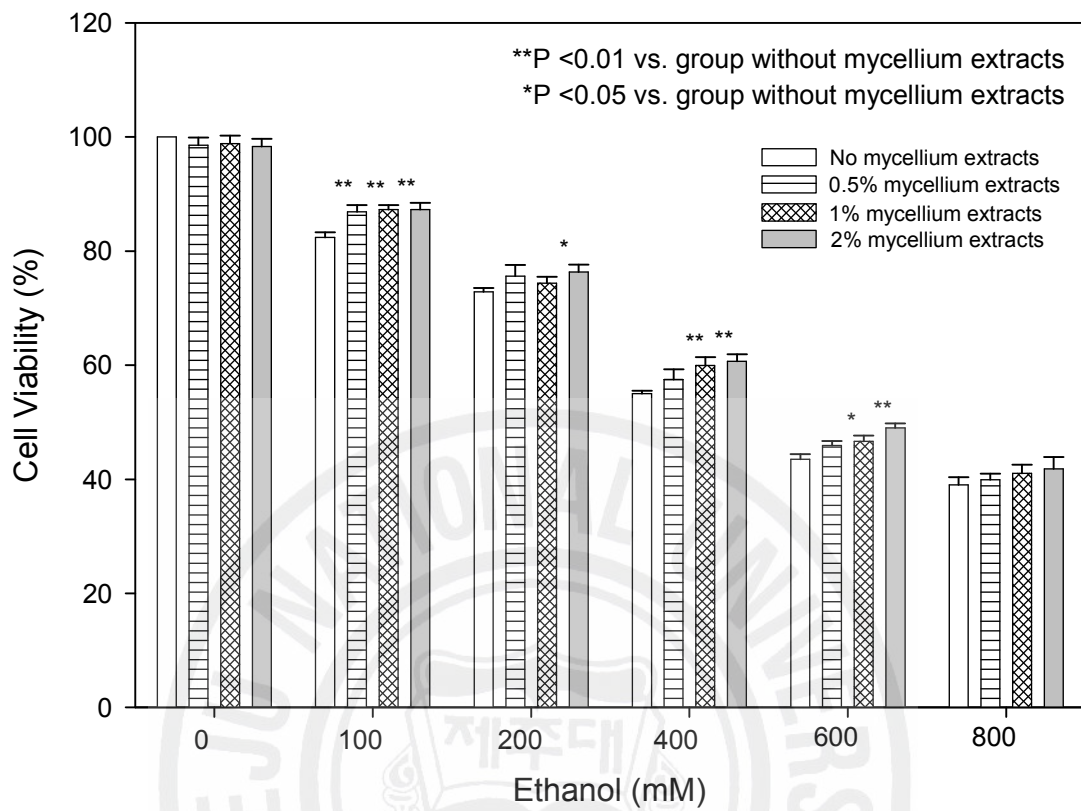


Fig. 5. HT 22 cell survival after 24 hr treatment of ethanol with or without co-incubation with mycellium extracts. Data are expressed as percentage of controls (without citrus extracts) and presented as means \pm SEM. *P < 0.05 versus group without mycellium extract; **P < 0.01 versus group without mycellium extract.

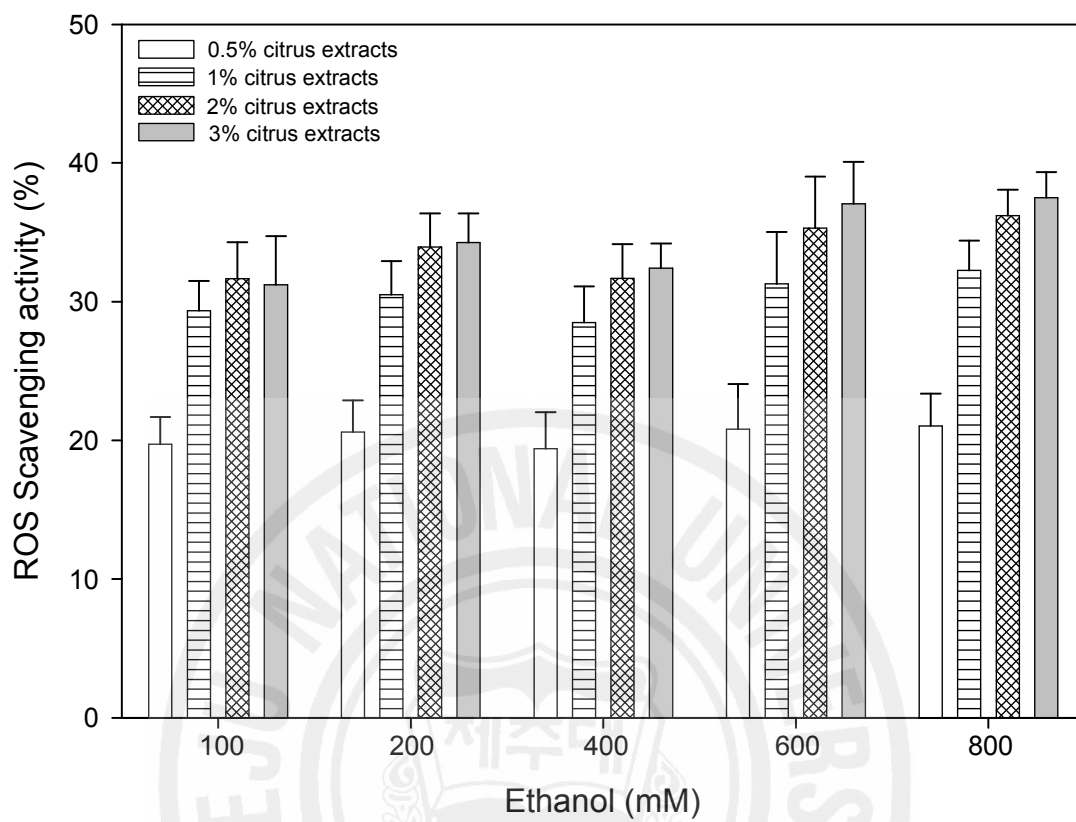


Fig. 6. Effects of citrus extracts on scavenging intracellular reactive oxygen species induced by ethanol treatment.

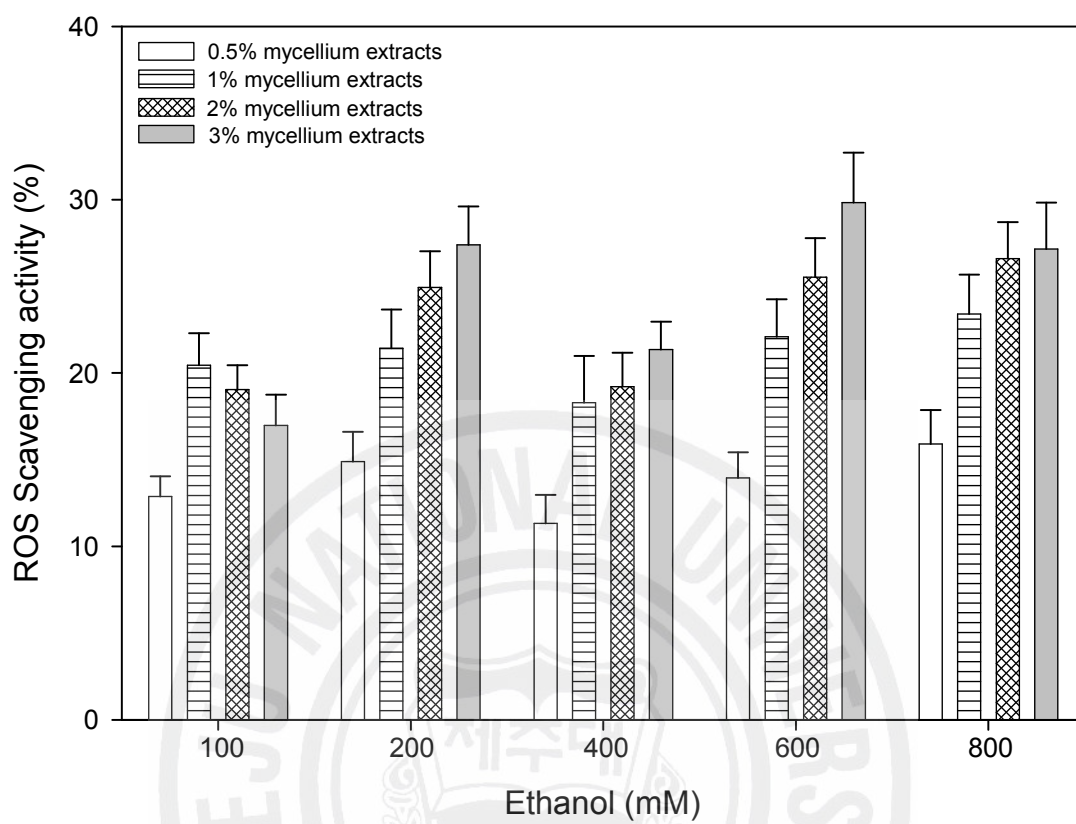


Fig. 7. Effects of mycellium extracts on scavenging intracellular reactive oxygen species induced by ethanol treatment.

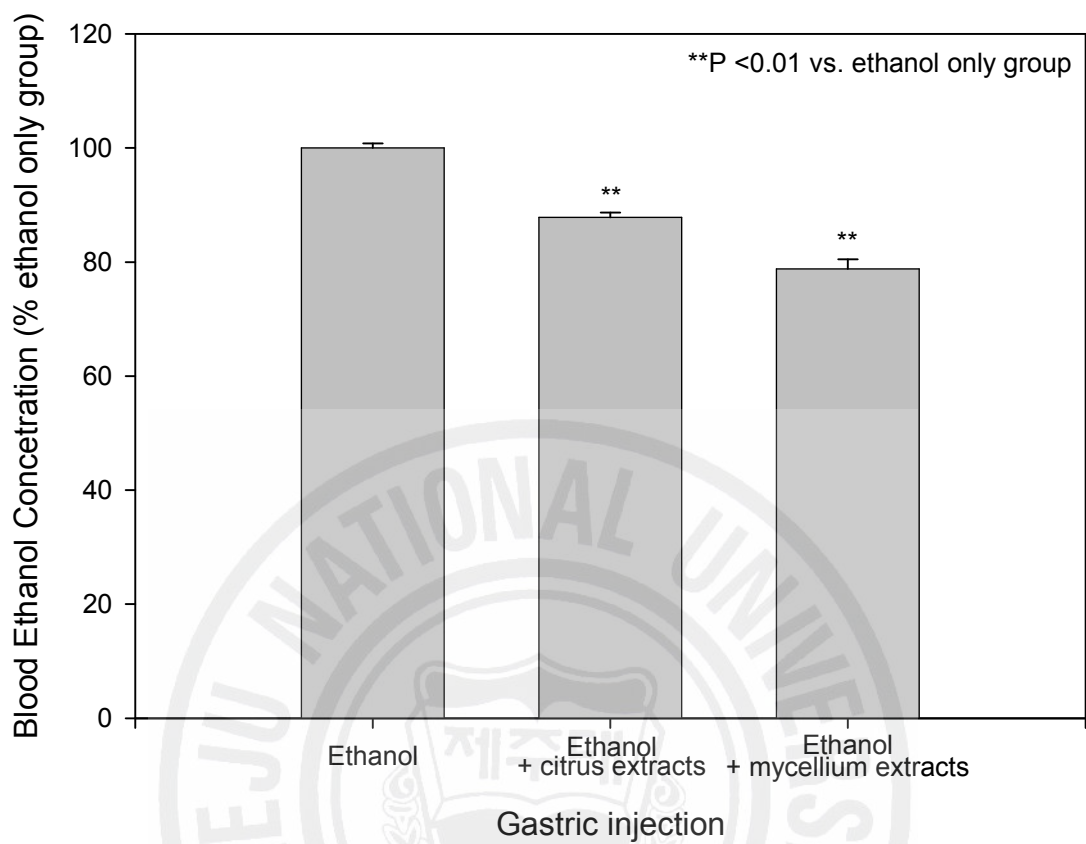


Fig. 8. Effect of citrus or mycellium extracts on blood alcohol concentration in mouse. Data are expressed as percentage of controls(ethanol only treated group) and presented as means \pm SEM. **P <0.01 vs. ethanol only group

IV. 고 찰

근래에 버섯균사체의 배지로서 대두분 등을 이용하여 배양한 후 그 추출물을 이용한 기능성 식품이 개발되어 다양한 제품이 시중에 유통되고 있다. 이러한 버섯균사체추출물은 면역증강이나 혈중알콜농도의 저하를 통한 숙취의 해소 등에 효과가 있는 것으로 알려져 소비자들에게 일정부분의 호응을 얻고 있는 것으로 알려지고 있다. 그러나 버섯균사체의 배양방법 등에 여러 가지 문제점을 가지고 있어 기능성을 갖는 배양기질의 대량 확보가 쉽지 않은 실정이다. 또한 버섯균사체추출물에 대해 알려진 효능에도 불구하고 이를 이용한 기능성식품이 시장에서 고가로 유통되고 있어 소비자들에게 실제적인 구매효과를 가져오는 데는 한계가 있어왔다.

최근의 연구결과에 의하면 버섯균사체의 배양기질로서 감귤농축액을 사용하여 균사체의 높은 회수율은 물론 그 균사체 버섯배양물이 항산화활성도를 가지며(Lee et al., 1990), 세포배양실험에서의 자궁암, 폐암, 전립선암 등에서 높은 항암효과를 관찰한 바 있다. 또한 그 배양물에서 버섯균사체의 주된 생리활성물질로서 면역 조절기능과 생체활성기능을 갖는 것으로 알려진 베타글루칸이 존재한다는 보고가 있었다 (하영래, 2002; Lee et al., 1992). 이러한 결과에 근거하여 배양액으로서 감귤농축액을 이용하여 버섯균사체를 배양한 후, 그 배양추출물을 이용하여 기능성 음료가 개발되어 출시되고 있으나 그 생리적 기능에 대한 연구는 미미한 실정이다.

한편 알콜의 섭취는 중추신경계통에서 신경연접 숫자의 감소, 말이집(myelin)의 소실, 그리고 신경세포의 죽음 등을 일으키는 것으로 알려져 왔다 (Moselhy et al., 2001; Brooks, 2000; Obernier et al., 2002). 산모에서 임신 후반기에 특히 신경세포의 분화와 발생이 왕성히 일어나는 brain growth spurt period에 알콜의 과다한 노출은 microencephaly, microcephaly, mental retardation 등으로 특징지어지는 fetal alcohol syndrome을 일으키는 것으로 보고되고 있다 (West et al., 1994; Warren et al., 2001; Riley et al., 2001). 일련의 연구결

과 알콜에 의한 중추신경계의 이상은 발생 중에 신경세포의 생성 (neurogenesis)이나 신경세포의 이동을 저해함으로써 일어나는 것이라기보다는 알콜에 의한 신경세포의 죽음이 그 주된 원인인 것으로 밝혀지고 있다 (Ikonomidou et al., 2000). 이러한 알콜에 의한 신경세포의 죽음은 신경세포내의 활성산소종의 축적과 그에 따른 oxidative stress가 그 주된 원인의 하나로 보고되고 있다 (Heaton et al., 2002; Suh et al., 2001). 따라서 본 연구의 궁극적인 목적은 감귤농축액으로 배양한 버섯균사체의 배양액추출물이 알콜에 의한 신경세포의 죽음에 미치는 영향을 조사하는 것이었다.

Hippocampal cell line인 HT22 cell을 에탄올에 24시간 처리하였을 때 농도에 의존적인 세포생존능의 감소를 가져왔는데 이것은 이미 보고된 다른 연구자들의 결과와 잘 일치하였으며, 실험동물을 이용한 in vivo 실험에서 에탄올의 과도한 섭취로 인한 신경세포죽음이 hippocampus에서 왕성히 일어난다는 보고와도 부합되는 결과였다 (Bonthius and West, 1991; Moulder et al., 2002). 감귤농축액과 버섯균사체추출물의 적정처리농도를 규명하기 위한 실험에서 감귤농축액은 2%에서 현저한 생존율의 저하(대조군의 63.9%)를 가져 왔으나 균사체배양추출물에서는 8%에서도 대조군의 95%에 이르는 생존율을 보여주었다. 이러한 생존율의 변화는 산성의 감귤농축액이 세포배양액의 pH의 변화를 일으킴으로써 나타난 결과로 사료된다.

에탄올에 의한 신경세포죽음의 억제효과는 감귤농축액이나 버섯균사체추출물에서 모두 10% 정도로 비교적 낮은 편이었으며, 또한 그 효과가 비슷하였다. 이러한 감귤농축액과 버섯균사체추출물이 알콜에 의해 유도되는 신경세포죽음의 억제효과는 기존에 보고된 바 있는 알콜에 의한 세포내 활성산소종의 생성과 그에 따른 oxidative stress가 신경세포의 죽음을 일으킨다는 사실과 관련해 볼 때 이들 두 물질이 세포내의 활성산소종의 생성을 억제하거나 혹은 생성된 활성산소종을 제거하는 효과가 있을 것으로 추론할 수 있다. 감귤농축액과 버섯균사체추출물이 에탄올에 의해 생성된 세포내 활성산소종의 제거효과를 조사하는 실험에서 감귤농축액은(3%) 에탄올처리군(800mM)에 대해 38%, 버섯균사체추출물은 3%의 농도로 처리하였을 경우는 27%의 제거효과를 보여주어 오히려 감귤농축액이 활성산소종의 제거에는 더 효과가 있는 것으로 나타났다. 감귤농축액과 버

셋균사체추출물이 신경세포의 죽음은 비슷한 정도로 억제시켰으나 활성산소종의 제거효과는 서로 다르게 나타난 이러한 결과는 활성산소종의 축적에 따른 oxidative stress만이 에탄올에 의한 신경세포죽음의 기작이 아닐 가능성을 시사하고 있다. 이와 관련하여 이미 다른 연구자의 보고에서 대뇌압(cerebral pressure)의 상승이나 PCREB (phosphorylated form of cAMP-response-element-binding protein)와 같은 세포의 생존촉진인자(survival factors)의 저해 등이 에탄올에 의한 신경세포죽음의 원인으로 제시되고 있다 (Misra and Pandey, 2006).

감귤농축액과 버섯균사체추출물을 0.5%의 농도로 처리하였을 경우 활성산소종의 제거효과는 각각 약 20%와 13%정도이었으며(100 mM 에탄올농도), 1%의 농도로 처리한 경우는 각각 약 30%와 21%이었다. 반면에 신경세포죽음의 억제효과는 0.5%의 농도로 처리하였을 경우에는 유의성 있는 변화가 없었으나 1% 이상으로 처리한 경우에는 신경세포죽음을 억제하는 것으로 나타났다. 이것은 활성산소종의 제거가 어느 정도 이상이 되어야 세포 죽음으로부터 구제될 수 있다는 것을 의미하는 것으로 사료된다. 즉 활성산소종의 세포내 축적이 어느 한계점(threshold)을 넘어야 세포의 죽음이 일어나며 역으로 항산화제 등의 작용으로 이 한계점보다 활성산소종의 농도가 낮게 조절이 되었을 때는 세포의 생존이 가능하게 되는 것으로 추측될 수 있다.

에탄올에 의한 신경세포의 죽음은 혈중알콜농도와 밀접한 관련이 있다. 즉 혈중알콜농도가 한계점의 농도 이상일 경우에 신경세포의 죽음이 일어나는 것으로 알려져 있다 (Ikonomidou et al., 2000). 본 연구에서 감귤농축액은 대조군에 비해 약 12%, 버섯균사체배양추출물은 약 21%의 혈중알콜농도의 감소효과를 가져왔다. 이것은 버섯균사체배양추출물이 감귤농축액보다 혈중 알콜농도를 저하시키는데 더 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 사실은 활성산소종의 제거효과에서는 감귤농축액이 보다 더 효과적인 결과에 비교해 볼 때, 알콜에 의한 신경세포의 죽음이 활성산소종의 축적에 의한 것만은 아닐 가능성을 시사해 주고 있다.

결론적으로 감귤농축액을 운지버섯의 균사체의 배양액으로 사용하여 얻은 배양액추출물은 첫째, HT22 세포의 배양실험에서 알콜에 의한 신경세포의 죽음을 어느 정도는 억제하나 큰 효과는 없는 것으로 나타났으며 둘째, 균사체배양추출물은 알콜에 의한 활성산소종의 생성을 억제하며 셋째, 실험동물에서 균사체 배

양추출물은 혈중알콜농도의 감소를 가져 오는 것으로 나타나 숙취해소효과가 있을 것으로 사료되었다.



V. 참고문헌

강경선. 2002. 제주감귤의 발전정책. 제주대학교출판부

강태수, 이동기, 이신영. 1997. *Phellinus* sp.의 분리 및 균사체의 배양. *Kor. J. Mycol.*, 25:257-267.

고진복, 최미애. 2004. 운지버섯균사체 배양액이 성장기 흰쥐의 지질대사, 단백질농도 및 효소활성에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 33(3):512-517.

문상욱. 2003. 감귤로 배양한 버섯균사체 혹은 그 배양추출물로부터 피부보습 및 피부노화억제 효과를 갖는 기능성 향장품의 개발. 제주대학교 생명과학기술혁신센터, 산학공동연구 최종보고서 과제번호 2차-06 pp149-159.

하영래. 2002. 느타리버섯배양물로부터 숙취해소 및 혈중알콜농도 감소물질의 분리,동정 및 기작규명. 2002보건의료기술진흥산업연구발표회초록집. 351-352.

Bonthius, D.J. and J.R. west. 1991. Prenatal neuronal deficits in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Teratology* 44:147-163.

Bohn, J.A. and J.N. Bemiller. 1995. beta-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polymers* 28:3-14.

Brooks, P.J. 2000. Brain atrophy and neuronal loss in alcoholism: a role for DNA damage? *Neurochemistry International* 37:430-412.

Chen W.J.A., S.E. Parnell and J.R. West. 1999. Effects of alcohol and nicotine on developing olfactory bulb: loss of mitral cells and alterations in neurotransmitter levels. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23(1) 18-25.

Chug, H. 1998. Development of the medicines from mushrooms. *Micriorg. Industry* 24:30-41.

Fleury C., B. Mignotte, and J.L. Vayssiere. 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling. *Biochimie* 84:131-141.

Fuji, T., H. Maeda, and N. Ishida. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysacchaides, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiot.* 31:1079-1090.

Goodlett C.R., B.L. Marcussen, and J.R. West. A single day of alcohol exposure during the brain growth spurt induces brain weight restriction and cerebellar Purkinje cell loss. *Alcohol* 7:107-114.

Gorman A.M., A. McGowan, C. O'Neill, and T. Cotter. 1996. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences* 139(Suppl.):45-52.

Han J.Y., Y. Joo, Y.S. Kim, Y.K. Lee, H.J. Kim, G.J. Cho, W.S. Choi, and S.S. Kang. 2005. Ethanol induces cell death by activating caspase-3 in the rat cerebral cortex. *Molecules and Cells* 20(2):189-195.

Harris, R.A., W.R. Proctor, S.J. McQuilkin, R.L. Klein, and M.P. Mascia. 1995. Ethanol increases GABA responses in cells stably transfected with

receptor subunits. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19:226-232.

Heaton M.B., M. Paiva, J. Mayer, and R. Miller. 2002. Ethanol-mediated generation of reactive oxygen species in developing rat cerebellum> *Neuroscience Letters* 334:83-86.

Hoffman, P.L., C.S. Rabe, F. Moses, and B. Tabakoff. 1989. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium influx and cyclic GMP production. *Journal of Neurochemistry* 52:1937-1940.

Ikonomidou C., P. Bittigau, M.J. Ishimaru, D.F. Wozniak, C. Koch, K. Genz, M.T. Price, V. Stefovskaja, F. Horster, T. Tenkova, K. Dikranian, and J.W. Olney. 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287:1056-1060.

Kim, B.K., M.J. Shin, O.N. Kim, H.W. Kim, and E.C. Choi. 1989. Antitumor components of the cultured mycelia of *Lepiota procera*. *Kor. J. Food Hygiene* 4:109-118.

Lee, B.W., M.S. Lee, K.M. Park, C.H. Kim, P.U. ahn, and C.U. choi. 1992. Anticancer activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 311-315.

Lee, J.W., C.H. Chung, H.J. Jeong, and K.H. Lee. 1990. Anticomplementary and antitumor activities of the Ikal, extract from the mycelia of *Lentinus edodes* IY-105. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18:571-577.

Lovinger, D.M., G. White, and F.F. Weight. 1989. Ethanol inhibits

NMDA--activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 244:1721-1724.

Maier S.E., J.A. Cramer, J.R. West, and F. Sohrabji. 1999. Alcohol exposure during the first two trimesters equivalent alters granule cell number and neurotrophin expression in the developing rat olfactory bulb. *Journal of Neurobiology* 41:414-423.

Mattson, M.P., W. Duan, W.A. Pederson, and C. Culmsee. 2001. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* 6:69-81.

Mehler, M.E. and S. Gokhan. 2000. Mechanisms underlying neural cell death in neurodegenerative diseases: alterations of a developmentally-mediated cellular rheostat. *Trends in Neuroscience* 23(12):599-605.

Misra K., and S.C. Pandey. 2006. The decreased cyclic-AMP dependent-protein kinase A function in the nucleus accumbens: a role in alcohol drinking but not anxiety-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology* 31:1406-1419.

Mooney S.H. and M.W. Miller. 2001. Effects of prenatal exposure to ethanol on the expression of bcl-2, bax and caspase-3 in the developing rat cerebral cortex and thalamus. *Brain Research* 911:71-81.

Moselhy, H.F., G. Georgiou, and A. Kahn. 2001. Frontal lobe changes in alcoholism: a review of the literature. *Alcohol and Alcoholism* 36(5):357-368.

Moulder K.L., T. Fu, H. Melbostad, R.J. Cormier, K.E. Isenberg, C.F. Zorumski, and S. Mennerick. 2002. Ethanol-induced death of postnatal hippocampal neurons. *Neurobiology of disease* 10:396-409.

Obernier, J.A., T.W. Bouldin, and F.T. Crews. 2002. Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26(4):547-557.

Olney J.W., T. Tenkova, K. Dikranian, Y.Q. Qin, J. Labruyere, and C. Ikonomidou. 2002. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Developmental Brain Research* 133:115-126.

Pantazis N.J., D.P. Dohrman, C.R. Goodlett, R.T. Cook, and J.R. West. 1993. Vulnerability of cerebellar granule cells to alcohol-induced cell death diminishes with time in culture. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 17(5):1014-1021.

Park, Y.D., Y.K. Hong, W.K. Whang, J.D. Huh, and S. Park. 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelia cultured broth and fruit body of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* 17:223-228.

Riley E.P., J.D. Thomas, C.R. Goodlett, A.Y. Klintsova, W.T. Greenough, B.L. Hungund, F. Zou, Y. sari, T. Powroz다, and T.K. Li. 2001. Fetal alcohol effects: mechanisms and treatment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 25(5):110S-116S.

Server, A.C. and W.C. Mobley. 1991. Neuronal cell death and the role of apoptosis. The molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press 263-278.

Simon H.U., A. haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis 5:415-418.

Slater A.F.G., C. Stefan, I. Nobel, D.J. van den Dobblesstone, and S. Orrenius. 1995. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. Toxicology Letters 82/83:149-153.

Suh A.Y., M. Ingelman-Sundberg, E. Neve, H. Matsumoto, Y. Nishitani, et al., 2001. Etanol and oxidative stress. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 25(5): 237S-243S.

Warren K.R., F.J. Calhoun, P.A. May, D.L. Viljoen, T.K. Li, H. tanaka, G.S. Marinicheva, L.K. robinson, and G. Mundle. 2001. Fetal alcohol syndrome: an international perspective. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 25(5):202S-206S.

West J.R., W.J.A. Chen, and N.J. Pantazis. 1994. Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. Metabolic Brain Disease 9(4): 291-321.