

## 저령다당체의 항종양 및 항돌연변이 효능

이정화<sup>1</sup> · 신유진<sup>2</sup> · 조덕제<sup>2</sup> · 임희진<sup>2</sup> · 최원일<sup>3</sup> · 이용규<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 분자생물학과  
<sup>2</sup>동서대학교 식품생명공학과  
<sup>3</sup>대우약품(주)

### Antitumor and Antimutagenic Effect of the Proteinpolysaccharides from *Polyporus umbellatus*

Jung-Wha Lee<sup>1</sup>, Yu-Jin Shin<sup>2</sup>, Duck-Jae Cho<sup>2</sup>, Hee-Jin Lim<sup>2</sup>,  
Won-Eil Choi<sup>3</sup> and Yong-Kyu Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Biology, Pusan National University, Busan 607-735, Korea  
<sup>2</sup>Dept. of Food and Biotechnology, Dongseo University, Busan 617-716, Korea  
<sup>3</sup>Daewoo Pharm. Co. Ltd., Busan 604-848, Korea

#### Abstract

The proteinpolysaccharides (PPS) from *Polyporus umbellatus* (*P. umbellatus*) sclerotium is composed by 78.2% of saccharide, 16.8% of protein, and 4.0% of ash. PPS from *P. umbellatus* showed antitumor activities against 180 solid tumor in ICR mice at the concentration of 20~160 mg/kg/day. PPS from *P. umbellatus* inhibited cell viability to 47.4% and 45.0% in leukemia cell lines, L-1210 and K-562 cells at 50~400 µg/mL concentration, respectively. But the hall mark of cell apoptosis, DNA fragmentation was not observed at those concentration. 2.5~10.0% of PPS from *P. umbellatus* inhibited mutagenicity evoked by 2-nitrofluorene and sodium azide in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. From these results, it is suggested that the PPS of *P. umbellatus* has antitumor and antimutagenic effect, and its cytotoxic effect may not be ascribed to the apoptosis.

**Key words:** *Polyporus umbellatus* sclerotium, L-1210, K-562, antitumor, antimutagenicity

#### 서 론

저령버섯(이하 저령)이라 불리워지는 *Polyporus umbellatus* (*P. umbellatus*)는 이노제(1), 종양치료 및 신장질환치료의 목적으로 중국, 일본, 한국 등지에서 사용되어오는 전통 약물이다. 저령의 생리 활성 효능은 다당체에 의한다는 여러 보고가 있으며, β-glucan과 같은 저령다당체는 사람의 폐암, 위암과 자궁경부암등을 치료하는 항종양효능을 갖는다고 보고되었다(2). 한편 저령다당체가 동물실험에서 유발된 암에 대하여도 항종양효능이 보고되었으며(3,4), 대식세포의 기능을 증가시켜 면역효능을 증가시킨다는 보고도 있다(5-7). 간세포에 대하여는 저령다당체가 만성 간염치료 효능(8)이 있으며, 간암치료시에 사용하는 mitomycin C의 작용을 증강시킨다는 보고가 있다(9). 이외에 모발의 성장을 촉진시킨다는 보고도 있다(10,11). 다당체외에 알려진 저령의 성분으로 ergosterol, 2-hydroxytetracosanoic acid, biotin 등과 같은 물질들로 보고되었다(12,13). 현재까지, 저령의 항종양효능을 암세포와 연관한 체계적인 연구는 이루어지지 않고 있다. 본

연구에서는 저령다당체의 성분을 분석하고, 백혈병세포에 대한 세포생존 억제능과 DNA분절현상을 시험하여 항종양 효능과의 연관성을 연구하고자 한다. 한편 저령다당체에 대하여 항돌연변이 효능을 검색하여 항종양 효능과의 연관성도 연구하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 실험재료

본 실험에 사용된 저령(*Polyporus umbellatus*)의 균핵은 한국산으로 부산의 영인 약품에서 공인하는 제품으로 구입하였다. 화학재료인 ethanol, glucose, galactose, xylose, mannose, fructose 3-[4,5-dimethylthiazole-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, agarose, 2-nitrofluorene, sodium-azide, 2-aminoanthracene 및 DMSO는 Sigma 제품을 사용하였고, RPMI(Hyclone), DMEM(Hyclone), 1-kb ladder (Bio-rad)을 사용하였다. K-562와 L-1210 세포주는 한국 세포주 은행으로부터 구입하였다.

\*Corresponding author. E-mail: lyk@dongseo.ac.kr  
Phone: 82-51-320-1795, Fax: 82-51-317-5138

### 단백다당체 추출 및 분석

80 g의 저령 균핵을 1 L의 증류수에 넣어서 10시간동안 끓인 후 여과하고, 잔사를 다시 800 mL의 증류수에 끓여서 재추출한다. 추출물에 동량의 95% 에탄올을 가하여 4°C에서 14시간동안 방치하여 침전을 형성시킨 후, 10,000 g로 30분간 원심분리하여 침전을 모은다. 침전물을 Spectra/Por Membrane(MWCO: 12,000~14,000)에 넣어서 4°C 증류수에서 48시간동안 투석하여 거른다(14,15). 다당체의 함량은 D-glucose를 표준으로 사용하는 anthrone test(16)법으로 분석하였고, 단당류의 함량은 HPLC로 분석하였으며, 시료처리에는 Choi 등(17)의 방법을 시행하였다. 단백질함량 분석은 우혈청 단백을 표준으로 사용하는 Lowry 등(18)의 방법을 행하였다.

### 실험동물

ICR마우스는 대한실험동물센터(대구, 효성사이언스)로부터 각각 생후 4주령의 것을 분양받아 본 대학 동물실험실에서 1주이상 안정화시킨 후 사용하였으며, 전 기간 항생제 무첨가 마우스용 사료 및 물을 자유로이 섭취케 하였다. 실온은 22±2°C, 습도는 50%를 유지하였고 하루에 12시간씩 조명을 시행하였다.

### in vivo 항암 실험

체중 20~40 g의 자성 ICR계 마우스를 실험동물로 하여 sarcoma 180 세포(1×10<sup>6</sup> cells/mouse)를 이식한 후 24시간 후부터 매일 1회씩 3주간 복강내에 약물 투여를 실시하였다. 암이식 30일만에 실험 동물을 처사시키고 유발된 고형암을 적출하여 종양저지 백분율(% tumor inhibition ratio)을 계산하여 항암 효과의 지표로 삼았다.

### 암세포 성장 억제효능 시험

기본 이론은 Mossman 방법(19)에 따라 시행하였다. 96 well plate의 각 well에 10<sup>5</sup> cell/100 µL를 분주하였고 24시간 배양후에 세포를 가라앉힌 다음, 새로운 배지로 교환하였다. 각 농도의 저령추출물을 각각의 well에 10 µL 부피로 3쌍씩 넣어주고 48시간 배양한 후, 3-[4,5-dimethylthiazole-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 5 mg/mL PBS로 제조하여 12 µL씩 넣고 흔들어서 주었다. 빛이 들어가지 않도록 하여 4시간 배양후, 3분 동안 세포를 가라 앉힌 후 배지를 제거하고, 100 µL 용액(DMSO: ethanol = 1:1)을 각각의 well에 넣어 주었다. Plate를 감싸서 5분간 흔들어서 후에 ELISA reader로 540 nM에서 흡광도를 측정하였으며 저령다당체투여군의 암세포성장을 대조군과 비교하여 백분율로 구하였다.

### DNA 분질현상 측정

1~5×10<sup>6</sup> cell에 각 농도의 저령 추출물을 넣어서 48시간 동안 배양한 후에 5000 rpm에서 3분간 원심분리하고 ice-PBS에 두 번 헹구어 주었다. 이것을 부유시킨 세포에 300 µL digestion buffer(10 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS)를 넣은 후, 50°C의 온도에서 12~18

시간 동안 incubation 하였다. DNA는 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1, Sigma, USA)로 추출되어졌다. 추출 후에 침전물을 30 µL의 TE buffer(10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 부유시켰으며, 각각의 DNA 시료를 1.5% Agarose gel에 전기영동시켰다. Agarose gel을 ethidium bromide(0.1 µg/mL)에 15분간 착색시킨 후에 DNA band를 UV light에 의해서 확인하였다.

### 돌연변이 억제능 시험

**돌연변이원과 S-9 mix**: 2-nitrofluorene(2-NF)과 sodiumazide(NaN<sub>3</sub>)를 TA98과 TA100에 대하여 각각의 돌연변이원으로 사용하였고, S-9 mix와 병행한 실험에서는 2-aminoanthracene(2-AA)이 TA 98과 TA 100에 대한 돌연변이원으로 사용하였다. S-9 mix는 Moltax Co.에서 구입하였다.

**돌연변이 균주**: *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100은 Dr. B.N. Ames(Univ. of California, Berkeley, CA, USA)로부터 공급받았고, Maron과 Ames의 방법(20)에 따라 유지 보관되었다. 시험균주의 유전자형은 histidine요구성 시험, rfa형질, UV 민감성과 R factor존재로 확인되었다.

**돌연변이 시험**: 저령다당체와 *Salmonella*균주를 30분간 전배양하는 modified plate incorporation test를 이용하였다(21). 얼음상에서, PBS(혹은 S-9 mix) 0.5 mL, 시험 균주 0.1 mL와 저령다당체 0.1 mL을 cap tube에 넣어 혼합 후, minimal agar plate에 균등하게 부여하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후 저령다당체에 의한 복귀 돌연변이 colony수와 대조군의 복귀 돌연변이 colony수를 비교하여 돌연변이 억제정도를 관찰하였다.

억제율 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{(a-b)}{(a-c)} \times 100$$

- a: 돌연 변이원만 있을 때 복귀돌연변이 colony수
- b: 저령버섯 추출물과 돌연 변이원을 첨가하였을 때 복귀 돌연변이 colony수
- c: 저령버섯 추출물과 돌연 변이원이 없는 경우의 복귀 돌연변이 colony수

## 결과 및 고찰

### 저령다당체의 성분분석

본 실험에서 제조한 단백다당체의 함량분석 결과, 78.2%의 당질, 16.8%의 단백질, 4.0%의 회분을 포함하는 것으로 나타났으며, 당질의 대부분은 glucose로 당질함량 중 92%로 분석되었다(Table 1).

### 항종양효능

ICR마우스에 이식된 sarcoma 180 고형암에 대하여 저령다당체를 20~180 mg/kg/day의 농도로 30일간 투여시 농도

**Table 1. Constituent of proteinpolysaccharides from *Polyporus umbellatus***

Component	Weight (%)	Component	Weight (%)
Saccharide	78.2±10.0	Glucose	92±5.5
		Galactose	4.3±2.5
		Mannose	3.2±2.1
		Fructose, xylose, arabinose, ribose	0.5±0.1
		Protein	16.8±2.6
Ash	4.0±2.0		

증가에 비례하여 48%까지 억제되었다. 160 µg/kg/day로 투여시에는 종양저지율이 46%로 80 µg/kg/day 투여군에 비하여 같은 효능을 나타내었고(Table 2), 저령다당체가 고형암 성장억제효능이 있는 것으로 사료된다.

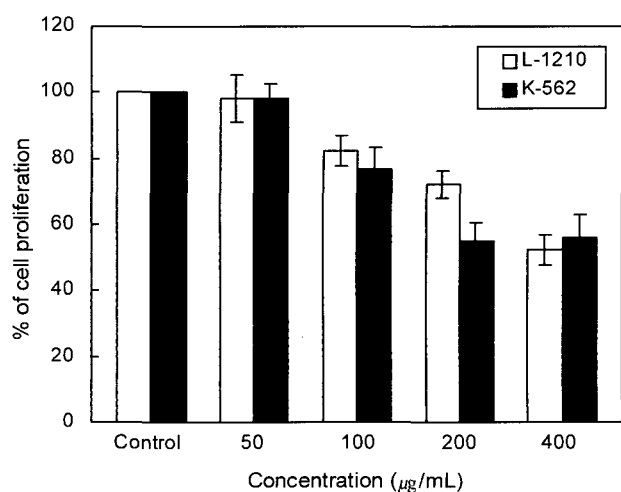
#### 암세포 성장 억제효능 및 DNA분절 현상

저령다당체를 백혈암 세포주인 L-1210와 K-562세포에 50, 100, 200, 400 µg/mL로 처리하여 48시간 배양후 암세포 성장율을 측정하였다(Fig. 1).

L-1210세포에 다당체를 100, 200, 400 µg/mL 처리시 각각 82.4%, 72.4%, 52.6%의 성장율을 나타내었다. K-562세포에 다당체를 100, 200, 400 µg/mL 처리시 각각 77.0%, 55.0%,

**Table 2. Antitumor activities of proteinpolysaccharides (PPS) from *Polyporus umbellatus* against 180 solid tumor in ICR mice**

Treatment	No. of mice	Dose (mg/kg/day)	Mean tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)
Saline	14		1.90	
PPS	10	20	1.52	20%
	10	40	1.18	38%
	10	80	0.98	48%
	10	160	1.02	46%



**Fig. 1. Cytotoxic effects of proteinpolysaccharides (PPS) from *Polyporus umbellatus* on L-1210 and K-562 cells.** Cells were incubated for 48 h, and cytotoxicity was measured by MTT assay.

55.8%의 성장율을 나타내었다. 농도증가에 따라 암세포성장 억제효능이 증가하여서 L-1210세포에서는 41.4%, K-562세포에서는 45%까지 성장이 억제되었다. K-562세포에서 400 µg/mL를 투여했을 때의 성장율은 200 µg/mL를 투여시와 같은 성장율을 나타내었다. 국제적인 기준에 의하여, IC<sub>50</sub> value(세포 성장을 50% 억제하는 약물 농도)는 230 µg/mL이하일 때 항암 효과가 있다고 판정되어진다(22). 본 결과에서는 L-1210세포와 K-562세포에서 IC<sub>50</sub> 값이 각각 395.80 µg/mL과 326.42 µg/mL로 나타났으며, 저령중 단일물질인 polyporusterone(1-7)의 IC<sub>50</sub> 값이 30~60 µg/mL인 것(23)에 비하여 높은 값을 보여주고 있다. 기준치보다 고농도에서 암세포성장 억제효능을 나타내었으므로 저령다당체가 항암효능이 있다고 판정되지는 않는다. 저령다당체의 암세포 성장억제 효능이 세포사멸(apoptosis)에 의한 것인가를 관찰하기 위하여, 세포사멸의 생화학적 증거인 nucleosomal DNA분절현상(24-26)을 시험하였다. 저령다당체를 백혈암 세포주인 L-1210와 K-562세포에 100, 200, 400 µg/mL로 처리하여 48시간 배양 후, DNA를 분리하여 agarose gel에 전기영동하였다(Fig. 2).

L-1210세포에서 대조군의 DNA와 비교할 때 다당체에 의한 DNA분절현상은 나타나지 않았고, K-562세포에서도 같은 결과를 나타내었다. 이러한 결과에 의하면, 다당체가 L-1210와 K-562세포에서 나타난 암세포성장 억제효능은 세포사멸(apoptosis)에 의한 작용은 아닌 것으로 사료된다. 그러므로 저령다당체의 항종양효능은 세포사멸에 의한 세포성장 억제효능에만 의존하지는 않는다고 사료되며, 다른 인자와의 연관성도 고려되어야 하는 것으로 사료된다.

#### 돌연변이 억제능 시험

간세포의 microsomal enzyme효능을 나타내기 위하여 S-9 mix를 첨가하거나(20), 첨가하지 않은 *Salmonella typhimurium* TA 100과 TA 98에서 유발된 복귀돌연변이 억제능을 관찰하였다(Fig. 3).

S-9 mix와 저령다당체를 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 µg/mL 첨가시 *Salmonella typhimurium* TA 100과 TA 98에서 유발된 복귀돌연변이 콜로니의 개수가 39.0, 41.0, 50.0 46.0% 및 28.0, 48.0, 56.0, 49.0%로 각각 억제되었다. 7.5 µg/mL 첨가시 억제효능이 가장 증가하였고, 10.0 µg/mL 첨가시에는 7.5 µg/mL 첨가시에 비하여 같거나 감소하였다. 저령다당체만 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 µg/mL 첨가시 *Salmonella typhimurium* TA 100과 TA 98에서 유발된 복귀돌연변이 콜로니가 13.3, 21.0, 33.1, 25.6% 및 22.4, 25.6, 27.2, 30.4%로 각각 억제되었다. 본 결과로 저령다당체는 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 µg/mL의 농도에서 돌연변이유발을 억제하는 것으로 사료되며, S-9 mix와 7.5 µg/mL의 다당체 첨가시에는 이 억제 효능이 가장 뚜렷하였다. 또한, *Salmonella typhimurium* TA 100과 TA 98에서 S-9 mix를 첨가시에는 S-9 mix를 첨가하지 않고 유발된 돌연변이일 때보다 저령다당체의 돌연변이 억제능이 뚜렷하였다.

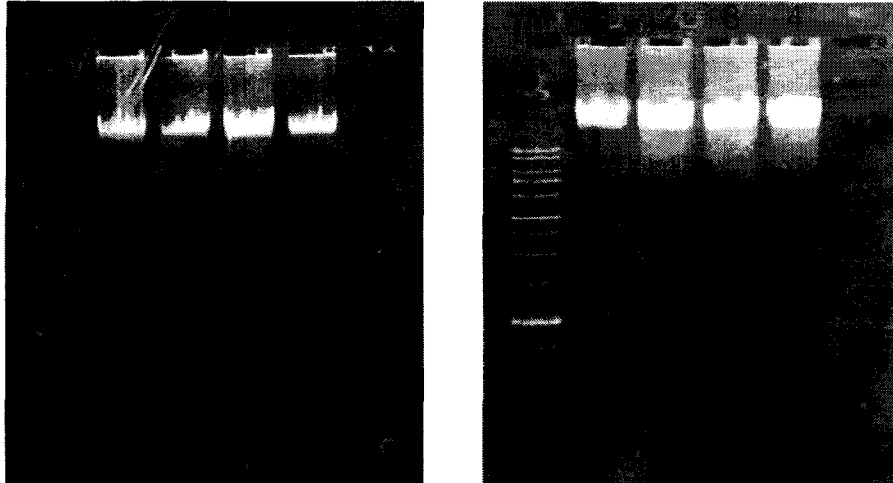


Fig 2. Effects of protein polysaccharides from *P. umbellatus* on DNA of L-1210 (left) and K-562 (right) cell lines. In each cell line, Line 1. marker, 2. 100 µg/mL, 3. 200 µg/mL of fr. 1, 4. 400 µg/mL. Cells were incubated for 48 hrs.

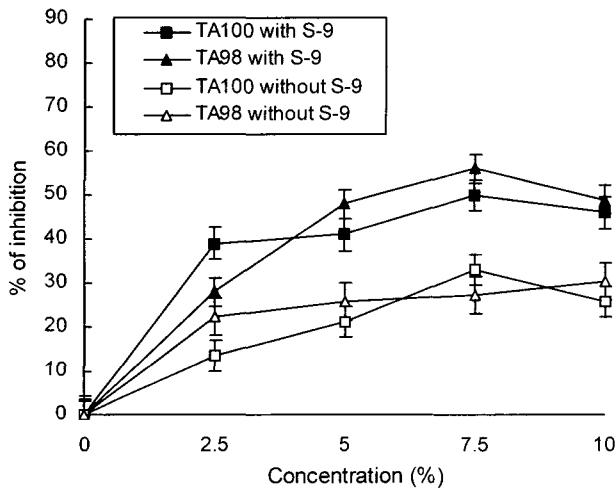


Fig. 3. Antimutagenic effect of protein polysaccharides from *P. umbellatus* against *Salmonella typhimurium* TA 100 and TA 98.

2-nitrofluorene and sodium azide were used as mutagens on TA 98 and TA 100, respectively. 2-aminoanthracene was used as a mutagen in S-9 mixed plates of TA 98 and TA 100.

본 연구 결과, 저령 다당체는 항종양효능, 암세포 성장 억제효능 및 항돌연변이 효능을 갖는 것으로 사료된다. 항종양 및 암세포 성장억제 효능은 세포사멸(apoptosis)에 기인하지 않는 것으로 사료되며, 이에 대한 보다 나은 연구가 요구된다.

### 요 약

저령 버섯으로부터 추출된 다당체는 78.2%의 당류, 16.8%의 단백질 및 4%의 회분으로 구성되었다. 저령다당체는 20~160 mg/kg/day로 3주간 투여시 ICR mouse에서 유발된 sarcoma-180에 대하여 항종양효능을 나타내었다. 또한 저령다당체를 50~400 µg/mL의 농도로 투여시 백혈암세포인 L-1210와 K-562세포에서 대조군에 비하여 52.6%, 55.0%로

각각 성장하였다. 그러나 이들 세포에서 세포사멸의 생화학적 증거가 되는 DNA 분절현상은 나타나지 아니하였다. 2.5~10.0%의 농도의 저령다당체는 *Salmonella typhimurium* TA 100과 TA 98에서 2-nitrofluorene과 sodium azide에 의해 유발된 돌연변이를 56%까지 억제하였다. 이 결과로 저령다당체는 항종양효능, 암세포성장 억제효능 및 항돌연변이 효능을 갖는 것으로 사료되며, 이 항종양 및 암세포 성장억제효능은 세포사멸(apoptosis)에 기인하지 않는 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부의 연구과제(01-PJ1-PG3-22000-0025) 지원 결과임을 밝힘.

### 문 헌

- Lu W, Adachi I, Kano K, Yasuta A, Torlizuka K, Ueno M. 1985. Platelet aggregation potentiators from cho-rei. *Chem Pharm Bull* 33: 5083-5087.
- Sato K, Osawa M, Suzuki Y, Oikawa S. 1984. Difference in fruiting capability of stocks in *Grifola Frondosa* and its allied species. *Trans Mycol Soc Japan* 25: 205-209.
- Miyazaki T, Oikawa N, Yadomae T, Yamada H, Yamada Y. 1979. Relationship between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifolla umbellata*. *Carbohydrate Research* 69: 165-170.
- Ueno Y, Okamoto Y, Yamauchi R, Kato K. 1982. An anti-tumor activity of the alkali-soluble polysaccharide (and its derivatives) obtained from the sclerotia of *Grifora umbellata*. *Carbohydrate Research* 101: 160-167.
- Zhang Y, Liu Y, Yan SC. 1991. Effect of *Polyporus umbellatus* polysaccharide on function of macrophages in the peritoneal cavities of mice with lesions. *Cheih Ho Tsa Chih* 11: 211-215.
- May L, Yun SC. 1990. Therapeutic investigation of *Polyporus*

- umbellatus* polysaccharide on the children with pure immunity. *J Traditional Chinese Medicine (China)* 3: 168-169.
7. Chang YF, Liu YY, Yun SC. 1991. Effect of *Polyporus umbellatus* polysaccharides on macrophages of liver damaged mice. *Intergrated J Chinese and Western Medicine (China)* 11: 225-226.
  8. Xiong LL. 1993. Therapeutic effect of combined therapy of *Salvia miltiorrhizae* and *Polyporus umbellatus* polysaccharide in the treatment of chronic hepatitis B. *Cheih Ho Tsa Chih* 13: 516-517.
  9. You J, Hau D, Chen K, Huang H. 1994. Combined effects fo chulling (*Polyporus umbellatus*) extract and mitomycin C on experimental liver cancer. *Am J Chin Med* 22: 19-28.
  10. Ishida H, Inaoka Y, Shibatani J, Fukushima M, Tsuji K. 1999. Studies of the active substances in herbs used for hair treatment II Isolation of hair regrowth substances acero syringone and polyporusterone A and B from *Polyporus umbellatus* fries. *Biol Pharm Bull* 22: 1189-1192.
  11. Ishida H. 1999. Studies of active substances in herbs used for hair treatment IV. The structure of the hair growth substance, polypurusterone A from *Polyporus umbellatus* fries. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 47: 2059-2062.
  12. Wang DC, Lee PY, Wan YC. 1983. Some pharmacological actions of *Polyporus umbellatus*. *Chinese Herb Medicine (China)* 14: 267-268.
  13. Natural Products Research Institute. 1996. *Tradimed*. Seoul National University.
  14. Moon CK, Park KS, Lee SH, Yoon YP. 1985. Antitumor activities of several phytopolysaccharides. *Arch Pharm Res* 8: 42-46.
  15. Lee JH, Cho SM, Ko KS, Yoo IK. 1995. Effect of cultural conditions on polysaccharides production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202. *Korean J Mycology* 23: 325-329.
  16. Herbert D, Phipps PJ, Strange RE. 1971. Chemical analysis of microbial cell. In *Methods in microbiolodsgy*. Norris JR, Ribbons DW, eds. Academic Press Inc, New York. Vol 5b, p 265.
  17. Choi JH, Jang JC, Park KD, Park MH, Oh SK. 1981. High performance liquid chromatogtopic determination of sugars in ginseng and it's products. *Korean J Food Sci Techool* 13: 107-111.
  18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-269.
  19. Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immuno Methods* 65: 55-63.
  20. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenecity test. *Mutat Res* 113: 173-178.
  21. Matsushima T, Sugimura T, Nagao M, Yahagi T, Shirai A, Sawamura M. 1980. Factors modulating mutagenecity in microbial test. In *Short-term test systems for detecting carcinogens*. Norpoth KH, Garner RC, eds. Berling, San-diego. p 273.
  22. Hay RJ, Park JG, Gazdar A. 1994. *Evaluation of physiological material*. Academic Press, San Diego. p 34-36.
  23. Takatomi O, Masae Y, Chusei T, Mitsuo M, Hideo B. 1992. Studies on constituents of fruit body of *Pollyporus umbellatus* and their cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull* 40: 143-147.
  24. Steller H. 1995. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1448.
  25. Im EO, Lee S, Suh H, Kim KW, Bae YT, Kim ND. 1999. A novel ursodeoxycholic acid derivative induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Pharm Pharmacol Commun* 5: 1-7.
  26. Ewa S, Anna BZ, Katarzyna P, Janusz S, Ewa R. 1997. Inhibition of proliferation and apoptosis of human and rat T lymphocytes by curcumin, a curry pigment. *Biochem Pharmacol* 54: 899-907.

(2003년 11월 11일 접수; 2004년 3월 3일 채택)