

한국산 고등균류의 항보체활성 효과에 관한 연구

정 훈 · 이준우 · 이권행

일양약품(주)중앙연구소

Studies on the Anticomplementary Activity of Korean Higher Fungi

Hoon Jeong, June-Woo Lee and Kweon-Haeng Lee

Central Institute of Research, Il Yang Pharmaceutical Co.

Ltd., Yong-in 449-900, Korea

ABSTRACT: Anticomplementary activity of 61 strains of Korean higher fungi was screened for immunostimulation. Extracts from 11 of 61 strains including 5 of *Ganoderma lucidum*, 3 of *Lentinus edodes*, 2 of *Cordyceps* sp. and 1 of *Agaricus campestris*, showed higher anticomplementary activity than krestin which was immunopotent extract from Japanese *Coriolus versicolor*. The most potent anticomplementary activity was found with extract from *Lentinus edodes* IY105 whose complement consumption was 31.7%.

KEYWORDS: *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps* sp, *Agaricus campestris*, Anticomplementary activity

Biological response modifier(BRM)는 면역계를 자극하여 숙주의 생물학적 반응을 변화시키므로서 여러 가지 치료효과를 나타내는 물질이다(Herberman, 1987). 이들 물질의 일부는 immunomodulator라고 불리우는데, 현재 사용 중인 BRM에는 합성 제제는 물론 생물학적 제제 등이 있으며, 이들은 대체적으로 상이한 화학구조로 되어있다. 식물유래 다당류(Franz 등, 1989), *Corynebacterium parvum*의 성분(Bjornsson 등, 1978; Purnell 등, 1977), Bacillus Calmette-Guérin(Mitchell 등, 1973; Yamamura 등, 1979) 및 *Nocardia rubra*의 세포벽 성분(Kagawa 등, 1984) 등과 같은 BRM들은 면역 증강제로서 종양치료를 위한 면역요법제로서 사용되고 있거나, 사용이 검토되고 있다. 최근에는 고등균류로부터 여러 종류의 면역증강제가 발견되었으며(Chihara 등, 1970; Tsukagoshi 등, 1974; Miyazaki 등, 1979; Suzuki 등, 1989), 이들의 주성분은 다당체로서, 현재 사용되고 있는 화학요법제가 암세포에 특이성이 적어 많은 부작용을 나타내는 반면, 이들은 숙주에 부작용을 거의 나타내지 않으면서

(Sugiura 등, 1977) 종양을 억제하는 작용을 나타내기 때문에, 면역증강 다당체는 종양치료에 새롭고도 관심을 끄는 분야이다. 고등균류 유래의 다당체의 항종양작용에 대한 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나, 이들이 주로 macrophage나 complement system 등과 관련이 있는 면역계를 활성화시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고있다(Suzuki 등, 1989). 특히, Okuda 등(1973)은 항종양 활성과 serum hemolytic activity의 손실이 밀접한 관계가 있음을 입증하여, 보체계 성분의 활성화가 항종양 작용에 관여함을 관찰하였으며, 1986년에 Ito도 항종양활성을 가진 polysaccharides를 이용하여 항종양작용과 보체계활성이 상관관계가 있음을 보고하였다.

본 실험에서는 한국산 고등균류로부터 면역증강 효과가 있는 물질을 검색하기 위해 국내에서 자생하는 60여주의 고등균류를 채집하여, 이들로부터 분리된 성분이 보체계에 미치는 영향을 검토하였다.

材料 및 方法

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 *Ganoderma lucidum* 7균주, *Lentinus edodes* 7균주, *Cordyceps* sp. 11균주, *Coriolus versicolor* 6균주, *Lyophyllum* sp. 2균주, *Grifora frondosa* 7균주, *Agaricus campestris* 3균주, *Schizophyllum commune* 18균주 등 총 61균주로 이중 일부는 농업기술연구소에서 입수하였고, 나머지는 본 연구실에서 야외채집 등으로 확보한 것들이다.

사용배지

종균보관용 배지로는 potato dextrose agar(Difco)를 사용하였으며, *Lentinus edodes*의 배양에는 감자 200g에 물 1l를 가해 100°C에서 1시간 추출한 액에 glucose 20g과 20ml의 basal medium을 첨가한 PD배지를 사용하였으며, 그 외의 균주들은 glucose 50g, peptone 20g, KH_2PO_4 0.87g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g과 basal medium 20ml를 가해 1l로 조정된 합성배지를 사용하였다. Basal medium은 0.5% $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.36% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.3% ZnCl_2 및 0.05% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 조성되었다.

시약

Complement 제조를 위한 guinea pig는 삼육측산에서 구입하였고 sheep RBC는 한국 메디아로부터, antisheep hemolysin은 Difco사의 것을 구입하여 사용하였다.

배양방법

사면배지에서 균사체를 무균적으로 채취하여 멸균된 액체배지 100ml가 함유된 500ml 삼각flask에 접종하고 진탕배양기에서 110rpm으로 7일간 배양하여 종균으로 사용하였다. 본 배양은 멸균된 액체배지 500ml에 종균 10ml를 접종하여 25°C로 조정된 진탕배양기에서 110rpm으로 6일에서 9일까지 배양하였다.

조다당류의 조제

배양액 500ml를 원심분리하여 여액은 버리고 균사체를 얻었다. 이 균사체에 500ml의 2.5N NaOH를 가해서 실온에서 24시간 동안 방치한 다음, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 acetic acid로 중화하여 pH 7.0이 되게 한다음, 농축하여 흐르는 물에 3일간 투석하였다. 투석한 후 침전물을

여과하여 제거한 다음 농축하여 3배량의 ethanol을 가해 4°C에서 하루 동안 방치하였다. 이것을 6000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 소량의 증류수에 용해시켜 동결 건조하였다.

항보체활성의 측정

10ml 시험관에 150 μ l의 GVB²⁺ 완충액과 250 μ g/ml 농도의 각 시료 50 μ l를 가한 다음, 여기에 50 μ l(100 u/ml)의 guinea pig serum을 complement로서 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 4.75ml의 GVB²⁺ 완충용액을 가하여 vortex한다. 이렇게 하여 얻은 complement를 동량의 anti-sheep hemolysin(2 MHU/ml)으로 실온에서 30분간 감작된 SRBC(2.5×10⁸ cells/ml)가 2ml씩 들어 있는 시험관에 각각 1.0ml, 1.2ml 및 1.6ml를 가한 다음 GVB²⁺ 완충용액을 가해 총용량이 5ml되게 조정된 후, vortex하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 70 μ l의 0.5M EDTA 용액을 가해 vortex한 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 541nm에서 흡광도를 측정하여 남아있는 total hemolytic complement의 양을 측정하였다. 항보체활성은 대조군의 total hemolytic complement (TCH50)에 대한 저해율(%)로서 나타내었다.

結果 및 考察

인체의 면역계는 매우 복잡하게 연관되어 일어나는 일련의 반응계로서 그 중 보체계는 생체내에서 면역기능의 하나인 감염방어 등과 같은 방어반응과 종양면역에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 보체계는 항암효과가 있는 polysaccharide에 의해 활성화 된다는 보고가 있어(Ito 등, 1986), 한국에서 자생하는 61종의 고등균류로부터 조다당류를 조제하여 항보체활성 실험을 행하여 보체계의 활성화도를 측정된 결과, Table I에서와 같이 항보체활성 효과가 가장 좋은 것은 *Lentinus edodes* IY105로 항보체활성 실험에서 소모된 보체의 양은 31.7%였으며, 이는 일본산 *Coriolus versicolor*에서 분리하여 현재 면역증강제로 시판 중인 krestin의 보체소모량인 20.6%보다 월등히 높았다. 균종별 보체활성도는 *Ganoderma lucidum*이 평균 21.2%로 가장 높았으며, 그 다음은 보체활성도가 평균 20.1%로 나타난 *Lentinus edodes*였다. 특이한 것은 일본산 *Coriolus*

Table I. Anticomplementary activity of Korean higher fungi.

Fungal species	Strain No.	Yield from 500 ml culture broth		Inhibition of TCH 50 (%)	Fungal species	Strain No.	Yield from 500 ml culture broth		Inhibition of TCH 50 (%)
		Wet weight of mycellium (g)	Crude polysaccharide (g)				Wet weight of mycellium (g)	Crude polysaccharide (g)	
<i>Ganoderma lucidum</i>	001	80.5	0.731	3.4	<i>campestris</i>	702	27.7	0.827	0.0
	003	51.0	0.510	15.5		703	187.5	1.777	23.6
	004	40.8	0.461	21.1	<i>Schizophyllum commune</i>	801	66.9	0.394	4.9
	005	41.6	0.441	21.3		802	234.6	0.893	3.2
	007	17.5	0.231	31.5		803	153.5	0.998	6.7
	008	44.8	0.504	31.1		804	143.2	0.832	4.7
	009	140.0	0.929	24.1		805	128.8	0.693	4.7
<i>Lentinus edodes</i>	101	46.0	0.324	19.6		806	148.3	1.008	2.3
	102	84.3	0.666	22.4		807	178.6	0.997	4.7
	103	147.2	0.806	12.6		809	41.4	0.171	2.5
	104	80.2	0.626	18.7		810	236.6	1.108	2.3
	105	38.7	0.355	31.7		811	139.9	0.470	11.1
	106	129.0	0.350	23.8		812	105.4	0.448	4.5
	107	91.2	0.802	11.7		813	91.6	0.335	4.5
<i>Coriolus versicolor</i>	301	75.0	0.583	4.7		814	38.0	0.75	2.1
	302	53.0	0.408	0.0		815	71.0	0.485	3.0
	303	77.7	0.476	0.9		816	119.0	0.472	2.0
	304	41.0	0.375	0.0		817	158.5	0.605	14.1
	306	41.4	0.520	0.0		818	114.0	0.558	9.8
	307	105.2	0.808	0.0		820	84.3	0.472	2.7
	krestin (from Japanese strain)			20.6	<i>Cordyceps</i>	901	141.5	2.285	30.1
<i>Lyophyllum</i> sp.	401	4.5	0.078	3.8	spp.	902	86.7	1.527	21.8
	402	20.7	0.173	0.0		903	113.7	1.727	9.2
<i>Grifora frondosa</i>	501	21.0	0.210	7.5		904	52.6	1.242	0.5
	502	29.6	0.315	5.8		905	57.7	1.275	4.5
	503	64.5	0.482	3.4		906	44.8	0.504	31.1
	504	26.0	0.268	5.8		907	79.3	1.140	0.0
	505	20.0	0.275	5.4		908	117.2	1.959	1.4
	506	18.7	0.179	5.7		909	200.0	2.197	19.5
	507	13.6	0.186	3.6		910	54.9	1.103	18.0
<i>Agaricus</i>	701	15.8	0.416	7.9		911	55.1	1.014	9.0

*versicolor*에서 분리된 krestin의 보체활성도는 20.6%로 비교적 높게 나타난 반면, 한국산 *Coriolus versicolor*의 경우 6균주 중 4균주는 보체활성 효과가

전혀 없었으며, 나머지 2균주의 보체활성도 0.9%와 4.7%로 현저히 낮게 나타났다. 이러한 결과는 동일한 균종이라 하더라도 산지에 따른 균주의 차이에 의해

약리효과가 다르게 나타날 수 있음을 보여주는 것으로 생각할 수 있다. *Cordyceps* sp.의 경우 평균 13.2%로 비교적 높은 항보체활성을 나타내었으나, 항종양 성분인 schizophyllan을 함유한 것으로 보고된 (Akima 등, 1985) *Schizophyllum commune* 종들은 평균 5.0%로 비교적 낮은 항보체활성을 나타내었다. 이와 같은 고등균류의 성분이 항보체활성 효과를 나타내는 것은 이 물질들이 C3의 활성화를 주축으로 하는 alternative complement pathway를 활성화시키는 것으로 볼 수 있으며, 이들이 숙주의 면역력을 증강시키는 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각되므로, 면역요법제로의 개발을 검토하는 것도 고려할 수 있다.

摘 要

국내에서 자생하는 61주의 고등균류로부터 면역 증강효과를 검색하기 위해 이들로부터 성분을 분리하여 이들의 항보체활성을 측정 한 결과, krestin의 보체활성도인 20.6%보다 우수한 보체활성 효과를 나타낸 것은 11주 였으며, 이 중에는 *Ganoderma lucidum* 5주, *Lentinus edodes* 3주, *Cordyceps* sp. 3주 및 *Agaricus campestris* 1주이다.

參考文獻

- Akima, K., Arika, T. and Amemika, K. (1985): Purification, physicochemical characterization, and antitumor activity of a cancer-associated human serum protein that is increased by treatment with schizophyllan, an antitumor polysaccharides. *Jpn. J. Cancer Res.* **76**: 541-548.
- Bjorsson, S., Takida, H., Kuberta, N., Preister, H., Higby, D. and Henderson, E. (1978): Combination chemotherapy plus methanol extracted residue of *Bacillus Calmette Guerin* or *Corynebacterium parvum* in stage III lung cancer. *Cancer Treat. Rep.* **67**: 505-510.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970): Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
- Franz, G. (1989): Polysaccharides in pharmacy. *Planta Med.* **55**: 493-497.
- Herberman, R.B. (1987): Cancer therapy by biological response modifier. *Drug. Res.* **37**(I): 246-250.
- Ito, H. (1986): Effect of antitumor agent from various natural sources on drug-metabolizing system. *Japan. J. Pharmacol.* **40**: 435-443.
- Kagawa, K., Yamashita, T., Tsubura, E. and Yamamura, Y. (1984): Inhibition of pulmonary metastasis by *Nocardia rubra* cell wall skeleton, with special reference to macrophage activation. *Cancer Res.* **44**: 665-670.
- Michell, R.G., Kirkpatrick, D., Mokyr, B. and Gevy, I. (1973): On the mode of action of BCG. *Nature*, **243**: 216-218.
- Miyazaki, T., Oikawa, N., Yadomae, T., Yamada, H., Hong-Yen, H. and Ito, H. (1979): Relation between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifora umbellata*. *Carbohydr. Res.* **69**: 165-170.
- Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K. (1973): Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature*, **238**: 290-291.
- Purnell, D., Bartlet, G., Kreider, J. and Biro, T. (1977): *Corynebacterium parvum* and cyclophosphamide as combination treatment for a murine mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* **37**: 1137-1140.
- Sugiura, M. and Ito, H. (1977): Toxicological studies of *Ganoderma lucidum*. *Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo.* **27**: 722-725.
- Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M. and Yadomae, T. (1989): Antitumor and immunomodulating activities of β -glucan obtained from liquid cultured *Grifora frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 410-413.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. (1974): Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Jpn. J. Cancer Res.* **65**: 557-560.
- Yamura, Y., Sakatani, M., Ogura, T. and Azuma, I. (1979): Adjuvant immunotherapy of lung cancer with BCG cell wall skeleton(BCG-CWS). *Cancer* **43**: 1314-1319.

Accepted for Publication 17 October 1990