

표고버섯의 열수추출 다당류 및 비타민 A와 E 첨가가 P₃₈₈의 세포독성에 미치는 영향

최미연* · 정태영** · 함건주***

인제대학교 의과대학 중앙의학연구소*
부산대학교 식품영양학과**

인제대학교 의과대학 임상병리학교실 부산 백병원***

Cytotoxic Effects of Hot Water Soluble Polysaccharides from Mushroom,
Lentinus edodes and Vitamin A & E Supplementation against P₃₈₈ Cells

Choi Mie Youn* · Jung Tae-Yung**, Hahm Kun Ju***

Central Research Institute of Medicine,* College of Medicine, Inje University, Pusan Korea
Department of Food and Nutrition,** Pusan National University, Pusan Korea
Department of Clinical Pathology,*** College of Medicine, Inje University, Paik Hospital,
Pusan Korea

ABSTRACT

The cytotoxic effects of hot water soluble polysaccharides extract(PS) from the mushroom, *Lentinus edodes*, and in combinations with vitamin A or vitamin E on life span of ICR mice bearing P₃₈₈ cancer cells and in vitro against P₃₈₈ cancer cells were examined. The chemical components of PS and fractions were analyzed and survival time and cell number of P₃₈₈ treated with extract fractions with and without vitamin A or E supplementation were also measured. The results obtained were summarized as follows ; The extract of fraction B was shown to have the highest antitumor activity against P₃₈₈ implanted in ICR mice. The antitumor fraction B was consisted of 82.0% of polysaccharide and 4.2 % of protein. All three fractions seemed to have in vivo antitumor activity against P₃₈₈, and fraction B showed the highest activity. In vitro P₃₈₈ cell growth was inhibited 76%, 89%, 54% by the addition of fraction A, B and C respectively. Vitamin A or E did not appear to have any accelerating effects on either in vivo or in vitro cell cytotoxicity when each of them was combined with the PS and fractions. All three fractions contained more than 68% of polysaccharides. The fraction B showed the highest value of 88% in polysaccharides. Monosaccharides of the fraction B were identified as galactose(59.1%), glucose(29.2%), fructose(2.8%) and uronic acid(4.2%). Hydrolysis of protein from the fraction B was identified to have 17 kinds of defined and 5 undefined amino acids. The inhibitory effects of the hot water extracts from mushroom against cancer cell growth of P₃₈₈ were stronger than the control group. And the survival time of ICR mice was shown to be 161 % between the control group and the experimental groups.

KEY WORDS : P₃₈₈ · cytotoxicity · polysaccharides extract.

채택일: 1995년 9월 11일

서 론

담자균류에 속하는 표고 버섯은 독특한 향미를 지니며, 영양가와 기호성이 높으며, 강장, 이뇨, 고혈압, 신장염, 신경쇠약, 불면증, 천식, 위궤양 등에 효능이 있는 것으로 알려져 왔을 뿐 아니라 면역 활성 연구의 재료로서 사용되어 왔다¹²⁾. 지금까지 알려진 항암제인 알킬화제, 대사 길항물질, 항생 물질 등은 일반적으로 부작용이 강하고, 생체 방어에 중요한 역할을 담당하고 있는 lymph 세포, 골수 세포 등을 암 세포보다 훨씬 강하게 파괴시켜 생체 내의 암 뿐만 아니라 다른 감염증에 대한 저항력까지 약화시킨다고 지적되고 있다. 이러한 연구의 일환으로 면역 활성 연구로는 Roland등³⁾, Gregory⁴⁾, Espenshade등⁵⁾, Yoshioka등⁶⁾, Fukuda⁷⁾, Tsukagoshi등⁸⁾, Nomoto⁹⁾, 水野등¹⁰⁾은 각 버섯에서 항종양 활성물질을 분리, 구조 분석하여 보고하였다. Ohno¹¹⁾와 Abe¹²⁾는 지연성 과민 반응 등의 다양한 종류의 면역 반응을 상승시키거나 회복시킨다고 보고하였고, Ohno등¹³⁾과 Kang등¹⁴⁾, Shim¹⁵⁾은 항암 효과의 메카니즘을 밝히기 위해 hemolytic plaque forming cell을 관찰해 본 결과 항암 성분은 암세포를 직접 공격하는 것이 아니라 암세포에 대한 숙주의 면역 능력을 증가시켜 줌으로써 간접적으로 억제작용이 나타난다고 증명하였다.

또한 水野등¹⁰⁾은 영지버섯에서 분자량이 4 만인 다당체를 추출한 후 20mg/Kg의 용량으로 10일간 ICR mouse 에 복강 투여한 결과 Sarcoma 180 육종에 대하여 95-98 %의 억제율이 있음을 보고하였다. Mizuno등¹⁶⁾은 영지에서 수,불용성 다당류에서 물리적 성질 및 항암 작용을 밝힌 바 있지만, 수용성 다당류에서 효과가 더 컸다고 보고하였으며, 한편 표고 버섯에서는 Chihara등¹⁷⁾에 의하여 표고 버섯(*Lentinus edodes*)의 자실체로부터 Sarcoma 180에 대한 강력한 저지력을 지닌 다당체인 LC-33을 분리 하였고, Maeda등¹⁸⁾은 이 LC-33의 항암 기전은 세포 면역 반응의 촉진에 기인하는 것으로 보고한 바 있으며, 또한 표고 버섯의 항암 성분에 관한 연구는 Kim¹⁹⁾이 구름 버섯, 표고 버섯, 느타리 버섯 자실체의 열탕 추출물이 Sarcoma 180에 대한 저해 작용이

있음을 밝힌 연구 보고가 있다. 이와 같이 식용 버섯의 항암 작용에 대하여 현저한 효과가 있음이 보고되고 있으나, 같은 버섯에서라도 각종 성분에 대하여 성장 과정, 산지, 균주의 종류 또는 기후 조건에 따라 함유량 및 약 효력에 차이가 있음을 알 수가 있었다. 따라서 본 연구에서는 다른 버섯류에 비교하여 표고 버섯이 식량원으로서, 항암 제제로서의 역할에 대하여 좀더 종합적인 연구가 필요하여, 표고 버섯에서 열수 가용성 다당류를 추출하여 그 화학적 성분을 분석하고, 이 다당류의 단독투여와 비타민 A 및 E를 복합투여하였을 때 백혈병성 임파모세포인 P₃₈₈에 대한 수명 연장 효과 및 암세포 증식 억제 효과에 미치는 영향을 살펴보고자 실험하여 소기의 지견을 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 표고 버섯의 열수 가용성 다당류(PS)의 추출 및 분획

표고 버섯(*Lentinus edodes*) 20Kg를 洗切하여 homogenizer로 균질화한후 메탄올로 85~95℃에서 중탕하여, 방해 물질을 제거한 잔사에 증류수를 가하여 85~95℃에서 5시간 씩 3회 반복 열수 추출한 후 11,400g에서 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 이를 1/10 정도로 농축한 후 농축액에 3 배량의 에탄올을 가하여 4℃에서 48 시간 방치하여 침전을 형성시켜 그 침전을 원심분리하여, 무수알콜로 세척한 후 이를 증류수에 녹여 visking tube(Fisher No.201-B)를 사용하여 4℃에서 48 시간 투석하였다. 투석막 내부 물질을 감압농축하여 동결 건조시켜 건조 분말을 얻었다. 얻어진 건조 분말을 PS (fraction A)라고 명명하고 건조 분말 중에서 20g을 취하여 0.01M 붕산 완충액(pH 9)에 녹여서 원심 분리하여 얻은 상층액을 DEAE-Sephadex A-50 resin (pharmacia fine chemical AB, uppsala, sweden, Cl⁻ form)을 column(30×900mm)에 넣고 0.1 M boric acid를 사용하여 borate 형태로 전환, 평형화시켜놓은 column에 시료를 천천히 흘려 넣었다. 그 뒤 붕산 완충액으로 용출시켜서 얻은 부분을 중성다당류(fraction B)라고 하였다. 다시 흡착된 부분을 0.2 M NaCl을 함

유한 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8)로 20ml/hour로 분획하여 시험관에 약 7ml 씩 받아 Anthrone test를 하여 다당 성분을 채취하였으며, 이 부분을 산성다당류 (fraction C)라고 하였다.

2. PS 및 분획분 B, C의 화학적 성분의 분석

분획한 시료의 성분 분석은 다음과 같다. 조단백질의 함량은 Lowry-Folin²⁰⁾법으로, 유리 아미노산 분석은 Speckman²¹⁾의 변법으로, 우론산 함량은 Dische²²⁾의 방법에 준하여 정량하였다. 또한 총 다당류의 함량은 Herbert²³⁾의 방법에 준하여 Anthrone test에 의하여, 단당류의 함량은 Mitruka²⁴⁾의 변법으로 추출하여 HPLC로 분석하였다. HPLC의 분석 조건은 column : Bio Rad HPX-87 Bondapak-Carbohydrate analysis (4mm ID×300mm), eluent solvent : CH₃CN : water = 80 : 20 v/v, flow rate : 2.0ml/min, detector : RI detector, chart speed : 0.25cm/min이다.

3. 항종양성 실험

1) 열수 추출물의 멸균

표고 버섯에서 열수 추출한 분획물을 생리수에 녹여 농도별로 millipore membrane (0.2µm)으로 제균시켜 사용하였다.

2) 암 세포의 배양

암 세포 중 P₃₈₈ 흰 생쥐의 백혈병성 임파모 세포를 Fisher 와 Sartorelli²⁵⁾ 법으로 배양하였다. 배양액은 Fischer's medium이며, fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA와 배양시약은 GIBCO(Grand island biological Co.)제품을 사용하였다.

3) 수명 연장 효과

실험 동물은 본 연구실의 동물사육실에서 번식시킨 양성 ICR mice를 각 군당 6마리씩 10군으로 나누어 Fig. 1과 같이 35일 동안, 조제한 종양 세포 부유액을 0.1ml (1×10⁶cells/mouse) 씩과 표고 버섯 열수 추출 다당액 (Fr. A), 중성 다당류(Fr. B)와 산성 다당류(Fr.C)에 각각 비타민 A와 E를 섞은 시료와 대조군으로는 식염수를 각각 실험동물의 복강 내에 이식한 뒤 24시간 후부터 10 일간 연속으로 시료를 복강 내에 투여하여 35일 까지

의 생존 여부를 관찰하고 평균수명 일수를 계산하여 수명연장 백분률(Prolongation ratio, %)을 구하였다.

4) 암세포 증식억제효과 측정(in vitro)

P₃₈₈ 백혈병성 임파모 세포의 경우에는 열수 추출물이 농도별로 함유된 Fischer's medium에 세포를 1×10⁴ cells/ml가 되도록 심은 후에 여러 군의 시험관에 배분하여 37℃에서 배양하면서 배양 시간별, 추출물 및 농도별로 각 군의 세포 수를 Coulter counter로 측정하여 대조군과 비교하여 증식 억제 효과를 산출하였다.

5) 혈액의 단백질 및 GOT, GPT 간 기능효소 활성 측정

ICR 마우스를 각 군당 6마리씩 Fig. 1과 같이 백혈병성 임파모 세포인 P₃₈₈에 각각 생리 식염수(대조군)와 시료를 일정 농도로 섞어 10일간 복강 주사하고, 35일째 경추 탈골법에 의하여 치사시키고 체중을 측정 후 2ml 주사기를 사용하여 혈액을 취하여, multichannel selective stat analyzer(Shimadzu CL-12)를 사용하여 측정하였다.

6) 간장, 비장 및 흉선의 중량

실험 동물의 간장,비장 및 흉선의 중량은 체중 측정 후 각각 측정하였다.

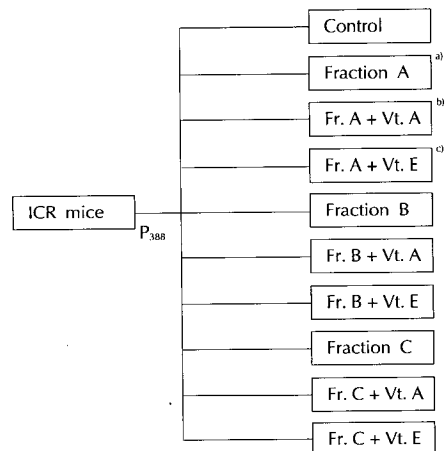


Fig. 1. Cytotoxic Effects of each fraction from mushroom (Lentinus edodes), with and without vitamin A or E Supplementation.

- a) 100mg of each fraction from mushroom/Kg/day, for 10 day(i.p.)
- b) 10mg of retinyl acetate/Kg/day
- c) 40mg of α-tocopheryl acetate/Kg/day

7) 통계처리

분석 결과의 통계처리는 실험군당 평균치와 표준오차를 계산하였고 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 하였다.

결과 및 고찰

1. 열수 추출 다당류의 분획별 구성성분

표고 버섯 20Kg을 추출, 분획한 결과 열수 추출 다당류(Fr. A)는 56.0g이었으며, 이중 중성 다당류(Fr. B)가 5.88g, 산성 다당류(Fr. C)는 14.84g을 얻었다. 이와 유사한 보고로는 Chihara등¹⁹⁾은 표고 버섯으로 부터 유사한 방법으로 열수 추출 다당류인 Lentinan 31.0g과 분획물에서 4.1g, 22.5g을 얻어 항암 효과 실험 재료로 사용하였다.

1) 단백질 및 아미노산의 조성

표고 버섯 열수 추출 다당류의 단백질 함량을 측정된 결과 각각 Fr. A는 4.6%, Fr. B는 9.3%, Fr. C는 0.8%였고, 이들의 각 아미노산의 조성은 Table 1과 같다. 아미노산은 총 17 개가 동정되었고 미동정된 것도 5개였다. 그 중에서 glutamic acid와 aspartic acid가 10.5~12.6%로 가장 많았다. 다음으로 proline(10.3%), serine(5.3~7.6%), cysteine(6.2~6.7%)순으로 함유되어 있었다. 또한 버섯은 성장 과정, 산지, 균주 등에 따라 함량 차이가 많으며, 대부분 버섯에는 glutamic acid, aspartic acid, alanine 순으로 다량 함유되어 있으나, 영지 버섯에서 함량이 많은 주요 아미노산은 alanine, lysine, valine이고 구름 버섯에서의 주된 아미노산은 alanine, proline이라고 정수현²⁰⁾은 보고한 바 있다.

함황 아미노산인 cysteine이 6.2-6.7 % 함유되어 있었으며, 이는 체내에서 glutathione이 지질 과산화로 생성된 유독 물질과 결합하여 해독 작용에 관여하는데, 이들 아미노산들 중에 glutamic acid, glycine과 함께 cysteine은 glutathione의 구성 성분으로 작용한다.

2) 다당류와 단당류 및 우론산의 함량 및 조성

표고 버섯의 열수 추출물의 구성 성분 중 다당류의 함량 및 조성은 Table 2와 같으며, 다당류는 Fr. A, Fr. B 및 Fr. C에서 각각 68.0%, 88.0% 및 82% 함유되어 있

었다. 단당류는 각 분획분 별로 분석한 결과, galactose는 Fr. B에서 그 함량이 월등히 높아 59.1%를 차지한 반면 Fr. A와 Fr. C에서는 5.3~10.5%였고, glucose는 Fr. A와 Fr. B에서 18.8~29.2%로 비교적 높은 함량을 보였으나 Fr. C에서는 2.9%에 불과하였으며 fructose는 10% 미만이었다. 그리고 maltotriose는 Fr. A(64.8%), maltotetrose는 Fr. C(59.1%)에서 높게 정량되었고, 우론산은 0.5~5.2% 범위였다. 이는 영지 버섯과 구름 버섯 외 다른 버섯류에서는 주로 maltose, glucose가 주로 함유되어 있으나²¹⁾, 표고 버섯은 오히려 열수 추출 다당류(Fr. A)에서는 maltotriose가 많이 함유되어 있고, 중성 다당류(Fr. B)에서는 galactose가, 산성 다당류(Fr. C)에서는 maltotetrose가 많이 함유되어 있었다.

3. 항종양성 실험

1) 수명 연장 효과

매일 각 군의 사망 여부를 관찰하여 생존율(T/C, %)은 다음식에 의해 계산하였다. 생존율(%) = 처치군의 평

Table 1. Amino acids composition of protein in the fractions from mushroom, *Lentinus edodes*

| Amino acid* | Fraction | | |
|---------------|----------|------|------|
| | A | B | C |
| Aspartic acid | 12.0 | 12.4 | 12.5 |
| Glutamic acid | 12.6 | 10.5 | 12.2 |
| Serine | 7.6 | 5.3 | 6.4 |
| Glycine | 4.4 | 4.1 | 4.5 |
| Histidine | 2.3 | 2.9 | 2.3 |
| Arginine | 3.9 | 3.2 | 3.7 |
| Threonine | 5.6 | 5.9 | 5.4 |
| Alanine | 5.6 | 5.9 | 5.5 |
| Proline | 10.5 | 10.3 | 10.2 |
| Tyrosine | 2.3 | 4.3 | 4.1 |
| Valine | 3.2 | 3.2 | 3.4 |
| Methionine | 5.3 | 5.3 | 5.1 |
| Cysteine | 6.7 | 6.2 | 6.3 |
| Isoleucine | 2.6 | 3.0 | 2.3 |
| Leucine | 4.6 | 4.2 | 4.2 |
| Phenylalanine | 4.3 | 4.3 | 4.2 |
| Lysine | 6.3 | 6.3 | 6.3 |
| Protein | 4.6 | 0.3 | 0.8 |

*Expressed the amounts of % to total amino acids

균생존 일 수/대조군의 평균생존 일수 × 100 으로 하였다. 표고 버섯(*Lentinus edodes*)의 열수 가용성 다당류의 분획분(Fr. A, Fr. B 및 Fr. C)에 비타민 A 혹은 E를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 ICR mice에 이식한 P₃₈₈ 암 세포에 대해 수명 연장 효과를 살펴 본 결과 Table 3에 나타난 바와같이 생리 식염수 투여군(대조군)과 비교해 볼 때 127~161%로 수명 연장 효과가 나타났으며, 특히 중성 다당류(Fr. B)에서는 161%이상의 높은 수명 연장 효과가 있었다. 또한 비타민 A와 비타민E의 첨가는 PS 와 분획분 각각의 단독투여에 크게 영향을 주

지 않는 것으로 나타났다. 그러나 산성다당류인 분획분 C(Fr.C)에서는 단독투여보다 비타민 A와 비타민 E첨가 시에 각각 9.44%, 12.44%씩 더 나은 수명연장효과를 보였음을 알 수 있었다. 이는 영지 버섯¹⁰⁾에서 분획한 열수 추출 다당류에 의한 수명연장 효과 144~162.5%와 유사한 경향이었다.

Table 2. Contents of polysaccharide, monosaccharide and uronic acid in the fractions from mushroom, *Lentinus edodes* (%)

| Content* | Fraction | | |
|----------------|----------|------|------|
| | A | B | C |
| Polysaccharide | 68.0 | 88.0 | 82.0 |
| Monosaccharide | | | |
| Galactose | 5.3 | 59.1 | 10.5 |
| Glucose | 18.8 | 29.2 | 2.9 |
| Fructose | 4.2 | 2.8 | 9.9 |
| Maltotriose | 64.8 | 3.8 | 12.5 |
| Maltotetrose | 6.4 | 0.9 | 59.1 |
| Uronic acid | 0.5 | 4.2 | 5.2 |

*expressed as the amounts of % to total polysaccharide

Table 3. Cytotoxic effects of the water soluble polysaccharide fractions from mushroom, *Lentinus edodes* with and without vitamin A or E supplementation on the life span of ICR mice bearing P₃₈₈

| Group | Mean survival(day) | prolongation ratio |
|-------------------------|--------------------|--------------------|
| Control | 21.2 ± 0.3 | - |
| Fraction A | 28.4 ± 0.2 | 134.1 |
| V-A ^{a)} added | 29.2 ± 0.3 | 137.2 |
| V-E ^{b)} added | 30.4 ± 0.4 | 143.1 |
| Fraction B | 34.2 ± 0.3* | 61.3 |
| V-A added | 33.8 ± 0.4* | 159.2 |
| V-E added | 34.2 ± 0.1* | 161.0 |
| Fraction C | 29.2 ± 0.4* | 127.0 |
| V-A added | 29.4 ± 0.8* | 139.1 |
| V-E added | 30.2 ± 0.4* | 142.8 |

a) 10mg of retinal acetate/Kg/day

b) 40mg of α -tocopheryl acetate/Kg/day

*Significantly different from the control group at p < 0.05

2) 암세포 증식 억제 효과

Lee등²⁷⁾은 P₃₈₈를 사용하여 암세포 증식 억제에 대한 실험으로서 양강 추출물에서 85~98%의 암 세포 증식 억제 효과가 있다고 보고하였으며, 인삼의 항암성분을 용매에 따라 specific activity(unit/mg)를 검토했던 결과 인삼의 수용성 추출물에는 열에 안정하고 비교적 독성이 적은 유효한 항암 성분이 함유되어 있을 것으로 추정된 바 있다²⁸⁾. 본 실험에서 암 세포 증식 억제 효과는 Table 4와 같다. 즉 세포 수를 측정하여 24시간, 48시간이 경과하면서 대조군에서는 4.0×10⁴ cells/ml, 12.0×10⁴ cells/ml 및 72시간에서는 60.0×10⁴ cells/ml 으로 급속히 증가하였다. 반면 표고 버섯 열수 추출물(Fr.A)에서 분획한 중성 다당류(Fr. B)를 첨가시킨 배지에서는 24시간이 경과 후 3.1×10⁴ cells/ml 이던 것이 72시간이 되면서 0.4×10⁴ cells/ml 로 급속히 증식이 저하되었다. 즉 Fr. B를 함유한 P₃₈₈ 세포군에서는 세포가 처음

Table 4. Effects of water soluble polysaccharide fractions from mushroom, *Lentinus edodes* with and without vitamin A or vitamin E supplementation on the number of cells (1×10⁴ cells/ml)

| Group ^{c)} | Tumor cell culture time(hrs.) | | | | Percent inhibition(%) |
|-------------------------|-------------------------------|-----|------|------|-----------------------|
| | 0 | 24 | 48 | 72 | |
| Control | 1.0 | 4.0 | 12.0 | 60.0 | 0.0 |
| Fraction A | 1.0 | 2.0 | 8.2 | 12.1 | 80.1 |
| V-A ^{a)} added | 1.0 | 2.5 | 10.4 | 18.0 | 70.1 |
| V-E ^{b)} added | 1.0 | 2.0 | 6.2 | 10.0 | 83.4 |
| Fraction B | 1.0 | 3.1 | 4.2 | 0.4 | 94.2 |
| V-A added | 1.0 | 3.4 | 4.8 | 0.5 | 92.3 |
| V-E added | 1.0 | 3.2 | 4.1 | 0.6 | 99.1 |
| Fraction C | 1.0 | 3.8 | 4.2 | 42.0 | 30.2 |
| V-A added | 1.0 | 5.2 | 6.8 | 25.0 | 58.4 |
| V-E added | 1.0 | 4.5 | 4.8 | 15.2 | 74.7 |

a) 10mg of retinal acetate/l media

b) 40mg of α -tocopheryl acetate/l media

c) Refer footnote of fig.1

표고버섯의 열수출물이 P₃₈₈의 세포독성에 미치는 영향

이식 시(1×10^4 cells/ml)보다 72시간 경과 후에는 0.4×10^4 cells/ml의 세포 수로서 대조군의 72시간에 증식한 암 세포에 대하여 거의 암 세포 증식 억제 효과가 99%를 보였고, 처음 암세포수에 비하여는 오히려 60% 저하시킨 결과를 나타내었다. 한편 표고 버섯 열수 가용성 다당류(Fr. A)와 비타민 A 및 E를 첨가 시킨 군에서는 70.1~83.4%의 암 세포 증식 억제율을 보였고, 산성 다당류(Fr. C)와 비타민 A 및 E를 첨가시킨 군에서는 30.2~74.7%의 암 세포 증식 억제율을 나타내었다. 따라서 표고 버섯의 열수 추출물과 비타민 A 및 E는 P₃₈₈ 백혈병성 임파모 세포에 대하여 증식 억제 효과가 다소 있는 것으로 사료 된다.

3) 혈액의 단백질 농도 및 효소 활성

혈액 중의 단백질 함량을 측정한 결과는 Table 5와 같다. ICR 마우스의 혈액 중의 단백질 함량은 대조군 및 여타 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. Albumin 및 globulin의 농도에 있어서 대조군과 유사한 값을 얻었다. 또한 SGOT 및 SGPT 활성에 있어서도 각 실험군은 대조군에 비하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 혈액 중의 포도당, 콜레스테롤 및 creatine의 농도는 Table 6에 나타낸 바와 같이 모두 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 이는 암의 생화학적 연구를 분류하면 전암기의 생화학, 형성된 암조직에 관한 생화학, 癌腫동물의 생화학으로 나눌 수 있는데 특히 전암기에서는 발암 조직과 상

Table 5. Effect of water soluble polysaccharide fractions from mushroom, *Lentinus edodes* on the plasma protein and enzyme activities of ICR mice treated with P₃₈₈ cell line

| Group* | Total protein(g/dl) | Albumin (g/dl) | Globulin (g/dl) | AST(SGOT) (Unit/l) | ALT(SGPT) (unit/l) |
|------------|---------------------|----------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| Control | 10.0 ± 0.2 | 3.2 ± 0.1 | 3.0 ± 0.3 | 56.8 ± 2.1 | 38.7 ± 3.4 |
| Fraction A | 10.1 ± 0.3 | 3.2 ± 0.2 | 3.2 ± 0.8 | 56.4 ± 2.2 | 38.4 ± 2.4 |
| V-A added | 10.1 ± 0.2 | 3.2 ± 0.2 | 3.0 ± 0.5 | 56.2 ± 2.8 | 38.1 ± 2.1 |
| V-E added | 10.0 ± 0.1 | 3.4 ± 0.1 | 3.0 ± 0.1 | 56.3 ± 2.4 | 38.2 ± 1.2 |
| Fraction B | 10.0 ± 0.4 | 3.7 ± 0.1 | 3.0 ± 0.1 | 56.2 ± 3.4 | 38.4 ± 1.6 |
| V-A added | 10.2 ± 0.3 | 3.2 ± 0.2 | 3.0 ± 0.3 | 56.4 ± 2.6 | 38.1 ± 2.6 |
| V-E added | 10.0 ± 0.4 | 3.2 ± 0.3 | 3.0 ± 0.2 | 56.4 ± 3.4 | 38.3 ± 3.4 |
| Fraction C | 10.0 ± 0.3 | 3.2 ± 0.2 | 3.0 ± 0.2 | 56.3 ± 2.6 | 38.5 ± 2.4 |
| V-A added | 10.0 ± 0.5 | 3.4 ± 0.2 | 3.0 ± 0.1 | 56.2 ± 2.8 | 38.4 ± 2.4 |
| V-E added | 10.0 ± 0.2 | 3.4 ± 0.3 | 3.0 ± 0.2 | 56.4 ± 3.7 | 38.3 ± 2.5 |

*Refer footnote of fig.1

Table 6. Effect of water soluble polysaccharide fractions with and without vitamin A or E supplementation from mushroom on the glucose, cholesterol and creatine level in the plasma of ICR mice treated with P₃₈₈ cell line

| Group* | Glucose (mg/dl) | Cholesterol (mg/dl) | Creatine (mg/dl) |
|------------|-----------------|---------------------|------------------|
| Control | 122.42 ± 10.3 | 48.74 ± 5.52 | 0.53 ± 0.01 |
| Fraction A | 121.48 ± 12.4 | 46.42 ± 3.27 | 0.58 ± 0.02 |
| V-A added | 122.46 ± 14.4 | 46.82 ± 3.68 | 0.57 ± 0.04 |
| V-E added | 121.58 ± 21.2 | 46.87 ± 4.84 | 0.56 ± 0.02 |
| Fraction B | 120.92 ± 18.4 | 46.85 ± 3.64 | 0.56 ± 0.03 |
| V-A added | 119.92 ± 20.3 | 47.34 ± 2.48 | 0.56 ± 0.05 |
| V-E added | 119.84 ± 18.8 | 47.21 ± 2.28 | 0.53 ± 0.02 |
| Fraction C | 118.93 ± 21.4 | 47.22 ± 2.48 | 0.59 ± 0.03 |
| V-A added | 118.82 ± 18.8 | 46.80 ± 2.58 | 0.58 ± 0.02 |
| V-E added | 119.02 ± 20.2 | 46.88 ± 2.68 | 0.58 ± 0.03 |

*Refer footnote of fig.1

Table 7. Effect of water soluble polysaccharide from mushroom, *Lentinus edodes*, with and without vitamin A or E supplementation on organ weight of ICR mice

| Treatment Group* | Body weight (g) | Liver/Body (%) | Spleen/Body (%) | Thymus/Body (%) |
|------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Control | 23.4 ± 0.8 | 1.21 ± 0.04 | 4.14 ± 0.02 | 0.28 ± 0.01 |
| Fraction A | 24.3 ± 0.8 | 1.32 ± 0.02 | 4.15 ± 0.03 | 0.32 ± 0.01 |
| V-A added | 24.2 ± 0.6 | 1.33 ± 0.02 | 4.14 ± 0.03 | 0.32 ± 0.04 |
| V-E added | 24.7 ± 0.3 | 1.32 ± 0.03 | 4.15 ± 0.06 | 0.33 ± 0.03 |
| Fraction B | 25.2 ± 0.8 | 1.28 ± 0.02 | 4.48 ± 0.08 | 0.38 ± 0.01 |
| V-A added | 25.3 ± 0.5 | 1.28 ± 0.04 | 4.48 ± 0.04 | 0.38 ± 0.04 |
| V-E added | 25.5 ± 0.6 | 1.28 ± 0.05 | 4.48 ± 0.02 | 0.38 ± 0.05 |
| Fraction C | 28.3 ± 0.2 | 1.22 ± 0.02 | 4.32 ± 0.08 | 0.32 ± 0.01 |
| V-A added | 28.7 ± 0.3 | 1.22 ± 0.03 | 4.32 ± 0.03 | 0.32 ± 0.03 |
| V-E added | 28.5 ± 0.4 | 1.22 ± 0.04 | 4.32 ± 0.02 | 0.32 ± 0.01 |

*Refer footnote of fig.1

태가 같은 것과 다른 것이 있으며 azo화합물을 경구 투여 시 간 catalase 및 esterase는 시간 경과에 따라 감소를 보이며, 경변기를 지나 암으로 이행될 때 현저히 감소된다. 따라서 본 실험 결과에서는 대조군(정상군)과 여타 실험군이 큰 변화를 나타내지 않은 것은 이 실험동물 체내에 암세포가 미처 다음 단계로 이행되지 못한 전암기 상태라고 여겨진다.

4) 간장, 비장 및 흉선의 중량

ICR 마우스의 체중과 간장, 비장 및 흉선의 체중에 대한 중량비는 Table 7과 같다. 체중에 있어서는 표고 버섯 산성다당류(Fr. C)투여군에서 대조군 및 여타 실험군에 비하여 비교적 높은 값을 나타내었다.

간장, 비장 및 흉선의 체중에 대한 중량비는 각 실험군 간에 별 다른 차이가 없었다.

결 론

제배 기술의 발달로 다량 생산되고 있는 표고 버섯에서 열수 가용성 다당류를 분리하여 그 화학적 구성 성분을 분석하고 이들 성분이 암세포에 어떤 영향을 미치는가를 규명코져, P₃₈₈에 대한 항암 효과의 실험을 시도하여 얻은 결과는 다음과 같다.

표고 버섯으로부터 열수 추출하여 얻은 가용성 다당류(PS)를 분획하여 얻어진 Fr. A, Fr. B 및 Fr. C의 단백

질 함량은 4.6%, 0.3% 및 0.8% 이고 그 조성은 5종류의 미확인 물질을 포함한 22종의 아미노산으로 구성되어 있었으며, 그 중 glutamic acid가 10.5~12.6%로서 가장 많았고, 다음으로 aspartic acid(12.0%), proline(10.3%), serine(5.3~7.6%), cystein(6.2~6.7%)순으로 함유되어 있었다. 구성 다당류를 분석한 결과, Fr. B 와 Fr. C에서는 82.0~88.0%로 높게 정량되었으나 Fr. A에서는 68.0%였다. 다당류를 구성하고 있는 단당류를 각 분획분별로 분석한 결과, galactose가 중성다당류(Fr. B)에서 그 함량이 월등히 높아 59.1%를 차지한 반면, Fr. A 와 Fr. C에서는 5.3~10.5%였고, glucose는 Fr. A와 Fr. B에서 18.8~29.2%로 비교적 높은 함량을 보였으나, 산성다당류(Fr. C)는 2.9%에 불과하였으며, fructose는 10.0% 미만이었다. 그리고 maltotriose는 Fr. A(64.8%), maltotetrose는 Fr. C(59.1%)에서 높게 정량되었고, uronic acid는 0.5~5.2% 범위로 나타났다.

또한 수명 연장 효과는 중성 다당류인 Fr.B에서 161% 이상을 나타내었으며 암 세포 증식 억제 효과도 Fr. B에서 95%이상으로 가장 좋았으며, 비타민 E첨가, 비타민 A첨가순으로 항암효과가 있었다.

Literature cited

- 1) 久保道徳. 靈芝. pp230, 三一書房, 東京, 1985

표고버섯의 열수출물이 P₃₈₈의 세포독성에 미치는 영향

- 2) 難波恒雄. 原色和漢藥圖鑑 下卷 pp239, 保育社, 東京, 1980
- 3) Roland JF, Chiniolowicz ZF, Weiner BA. Calvacin, a new antitumor agent. *Science* 23 : 1897, 1960
- 4) Gregory FJ, Healy EM, Agerbory HP, Warn GH. Studies on antitumor substances produced by basidiomycetes. *Mycologia* 58 : 80-90, 1966
- 5) Espenshade MA, Griffith EW. Tumor-inhibiting basidiomycetes, isolation and cultivation in the laboratory. *Mycologia* 58 : 511-517, 1966
- 6) Yoshioka Y, Sano T, Ikekawa T. Studies on antitumor polysaccharides of flammulina velutipes. *Chem Pharm Bull* 21 : 1772-1776, 1973
- 7) Fukuda K, Uematsu T, Hamada A. The polysaccharide from lampteromyces japonicus. *Chem Pharm Bull* 23 : 1955-1959, 1975
- 8) Tsukagoshi S, Ohashi F. Protein-bound polysaccharide preparation, ps-K effective against mouse sarcoma180 and rat ascites hepatoma AH₃ by oral use. *Gann* 66 : 557-558, 1974
- 9) Nomoto K, Yoshikumi C, Matsunaga K, Fuji T, Takeya K. Restoration of antibody-forming capacities by ps-K in tumor bearing mice. *Gann* 66 : 365-374, 1975
- 10) 水野卓, 加藤尙美, 戸塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水子. 靈芝의 水溶性多糖類의 分割, 構造, 抗腫瘍活性について. *日本農藝化學會誌* 58(9) : 87, 1984
- 11) Ohno R, Yokomaku S, Wakayama K. Effect of protein bound polysaccharide preparation, ps-K on the immune response of mice to sheep red blood cells. *Gann* 67 : 97-99, 1976
- 12) Abe S, Ohkuma M, Yamazaki M, Mizuno D. Differentiation of host mediated antitumor agents from mitotoxic poisons by the antitumor foot ped reaction in Ehrlichcarcinoma-ddy mouse system. *Gann* 67 : 685-692, 1976
- 13) Ohno R, Imai K, Yokomaku S, Yamada K. Antitumor effects of protein bound polysaccharide preparation, PS-K against 3-methyl cholanthrene induced fibrosarcoma in C28 Bl/mice. *Gann* 66 : 679-681, 1975
- 14) Kang CY, Shim MJ, Choi EC, Lee YN, Kim BK. Studies on antineoplastic components of korean basidiomycetes, mycelical culture and antineoplastic components of Ganoderma lucidum. *Korean Biochem J* 14 : 101-112, 1981
- 15) Shim MJ. Studies on constituents and culture of the higher fungi of korea(XXV), stimulatory effects of coriolus versicolor constituents on immune response. *Korean J Mycol* 8 : 115-116, 1980
- 16) Mizuno T, Suzuki E, Maki K, Tamaki H. Fractionation, chemical modification and antitumor activity of water soluble polysaccharides of the fruiting body of Ganoderma lucidum. *Nippon Nok-eikagaku Kaishi* 59 : 1143-1151, 1985
- 17) Chihara G, Hamuro T, Maeda Y. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity especially lentinan from lentinus edodes. *Cancer Res* 30 : 2776-2781, 1970
- 18) Maeda Y, Chihara G. Lentinan a new immuno-accelerator of cell mediated responses. *Nature* 229 : 634, 1971
- 19) Kim BK, Kim DH, Choi EC, Shim MJ. Taxonomic investigations on korean higher fungi(IV). *Korean J Mycol* 4 : 17-25, 1976
- 20) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265, 1951
- 21) Speckman DH, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal Chem* 30 : 1190, 1958
- 22) Dische Z. Determination of uronic acid. *J Biol Chem* 17 : 167, 1947
- 23) Herbert D, Phipps PJ, Strange RE. Chemical analysis of microbial cells, in "Methods in microbiology" vol. 5, Academic press New York : 265, 1971
- 24) Mitraka BM. Gas chromatographic application in microbiology and medicine. Jone wiley & sons New York : 158, 1971
- 25) Fischer GA, Sartorelli AG. Development maintenance and assay of drug resistance. *Meth in Med Res* 10 : 247, 1964
- 26) 정수현. 수종의 한국산 구름버섯자실체와 배양균사체의 함압력 및 함압성분 비교연구. *충남대학교 대학원 석사학위 청구논문* : 22-28, 1989
- 27) Lee MH, Kim HW, Shim MJ. Studies on constituents of higher fungi of korea(LVI). *Kor J*

최미연 · 정태영 · 함건주

Mycol 14(2) : 149-163, 1986

28) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide

dismutase. *Eur J Biochem* 47 : 469-474, 1974

29) 황우익, 오수경. 인삼의 지용성 성분과 사포닌유도체의 항암작용연구. *고려인삼학회지* 8(2) : 153-155, 1984