Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 25, No. 2, 178-182 (1997)

띠미로 버섯 추출물의 항암효과

양규호[1] · 양정희[2] · 류병호*
신곡중학교[1], 하바드대학교 의과대학[2], 경성대학교 식품공학과*

Antitumor Effects of Extracts Obtained from *Daedalea dickinsii*. **Kyoo Ho Yang, Jung Nee Yang and Beung Ho Ryu*.** *Shin Gok Middle School, Pusan 612-010, Korea, Havard Medical School, Boston 02215, USA, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University, Pusan 608-732, Korea* – This study was carried out particularly focusing on the antitumor effects of extracts obtained from mushroom, *Daedalea dickinsii* against Hela cell, Hep G_2 cell, L 929 cell and Sarcoma-180. Antitumor effect of hot water extracts obtained from *Daedalea dickinsii* against Hela cell showed at the highest level of 70% when adiministrated at the concentration of 1.5 mg/100 ml, however Hep G_2 cell inhibited 40% at the same concentration of hot water extracts. Antitumor effects of methanol extract of *Daedalea dickinsii* against Hela cell indicated at the highest level of 60% when 4 mg/ml was administerated. Antitumor effect of hot water extract of *Daedalea dickinsii* inhibited 51.03% against L929 cell. The solid tumor sarcoma-180 growth inhibition of methanol extract of *Deadalea dickinsii* inhibited 45.67% when administrated at the concentration of 60 mg/kg, and the life prolongation was higher 30.88% than that control group.

현대 의학의 발전에도 불구하고 암은 아직도 그 원인 및 치료방법이 분명치 않아 인류의 건강을 위협하는 가장 중요한 인자로 남아 있다. 암의 공포로 부터 벗어나기 위하여 오래 전부터 연구가 진행 되어 많은 새로운 사실들이 밝혀지고 있으나 현재 암치료에 이용되고 있는 화학요법, 방사선요법 및 외과적 수술요법등은 치료적 한계성 및 부작용등의 불가피성으로 인해 그 이용에 많은 문제점을 가지고 있다. 이런 관점에서 볼 때 불완전한 기존의 암치료법에 병행하여 현재에 이르러서는 자연계에 존재하는 천연물로부터 분리한 물질을 생체 방어기전에 이용하여 암을 구축하고자 하는 시도가 활발히 진행되고 있다. 최근에 와서는 고등균류에 속하는 담자균류의 항암성분의 연구가 보고 되고 있다. 이러한 항암성분은 면역기능을 촉진 또는 부활시킴으로써 그 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있으며 종래의 항암제와는 달리 그 부작용이 현저히 낮고 특히 화학 요법이나 방사선 요법과 병용으로 치료효과를 극대화 시킬 수 있어 실용가치를 더욱 높이고 있다. 우리나라에서도 한국산 담자균류의 각종 성분에 대한 연구를 계속해온 바 근년에와서 한국산 고등 균류 중 구름버섯(1, 2), 표고버섯(3), 만년버섯(4), 영지버섯(5) 등에서 항암성분을 분리하여 그 화학적 조성을 밝히고 실험동물에서의 암세포 억제효과를 계속 연구해 왔다. 그 중에서도 특히 구름버섯, 표고버섯, 영지버섯 등에서 항암성분을 추출하여 암세포 억제 효과에 대한 임상실험이 더욱 활발히 연구되고 있다. 영지버섯의 약효 성분은 주로 다당류와 단백질이 결합된 polysaccharide-protein complex로서 그 화학적 조성도 밝혀진 바 있고, 동물실험에서도 암세포 억제효과가 입증되었다(6-8). 구름버섯 유래의 PS-K Krestin(9, 10) 비늘버섯(11), 덧다리버섯(12)의 항암효과가 우수하다고 보고 되었다.

본 실험에서 사용한 띠미로 버섯(*Deadalea dickinsii* Yasuda)은 구멍장이 버섯과(*polyporaceas*)에 속하는 균류로써 주로 참나무, 떡갈나무 등의 활엽수인 고사목에 발생하는 갈색, 흑색, 회색의 목재부후균이며 한국, 동아시아, 인도, 중국에 분포하고 있다(13). 우리나라에서는 지리산, 덕유산, 강원도 일원의 해발 약 800 m 부근에서 자생하고 있는 띠미로 버섯이 요통, 복통, 관절염등의 통증해소는 물론 간기능 강화와 항암제, 혈압치료에 민간요법으로 복용하고 있으나 생리활성에 대한 연구는 찾아 볼수 없다. 따라서 본 연구는 버섯의 자실체로 추출한 추출물로서 암세포에 대한 억제효과에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 실험방법

시료의 조재

띠미로 버섯(*Daedalea dickinsii*, Yasuda)은 지리산 중산리에서 수집하여 사용하였다. 시료의 추출은 열수 및 methanol로서 추출하였다. 열수 추출은 건조중량 500 g을 2*l* 증류수에 48시간 추출한 후 10 m*l*정도 남은 추출물을 거즈로 한번 거른 후 Whatman NO.3로 다시 걸러서

*Corresponding author
Tel. 82-51-620-4712, Fax. 82-51-622-4986
Key words: Antitumor, *Daedalea dickinsii*

동결 건조한 후 시료를 사용하였다. Methanol추출법은 건조 중량 500 g의 떠미로 버섯을 2 cm크기로 잘라서 추출기의 둥근 flask에 넣고 methanol을 떠미로 버섯이 잠길 정도로 부어 80-90℃에서 10시간동안 환류시키면서 얻은 추출액을 농축기에 옮겨 농축시킨후 시료를 사용하였다. 이때 사용된 시약은 minimal essential media, dimethyl sulfuroxide (DMSO), sodium bicarbonate ($NaHPO_4$), sodium phosphate ($NaHPO_4$), sodium chloride (NaCl), formalin, ethanol, methanol은 Sigma Co.에서 구입하였다. Tissue culture flask는 Costar Co., 96-well plate는 Flacon Co., Hepes는 Boehringer Mannheim Co.에서 구입하였다.

동물 암세포 및 배양

실험 동물세포로는 HeLa cell(사람의 경부암 세포), Hep G_2 cell(간암세포), L929 cell(mouse liver fibroblast tumor)은 sodium bicarbonate, HEPES, gentamycin, FBS를 첨가한 MEM배지에서 배양하였다(14).

동물 암세포 배양은 사람의 자궁경부 암세포(HeLa cell), 간암세포(Hep G_2 cell), 생쥐의 간암세포(L929 cell)를 tissue culture flask 안에서 37℃, 5% CO_2 조건을 유지하면서 배양하였으며 3일에 1회씩 성장배지(MEM)를 교환하였다. 세포들을 inverted microscope로 보았을 때 서로 붙어서 monolayer를 형성하기 직전의 상태(submonolayer)가 되면 다음과 같이 계대배양(subculture)하였다. Tissue culture flask안의 배지를 pipette을 이용하여 모두 걷어낸 후 세포들은 serum을 포함하지 않는 성장배지로 씻어주고 0.05% trypsin으로 처리하여 세포를 분리하였다. 이를 1,000×g에서 2분간 원심분리하여 모은 암세포를 다시 성장배지에 희석한 후 1.0×10^5 cells/m*l*가 되도록하여 새로운 tissue culture flask에 넣어 주었다. 이때 세포의 수는 hemocytometer를 이용하여 측정하였다(15).

실험동물과 암세포 억제 효과

실험에 사용한 동물은 본 대학 동물사육장에서 사육한 체중 25 g(♀) BALB/C mouse를 사용하였고, 물과 사료는 충분량을 공급하였으며 온도 21±2℃, 습도 50-60%로 유지되는 항온 항습 사육실에서 사육하였다.

시료의 암세포 억제 효과는 HeLa cell, Hep G_2 cell, L929 cell의 각 동물세포를 96-well microtiter plate에 well당 $3\text{-}4\times10^4$ 세포를 접종하고 37℃, 5% CO_2조건하에서 24시간 동안 배양후 96-well plate의 상층배지를 버린다음 cytotoxicity을 측정하기 위하여 3.63 mg/100 μ*l*시료의 추출액 100 μ*l*를 취하여 100 μ*l*의 배지와 섞어 200 μ*l*를 만들고 이 용액을 serial dilution하여 37℃, 5% CO_2에서 24시간 배양한 후 plate의 배지를 제거한 후 crystal violet염색 용액(0.1% crystal violet, 10% calcium carbonate saturated formalin, 11.1% ethanol)에 15분 담구어 염색하였다. 염색시킨 96-well plate를 증류수로 잘 세척한 후 털어서 말리고 microplate reader기를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(14).

BALB/C mouse의 암세포 억제 및 장기에 미치는 실험

체중 25 g(♀) ICR mice의 복강에 10일 간격으로 이식하여 배양되고 있는 sarcoma-180 육종암세포를 실험용 종양세포로 사용하였다. 육종암 세포를 복수와 함께 취하여 원심분리한 뒤 ICR mice당 2×10^4 cells를 복강에 주사한 7마리를 대조군으로 하였고 대조군과 같은 몸무게를 가진 mouse에 sarcoma-180 육종암 세포를 대조군과 같은량으로 각각 주사한 후 24시간 뒤 각군에 4일간 연속으로 열수추출한 버섯의 다당류의 일정 농도를 주사하여 생존기간을 대조군과 비교하여 암세포 억제 효과를 측정하였으며 각 군의 mouse의 개체수는 7마리로 하였다(15).

수명연장실험

앞의 방법으로 조제한 종양세포 부유액 0.1 m*l*(1.0×10^6 cell/mouce)씩을 실험동물의 복강내에 이식한 뒤 24시간 후부터 10시간 연속으로 시료를 복강내에 투여하여 35일까지의 생존여부를 관찰하고 평균수명일수를 계산하여 Goldin(16) 등의 방법에 따라 수명연장 백분율을 구하였다.

다당류의 정량

다당류의 정량은 Anthrone test로 측정하였다(17).

통계처리

모든 실험 data는 mean standard error로 나타내었으며, 유의성 검정은 t-test로 하였다.

결과 및 고찰

다당류의 함량

떠미로 버섯을 열수 및 메타놀로 추출하여 다당류의 함량을 알아보기 위하여 glucose를 표준당으로하여 Anthrone시약과 반응시켜 흡광도를 측정한 결과 떠미로 버섯 500 g에서 추출한 시료의 다당류는 열수추출물의 경우 0.18 g이였고 메타놀 추출물에서는 0.195 g을 얻었다.

열수 및 메타놀 추출물의 암세포에대한 억제 효과

열수 추출물을 일정 농도로 조절하여 자궁 경부암 세포(HeLa cell), 간암 세포(Hep G_2 cell)의 억제효과에 대한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Hela cell인 자궁 경부

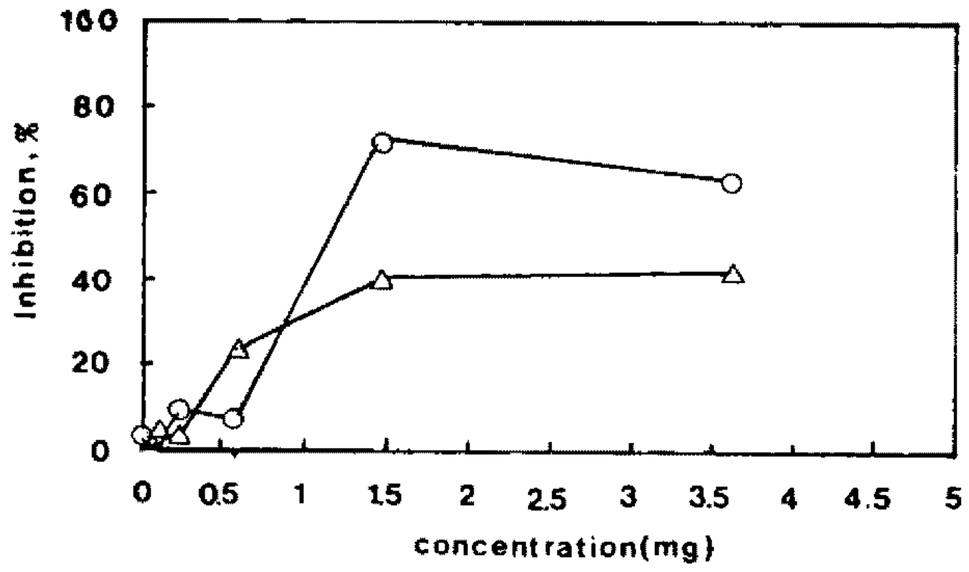

Fig. 1. Antitumor activity of hot water extracts obtained from *Daedalea dickinsii*.
Hela cell, ○−○; Hep G_2 cell, △−△.

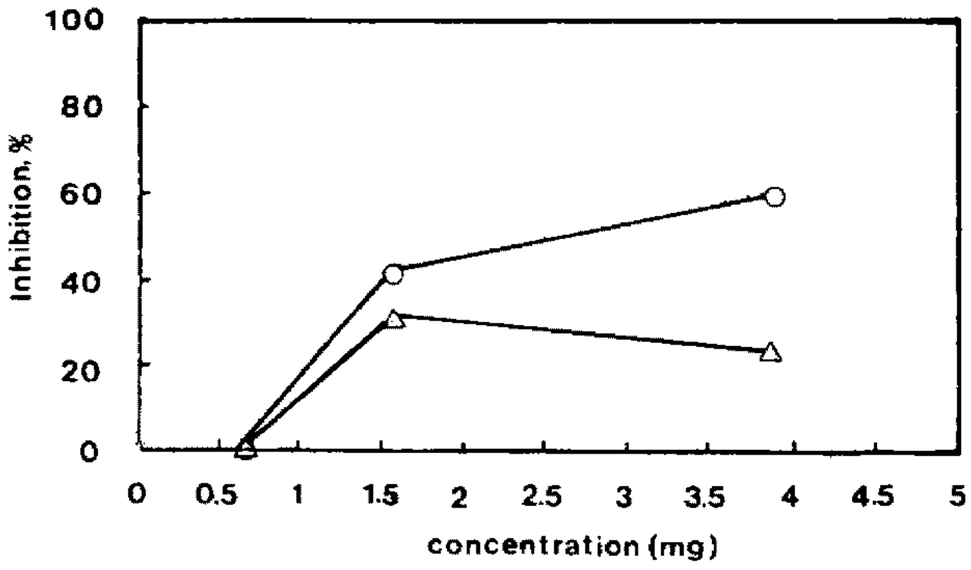

Fig. 2. Antitumor activity of methanol extracts obtained rom *Daedalea dickinsii*.
Hela cell, ○−○; Hep G_2 cell, △−△.

암은 열수 추출물의 경우 1.0 mg/100 m*l*의 농도에서는 약 32%의 억제효과를 나타내었으나 1.5 mg/100 m*l* 농도에서는 70% 이상의 암세포 억제 효과를 볼 수 있었고, 열수 추출물의 농도가 높을 수록 효과는 뚜렷이 나타나지 않았다. 간암세포인 Hep G_2 cell의 경우 각 종 농도를 투여한 결과 1.5 mg/100 m*l*의 농도에서 약 40%의 억제 효과를 나타내었고, 2~3.5 mg/100 m*l*의 농도에서는 42%정도로 열수 추출물의 농도가 높을 수록 억제효과는 거의 비슷함을 알 수 있었다.

메탄올 추출물의 경우 자궁 경부암 세포(Hela cell)와 간암 세포(Hep G_2 cell)에 대한 억제 효과를 Fig. 2에 나타내었다. 자궁 경부암 세포는 메타놀 추출을 약 1.5 mg/m*l*의 농도에서 40% 이상의 항암 효과가 있었고, 4 mg/m*l*에서는 약 60%의 억제효과를 나타내었다. 간암 세포의 경우 이 보다 약간 낮은 30%의 암세포 억제 효과를 볼 수 있었다. 이와 같은 결과로 보아 띠미로 버섯의 메탄올 추출에 의한 버섯 다당류 농도가 열수 추출한 버섯 다당류 농도가 동일하지만 자궁암 세포와 간암세포의 억제 효과가 더 높은 것으로 사료 된다.

한편 버섯의 항암효과가 비교적 잘 알려져 있는 영지버섯을 각각 열수 추출한 성분을 띠미로 버섯과 암세포 억제 효과를 비교하기 위하여 각각 500 g을 물 2 *l*에 넣

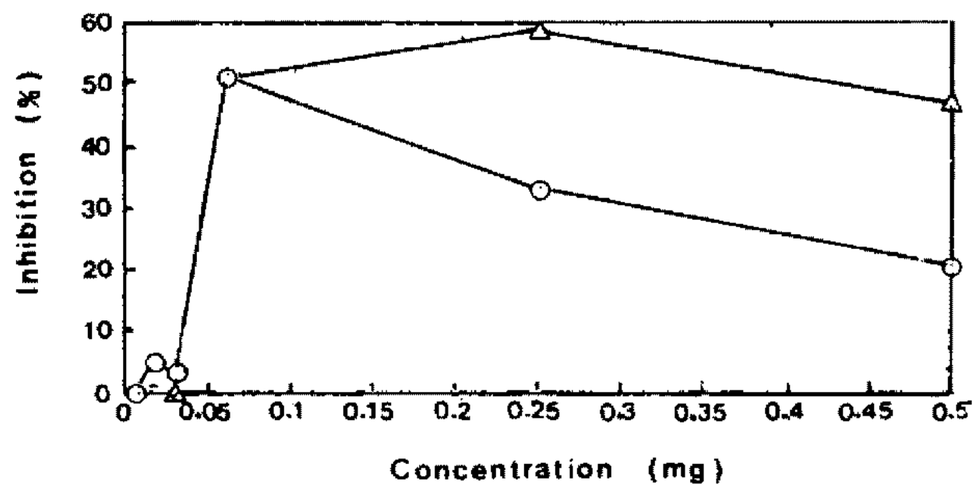

Fig. 3. Comparison of antitumor activity of hot water extract between *Daedalea dickinsii* (○−○), Ganoderma lucidum(△−△) against L 929 cells.

Table 1. Antitumor activity of hot water extracts obtained from *daedalea dickisii* against of sarcoma-180 bearing mice

Dose (mg/kg)	No. of mice	Tumor weight (g, mean±S.E)	Inhibition ratio (%)
0	7	7.86±1.24	
20	7	6.24±1.00**	20.61
40	7	5.61±0.63*	28.62
60	7	4.27±0.15*	45.67

*P<0.05, **P<0.01.

어 열수 추출한 시료를 냉동 건조시켜 다당류 정량 방법에 의해서 정량한 후 같은 농도에서 세가지 sample 농도에 대한 L929 cell (mouse liver fibroblast tumor)의 암세포 억제 효과를 Fig. 3에 나타내었다. 열수 추출물의 농도가 0.0625 mg/m*l*에서 띠미로 버섯은 51.03%, 영지버섯은 50.94%로서 띠미로 버섯과 영지 버섯의 암세포 억제 효과가 비슷하였으나, 0.25 mg/m*l*에서 띠미로 버섯은 33.1%, 영지버섯은 68.3%로서 영지버섯이 약 2배이상의 항암효과가 있었으며, 0.5 mg/m*l*에서는 띠미로 버섯이나 영지버섯의 효과는 다소 감소하는 경향이었다. 이와 같이 띠미로 버섯이나 영지버섯이 일정농도에서 항암효과가 높았으나 일정농도 범위를 초과할 경우 항암효과가 다소 감소하는 바 이는 본 연구에 사용된 추출물이 용량 의존형이 아님을 알 수 있다.

띠미로 버섯의 추출성분에 의한 mouse의 암세포 억제 효과

띠미로 버섯을 열수 및 메타놀로 추출하여 20~60 mg/kg으로 구분하여 sarcoma 180 세포를 이식한 ICR mice에 투여한 결과는 Table 1에 나타내었다. 이때 대조군의 평균 종양 무게는 7.86±1.24 g이였고 띠미로 버섯의 추출물을 20 mg/kg 투여하였을 때는 종양무게는 6.24±1.0 g으로 20.61% 나타났으며 40 mg/kg 투여하였을때 종양무게는 5.61±0.63 g으로 28.62%의 억제율을 나타내었으나 60 mg/kg 투여하였을때 종양무게는 4.27±0.15 g으로 종양 억제율은 45.67%로 높게 나타났다. 따라서 투여량의 농도가 높을 수록 종양무게가 줄어드는 용량의

Table 2. Effect of hot water extracts obtained from *Daedelea dickinsii* against life prolongation of sarcoma-180 bearing mice

Doses mg/kg	No. of mice	Survival days	Prolongation ratio (%)
0	7	18.23	-
10	7	20.40	11.90
20	7	23.46	28.68
30	7	23.86	30.88

존형으로 떠미로 버섯은 종양억제효과가 좋았다. 이러한 결과는 김 · 청각의 추출물의 억제효과(53.30%)(18), 초산균의 항암효과(64.96%)(19), 해조류의 항암효과(58.7~100%)(20)에 비하여 다소 낮은 수치를 나타내었다.

떠미로 버섯의 수면연장 효과에서 ICR mice로 실험한 결과는 Table 2에 나타내었다. 수명연장실험에서의 열수 추출물을 10, 20, 및 30 mg/kg의 농도로 실험한 결과 대조군의 생존일수가 18.23일이였으나 10, 20, 30 mg/kg일 때 각각 20.40, 23.46 및 23.86일로 sarcoma-180을 이식한 대조군에 비하여 따미로 버섯의 열수 추출물을 투여한 그룹의 생존일수가 높았다. 이러한 결과는 고형암 성장 저지 실험결과와 비교해 볼 때 *in vivo*에서 고형암 성장 저지 효과가 다소 높은 것으로 보아 숙주 매개형 반응에 의한 것으로 생각된다.

이러한 결과들은 류 등(20)이 해조류에서 추출한 다당류와 Kanayama 등(21)이 보고한 *Poria cocos*의 수명 연장 백분율과 거의 비슷한 수치를 나타내고 있다.

요 약

본 연구는 옛날부터 생리활성이 우수한 것으로 알려진 떠미로 버섯(*Daedalea dickinsii*)에 대한 항암효과를 알아보기 위하여 열수 및 메타놀 추출물로서 사람의 암세포인 Hela cell, Hep G_2 cell, L929 cell 및 동물의 육종암세포인 sarcoma-180을 이용하여 실험하였다.

떠미로 버섯의 열수 추출물은 1.5 mg/100 m*l* 농도에서 Hela cell에 대하여 70%의 높은 항암효과를 나타내었고, Hep G_2 cell은 40%정도의 항암효과를 나타내었다. 떠미로 버섯의 메타놀 추출물의 경우 4 mg/m*l*농도에서 Hela cell에 대하여 60%의 억제효과를 나타내었다. L929 cell에 대한 떠미로 버섯의 열수 추출물은 50.03%의 억제효과를 나타내었다.

Sarcoma-180에 대한 종양 억제효과는 떠미로버섯의 열수 추출물을 60 mg/kg 투여시 45.67%의 억제효과가 있었고 수명연장은 30.88%로서 대조군보다 높았다.

참고문헌

1. Kim, B. K., Park, E. K. and Shim, M. J. 1979. Studies on constituents of higher fungi of Korea(XXIV), Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor* (L.ex Fr.) Qule. *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* **2**: 145-151.
2. Park, E. K., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1979. Studies on the constituents of higher fungi of Korea (XXIV), Chemical analysis of antineoplastics components of *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel., *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing., *Arch. Pharm, Res.* **2**: 153-159.
3. Min, H. K., Choi, E. C., and Shim, M. J. 1980. Studies on constituents of higher fungi of Korea(XVIII), *Kor. J. Mycol.* **8**: 13-20.
5. Kang, C. Y., M. J. Shim, E. C. Choi, Y. N. Lee and B. K. Kim, 1981. Studies on antitumor components of Korean Basidiomycetes. Mycelial culture and antitumor components of Ganoderma lucidum, *Kor. Biochem. J.* **14**: 100-109.
6. 강창률, 심미자, 최응칠, 이영남, 김병각. 1981. 한국산 담자균류의 항 암성분에 관한 연구. 만년버섯의 균사배양 및 항암성분. 한국생화학 회지 **14**: 101-112.
7. Moon, S. H., Lee, S. H., Mock, M. S. and Kim, K. O., 1987. Antitumor Activity of the Polysaccharide-Fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its Effects on the Immune Function. *Yakhab Hoeji* **31**: 26-32.
8. Tsukagoshi, S and F. Ohasi, 1974. Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Ganr,* **65**: 557-558.
9. Park, D. W., Shim, M. J. and Kim, B. K., 1979. Studies on constituents of higher fungi of Korea (XVII). Production of antintoplastic components by the submerged culture of *Lentinus edodes, Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **4**: 19.
10. Yoshikumi, C., Nomoto, K., Matsunaga, K. Fujii, T. and Takeya, K., 1975. Mouse strain difference in the expression of antitumor activity of PS-K, *Gann* **66**: 649-654.
11. Park, W. H., Kim, B. K. and Ro, I. H., 1983. Studies on the component of *Pholiota squarrwsa*(II), *Kor. J. Mycol.* **11**: 35.
12. Kang, C. Y., Lee, C. O., Chung, K. S., Choi, E. C., and Kim, B. K., 1982. Anantitumor component of *Laetiporus sulphureus* and its immunostimulating activity, *Arch. Pharm. Res.* **5**: 39.
13. 김삼순, 김양섭, 1990. 한국산 버섯도감. 유풍출판사, 290-291.
14. Herbert, D., Phipps, P. J. and Strange, R. E., 1971. Chemical analysis of microbial cells, In *Methods in Microbiology* (Ed. J. R. Norris and D. W. Ribbons) *Vol. 5B*, Academic press, 265-301.
15. Nuzzolo, L. and A. Vellucci. 1978. *Tissue Culture Techniques*. Green, W. H., Inc. 74.
16. Goldin, A., Kline, I., Sofina, Z. P., Syrkin, A. B. 1980. Experimental evaluation of antitunor drugs in the USA and USSR and clinical correlations, NIH, 33-34.

17. 한국생화학회; 1986, 신판 실험 생화학 p147 탐구당.
18. 조경자, 이영숙, 류병호, 1990. 청각과 김에서 추출한 당단백질의 sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역 활성, 한국수산학회지, **23(5)**: 345-352.
19. 김동석, 류병호, 1991. *Acetobacter pasterianus* IFO 13751-5 변이주가 생산하는 다당류의 항암효과. 한국식품과학회지, *23(4)*: 405-409.
20. 류병호, 김동석, 신동분, 1989. Sarcoma-180에 대한 해조류의 항암 활성, 한국식품과학회지, *21(5)*: 596-601.
21. Kanayama, H., Togami, M., Adachi, N., Fukai, Y. and Okumoto, T. 1986. Studies on the antitumor active polysaccharides from the mycelia of *Poriacocos*. Wolf. III. Antitumor activity against mouse tumors. *Yakugaku Zasshi,* **106**: 307.

(Received 3 December 1996)