

저령(*Grifola umbellata*)의 균핵에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암 효과

오윤희 · 이우윤 · 이민웅¹ · 심미자² · 이태수*

인천대학교 생물학과, ¹동국대학교 응용미생물학과, ²서울시립대학교 생명과학과

Immuno-modulatory and Antitumor Effect of Crude Polysaccharides Extracted from Sclerotium of *Grifola umbellata*

Yun-Hee Oh, U-Youn Lee, Min-Woong Lee¹, Mi-Ja Shim² and Tae-Soo Lee*

Department of Biology, University of Incheon, Incheon 402-749, Korea

¹Department of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

²Department of Life Science, University of Seoul 130-743, Korea

(Received February 13, 2004)

ABSTRACT: Neutral salt-soluble, hot water-soluble and methanol-soluble materials (hereinafter referred to Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH, respectively) were extracted from sclerotium of *Grifola umbellata*. The Fr. NaCl and Fr. HW did not show any direct cytotoxicity against NIH3T3, Sarcoma 180 and MCF-7, but Fr. MeOH showed cytotoxicity against these cell lines at the concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$. Intraperitoneal injection with Fr. NaCl showed antitumor effect with life prolongation of 66.7% and decrease the number of Sarcoma 180 cells of 54.2% in mice inoculated with Sarcoma 180. Fr. NaCl improved the immunopotential activity through alternative complement pathway and the alkaline phosphatase activity by 85.05-88.73% and 6 folds, respectively. The number of peritoneal exudate cells and the circulating leucocytes were increased by 1.7 and 3.6 folds in the Fr. NaCl treating group compared with the control group, respectively. The weight of immunoorgans such as liver, spleen and thymus were also gradually increased. The hematological analysis of the Fr. NaCl group was similar with that of the control group. The total polysaccharide and protein contents of Fr. NaCl were 98.25% and 1.44%, respectively. These results indicate that the antitumor activity of Fr. NaCl was exerted through immunopotential, but not through cytotoxicity against the tumor cells.

KEYWORDS: Antitumor activity, *Grifola umbellata*, Immuno-modulatory effect, Sarcoma 180

고등균류에 속하는 식용버섯은 독특한 향기와 맛뿐만 아니라 식물성 단백질, 다당류, 식이섬유, 키틴, 비타민 그리고 인체에 필수적인 여러 종류의 무기물을 함유하여 영양은 물론 약용 가치가 높아 중국을 비롯한 동양에서는 버섯을 불로장수의 영약으로 여겨 오랫동안 전통 약재로 사용하여 왔다. 최근 이러한 버섯을 대상으로 건강을 유지하고 성인병을 예방하기 위한 연구가 진행되고 있다. 이들의 연구 결과는 버섯이 인체의 생리적 항상성을 유지시켜 주어 질병에 대한 저항력을 높일 뿐만 아니라, 부작용 없이 항암 및 면역조절 효과를 갖고 있는 것으로 보고하고 있다(水野 卓, 1992).

담자균류의 항암 성분에 관한 연구는 큰발장버섯(*Calvatia gigantea*)으로부터 Roland 등(1960)이 calvacin을 분리함으로써 시작되어 Chihara 등(1969)은 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 자실체로부터 Sarcoma 180에 저지력을 지닌 고분자 β -1,3-glucan인 lentinan을 분리하였으며, Komatsu 등(1969)은 치마버섯(*Schizophyllum commune*)으로부터 항

암 효과를 나타내는 β -1,6; β -1,3-glucan인 schizophyllan을 분리하여 보고하였다. 이후 Tsugagoshi 등(1974)은 구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 배양 균사체로부터 β -1,3; β -1,4; β -1,6-glucan인 항암성 단백질다당체인 PS-K(Krestin)를 분리하였고, Fujii 등(1978)은 표고버섯(*L. edodes*)의 배양 균사체로부터 단백질이 결합된 다당체 KS-2를 분리하여 인터페론을 유발하는 효과가 있음을 보고하였다.

최근 국내에서는 메미눈꽃동충하초와 삼색도장버섯에서 중성염용액을 이용하여 추출한 조다당류가 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 억제 작용을 나타내 생명연장효과가 있다는 것을 밝힌 바 있으며, 또한 이들 추출물을 생쥐의 복강에 투여하였을 때 면역을 활성화시키는 것을 확인할 수 있었다(심 등, 2003a, b).

Grifola umbellata(Pers. ex Fr.) Pilat.(저령)는 민주름버섯목(Aphyllporales) 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 담자균으로서, 활엽수, 특히 오리나무, 참나무류 등의 뿌리에 기생하여 땅 속에 흑색의 균핵을 형성하며, 자실체는 가을에 균핵으로부터 지상에 발생한다. 저령은 한

*Corresponding author <E-mail: tslee@incheon.ac.kr>

국, 일본, 중국, 유럽, 북아메리카에 분포하는 식용버섯으로 항종양, 항균 및 대식세포 활성화 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다(박 등, 1999).

이에 본 연구에서는 저령의 균핵으로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올용액으로 추출한 조다당류 성분들을 이용하여 실험관 내 및 마우스 생체 내에서 항암능에 대한 효과를 실험하였다. 이외에도 이들 추출물이 면역계에 대한 작용을 알아보기 위하여 조다당류를 투여한 생쥐를 대상으로 대식세포, 임파구, 보체계 및 면역 장기들의 변화를 조사하여 항암 작용의 기작을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

저령(*Grifola umbellata*)의 균핵은 서울의 경동 한약시 장으로부터 구입하여 본 실험에 사용하였다.

조다당의 추출 및 분리

Methanol 추출물은 건조된 저령의 균핵 1kg을 분쇄기로 마쇄한 후 80% methanol 10 l에 침지하여 48시간 동안 상온에서 추출하였다. 이 추출액을 여과지(No. 2, Advantec Toyo Co.)로 여과한 다음 rotary evaporator로 감압농축하였다. 농축액을 동결건조한 후 ethylacetate와 증류수를 1 : 1(v/v)로 혼합한 용액으로 추출하여 물 층의 여액을 얻어 감압농축시킨 다음, 동결건조하여 methanol 추출물을 얻었다(한 등, 2000).

중성염용액 추출물은 methanol 추출 후 남아있는 재료에 0.9% NaCl 4 l를 첨가하여 2회 반복 추출하였다. 이 추출액을 여과한 다음 동결건조하고 300 ml의 3차 증류수를 가하여 용해시킨 후 이 용액을 투석막(MW: 12,000)을

사용하여 4°C에서 48시간 동안 투석하였다. 투석막 내 액에 4배 용량의 ethanol을 가한 뒤 4°C에서 24시간 정치시킨 후 10,000×g로 20분간 원심 분리하여 다당류 침전물을 얻었다. 침전물을 3차 증류수로 현탁하여 위의 방법으로 재투석하고 동결건조하여 중성염용액 추출물을 얻었다(조 등, 1995).

열수 추출물은 중성염 추출 후 회수한 균핵 분말에 증류수 5 l를 첨가하여 95°C에서 12시간 동안 추출하였다. 다당류를 침전시키기 위하여 추출액에 4배의 ethanol을 첨가하고 4°C에서 24시간 동안 정치시킨 후 원심 분리하였다. 침전물을 3차 증류수 500 ml에 용해시켜 4°C에서 48시간 동안 투석한 후, 투석막 내액을 동결건조하여 열수 추출물을 얻었다(조 등, 1995)(Fig. 1).

항암효과

암세포에 대한 세포독성: 실험에 사용한 세포주는 정상세포인 마우스 섬유아세포 NIH3T3와 암세포인 마우스 유종암세포 Sarcoma 180과 유방암세포 MCF-7을 사용하였으며, 세포독성 실험은 Denizot 등(1986)의 방법에 따라 수행하였다.

NIH3T3와 MCF-7은 2×10⁵ cells/ml의 세포를 96 well plate에 100 μl씩 주입한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2000 μg/ml이 되도록 조정된 후 100 μl씩 세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 5 mg/ml의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) solution을 10 μl를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μl로 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Sarcoma 180은 4×10⁵ cells/ml의 세포를 96 well plate에 50 μl씩 주입하고 각 추출물의 최종 농도를 10~2000 μg/ml이 되도록 암세포에 처리하여 최종 용량이 100 μl가 되도록 하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 25 μM phenazine methosulfate가 포함된 1 mg/ml 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT) solution을 well 당 30 μl씩 처리하여 암 조건에서 2시간 배양한 후 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였고, 실험군이 대조군에 비해 생존율이 50% 감소하는 50% inhibition concentration(IC₅₀) 값을 구하였다.

$$\text{Viability}(\%) = (T - B) / (C - B) \times 100$$

T : 실험군의 평균 흡광도

C : 대조군의 평균 흡광도

B : Blank

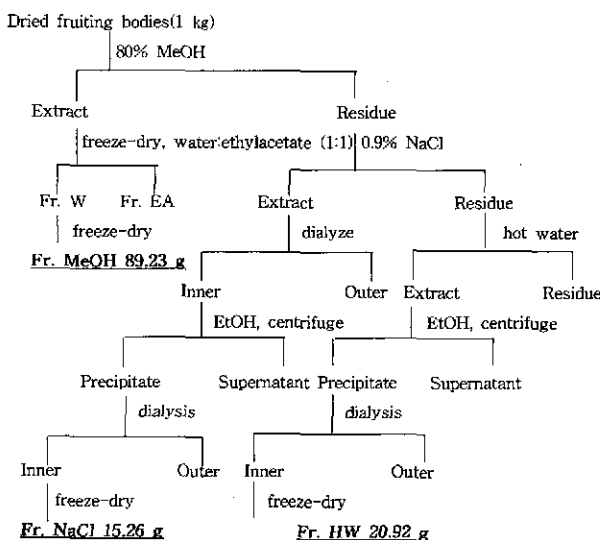


Fig. 1. The extraction procedures of crude polysaccharides from sclerotium of *Grifola umbellata*.

Sarcoma 180에 대한 함양 실험: 중성염, 열수 및 methanol 추출물이 복수암 세포 Sarcoma 180에 미치는 함양 효과를 확인하기 위해 7주령의 마우스를 대조군과 실험군으로 나누었다. 실험군의 경우 20 mg/kg body weight에 해당되는 추출물을 0.2 ml의 PBS에 녹여 0.2 μ m의 1회용 membrane filter로 여과시킨 후 ICR 마우스에 10일 동안 하루 1회 복강 투여하였다. 추출물 최종 투여 24시간 후에 Sarcoma 180을 5×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켜 중성염, 열수 및 methanol 추출물을 투여한 각각의 마우스 복강에 0.2 ml씩 투여하였으며 Sarcoma 180 투여 후에도 10일간 추출물을 매일 1회 복강 투여하였다. 대조군에는 같은 방법으로 같은 기간, 동량의 PBS buffer를 투여하였으며 암세포 최종 투여 후 35일까지 관찰하였다.

대조군과 실험군의 마우스 복부에 5 ml의 차가운 PBS를 주입하고 주사기로 Sarcoma 180을 취한 후 광학현미경 하에서 세포 수를 측정하였으며, 암세포의 성장 억제 효과는 increase of life span(ILS)으로 평가하였다.

$$ILS(\%) = (T - C/C) \times 100$$

T: 실험군의 평균 수명 (일)

C: 대조군의 평균 수명 (일)

면역 활성화 효과

보체 대체 경로의 활성화에 대한 작용: 보체 대체 경로(alternative complement pathway)에 대한 작용을 알아보기 위해 Adachi 등(1990)의 방법에 따라 실시하였다. 보체원인 신선한 사람 혈청 0.4 ml에 1, 2.5 및 5 mg/ml 농도의 추출물과 zymosan A(Sigma Co.)를 각각 0.1 ml씩 가하고 37°C에서 1시간 배양한 후, gelatin veronal buffer [GVB(gelatin 1 g, NaCl 8.65 g, sodium barbiturate 2.06 g/달이온수 1 l, pH 7.4)]-ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA) Mg²⁺ 용액 0.3 ml와 sheep red blood cell을 0.2 ml(5×10^7 cell/ml)씩 가하였다. 37°C에서 1시간 배양하고 빙냉의 PBS buffer를 2 ml씩 가하여 반응을 종결시킨 후 300×g에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 상정액의 흡광도를 414 nm 파장에서 측정하였다.

% hemolysis

$$= \frac{OD(\text{Test or Control lysis}) - OD(\text{Blank})}{OD(\text{maximum lysis}) - OD(\text{minimum lysis})} \times 100$$

Anticomplementary activity (%)

$$= \left(1 - \frac{\% \text{ hemolysis of Test}}{\% \text{ hemolysis of Control}} \right) \times 100$$

마우스의 B 림파구 활성화에 미치는 영향: Ohno 등(1986)의 방법에 따라 분화된 B 림파구의 표면에 발현되

는 alkaline phosphatase를 측정하였다. 준비된 비장세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 well 당 100 μ l씩 분주하고 50, 200, 500 μ g/ml의 추출물과 양성 대조군으로 5, 50 μ g/ml의 LPS(lipopolysaccharide)를 가함으로써 최종 부피가 200 μ l가 되도록 하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후, 세포 배양액을 원심분리하고 침전물에 1 mM MgCl₂를 포함한 50 mM sodium carbonate buffer(pH 9.0)에 1 mg/ml이 되도록 *p*-nitrophenyl phosphate를 첨가한 용액을 100 μ l씩 가한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시켰다. 빙냉의 0.3 N NaOH 용액 50 μ l를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Alkaline phosphatase activity}(\rho\text{-nitrophenol } \mu\text{mol/5} \\ & \quad \times 105 \text{ lymphocytes/60 mins}) \\ & = 1.15 \times \text{O.D. at 405 nm} \end{aligned}$$

총 복강 세포 수에 미치는 영향: 7주령의 ICR 음성 마우스를 대조군과 실험군으로 나눈 후 추출물 투여는 3일간 연속으로 50 mg/kg body weight의 농도로 복강 내에 투여하였으며, 대조군은 PBS buffer를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 24시간 후 경추탈골법에 의해 마우스를 치사시키고 10 ml의 PBS buffer로 복강 내를 잘 씻어준 다음 복강 세포를 복수와 함께 취하였다. Turk's solution으로 염색한 후 혈구계수기로 총 복강 세포 수를 측정하였다.

혈 중 백혈구 수와 체중, 장기의 중량에 미치는 영향: 7주령의 ICR 음성 마우스를 대조군과 실험군으로 나누고 추출물 투여는 10일간 연속으로 복강 내에 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 투여하였으며, 대조군은 PBS buffer를 투여하였다. 전 동물에 대하여 투여 개시일로부터 1일 1회 전자저울로 체중을 측정하였고, 추출물 투여 최종일로부터 2일 후에도 상대장기중량의 계산을 위해 부검 직전의 체중을 측정하였다. 추출물 투여 최종일로부터 2일 후 EDTA 용기에 혈액을 채취하여 잘 섞은 다음 Turk's solution으로 염색하고 혈구계수기를 이용하여 백혈구 수를 측정하였다. 또한, 간, 비장 및 흉선을 적출하여 중량을 측정하였고 상대장기 중량은 장기의 중량을 부검 전 체중으로 나누어 백분비로 산출하였다.

혈액생화학적 검사: 7주령의 ICR 음성 마우스를 각 군 당 5마리씩으로 나누고 추출물 투여는 10일간 연속으로 복강 내에 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 투여하였으며, 대조군은 PBS buffer를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 2일 후 심장에서 채혈하여 혈액생화학적 검사에 사용하였다.

혈액을 원심분리관에 채집하여 상온에서 15~30분 동안 방치한 후, 500×g에서 10분 동안 원심분리함으로써 얻은 혈청으로 alanine aminotransferase(ALT), aspartate amino-

transferase(AST), 혈당, 총단백, blood urea nitrogen(BUN), creatinine, bilirubin을 혈액화학검사 자동분석장치(Hitachi 7150)로 분석하였다.

항암 성분의 화학적 분석

총 다당류의 함량 측정: Herbert 등(1971)의 방법에 따라 anthrone test를 실시하여 정량하였다. 표준당으로 fructose, galactose, glucose, mannose, ribose 및 xylose의 혼합당을 사용하였으며, anthrone 반응을 실시한 후, 625 nm에서 흡광도를 측정하여 추출물 중 총 다당류를 정량하였다.

총 단백질의 함량 측정: Bradford의 방법(1976)에 준하였고 bovine serum albumin을 표준으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량선으로부터 추출물 중 총 단백질 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

조다당의 추출 및 분리

저령의 균핵 1 kg을 80% methanol에 침지시켜 Fr. MeOH 89.23 g을 얻었으며, 회수한 균핵으로부터 0.9% NaCl 용액을 이용하여 Fr. NaCl 15.26 g을 얻었다. 중성 염용액 추출 후 남은 균핵을 열수 추출하여 Fr. HW 20.92 g을 얻었다.

항암효과

암세포에 대한 세포독성: 저령 균핵 유래의 중성염용액, 열수 및 메탄올 추출물의 암세포에 대한 직접적인 독성 효과를 보기 위하여 정상세포인 마우스 섬유아세포 NIH3T3와 복수암세포인 Sarcoma 180, 유방암세포인 MCF-7을 배양하여 10, 100, 1000 및 2000 µg/ml의 농도 범위에서 세포의 생존율을 관찰하였다. 메탄올 추출물만이 1000 µg/ml 이상의 농도에서 NIH3T3, Sarcoma 180 및 MCF-7에 대해 모두 50% 이하의 생존율을 나타내었다(Fig. 2).

Kim 등(2001)은 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)로부터 메탄올을 이용해서 추출한 성분이 여러 암세포에 대해 직접적인 세포독성을 나타내는 것을 보고하였다. 본 실험에서도 저령 균핵의 메탄올 추출물이 NIH3T3, Sarcoma 180 및 MCF-7에 직접적인 독성을 나타낸 것은 추출 과정의 첫 단계였던 메탄올 침지 과정에서 독성을 갖는 물질이 비섯으로부터 추출되었기 때문으로 사료된다.

Sarcoma 180에 대한 항암 실험: 저령 균핵의 중성염용액, 열수 및 메탄올 추출물이 생체에서 마우스 복수암 세포인 Sarcoma 180에 미치는 효과를 분석한 결과, 대조군의 평균 생존 일수는 21±0.65일이었으며 중성염용액 추출물과 메탄올 추출물을 투여한 실험군의 평균 생존 일수는 약 35일로 66.7%의 생명 연장 효과를 나타내었다

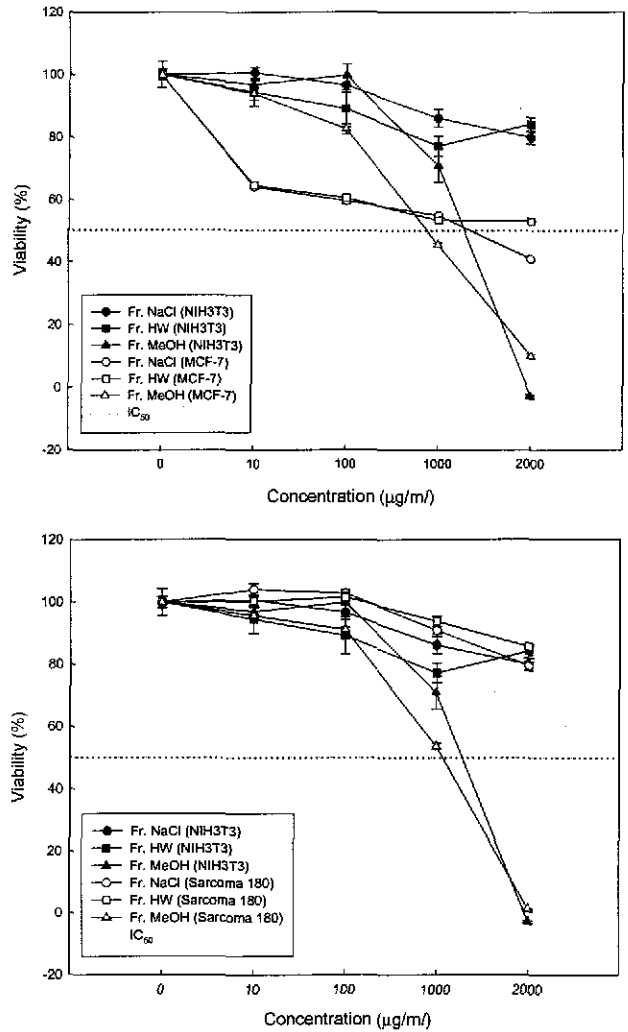


Fig. 2. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from sclerotium of *Grifola umbellata* against (A) NIH3T3 and MCF-7, and (B) NIH3T3 and Sarcoma 180. Cytotoxicity was measured after 48 hours of incubation. Concentration of cells was 2x10⁴ cells/well. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. IC₅₀ means 50% inhibition concentration.

(Table 1). 또한 복수와 함께 Sarcoma 180을 취하여 생 세포 수를 측정한 결과, 중성염용액 추출물은 대조군에 비해 54.2%의 높은 억제율을 나타내었다(Table 2). 메탄올 추출물의 경우에는 50% 이상의 높은 생명 연장 효과를 보였으나, 이는 앞서 시행하였던 실험관 내의 세포독성 실험에서 정상세포인 NIH3T3에 대해서도 독성을 나타내었으므로 이후의 실험에서는 제외하였다. 따라서, 암세포에 대한 직접적인 독성은 나타내지 않았으나 마우스 생체에서 높은 암 성장 억제를 보인 저령 균핵의 중성염용액 추출물이 체내의 면역 체계를 증강시켜 암세포의 성장을 억제시켰을 것으로 판단되어 이 추출물을 대상으로

Table 1. Effect of crude extracts from sclerotium of *Grifola umbellata* on the life span of ICR mice inoculated with Sarcoma 180 by i.p. injection^a

Group ^b	Dose (mg/kg body weight)	Survival days ^c	ILS (%) ^d
Control	0	21±0.65	—
Fr. NaCl	20	35±2.14	66.7
Fr. HW	20	27±2.76	28.6
Fr. MeOH	20	35±3.87	66.7

^ai.p. injection; intraperitoneal injection.

^bFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water, Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol.

Each experimental group consisted of 5 mice.

^cSurvival days of each animal in experimental group were counted individually and the mean survival days (M±S.E.: mean±standard error) of each group were calculated.

^dILS; Increase of life span.

Table 2. Antitumor effect of crude extracts from sclerotium of *Grifola umbellata* on Sarcoma 180 ascites tumor in the ICR mice (i.p. injection^a)

Group ^b	Dose (mg/kg body weight)	No. of Sarcoma 180 cells recovered (×10 ⁶)	Inhibition rate (%) ^c
Control	0	87.0	—
Fr. NaCl	20	40.4	54.2
Fr. HW	20	65.1	25.4
Fr. MeOH	20	56.8	35.1

^ai.p. injection; intraperitoneal injection.

^bFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water, Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol.

Each experimental group consisted of 5 mice.

^cInhibition rate (%) = (Nc - NFr.) / Nc × 100.

Where Nc is mean of the number of Sarcoma 180 cell in the control mice and NFr. is mean of the number of Sarcoma 180 cell in the test mice.

면역 활성 효과에 대한 실험을 수행하였다.

면역 활성 효과

보체 대체 경로의 활성화에 대한 작용: 보체 대체 경로의 활성화에 대한 저령 균핵의 중성염용액 추출물의 영향을 검토한 결과, 1000 µg/ml 농도에서는 양성 대조군인 zymosan A의 87.25%와 비교하여 중성염용액 추출물은 88.11%로 비슷한 효과를 나타내었다(Fig. 3).

저령 균핵의 중성염용액 추출물이 항보체 활성 효과를 나타내는 것은 이 물질이 C3의 활성화를 주축으로 하는 alternative complement pathway를 활성화시키는 것으로 볼 수 있으며, 숙주의 macrophage, lymphocyte의 활성화 등과 관련된 면역력을 증강시킬 수 있을 것으로 생각된다.

마우스 B 임파구 활성화에 미치는 영향: B 임파구의 활성 시 분비되는 alkaline phosphatase의 양을 측정된 결과, 저령 균핵의 중성염용액 추출물이 50~500 µg/ml의 각

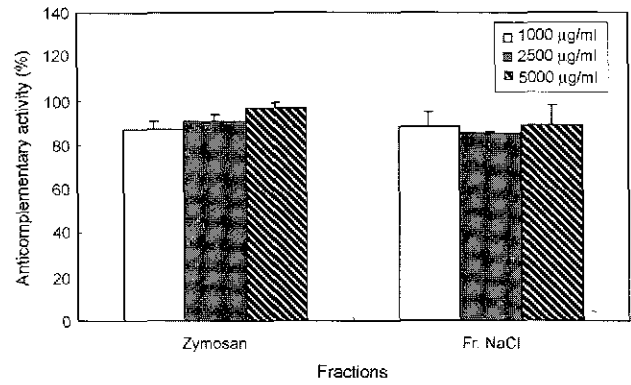


Fig. 3. Anticomplementary activity of fraction extracted from sclerotium of *Grifola umbellata* on the alternative pathway. Anticomplementary activity was presented as inhibition of 50% complement hemolysis by Adachi's method. Zymosan, a known immuno-active polysaccharide was used as a positive control.

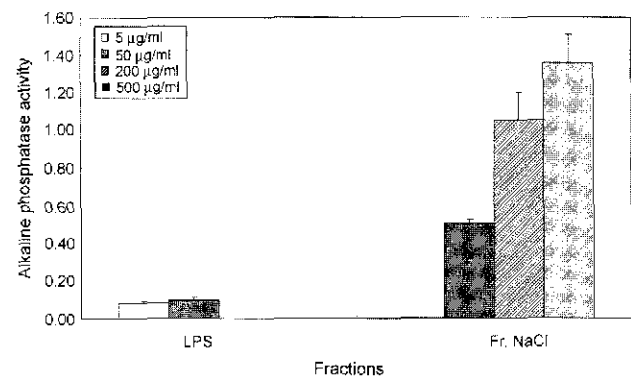


Fig. 4. Effect of fractions extracted from sclerotium of *Grifola umbellata* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Alkaline phosphatase activity (ρ -nitrophenol µmol/5×10⁵ lymphocytes/60 mins) = 1.15× O. D. at 405 nm. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111 : B and was used in positive control.

농도에서 대조군에 비해 상당한 증가를 보였다. 50 µg/ml 농도에서 비교한 결과, 양성 대조군으로 사용한 *Escherichia coli* 0111 : B의 LPS 보다는 중성염용액 추출물이 6배의 alkaline phosphatase 활성을 보였다(Fig. 4). 이 결과로 보아 중성염용액 추출물은 B 임파구의 분화 단계에도 관여함을 알 수 있었다.

Ohno 등(1986)은 B cell mitogen에 의해 직접적으로 자극 받거나, T cell mitogen에 의한 lymphokines에 의해 간접적으로 자극 받음으로써 B lymphocyte blast가 형성되는 경우에 alkaline phosphatase가 활성화된다고 보고하였으며, Kasyapa 등(1992), Garcia-Rozas 등(1982)도 B cell의 증식 과정에서 alkaline phosphatase의 활성이 향상된다고 보고하였다. 김 등(1996)은 *Lentinula edodes*와

Table 3. Effect of Fr. NaCl extracted from sclerotium of *Grifola umbellata* on the number of peritoneal exudate cells and circulating leucocytes in ICR mice

Treatment	Dose (mg/kg body weight)	No. of mice	No. of peritoneal exudate cells ($\times 10^3/ml$)	No. of leucocytes ($\times 10^3/ml$)
Control	-	5	4.99 \pm 0.28 ^b	2.78 \pm 0.11
Fr. NaCl ^a	20	5	NE ^c	5.56 \pm 0.80
Fr. NaCl	50	5	8.68 \pm 0.35	9.97 \pm 0.67

^aFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution.

^bMean \pm S.E.; mean \pm standard error.

^cNot examined.

*Ganoderma lucidum*의 원형질 융합체 P22를 배양한 균사체로부터 열수 추출하여 얻은 분획을 대조군과 비교하였을 때 alkaline phosphatase의 활성을 1.6배 촉진시켰다고 보고하였는데 본 연구에서 저령 균핵의 중성염용액 추출물은 이와 같은 조건에서 전자보다 3.8배 높은 alkaline phosphatase의 활성을 나타내었다.

총 복강 세포 및 혈 중 백혈구 수에 미치는 영향: 저령 균핵의 중성염용액 추출물을 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 후 복강 세포 수를 측정한 결과, 대조군의 복강 세포 수, 4.99×10^5 cells/ml에 비해 중성염용액 추출물을 투여한 균의 복강 세포 수는 8.68×10^5 cells/ml로서 73.95% 증가하였다. 또한 저령 균핵의 중성염용액 추출물이 혈액 내의 백혈구 수에 미치는 영향을 알아본 결과, 20, 50 mg/kg body weight로 투여한 경우, 대조군의 2.78×10^3 cells/ml에 비하여 각각 2배, 3.6배 증가하였다 (Table 3).

복강 세포 중 polymorphonuclear leukocytes(PMN)와 macrophage는 생체 내에 염증이 생기면 직접 염증이 있는 부위로 이동하여 식균 작용을 하는 세포이며 항원을 인지해서 T 및 B cell과 반응함으로써 체액성 및 세포성 면역을 나타내는데 주 역할을 한다(Gross *et al.*, 1980). 따라서 복강 세포 수의 증가는 이를 구성하고 있는 세포 수의 증가 및 이들의 기능인 면역능의 증대를 의미하는 것으로 알려져 있다.

백혈구는 체내 혈액을 구성하는 주요 성분으로 체내에 침입한 세균들에 대해서 식작용을 담당함으로써 생체를 보호해 주는 역할을 하고, 호중구는 생체의 염증 반응 즉 leukocytosis에도 관여한다. 또한 면역체의 형성 등으로 생체를 감염으로부터 방어하여 면역 반응에 관여하는 1차적 작동세포로서 중요한 기능을 수행하고 있다(Arthur and Guyton, 1986). 따라서 이러한 백혈구 수의 증가는 면역기능 증가의 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

체중 및 장기 중량: 저령 균핵의 중성염용액 추출물의 투여가 마우스의 체중 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 대조군에 비하여 중성염용액 추출물을 투여한 경우, 추출물 투여 2일째에 체중의 급격한 감소를 보였으나, 3일째

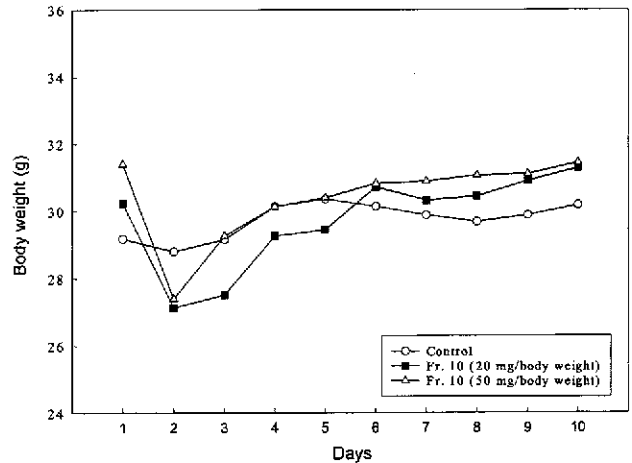


Fig. 5. Changes of body weight of ICR mice treated with Fr. NaCl extracted from sclerotium of *Grifola umbellata*.

Table 4. Effect of Fr. NaCl extracted from sclerotium of *Grifola umbellata* on the body and immunoorgan weights of ICR mice

Dose (mg/kg body weight)	Treatment		
	Control	Fr. NaCl ^a	Fr. NaCl
No. of mice	5	5	5
Body weight (g)	30.96 \pm 0.38 ^b	31.52 \pm 0.99	31.98 \pm 0.16
Liver weight (g)	1.67 \pm 0.06	1.94 \pm 0.16	2.28 \pm 0.04
Liver/Body (%)	5.39 \pm 0.24	6.12 \pm 0.32	7.12 \pm 0.12
Spleen weight (g)	0.08 \pm 0.00	0.24 \pm 0.02	0.41 \pm 0.05
Spleen/Body (%)	0.25 \pm 0.02	0.76 \pm 0.05	1.30 \pm 0.14
Thymus weight (g)	0.02 \pm 0.00	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
Thymus/Body (%)	0.08 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02

^aFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution.

^bMean \pm S.E.; mean \pm standard error.

부터 서서히 증가하였다. 그러나 체중 증가율은 대조군과 비교하였을 때 유의성 있는 변화는 없었다(Fig. 5).

또한 면역 관련 장기의 체중에 대한 중량을 측정한 결과, 중성염용액 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여하였을 때, 간과 비장, 흉선의 중량비는 대조군의 경우 각각 5.39%, 0.25%, 0.08% 인데 비하여 각각 7.12%, 1.30%, 0.19%로서 상당한 증가를 보였다(Table 4).

간에는 Kuffer cell을, 비장에는 splenic macrophage를 함유하고 있으며, 이들이 체내의 이물질에 대한 방어 작용을 담당하고 있다는 사실을 감안할 때, 간과 비장의 중량 증가는 macrophage 기능의 증가에 기인된 것으로 사료된다. 또한, 흉선은 일종의 내분비기관으로 thymus polypeptide를 혈액으로 방출시켜 임파구 분화 직전 및 직후에 작용할 뿐만 아니라 세포 분화 장소로서 미성숙 세포를 수질에서 성숙시켜 방출함으로써 면역계에 작용한다고 알려져 있다.

Table 5. Hematobiological analysis in ICR mice administered with Fr. NaCl extracted from sclerotium of *Grifola umbellata*

	Treatment		
	Control	Fr. NaCl ^a	Fr. NaCl
Dose (mg/kg body weight)	-	20	50
No. of mice	5	5	5
AST ^b (U/l)	51.77±6.44 ^e	40.21±5.53	31.07±4.43
ALT ^c (U/l)	34.38±3.68	33.10±2.89	25.40±3.67
Total protein (g/dl)	5.66±0.12	6.20±0.18	6.36±0.35
Total bilirubin (mg/dl)	0.32±0.04	0.56±0.10	0.44±0.12
Glucose (mg/dl)	182.50±17.72	173.00±12.36	159.80±6.17
BUN ^d (mg/dl)	26.30±1.28	25.74±1.52	22.34±0.56
Creatinine (mg/dl)	0.22±0.02	0.22±0.02	0.20±0.00

^aFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution.

^bAST; aspartate aminotransferase.

^cALT; alanine aminotransferase.

^dBUN; blood urea nitrogen.

^eMean±S.E.; mean±standard error.

혈액생화학적 검사: 혈청 중의 aspartate aminotransferase(AST)는 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으며, alanine aminotransferase(ALT)는 대조군과 저령 균핵의 중성염용액 추출물의 투여군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 혈액 중의 단백질 함량의 변화는 대조군의 5.66 g/dl에서 추출물 투여군에서는 6.20~6.36 g/dl의 범위로 다소 증가하는 경향을 나타내고 있으며, bilirubin, glucose는 대조군과 추출물의 투여군에서 별 차이를 나타내지 않았다. 또한 신장 장애의 지표로 이용되는 blood urea nitrogen(BUN)과 creatinine 수치 역시 대조군과 유사하였다(Table 5).

AST, ALT는 간에서 만들어지며 간의 정상 대사에 필요한 효소이나 어떤 원인이든 간에 손상 받으면 간세포가 분해 되면서 이 효소가 혈액으로 유리되어 정상 상태보다 많이 증가하게 되므로 이 수치를 이용하여 간의 손상 정도를 간접적으로 알 수 있다. 또한, 혈청 내 단백질 농도의 급격한 변동은 체내의 단백질의 정상적인 합성과 평형 상태에 이상이 있음을 나타내는 또 다른 지표로 알려져 있다. 따라서, 본 실험에서 저령 균핵의 중성염용액 추출물의 투여군은 외관상 어떠한 이상도 보이지 않았으며, 마우스의 생체 항상성 유지에 어떤 이상 반응도 나타내지 않고 있음을 확인할 수 있었다.

항암 성분의 화학적 분석

저령 균핵의 중성염용액 추출물의 총 다당류와 단백질의 함량을 알아본 결과, 각각 98.25%와 1.44%이었다(Table 6). 본 추출물의 다당체를 구성하는 다당류의 성분을 thin layer chromatography(TLC)로 분석한 결과, 대부분이 glucose로 구성되어 있었으며 소량의 galactose도 함

Table 6. Polysaccharide and protein contents of Fr. NaCl extracted from sclerotium of *Grifola umbellata*

Fraction	Polysaccharide ^b	Protein ^c
Fr. NaCl ^a	98.25±0.03 ^d	1.44±0.26

^aFr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution.

^bTotal polysaccharide contents were quantitatively determined by anthrone reaction and expressed as the weight percentage.

^cTotal protein contents were quantitatively determined by Bradford reaction and expressed as the weight percentage.

^dMean±S.E.; mean±standard error.

유하고 있음을 확인하였다(미발표 자료).

적 요

저령의 균핵으로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올 추출물을 분리하였다. 세포독성 실험 결과, 중성염용액 추출물은 0~2,000 µg/ml의 농도에서 NIH3T3, Sarcoma 180 및 MCF-7에 대한 세포독성이 없었으나, 메탄올 추출물에서는 1,000 µg/ml 이상의 농도에서는 독성을 나타내었다. Sarcoma 180 복수암에 대한 항암 효과는 중성염용액 추출물을 투여한 실험군에서 66.74%의 높은 생명 연장 효과를 나타내었으며, 암세포의 생 세포 수 또한 54.2% 감소시키는 효과를 나타내었다. 중성염용액 추출물은 대조군에 비해 보체 대체 경로에서의 항보체 활성을 85.05~88.73%, B 임파구의 alkaline phosphatase 활성을 6배 이상 증가시킴으로써 면역 활성 효과를 향상시켰다. 또한 중성염용액 추출물을 50 mg/kg body weight의 농도로 마우스 복강에 투여하였을 때 대조군에 비하여 복강세포수가 1.7배 증가하였으며, 혈액 내 백혈구 수 또한 3.6배의 증가를 나타내었다. 간, 비장 및 흉선 등의 면역 관련 장기의 체중에 대한 증량을 측정된 결과, 중성염용액 추출물 투여군은 대조군에 비해 증가된 수치를 보였으며, 혈액생화학적 검사를 시행한 결과, 대조군과 유사한 경향을 나타내었다. 중성염용액 추출물의 총 다당류와 단백질의 함량은 각각 98.25%와 1.44%로 추정되었다. 따라서 저령 균핵의 중성염용액 추출물의 항암 효과가 암세포에 대한 직접적인 세포독성에 의한 것이 아니고 면역활성에 의한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학재단이 지원하는 특수소재은행인 “야생 미생균주은행”을 통해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

김병각, 문철, 김채균, 윤종명, 심미자, 김하원, 최용철. 1996. 원

- 형질체 융합 및 핵전이에 의한 새로운 담자균류의 개발에 관한 연구(II)-융합균사체의 항암성분이 생쥐의 면역세포에 미치는 영향. *생약학회지* 27(3): 231-237.
- 박완희, 이호득. 1999. 한국 약용버섯 도감. 교학사. pp. 504-505.
- 심성미, 임경환, 이우윤, 김정완, 심미자, 이민웅, 이태수. 2003. 매미눈꽃동충하초(*Paecilomyces sinclairii*)로부터 추출한 조다당류의 면역 활성화와 항암 효과에 관한 연구. *한국균학회지* 31(3): 155-160.
- 심성미, 임경환, 김정완, 이우윤, 김하원, 이민웅, 이태수. 2003. 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)에서 추출한 조다당류의 면역 활성화 및 항암 효과. *한국균학회지* 31(3): 161-167.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I)-중성염 용액 추출 다당류의 특성. *한국균학회지* 23(4): 332-339.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(II)-열수추출 다당류의 분리 및 특성. *한국균학회지* 23(4): 340-347.
- 한정, 이인선. 2000. 까치버섯(*Polyozellus multiplex*) 추출물의 항산화 및 항암 효과. *한국균학회지* 28(1):55-59.
- 水野 卓, 川合正允. 1992.キノコの化学・生物学. 学会出版センタ. pp. 372.
- Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T. 1990. Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked (1→3)- β -D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.* 38: 988-992.
- Arthur, C. and Guyton, M. D. 1986. Textbook of medical physiology. 7th Ed. W. B. Saunders Company. 51-59.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 17: 222(194): 687-688.
- Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277.
- Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Ishida, N. 1978. Isolation and characterization of new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibio.* 31: 1079-1090.
- Garcia-Rozas, C., Plaza, A., Diaz-Espada, F., Kreisler, M. and Martinez-Alonso, C. 1982. Alkaline phosphatase activity as a membrane marker for activated B cells. *J. Immunol.* 129(1): 52-55.
- Gross, R. L. and Newberne, P. M. 1980. Role of nutrition in immunologic function. *Physiol. Rev.* 60(1): 188-302.
- Herbert, D., Phipps, P. J. and Strange, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells, *In Methods in Microbiology*. Academic Press Inc., N. Y. Vol. 5B, 265-301.
- Kasyapa, C. S. and Ramanadham, M. 1992. Alkaline phosphatase activity is expressed only in B lymphocytes committed to proliferation. *Immunol Lett.* 31(2): 111-116.
- Kim, B. K., Chung, H. S., Chung, K. S. and Yang, M. S. 1980. Studies on the antineoplastic components of Korean Basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* 8(2): 107-113.
- Kim, H. W., Lindequist, U. and Kim, Y. H. 2001. Isolation of antitumor compounds from *Paecilomyces tenuipes* and induction of apoptosis on human cancer cell lines. *Proceedings of the fifth Korea-China joint symposium for mycology* 13: 184-198.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K. and Saito, G. 1969. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann.* 60(2): 137-144.
- Ohno, N., Arai, Y., Suzuki, I. and Yadomae, T. 1986. Induction of alkaline phosphatase activity in murine spleen cells treated with various mitogens. *J. Pharmacobio-Dyn.* 9: 593-599.
- Roland, J. F., Chmielewicz, Z. F., Weiner, B. A., Gross, A. M., Boenong, O. P., Luck, J. V., Bardos, T. J., Rerly, H. C., Sugiura, K., Stock, C. C., Lucas, E. H., Byerrum, R. U. and Stevens, J. A. 1960. Calvacine, a new antitumor agent. *Science* 132: 1987.
- Tsugagoshi, 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. *Gann.* 65: 557.