

## 저령의 암세포증식 억제효능

### - 연구노트 -

신유진<sup>1</sup> · 김봉선<sup>1</sup> · 서용준<sup>1</sup> · 조덕제<sup>1</sup> · 최원일<sup>2</sup> · 이용규<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>동서대학교 식품생명공학과

<sup>2</sup>대우약품(주)

### Activity of the Extracts from *Polyporus umbellatus* as a Apoptosis Inducer

Yu-Jin Shin<sup>1</sup>, Bong-Sun Kim<sup>1</sup>, Yong-Jun Suh<sup>1</sup>, Duck-Jae Cho<sup>1</sup>,  
Won-Eil Choi<sup>2</sup> and Yong-Kyu Lee<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Biotechnology, Dongseo University, Busan 617-716, Korea

<sup>2</sup>Daewoo Pharm. Co. Ltd., Busan 604-848, Korea

#### Abstract

The effect of gradient eluted fractions from Et<sub>2</sub>O extracts of *Polyporus umbellatus* sclerotium was investigated on the viability of leukemia cell lines, K-562, L-1210, HL-60 and U-937 cells. Among those fractions, fraction 2 showed mild cytotoxic effect on L-1210 and HL-60 cells. Fraction 3 showed cytotoxic effect on 4 cell lines, and cytotoxic effect was the most potent on L-1210. The hallmark of apoptosis, DNA fragmentation, also appeared by fraction 3 on L-1210 after 48 hr treatment. Furthermore, this fraction was shown to be able to induce cell death on L-1210 cells by the inhibition of DNA synthesis in [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation test. From these results, *P. umbellatus* involves a potent chemical component that inhibits the viability of leukemia cell lines, L-1210. Further studies about the components of fraction 3 to function as a apoptosis inducer are necessary.

**Key words:** *Polyporus umbellatus* sclerotium, leukemia cells, cytotoxicity, DNA fragmentation, [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation

#### 서 론

천연약물 “chorei”는 *Polyporus umbellatus*(저령버섯 이하 저령)의 전조된 열매로부터 제조되며, 이 약물은 이뇨제, 종양치료, 신장질환 등에 사용되어진다. 알려진 실험 결과에 의하면, 저령의 구성성분은 ergosterol, 2-hydroxytetracosanic acid, glucan, biotin 등으로 보고되었다(1,2). 저령의 물추출물은 sarcoma-180으로 유발한 간 종양을 억제하고(3), mouse에 이식한 종양의 성장을 저지한다고 보고되었다(4). 또한 저령추출물이 mouse에서 손상된 백혈구를 회복시키는 작용이 있다는 보고도 있다(5). 저령의 항종양효능 이외에 알려진 작용으로는 머리카락의 성장을 촉진한다고 보고되었다(6,7). 이와 같이 알려진 저령의 항종양효능은 저령다당체에 기인한다는 보고들이 있다. 저령다당체는 간세포에 항암활성을 나타내고 있으며(8-11), 면역반응에도 관여한다고 보고되었다(12,13). 한편 저령추출물이 위암세포 SUN-668에 대하여 세포증식을 억제하였고, 위 케양 원인균에 대한 항균효과가 보고되기도 하였다(14). 이러한 몇몇의 암세포증식억제(항암)작용에 대한 보고가 있었지만 백혈병 세포에 대한 저령의

효능에 관한 연구는 전혀 이루어지지 않았다. 또한 이를 암세포증식억제(항암)작용이 세포사멸(apoptosis)에 유래하는지 혹은 세포괴사(necrosis)에 유래하는가에 대한 연구도 이루어지지 않았다. 그러므로 본 연구는 항암효능을 나타내는 저령의 성분에 대하여 체계적인 연구를 백혈병 세포에 대한 세포증식 억제능으로 증명한 후, 나아가서 이러한 작용이 세포사멸(apoptosis)에 의함을 제시하고자 아래와 같이 시행하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 실험에 사용된 저령의 균핵은 부산의 영인 약품에서 구입하였다. Silica Gel 60(Merck), silica gel 60 F254(Merck), dichloromethane(Merck), ethyl anhydrous(J.T. Baker), methyl alcohol(CARLO ERBA), hexane(KANTO Co.), villber lourmat(UV lamp, Mame La Vallee, France), RPMI(Hyclone), DMEM(Hyclone), 3-[4,5-dimethylthiazole-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma), agarose(Sigma), 1-

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

kb ladder(Bio-rad), [<sup>3</sup>H]thymidine(Amersham)을 사용하였으며, K-562, L-1210, HL-60 및 U-937 세포주는 한국 세포주 은행으로부터 구입하였다.

### 추출 및 분리

건조된 저령에 kg당 30% 에탄올 10 L를 가한 후, 60°C에서 12시간 3회 반복 추출하였다.

30% 에탄올 추출물을 물과 혼합한 후 에틸아세테이트 층으로 추출하였다. 에틸아세테이트 분획을 1 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>에 중화시킨 후, SiO<sub>2</sub> 크로마토그램 분석과 CHCl<sub>3</sub>-MeOH(1:0→0:1) elution에 의하여 분리하였다(Fig. 1).

### 세포 생존 시험

기본적으로 Mossman 방법(15)에 따라 시행하였다. 96 well plate의 각 well에 10<sup>5</sup> cell/100 μL를 분주하여 24시간 배양 후에 세포를 가라앉히고, 새로운 배지로 교환하였다. 각 농도의 저령추출물을 각각의 well에 10 μL 부피로 3쌍씩 넣었다. 48시간 배양한 후, 3-[4,5-dimethylthiazole-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 PBS에 5 mg/mL의 배양 후, 3분 동안 세포를 가라앉힌 후 배지를 제거하고, 100 μL 용액(DMSO : ethanol=1:1)을 각각의 well에 넣어준다. Plate를 감싸서 5분간 흔들어준 후에 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### DNA 분절현상 측정

1~5×10<sup>6</sup> cell에 각 농도의 저령 추출물을 넣어서 48시간 동안 배양한 후에 5,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 ice-PBS에 두 번 세척하였다. 이것을 부유시킨 세포에 300 μL degestional buffer(10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS)를 넣은 후, 50°C의 온도에서 12~18시간 동안 incubation하였다. DNA는 phenol/chloroform/isoamyl-alcohol(25:24:1, Sigma, USA)로 추출하였다. 추출 후에 침전물을 30 μL의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM

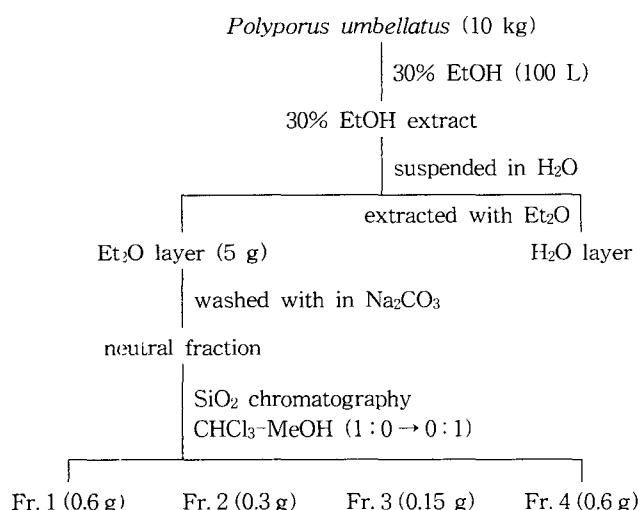


Fig. 1. Extraction scheme of *Polyporus umbellatus*.

EDTA)에 부유시켰다. 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.

### 세포증식 억제능 시험

저령추출물에 의한 세포증식 억제능을 실험하기 위하여, [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation test를 실시하였다. 96 well plate에 5×10<sup>6</sup> cells/mL의 L-1210 세포와 각 농도의 저령추출물을 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후에 각 well에 4 μCi의 [<sup>3</sup>H]thymidine(specific activity, 27 Ci/mmol) (Amersham, Braunschweig, Germany)을 넣어서 18시간 동안 배양하였다. Cell harvester(Skatronm Tranby, Norway)로 세포를 모은 후, 혼입된 방사성물질을 liquid scintillation counter로 측정한다(Beckman Instrumens, Inc., Fullerton, CA, USA).

### 결과 및 고찰

본 연구에서는 저령의 4개 분획의 세포생존 억제효능을 MTT assay에 의하여 측정하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 fr. 1과 fr. 4는 4개의 백혈구 세포종(K-562, L-1210, HL-60과 U-937)에 대하여 암세포 생존 억제효과를 나타내지 못하였다.

국제적인 기준에 의하여, IC<sub>50</sub> value(세포 성장을 50% 억제하는 약물 농도)는 230 μg/mL 이하일 때 항암 효과가 있다고 사료된다(16). 그러므로 fr. 2는 L-1210과 HL-60 세포에 대하여 미미한 세포생존 억제효과가 있었다. Fr. 3은 4종의 백혈암 세포종(K-562, L-1210, HL-60과 U-937)에 대하여 생존 억제효과가 있는 것으로 나타났다. Fr. 2와 fr. 3은 IC<sub>50</sub> value가 230 μg/mL보다 낮은 값이므로 항암효능이 있다고 사료된다. 이 효능은 L-1210 세포에서 가장 뚜렷이 나타났다. 저령의 분획들이 세포사멸효능(apoptosis)을 나타내는지를 판별 하기 위하여, 계획된 세포사멸 현상(programmed cell death)을 증명하는 생화학적 현상인 DNA분절 현상(17,18)을 관찰하였다. 이는 세포생존 억제효능 현상이 뚜렷한 L-1210 세포에 대하여 관찰하였다. 저령의 각 분획을 10 μg/mL, 50 μg/mL과 100 μg/mL로 처리하였을 때, DNA 분절현상은 fr. 3을 50 μg/mL과 100 μg/mL을 48시간 동안 처리한 시료에서 검출되었고, 다른 분획을 처리한 L-1210 세포에서는 DNA 분

Table 1. Cytotoxic effect of four fractions from *Polyporus umbellatus* on leukemia cell lines

Subfractions	IC <sub>50</sub> μg/mL (95% confidence limit)			
	K-562	L-1210	HL-60	U-937
Fr. 1	450	220	300	322
Fr. 2	260	108	132	270
Fr. 3	180	32	88	186
Fr. 4	420	380	320	290

Cells were incubated for 48 hrs with fractionated products.

절 현상은 관찰되지 않았다(Fig. 2). 그러므로, fr. 3이 L-1210 세포에 대하여 세포생존 억제효능을 나타낸 것은 계획된 세포사멸 효능(apoptosis)을 유도하는 작용에 의한 것으로 사료된다.

저령에 대하여 DNA합성능 저하에 의한 cell death 유발을 측정하기 위하여 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation test(19)를 시행하였다. Fr. 3은 50 µg/mL과 100 µg/mL로 처리한 L-1210 세포에서만 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation이 대조군 L-1210 세포보다 유의성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). 그외 다른 fr.들은 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation 억제를 나타내지 아니하였다. 그러므로 저령의 fr. 3은 백혈병 세포인 L-1210 세포에 대하여 DNA합성능을 저하시켜 cell death를 유발하는 것으로 사료된다.

결론적으로 저령에는 백혈병 세포인 L-1210과 HL-60의 세포생존 억제성분이 포함되어 있으며, 억제작용은 L-1210에 가장 뚜렷이 나타내었다. Fr. 3은 L-1210 세포에 대하여



Fig. 2. Effects of *P. umbellatus* on DNA fragmentation in L-1210 cell line.

Line 1. marker; 2. 10 µg/mL of fr. 1; 3. 50 µg/mL of fr. 1; 4. 100 µg/mL of fr. 1; 5. 10 µg/mL of fr. 2; 6. 50 µg/mL of fr. 2; 7. 100 µg/mL of fr. 2; 8. 10 µg/mL of fr. 3; 9. 50 µg/mL of fr. 3; 10. 100 µg/mL of fr. 3; 11. 10 µg/mL of fr. 4; 12. 50 µg/mL of fr. 4; 13. 100 µg/mL of fr. 4. Cells were incubated for 48 hrs.

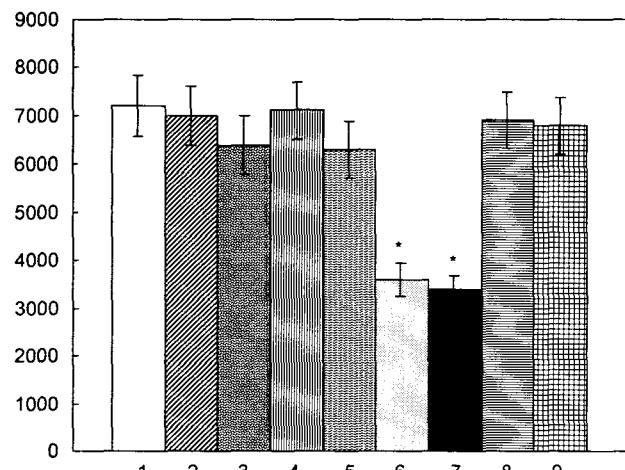


Fig. 3. [<sup>3</sup>H]Thymidine incorporation into L-1210 cell.  
1. control; 2. 2.50 µg/mL of fr. 1; 3. 100 µg/mL of fr. 1; 4. 50 µg/mL of fr. 2; 5. 100 µg/mL of fr. 2; 6. 50 µg/mL of fr. 3; 7. 100 µg/mL of fr. 3; 8. 50 µg/mL of fr. 4; 9. 100 µg/mL of fr. 4.  
Cells were treated for 48 hrs.

\*Significantly different from control value ( $p < 0.01$ ).

DNA합성능을 저해시켰고, L-1210 세포의 생존 억제작용을 나타내는 것은 계획된 세포사멸현상인 apoptosis를 유도하기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 fr. 3에 대한 성분 연구가 요구되어진다.

## 요 약

저령의 에틸아세테이트 추출물에서 4개의 분획을 제조한 후 백혈병 세포인 K-562, L-1210, HL-60와 U-937 세포의 세포생존 억제효능을 관찰하였다. Fr. 2는 L-1210, HL-60 세포 억제효능이 미비하였고, fr. 3은 4종의 백혈병 세포주에 대하여 세포생존 억제효능이 있었다. 이 효능은 L-1210 세포에 대하여 가장 강하게 나타났다. 세포사멸 작용을 증명하는 DNA분절 현상을 L-1210 세포에서 관찰하였을 때, fr. 3 을 30 µg/mL, 100 µg/mL로 처리한 군에서만 DNA분절 현상이 관찰되었다. Fr. 3에 대한 DNA합성 억제능을 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation test로 관찰하였을 때 50 µg/mL, 100 µg/mL로 처리한 군에서만 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation이 저해되었다. 결론적으로 저령에는 백혈병 세포인 L-1210과 HL-60의 세포생존 억제성분이 포함되어 있으며, 억제작용은 L-1210에 가장 뚜렷이 나타내었다. Fr. 3은 L-1210 세포에 대하여 DNA 합성능을 저해시켰고, fr. 3가 L-1210 세포에 대하여 세포생존 억제작용을 나타내는 것은 계획된 세포사멸현상인 apoptosis에 의한 것으로 사료된다. 따라서 fr. 3에 대한 성분 연구가 요구되어진다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부(과제번호: 01-PJ1-PG3-22000-00250)의 지원에 의함.

## 문 헌

- Wang DC, Lee PY, Wan YC. 1983. Some pharmacological actions of *Polyporus umbellatus*. *Chinese Herb Medicine (China)* 14: 267-268.
- Natural Products Research Institute. 1996. *Tradimed*. Seoul National University, Seoul.
- 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.
- Wei Q, Wu C, Nie, IC. 1983. Effect of *Polyporus umbellatus* polysaccharide on storage, enzyme activities in glyconeogenesis and glycogenolysis of liver in mice bearing hepatoma H22. *Acta Pharmacologica Sinica (China)* 4: 141-143.
- You JS, Chen DM, Song FC. 1990. Effect of *Polyporus umbellatus* on the leukocyte count in gamma ray-irradiated mice. *Natl Sci* 12: 293-298.
- 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 acerosyringone and polyporusterone A and B from *Polyporus*

- umbellatus* fries. *Biol Pharm Bull* 22: 1189-1192.
7. 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.
  8. Miyazaki T, Oikawa N, Yadomae T, Yamada H, Yamada Y. 1979. Relationship between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifola umbellata*. *Carbohydrate Res* 69: 165-170.
  9. 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 *Grifola umbellata*. *Carbohydrate Res* 101: 160-167.
  10. 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.
  11. Xiong LL. 1993. Therapeutic effect of combined therapy of *Salvia miltiorrhiza* and *Polyporus umbellatus* polysaccharide in the treatment of chronic hepatitis B. *Cheih Ho Tsa Chih* 13: 513-517.
  12. 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.
  13. Chang YF, Liu YY, Yun SC. 1991. Effect of *Polyporus umbellatus* polysaccharides on macrophages of liver damaged mice. *Integrerated J Chinese and Western Medicine (China)* 11: 225-226.
  14. Ha YD. 2001. Antitumoral, antioxidant and antimicroviral activities of solvent fractions from *Grifola umbellata*. *Korean J Postharvest Sci Technol* 8: 481-487.
  15. Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immuno Methods* 65: 55-63.
  16. Hay RJ, Park JG, Gazdar A. 1994. *Evaluation of physiological material*. Academic Press, San Diego. p 34-36.
  17. Steller H. 1995. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1448.
  18. 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.
  19. 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 10월 1일 접수; 2004년 6월 22일 채택)