

뽕나무버섯부치(*Armillaria tabescens*)의 자실체에서 추출한 조다당류의 생쥐 Sarcoma 180에 대한 항암 및 면역증강 효과

이건우 · 김혜영 · 이우윤 · 이태수*

인천대학교 생물학과

Antitumor and Immuno-modulatory Effect Against Mouse Sarcoma 180 of Crude Polysaccharides Extracted from Fruiting Body of *Armillaria tabescens*

Geon Woo Lee, Hye Young Kim, U-Youn Lee and Tae Soo Lee*

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

(Received December 14, 2007)

ABSTRACT: *Armillaria tabescens*, one of edible and medicinal mushrooms belonging to Agaricales of Basidiomycota, has been known to have outstanding curative effects on chronic hepatitis and cholecystitis and inhibitory effects on the sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma of mice. Neutral saline soluble (0.9% NaCl), hot water soluble and methanol soluble substances (hereinafter referred to Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH, respectively) were extracted from fruiting body of the mushroom. *In vitro* cytotoxicity tests showed that crude polysaccharides were not cytotoxic against cancer cell lines such as NIH3T3 and Sarcoma 180 at the concentration of 2000 µg/ml. Intra-peritoneal injection with crude polysaccharides exhibited life prolongation effect of 28.8~46.5% in mice inoculated with Sarcoma 180, respectively. Fr. NaCl improved the immunopotential activity of B lymphocyte by increasing the alkaline phosphatase activity by 1.8~2.1 folds, respectively. In case of Fr. NaCl, the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes were increased by 9 and 1.9 folds, respectively.

KEYWORD: Antitumor effect, *Armillaria tabescens*, Crude polysaccharides, Immuno-modulatory

뽕나무버섯부치(*Armillaria tabescens*)는 분류학적으로 주름버섯목(Agaricales), 송이과(Tricholomataceae), 뽕나무버섯속(*Armillaria*)에 속하는 버섯으로서 여름부터 초가을에 걸쳐 활엽수의 그루터기, 나무의 밑동에 속생하는 버섯이다. 이 버섯은 뽕나무버섯과는 형태적으로 매우 유사하나 대에 턱받이가 없는 것과 발생시기가 뽕나무버섯보다 이른 6월에 시작한다는 점에서 다르다. 갓은 지름 4~6로 초기에는 평반구형이나 후에 편평형이 되고, 갓 표면은 황갈색~담갈색이며, 중앙부에 가는 인편이 밀집되게 나있다. 주름살은 내린형이며 약간 뾰뾰하고, 초기에는 백색이나 후에 담갈색이 된다. 대는 길이가 5~8 × 0.6~1.6 cm로 섬유질이며, 상하의 굵기가 같으며 갓과 같은 색이다. 포자는 넓은 타원형으로 6~9 × 4~5.5 µm이며, 표면은 평활하고, 포자문은 백색이다(박과 이, 1991).

뽕나무버섯은 동의보감에 의하면 영양이 풍부하고 맛이 우수한 식·약용 버섯이다. 중국 연구자들의 실험결과에 의하면 이 버섯 자실체의 열수 추출물을 만성간염과 담낭염 환자에 투여한 결과 큰 치료효과가 있어서 이미 이 버

섯의 균사체 추출물을 이들 병의 치료에 이용하고 있으며 또한 이 버섯의 자실체에서 열수로 추출한 물질이 생쥐의 Sarcoma 180 암세포에 대해 저지력도 크고 대식세포의 수도 증가시키는 효과가 있다는 것도 밝혀져서 함암 보조제로서의 이용가능성이 제기되고 있다(Ying *et al.*, 1987). 박 등(1995)은 이 버섯 균사체의 추출물이 장티프스 원인균인 *Salmonella typhimurium*과 *S. typhi*의 성장을 저지하는 항생물질과 무좀균 원인균인 *Trichophyton mentagrophytes*의 균사 성장을 억제하는 항균물질도 함유하고 있는 것으로 보고한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 식·의약용 버섯인 뽕나무버섯부치의 자실체로부터 중성염용액(0.9%), 메탄올(80%) 및 열수를 이용하여 유효성분을 추출한 후 *in vitro*와 *in vivo*에서 생쥐의 면역증강과 항암효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서는 2004년 여름 동구릉에서 채집한 뽕나무버섯부치(*Armillaria tabescens*)의 자실체를 사용하였다.

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

수확한 신선한 자실체는 50°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시키고 분쇄한 후 -65°C의 저온냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다. 또한 뽕나무버섯의 균사체를 순수 분리하여 인천대학교 야생버섯균주은행에 기탁하였다(보관 번호 IUM 1173).

성분의 추출 및 분리

조 등(1995a, b)과 심 등(2003a)의 방법에 따라 중성염 용액 (0.9% NaCl), 80% 메탄올 및 열수로 추출하였으며, 추출한 물질은 각각 수율을 조사하였다.

세포독성 실험

실험에 사용한 정상세포는 마우스 대식세포 RAW 264.7 및 RAW 309 Cr.1, 암세포는 마우스 육종암세포 Sarcoma 180 이었다. 세포독성 실험은 Denizot and Lang (1986)의 방법에 따라 수행하였다. RAW 264.7 및 RAW 309 Cr.1 세포는 1×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate 에 100 μ l씩 주입한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2000 μ g/ml이 되도록 조정된 후 100 μ l씩 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 μ l를 각 well에 첨가한 후 4 시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan 이 생성되면 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μ l로 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sarcoma 180은 2×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 50 μ l씩 주입하고 각 추출물의 최종 농도를 10~2000 μ g/ml이 되도록 암세포에 처리하여 최종 용적이 100 μ l가 되도록 하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis(2-methoxyl-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) solution 당 25 μ M phenazine methosulfate가 포함된 용액을 well 당 30 μ l씩 처리하여 암 조건에서 2시간 배양한 후 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였다.

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

T : 실험군의 평균 흡광도

C : 대조군의 평균 흡광도

수명연장 실험

Sarcoma 180을 5×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켜 0.2 ml씩(1×10^6 cells/mouse) ICR 마우스의 복강에 이식하여 복수암을 유발시키고 Sarcoma 180을 이식한 24시간 후 부터 20 mg/kg body weight 농도의 추출물을 생리식염수에 용해시켜 0.22 μ m의 membrane filter로 여과시킨 후

각각의 추출물을 매일 1회 10일간 복강 내에 0.2 ml씩 투여하였다. 대조군에는 같은 기간, 동량의 생리식염수를 투여하였으며, Sarcoma 180 최종 투여 후 32일까지 관찰하여 평균 수명 일수를 계산하고 다음 식으로 increase of life span(ILS)을 계산하여 암세포의 성장 억제 효과를 평가하였다.

$$\text{ILS} = [(T - C)/C] \times 100$$

C : 대조군의 평균 수명(일)

T : 실험군의 평균 수명(일)

B : Blank

비장세포의 증식에 미치는 영향

20~25 g의 ICR 계열 웅성 마우스로부터 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망 위에서 분쇄하고 이 세포 부유액에 2배 부피의 lymphocyte separation medium을 첨가하여 원심분리 하였다. 단핵 세포층만 조심스럽게 취하여 3회 세척한 후 세포수가 2×10^5 cells/ml이 되도록 조정하여 96 well plate에 100 μ l씩 분주하였다. 50, 200, 500 μ g/ml 농도로 희석한 각각 추출물과 양성 대조군으로 5, 50 μ g/ml 농도의 lipopolysaccharide(LPS)를 100 μ l씩 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 다음 위의 MTT법과 동일한 방법으로 처리한 후 흡광도를 측정하였다(Mossman, 1983).

마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

Ohno *et al.*(1986)의 방법에 따라 분화된 B 임파구의 표면에 발현되는 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. 차가운 0.3 N NaOH 용액 50 μ l를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음 식에 따라 계산 하였다.

$$\begin{aligned} &\text{Alkaline phosphatase activity}(\rho\text{-nitrophenol } \mu\text{mol} \\ &\quad /1 \times 10^5 \text{ lymphocytes}/60 \text{ mins.}) \\ &= 1.15 \times \text{O. D. at } 405 \text{ nm} \end{aligned}$$

대식세포의 활성화에 미치는 영향

마우스 대식세포주인 RAW 264.7을 96 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 추출물의 최종 농도가 50,

100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 세포주에 첨가하였으며, 양성대조군으로 LPS를 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가하였다. 각 농도의 추출물을 첨가한 실험군과 양성 대조군은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 후, 10%가 되도록 FBS를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 상등액 100 μl 에 100 μl 의 Griess reagent(50 μl of 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 50 μl of 0.2% N-naphthylethylenediamine 2HCl)를 첨가하고, 10분간 실온에서 방치한 후 ELISA plate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide(NO)의 대사체인 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻은 표준곡선으로부터 계산하였다(Choi *et al.*, 1993).

Cytokine 분비에 미치는 영향

준비된 비장세포 1×10^7 을 여러 가지 추출물, 각각의 농도와 함께 24 well plate에서 37°C, 5% CO₂ 및 가습 조건으로 24시간 배양하였다. 이 배양액을 300 \times g에서 10분간, 10,000 \times g에서 30분간 원심 분리시킨 후, 그 상층액을 취하여 -70°C 냉동기에 보관하였고(Weir *et al.*, 1986), 분비된 cytokine(TNF- α)은 ELISA Complete Kit(Koma Biotech Inc, Korea)로 측정하였다. 비장 임파구 자극의 양성 대조군으로 T cell mitogen(ConA) 및 B cell mitogen(LPS)이 첨가 되었다.

총 백혈구 수에 미치는 영향 분석

6주령의 ICR 음성 마우스를 실험군과 대조군으로 나누어 3일간 연속으로 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 추출물을 복강 내에 투여하였고, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 24시간 후 마우스를 경추탈골시켜 10 ml의 PBS buffer(pH 7.2)로 복강 내를 세척한 다음 복강 세포를 채취하여 Turk's solution으로 염색한 후 혈구계수기를 이용하여 측정하였다.

혈 중 백혈구 수와 면역 장기의 중량에 미치는 영향 분석

6주령의 ICR 음성 마우스를 실험군과 대조군으로 나누어 10일간 연속으로 복강 내에 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 추출물을 투여하였으며, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 2일 후 심장체혈하여 혈액을 채취하여 Turk's solution으로 염색하여 혈구계수기로 백혈구 수를 측정하였다. 또한 간, 비장 및 흉선을 적출하여 중량을 측정하였고 상대장기 중량은 장기의 중량을 부검 전 체중으로 나누어 백분율로 산출하였다.

결과 및 고찰

성분의 추출 및 분리

3 종류의 추출방법에 따른 수득률은 80%의 메탄올에서

Table 1. Recovery rate of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens*

Fraction ^a	Weight of the used mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery rate ^b (%)
Fr. MeOH	400	94.52	23.6
Fr. NaCl	400	4.16	1.0
Fr. HW	400	10.49	2.6

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

^bRecovery rate (%) = [Weight of extract (g)/Weight of the used mushroom (g)] \times 100.

94.5 g이 추출되어 23.6%의 높은 수득률을 보였고, 중성 염에서는 4.2 g이 추출되어 가장 적은 1.0%의 수득률을 나타내었고, 열수에서는 10.5 g이 추출되어 2.6%의 수득률을 나타내었다(Table 1). 이 결과는 김 등(2006)이 뽕나무 버섯의 자실체로부터 메탄올 및 열수를 이용하여 추출한 조다당류의 수득률인 13.0%와 2.4%와 오 등(2004)이 저령의 균핵에서 메탄올로 추출한 조다당류 수득률인 9.8%와 중성염에서의 1.5%에 비해서는 많이 추출되었으나 심 등(2003b)의 매미눈꽃동충하초의 자실체에서 메탄올을 이용하여 추출한 30.6%에 비해서는 적은 양이었다. 따라서 버섯에 따라 이렇게 상반된 결과가 나타난 것은 용매의 종류에 따라 서로 다른 종류의 버섯으로부터 추출되는 조다당류의 양이 다르기 때문으로 사료된다.

평균 수명 연장효과

자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180 접종 생쥐에 주사하여 수명연장 효과를 분석한 결과, 3종류의 추출물이 각각 생쥐의 수명을 약 29~47% 연장시키는 효과가 있었다. 대조군의 평균 생존 일수는 15일이었으며, 메탄올

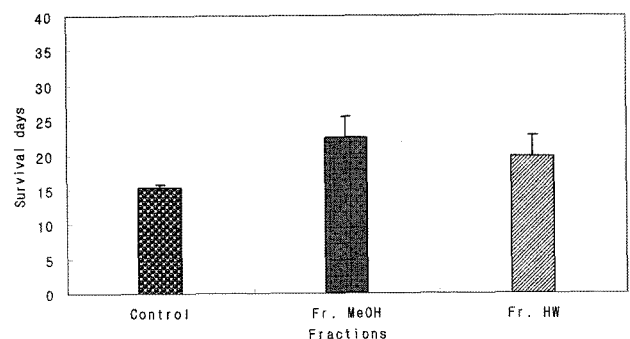


Fig. 1. Effect of crude polysaccharides^a extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* on the life span of ICR mice^b inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection^c). ^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water. ^bEach experimental group consisted of 10 mice. ^ci.p. injection intraperitoneal injection.

을 20 mg/kg body weight 투여한 실험군의 평균 생존일수는 22.4일로 나타나 수명 연장효과가 46.47%로 매우 높게 나타났다(Fig. 1). 심 등(2003a)은 매미눈꽃동충하초의 자실체로부터 중성염용액으로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종된 생쥐에 투여하여 조사한 결과 수명연장효과가 32.3%로 본 실험결과에 비해서는 낮게 나타났다. 그러나 삼색도장버섯의 중성염추출 조다당류를 투여한 실험에서는 수명이 77.4% 연장되어 뽕나무버섯부치에 비해서는 수명 연장효과가 약 30% 높게 나타났다(심 등, 2003b). 이외에도 흰목이로부터 중성염용액으로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180 접종 생쥐에 투여한 경우에도 수명 연장효과가 53%(오 등, 2006)로 나타나 여러 종류의 약용버섯에서 추출한 조다당류가 Sarcoma 180을 접종하면 생쥐의 수명이 대조군에 비해 32.3~77.4%의 범위에서 연장되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 약용버섯의 자실체로부터 추출한 조다당류를 투여하는 경우 암의 증식이 억제되어 수명의 연장효과가 나타나는 것으로 사료된다. 그러나 본 실험에서 중성염용액 추출물을 투여한 실험군에서는 투여한 지 15일 이내에 모든 실험군의 쥐가 털이 빠지면서 죽게 되어 수명이 연장되는 효과를 확인할 수 없었으나, 세포독성실험에서는 뽕나무버섯부치에서 추출한 조다당류가 고농도인 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 Sarcoma 180, RAW 264.7 및 RAW 309 Cr.1의 세포주에 대해 독성을 나타내지 않았다. 이와 같은 결과가 나타난 것은 중성염을 이용하여 뽕나무버섯부치로부터 조다당류를 추출하면 조다당류는 물론 생쥐에 치명적으로 작용하는 물질도 함께 추출되어 이를 생쥐에 투여할 경우 생쥐가 이들 물질에 의해 단기간에 죽는다고 사료된다. 따라서 앞으로 이에 대한 심층적인 연구가 필요하고 사료된다.

세포에 대한 특성효과

세포주 RAW 264.7, RAW 309 Cr.1 및 Sarcoma 180에 대하여 메탄올, 중성염 및 열수 등 3종류의 용매를 이용하여 뽕나무버섯부치의 자실체로부터 추출한 조다당류를 10~2000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 생쥐에 투여한 결과 가장 높은 농도인 2000 $\mu\text{g/ml}$ 에서도 각각의 세포주가 60~100% 내외의 생존율을 나타내어 뽕나무버섯부치 자실체의 조다당류는 이들 3종류의 세포주에 대해 독성이 매우 낮거나 없었다(Fig. 2). 이 실험결과는 다르게 심 등(2003a)의 매미눈꽃동충하초의 조다당류를 이용한 세포독성 실험에서는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 독성을 나타내지 않았으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 독성을 나타내었다. 그러나 삼색도장버섯(심 등, 2003b)과 흰목이(오 등, 2006)의 열수추출물 독성실험에서는 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도실험에서 실험세포주인 NIH3T3와 Sarcoma 180에 독성이 없었다.

비장세포의 증식에 미치는 영향

3종류의 뽕나무버섯부치 추출물에 대한 비장세포의 증

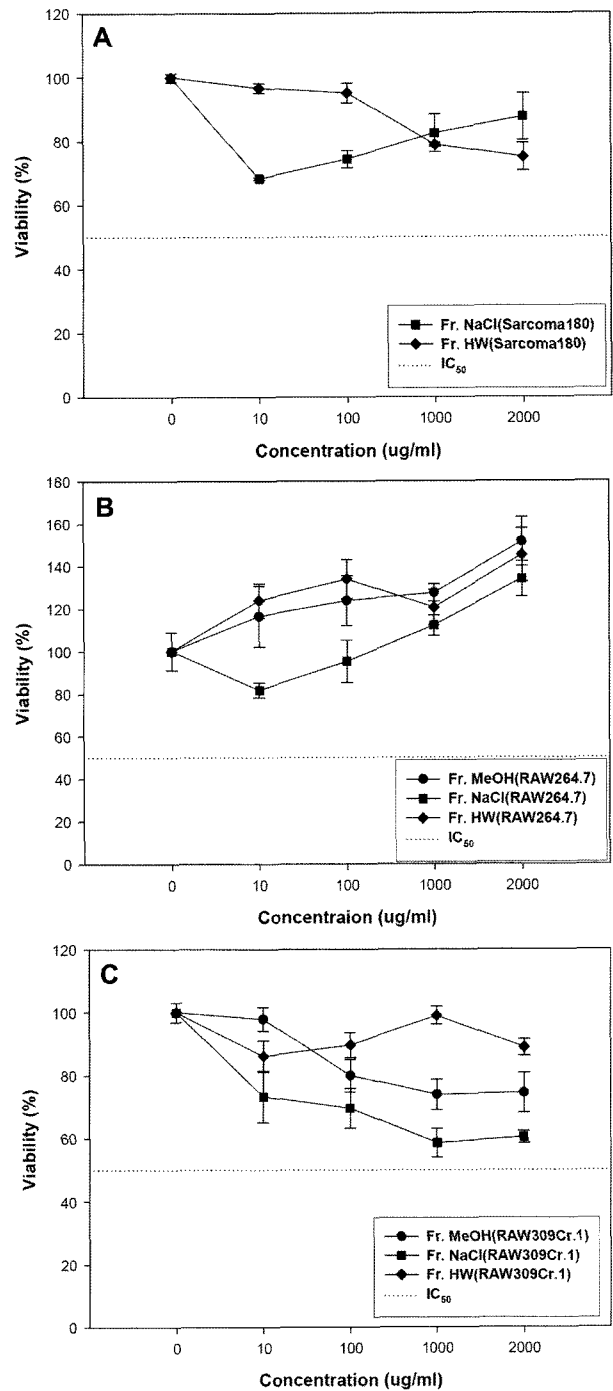


Fig. 2. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* against (A) Sarcoma 180, (B) RAW264.7, (C) RAW 309 Cr.1. Concentration of cells was 1×10^5 cells/well. The Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. The Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW was extracted with hot water. IC₅₀ means 50% inhibition concentration.

식에 대한 영향은 메탄올, 중성염용액 및 열수 추출물이 50~500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군보다 약 1.8~2.1배의 높은 증식능을 나타내었고 양성 대조군으로 사용된 LPS는

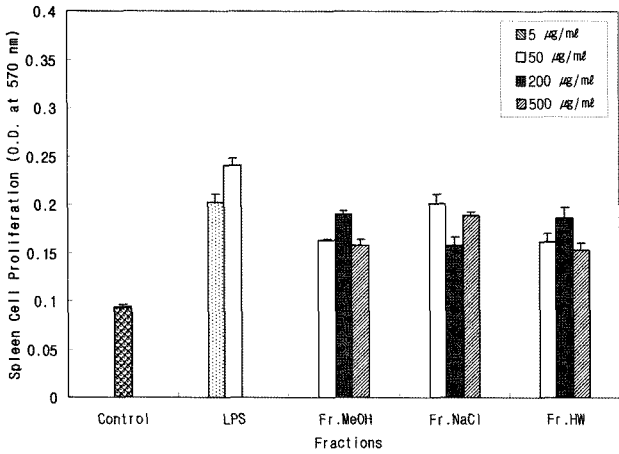


Fig. 3. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* on proliferation of murine spleen cells. Concentration of spleen cells was 2×10^5 cells/ml. Proliferation of murine spleen cells was measured after 48 hours of incubation by MTT method. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

50~200 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 약 2.4배의 증식능을 나타내었다(Fig. 3). 진(1996)은 잣버섯의 균사체에서 추출한 lepidan이 대조군에 비해 비장세포를 10배 이상 증식시켰으며 또한 비장세포내의 B 임파구의 증식을 촉진시켰다고 보고하였다. 따라서 생체 내에서 면역에 관여하는 면역세포와 항체를 생산하는 비장 세포의 증식 촉진은 면역의 증강을 위해서 매우 필요하다고 사료된다.

생쥐의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

Alkaline phosphatase는 B 임파구에서 분비되며 면역의 활성화에 영향을 미치는 효소이다. 뽕나무버섯부치의 자실체에서 중성염용액과 열수를 이용해 추출한 조다당류를 투여하여 alkaline phosphatase의 활성화된 양을 측정할 결과 중성염용액과 열수의 추출물 200~500 µg/ml 농도에서 LPS 처리 양성대조군에 비해서는 약간 증가되었으나 대조군에 비해서는 약 2배의 높은 alkaline phosphatase 활성을 나타내어 이 버섯의 추출물이 B 임파구를 활성화시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이 결과는 저령 균핵의 중성염용액 추출물이 양성대조군인 LPS보다 6배 이상 높은 활성을 보였다는 것 보다는 활성이 낮았으나 오 등(2006)의 흰목이 중성염 추출물과 김 등(2006)의 뽕나무버섯 중성염 추출물 실험에서의 대조군과 비교해서 활성도가 높게 나타났다. 따라서 뽕나무버섯부치 자실체에서 추출한 조다당류는 생쥐의 B 임파구를 활성화하는 효과가 있는 것으로 보여 진다.

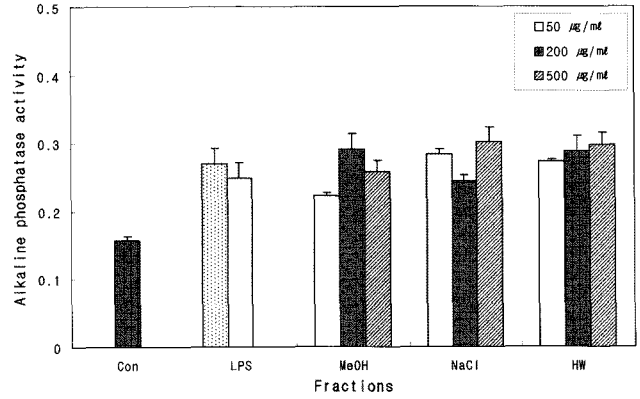


Fig. 4. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows: Alkaline phosphatase activity (ρ -nitrophenol $\mu\text{mol/l} \times 10^5$ lymphocytes/60 mins) = $1.15 \times$ optical density at 405 nm. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

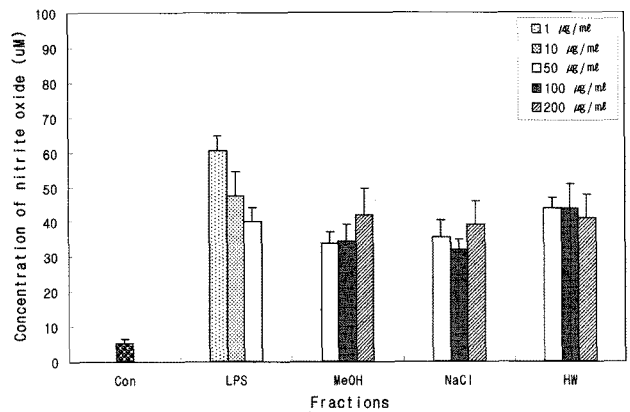


Fig. 5. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* on nitrite oxide production in RAW 264.7. Concentration of RAW 264.7 cell was 1×10^6 cells/ml. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

대식세포의 활성화에 미치는 영향

3가지 용매로 추출한 조다당류의 대식세포 활성화에 미치는 효과를 조사한 결과(Fig. 5), 대조군의 RAW 264.7에 의해 발생된 nitric oxide(NO) 농도가 5.12 µM인 것에 비해 열수 추출물을 50~200 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 대식세포주는 40.98~43.62 µM의 NO를 발생시켰다. 특히, 열수 추출물은 50 µg/ml 농도에서 양성대조군인 LPS에 의해 생성된 40 µM의 nitric oxide 농도에 비해 다

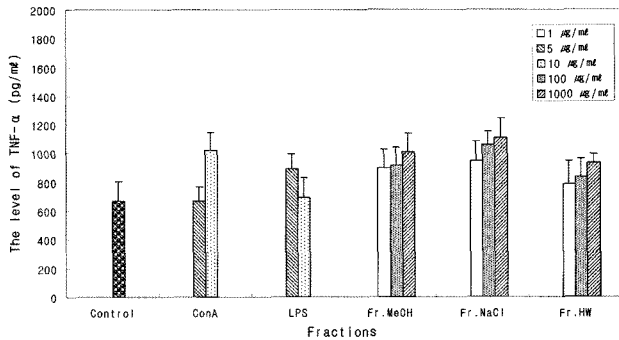


Fig. 6. Effects of fractions extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* on cytokine (TNF- α) production in splenocytes. Concentration of splenocytes was 1×10^7 cells/ml. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control on B cell. Con A (Concanavalin A) was used in positive control on T cell.

소 높은 43.62 μ M 농도의 NO를 생성하였다. 따라서 뽕나무버섯부치의 자실체에서 열수를 이용하여 추출한 조다당류는 대식세포의 활성을 증가시켜 숙주세포의 항암효과를 높이는 것으로 판단된다.

Cytokine 분비에 미치는 영향

세포수준의 항암작용과 관련성이 있는 면역조절 기능을 확인하기 위하여 뽕나무버섯부치의 세가지 조다당류가 생쥐의 비장 세포를 자극하여 cytokine의 분비를 조절하는지 조사하기 위하여 TNF- α 를 ELISA assay kit로 측정하였다.

TNF- α 는 뽕나무버섯부치의 중성염용액과 열수로 추출한 조다당류는 1~1000 μ g/ml 범위에서 대조군보다 높은 활성을 보였다. 그러나 Con A와 LPS에 비해서는 모든 조다당류의 활성이 약간 높아지는 정도를 보였다(Fig. 6). 따라서 본 실험의 결과 뽕나무버섯부치에서 추출한 세 종류의 조다당류가 TNF- α 에 활성을 촉진한 것은 이들 물질이 생쥐의 항암효과와 면역증강효과와 밀접한 관계가 있을 것으로 판단된다.

총 복강 세포 수에 미치는 영향

3종류의 추출물에 대한 복강 세포수의 증가는 메탄올과 열수 추출 조다당류에서 농도에 따라 약 1.5~3배 증가하였다. 이와는 다르게 중성염용액으로 추출한 조다당류는 농도에 따라 대조군에 비해 5~9배 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 7). 이와 같은 결과는 중성염을 제외한 메탄올과 열수 추출 조다당류가 복강 내 세포들의 활성화에 비교적 낮은 효과를 나타낸 것으로 판단된다. 김 등(2006)은 뽕나무버섯의 열수추출 조다당류를 50 mg/kg body

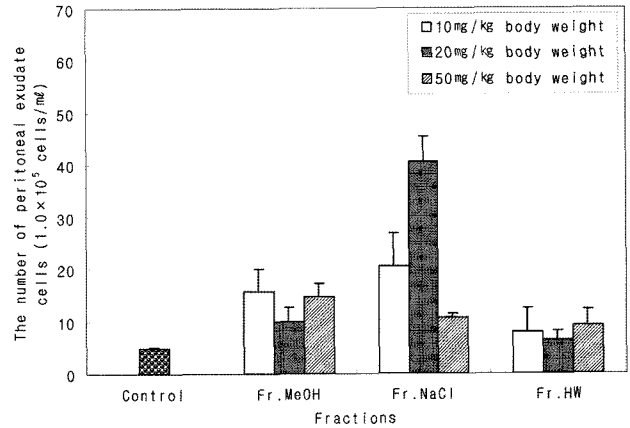


Fig. 7. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* on the numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW was extracted with hot water.

weight로 투여한 생쥐의 복강세포 수는 대조군에 비해 3.3배 증가했다고 보고하였고, 오 등(2006)은 흰목이의 중성염 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포 수가 대조군에 비해 7.4배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 뽕나무버섯부치의 자실체에서 추출한 다당류가 투여된 생쥐의 복강세포 수가 크게 증가했다는 것은 이 추출물의 투여가 생쥐의 면역증강에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

혈액 중 백혈구 수에 미치는 영향

백혈구는 외부의 감염으로부터 생체를 방어하는 면역반응에 1차적으로 관여하는 세포로 보고되어 있다(Arthur and Guyton, 1986). 각각 추출된 조다당류가 면역반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10, 20, 50 mg/kg body weight 농도의 추출된 조다당류를 투여한 생쥐의 백혈구 수를 조사하였다. 혈액 내의 백혈구 수는 대조군 2.31 \pm 0.88에 비하여 메탄올 추출물 50 mg/kg body weight가 4.42 \pm 1.14로 1.9배 증가하였으며, 열수추출 조다당류는 같은 농도에서 각각 1.42배의 증가를 보였다. 그러나 중성염용액 추출 조다당류에서는 이 결과와는 다르게 50 mg/kg body weight의 실험군에서는 독성으로 인해 정상적인 실험이 이루어 지지 않았고 10 mg/kg body weight의 농도에서는 오히려 5.9배 백혈구 수의 증가를 보였다(Table 2). 이 결과를 통해 뽕나무버섯부치의 중성염추출 조다당류는 저농도에서 생쥐의 백혈구수를 증가시키는 것으로 나타났다. 오 등(2006)은 흰목이의 중성염 추출 조다당류를 50 mg/kg body weight 농도로 투여한 생쥐의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.6배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 위의 실험을 통해 메탄올 추출 조다당류를 투여한 생쥐의 백혈구 수가 1.9배 증가했다는 것은 버섯추출물이

Table 2. Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* on the number of circulating leukocytes in ICR mice

Group ^a	Dose (mg/kg body weight)	No. of mice	No. of leukocytes ($\times 10^6/ml$)
Control	-	10	2.31 \pm 0.88 ^b
Fr. MeOH	10	10	2.32 \pm 1.24
Fr. MeOH	20	10	3.17 \pm 1.44
Fr. MeOH	50	10	4.42 \pm 1.14
Fr. NaCl	10	10	13.63 \pm 2.11
Fr. NaCl	20	10	6.14 \pm 0.63
Fr. NaCl	50	10	-
Fr. HW	10	10	5.6 \pm 1.03
Fr. HW	20	10	3.99 \pm 0.61
Fr. HW	50	10	3.29 \pm 0.60

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

^bMean \pm S.E.

면역증강에 도움을 줄 수 있다는 것을 의미한다고 사료된다.

면역 장기 중량에 미치는 영향

면역관련 장기의 중량변화는 전체적으로 증가하는 양상을 보였으나 유의성이 없었다. 간의 경우 메탄올 추출물의 농도가 10, 20, 50 mg/kg body weight 일 때 각각의 면역장기의 증가는 없었다(Table 3). 그러나 비장과 흉선의 경우 투여한 조다당류의 농도가 높아질수록 총 중량대비 장기의 상대적인 중량비가 증가하는 추세를 나타냈다. 오 등(2006)의 흰목이 중성염용액 추출 조다당류를 투여한 실험에서 실험군의 간, 비장, 흉선의 무게가 대조군에 비해 0.85~7.24% 증가된 것으로 조사되었으며, 김 등(2006)의 뽕나무버섯 중성염용액 추출 조다당류를 투여한 실험에서도 실험군의 간, 비장, 흉선의 무게가 대조군에

비해 약간 증가된 것을 확인되었다. 따라서 앞의 실험결과를 종합하면 버섯 자실체의 조다당류를 투여한 생쥐의 간, 비장, 흉선의 무게는 증가된다고 사료된다.

적 요

뽕나무버섯부치는 주름버섯목, 송이버섯과에 속하는 버섯으로 예로부터 만성간염, 담낭염 및 암의 치료에 널리 이용해온 맛이 좋은 식의약품 버섯이다. 뽕나무버섯부치의 자실체로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올을 이용하여 조다당류를 추출하여 Sarcoma 180가 접종된 ICR mice에 주사하여 항암 및 면역증강 효과를 조사하였다. 세포독성 실험결과, 각각의 세포는 10~2000 $\mu g/ml$ 추출물 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 각각의 조다당류가 투여된 실험군은 대조군에 비해 수명이 각각 28.8~46.5% 연장되었다. 중성염용액으로 추출한 조다당류는 B 임파구의 alkaline phosphatase 활성을 대조군에 비해 약 1.8~2.1배 내외의 증가율을 나타냈다. 중성염추출 조다당류를 투여한 생쥐의 총 복강 세포 수는 대조군에 비하여 최고 9배 정도 증가하였으며, 혈액 중 백혈구의 수도 대조군에 비하여 약 1.9배 증가하였다. 또한 면역에 관련된 장기인 간, 비장 및 흉선의 체중이 대조군에 비하여 증가된 것을 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 인천대학교 자체 연구비지원(2006년도)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

구현옥, 김인천, 박신자, 정상희, 박종명, 이재진, 유한상, 이영순.

Table 3. Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens* on the body and immunoorgan weight of ICR mice

	Group ^a									
	Control	Fr. MeOH			Fr. NaCl			Fr. HW		
Dose (mg/kg body weight)	-	10	20	50	10	20	50	10	20	50
NO. of mice	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	37.58 \pm 0.66 ^b	34.88 \pm 3.35	35.45 \pm 1.82	31.21 \pm 1.99	28.28 \pm 0.88	27.1 \pm 2.82	-	33.55 \pm 1.54	33.18 \pm 2.65	34.6 \pm 1.69
Liver weight (g)	1.99 \pm 0.20	1.70 \pm 0.38	1.63 \pm 0.10	1.91 \pm 0.19	1.96 \pm 0.12	1.44 \pm 0.41	-	1.51 \pm 0.20	1.69 \pm 0.20	1.89 \pm 0.26
Liver/Body (%)	5.29 \pm 0.46	4.94 \pm 1.32	4.63 \pm 0.53	6.14 \pm 0.70	6.99 \pm 0.27	5.43 \pm 1.91	-	4.52 \pm 0.73	5.11 \pm 0.71	5.45 \pm 0.67
Spleen weight (g)	0.11 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01	0.33 \pm 0.05	0.24 \pm 0.07	0.24 \pm 0.06	-	0.17 \pm 0.06	0.18 \pm 0.01	0.18 \pm 0.04
Spleen/Body (%)	0.31 \pm 0.05	0.39 \pm 0.06	0.42 \pm 0.08	1.04 \pm 0.12	0.87 \pm 0.27	0.89 \pm 0.28	-	0.52 \pm 0.20	0.55 \pm 0.08	0.53 \pm 0.09
Thymus weight(g)	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	-	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
Thymus/Body (%)	0.08 \pm 0.05	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.03	0.04 \pm 0.04	0.05 \pm 0.05	0.06 \pm 0.02	-	0.05 \pm 0.03	0.06 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01

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

^bMean \pm S.E.

1999. 신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)에서 분리한 다당체의 *Staphylococcus aureus* 감염 및 마우스 Sarcoma 180 종양세포에 대한 방어효과. 한국실험동물학회지 **15**: 155-158.
- 김상범, 이건우, 김혜영, 심미자, 노현수, 이현숙, 이민웅, 이우윤, 이태수. 2006. 뿔나무버섯(*Armillaria mellea*)의 자실체에서 추출한 조다당류가 생쥐의 Sarcoma 180에 미치는 억제효과. 한국균학회지 **36**: 98-104.
- 박상신, 이갑득, 민태진. 1995. 버섯 중 항균물질의 검색 및 개발에 관한 연구. 그람음성균 및 곰팡이에 대한 항균물질의 검색(2보). 한국균학회지 **23**: 176-189.
- 박완희, 이호득. 1991. 한국의 버섯. 교학사.
- 박완희, 이호득. 1999. 한국약용버섯도감. 교학사.
- 심성미, 임경환, 이우윤, 김정완, 심미자, 이민웅, 이태수. 2003a. 매미눈꽃동충하초(*Paecilomyces sinclairii*)에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과에 관한 연구. 한국균학회지 **31**: 155-160.
- 심성미, 임경환, 김정완, 이우윤, 김하원, 이민웅, 이태수. 2003b. 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과. 한국균학회지 **31**: 161-167.
- 오윤희, 이우윤, 이민웅, 심미자, 이태수. 2004. 저령(*Grifola umbellata*)의 균핵에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과. 한국균학회지 **32**: 23-30.
- 오윤희, 김상범, 이건우, 김혜영, 심미자, 노현수, 이현숙, 이민웅, 이우윤, 이태수. 2006. 흰목이(*Tremella fuciformis*)에서 추출한 조다당류의 면역 활성 및 항암 효과. 한국균학회지 **34**: 105-111.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995a. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I)-중성염 용액 추출 다당류의 특성. 한국균학회지 **23**: 332-339.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995b. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(II)-열수추출 다당류의 분리 및 특성. 한국균학회지 **23**: 340-347.
- 진미림. 1996. 갯버섯 성분의 면역세포 및 전사인자의 활성화 작용에 관한 연구. 서울대학교 대학원 논문집. Pp 1-121.
- 水野 卓, 川合正允. 1992.キノコの化学・生物学. 學會出版センタ. p. 372.
- Arthur, C. and Guyton, M. D. 1986. *Textbook of medical physiology. 7th Ed.* W. B. Saunder company. Pp 51-59.
- Choi, S. H., Jun, C. D., Lee, B., S., Park, S. D., Oh, J. S. and Chung, H. T. 1993. Effect of various extrinsic and intrinsic factors on the nitric oxide production of murine macrophage. *Kor. J. BRM* **3**: 15-22.
- 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.
- Gross, R. L. and Newberne, P. M. 1980. Role of nutrition in immunologic function. *Physiol. Rev.* **60**: 188-302.
- 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**: 137-144.
- Stevens, J. A. 1960. Calvacine, a new antitumor agent. *Science* **132**: 1987.
- Sugihara, T., Yoshioka, Y. and Nishioka, K. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biology* **235**: 59-60.
- Suzuki, M., Arika, T., Amemiya, T. and Fujiwara, M. 1982. Cooperative role of T lymphocytes and macrophages in antitumor activity of mice pretreated with schizophyllan. *Jpn. J. Exp. Med.* **50**: 59-65.
- Weir, D. W., Herzenberg, L. A. and Blackwell, C. 1986. *Handbook of experimental immunology.* 4th ed. Blackwell Scientific Publications, Boston. p. 60.1
- Ying, J. Z., Mao, X. L., Ma, Q. M., Zong, Y. C. and Wen, H. A. 1987. *Icons of medicinal fungi from China.* Science Press, Beijing, China.