

한국산 고등균류 만가닥버섯의 항암성분

박성미 · 진미림 · 김진숙 · 최응철 · 김병각*

서울대학교 약학대학

(Received August 30, 1993)

Studies on Constitutents of the Higher Fungi of Korea. Antitumor Components of the Basidiocarps of *Hypsizigus mamoreus*

Sung Mee Park, Mi Rim Jin, Jin Sook Kim, Eung Chil Choi and Byong Kak Kim*
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—To find antitumor components in the hot water extract from the basidiocarps of *Hypsizigus mamoreus*. protein-bound polysaccharides were purified and fractionated by DEAE-cellulose ion exchange column chromatography and Sepharose CL-4B gel filtration chromatography. When a dose of 20 mg/kg/day was injected intraperitoneally into ICR mice. fraction IV of the component showed the highest inhibition ratio of 73.8% against the count of hemolytic plaque forming cells in mice to 3.2 times. when IV was about 30 KD and the fraction was composed of 76.1% polysaccharide and 4.9% protein. The hexosamine was detected in all the fractions, showing that the polysaccharide and protein moieties were bound each other.

Keyword □ *Hypsizigus mamoreus*, basidiocarps, protein-bound polysaccharides, tumor inhibition ratio, hemolytic plaque forming cells.

항암작용이 있는 다당체는 고등식물,¹⁾ 곰팡이,²⁾ yeast,³⁾ bacteria⁴⁾ 등 천연자원에서 분리되어 왔으며 Ringler⁵⁾가 담자균류의 다당체에 대한 항암제연구가 광범위하게 시행되고 있다. Chihara^{6,7)} 등은 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 sarcoma 180에 강력한 저지력을 지닌 고분자 β -1,3-glucan⁸⁾인 lentinan을 분리하였고, Komatsu⁹⁾ 등은 *Schizophyllum commune*의 배양액으로부터 항암력을 지닌 schizophyllan을 분리하였다. Tsugagoshi¹⁰⁾ 등은 *Coriolus versicolor*의 배양균사로부터 항암력을 가진 단백 결합 다당체로 β -(1→3), β -(1→4), (1→6) glucan인 PS-K를 분리하였다.

이들 담자균류의 항암성분들이 면역능에 미치는 연구도 진행되었는데 Maeda¹¹⁾ 등은 lentinan이 세포성 면역의 immunoaccelerator로 작용함을 밝혔고, Den-

ner¹²⁾ 등은 lentinan이 T-cell adjuvant로 작용함을 입증하였다.

한편 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 Kim¹³⁾ 등이 구름버섯, 포고버섯, 느타리버섯 등의 자실체의 열수 추출물이 sarcoma 180에 강한 저지력이 있음을 밝힘으로써 시작되었다. Shim¹⁴⁾은 구름버섯 배양균사에서 분리한 항암성분인 단백결합 다당체의 SRBC(sheep red blood cell)에 대한 마우스 면역효과에서 비장세포수와 용혈반 형성 세포수의 증가효과에 대해 보고하였다. 또한 Shim은 구름버섯 균사의 액내 배양에 의한 항암성분의 대량 생산 가능성을 입증하였다. 본 연구실에서는 한국산 고등균류의 성분 연구를 계속해왔으며 최근 영지버섯¹⁵⁾으로부터 항암성분을 분리하고 그 화학적 조성을 밝히는 등 활발한 연구를 하고 있다.

저자들이 실험한 만가닥 버섯은 *Lyophyllum ulma-*

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

rium으로 알려져 왔으나, 최근 Bigelow에 의해 새로운 학명 *Hypsizigus mamoreus*로 밝혀졌다. 이 버섯은 야생 식용 버섯인데 최근 인공 재배법으로 대량생산이 가능하게 되었다. 이 연구에서 만가닥 버섯의 자실체로부터 항암성분을 분리, 정제하고 그 항암력을 시험하였고 면역학적 연구를 수행하였으며, 그 화학적 특성을 구명하였기에 보고하는 바이다.

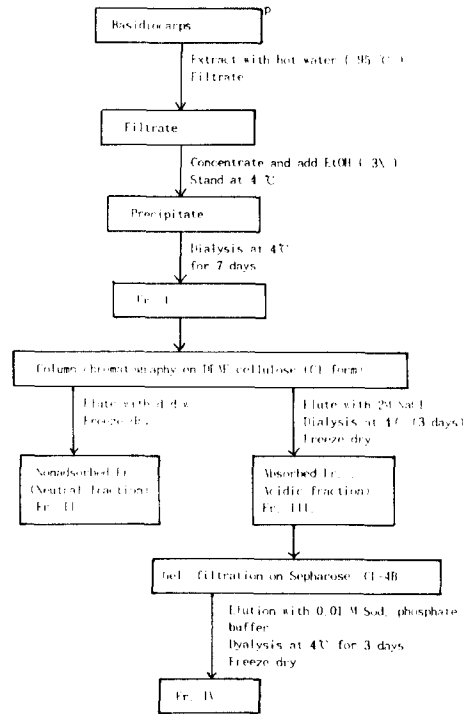
재료 및 방법

실험재료—농촌진흥청 균이과에서 재배된 *Hypsizigus mamoreus*(Peak.) Bigelow의 자실체의 신선한 것을 사용하였다.

단백다당체의 추출 및 분리—자실체 2.5 kg을 blender로 균질화 시킨 후 95°C로 고정시킨 mantle에서 6시간 동안 3회 증류수로 열수 추출하였다. 감압여과하여 추출액을 분리하고 감압농축한 후 냉동보관한 95% ethanol을 3배 가하고 4°C에서 24시간 방치하여 침전을 완결시켰다. 상등액을 버리고 침전물을 얻어서 visking tube에 넣어 4°C에서 7일간 투석하였다. 투석 후 원심분리하여 상등액을 얻고 이를 감압농축하고 동결건조하여 갈색 건조분말(이후 Fr. I이라 칭함)10.3 g을 얻었다.

단백다당체의 정제—상기에서 얻은 Fr. I 6g을 DEAE-cellulose (Cl-form, Sigma Chemical Company, U.S.A.)으로 packing 시킨 column(4.2 cmφ×40 cm)에 적용하여 탈이온수(pH 7.2)로 1 ml/min의 유속으로 elution하여 effluent를 7 ml/fraction으로 분취하였다. 각 분획에 대한 흡광도는 625 nm에서 anthrone 반응, 595 nm에서 Bradford 반응을 실시하여 각각 다당체와 단백질 함량을 측정하였다. anthrone 양성 분획들을 모아 농축, 동결건조하여 흰색 건조분말(이후 Fr. II라 칭함) 1.2 g을 얻었다. DEAE-cellulose에 흡착된 성분은 2 M NaCl로 elution한 후 anthrone 양성 분획을 모아 이를 visking tube에 넣어 4°C에서 4일간 투석하고 농축, 동결건조하여 갈색 건조분말(이후 Fr. III라 칭함) 2.1 g을 얻었다.

상기에서 분리한 Fr. III 600 mg을 0.01 M Sodium phosphate buffer solution(pH 6.8)에 용해시킨 후 sepharose CL-4B(Pharmacia Co., Sweden)로 충전시킨 column(2.5 cmφ×75 cm)을 이용하여 0.01 M sod.



Scheme I—Extraction, Isolation and purification of water soluble polysaccharides by DEAE-ellulose and gel filtration chromatography.

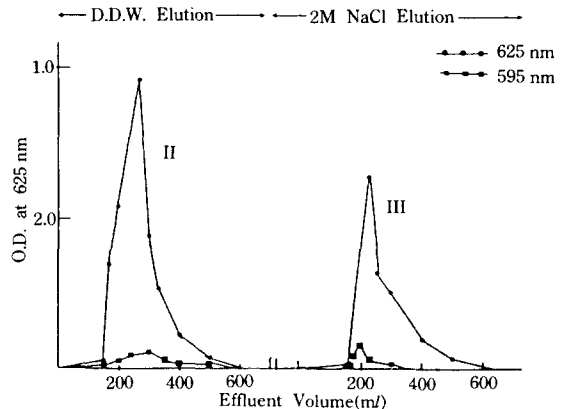


Fig. 1—The elution profile of Fr. I by DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

phosphate buffer(pH 6.8)으로 0.5 ml/min의 유속으로 elution하였으며, 7 ml/fraction으로 분취하였다. anthrone 양성분획들을 모아 4°C에서 4일간 투석하고

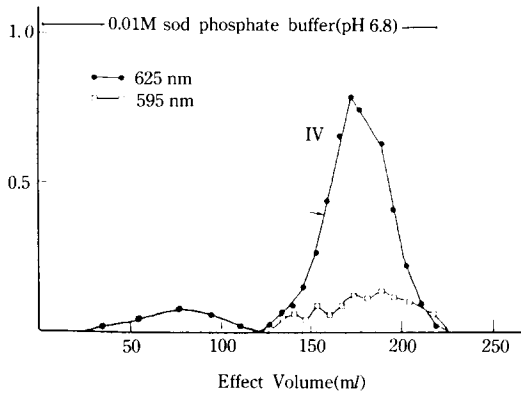


Fig. 2—The elution profile of Fr. III by sepharose CL-4B gel filtration Chromatography. The arrow indicates V_e of Fr. IV.

농축, 동결건조하여 미갈색 건조분말(이후 Fr. IV라 칭함) 350 mg을 얻었다.

단백다당체의 항암실험—서울대학교 동물사육장에서 제공받은 ICR 생쥐(♂ 20~25 g)를 사용하였다.

ICR 생쥐의 복강내에서 7일간 배양한 sarcoma 180 세포를 복수와 함께 취하여 생리 식염수로 3회 세척하고 2×10^6 cells/ml이 되도록 한 후 이 현탁액 1 ml을 정상 ICR마우스의 왼쪽 서혜부에 피하 이식하였다.

sarcoma 180 세포를 이식하고 3일 후부터 매일 1회씩 10일간 연속하여 항암성분을 복강내에 피하 주사하였다. 항암성분 투여군에는 생리식염수를 0.1 ml/씩 주사하였다. 모든 주사약물들은 121°C , 1.1 kg/cm^2 에서 15분간 고압증기 멸균하였다.

종양세포 이식 후 28일째 되는 날 실험동물을 치사시키고, 고형암을 적출하여 그 중량을 측정하고 다음식을 이용하여 종양 저지백분율(percent inhibition ratio, I.R. %)를 계산하였다.

$$\text{I.R. \%} = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

C_w : 대조군의 평균 종양 중량

T_w : 항암성분 투여군의 평균 종양 중량

생쥐의 대식세포 활성화에 미치는 영향—서울대학교 동물사육장에서 제공받아 ICR 생쥐(♂ 20~25 g)를

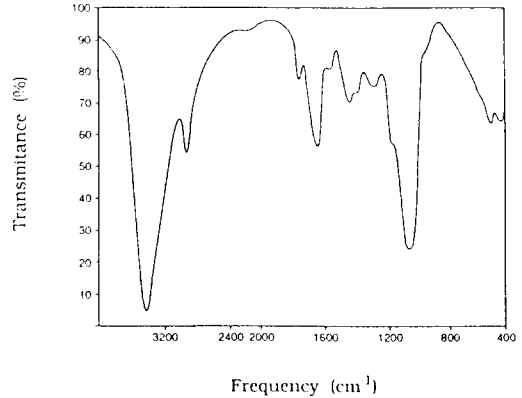


Fig. 3—IR spectrum of Fr. IV.

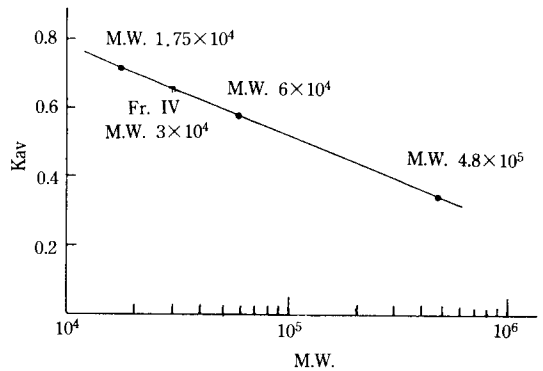


Fig. 4—Standard calibration curve for the determination of molecular weight of Fr. IV.

사용하였다. 12마리의 생쥐를 4실험 군으로 그 중 2군의 대조군으로 나머지군은 항암성분 투여군으로 준비하였다. 대조군과 투여군의 각 1군에 sarcoma 180 세포 현탁액(2×10^6 cells/ml) 0.1 ml를 생쥐 서혜부에 이식하였다.

대조군에는 생리식염수를, 투여군에는 Fr. III(40 mg/Kg/day)를 매일 1회 5일간 투여하였다.

항암성분 투여 완료 5일째 되는 날 생쥐의 치사시키고 HBSS(Hank's balanced salt solution)로 복강세포를 취한 후 이를 1200 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 침전세포를 1×10^6 cells/ml로 희석하고 1.5 ml를 취하여 RPMI-1640를 배지로 하여 37°C 에서 2시간동안 배양하였다. Plate에 부착된 대식세포만을 취하고 부착되지 않은 세포는 HBSS로 세척하여 제거하였다.

Plate에 부착된 대식세포에 10 mM glucose, 80 μ M ferricytochrome C와 0.02 mg/ml opsonized zymosan을 함유한 PBS(phosphate buffered saline)를 11.5 ml 가하고 37°C 에서 90분간 배양한 후 3000 rpm에서 원심분리하여 상등액은 ice bath상의 시험관으로 옮겨 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질당 SOA(superoxide anion)양은 다음식을 이용하여 계산하였다.

$$\Delta E_{550} = 2.1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$$

$$SOA \text{ nmol/well} = O.D. \text{ at } 550 \text{ nm} \times 15.87$$

$$SOA \text{ nmol/mg protein} = (O.D. \text{ at } 550 \text{ nm} \times 15.87) / M\phi \text{ amount(mg)}$$

생쥐의 용혈반 형성 세포수에 미치는 영향—12마리의 생쥐를 2그룹으로 나누어 각각 대조군과 투여군으로 준비하였다. 대조군에는 생리식염수를, 투여군에는 Fr. III(40 mg/kg/day)를 매일 1회 5일간 투여하였다. 투여완료 7일 후 SRBC(1×10^7 cells/ml)를 복강내에 주사하여 면역화시켰다.

면역화시킨 후 5일 후에 생쥐를 치사시키고 즉시 비장을 적출한 후 빙냉의 HBSS로 균질화하여 비장세포를 유리시키고 400 \times g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 37°C 에서 0.83% NH₄Cl에 현탁시켜 적혈구를 용혈시켰다. 이를 다시 400 \times g에서 원심분리하여 상등액을 제거하고 빙냉의 HBSS에 현탁시켜 비장세포수를 측정하고 1×10^7 cells/ml로 희석하였다.

Alsver's 용액에 SRBC를 생리식염수로 3회 세척하고(400 \times g, 5분) 50%(V/V)가 되도록 생리식염수를 현탁시켰다. HBSS에 0.5% DEAE dextran을 넣어 녹인 후 47°C 로 유지하였다.

25 μ l의 50% SRB, 25 μ l의 complement, 350 μ l의 agar-용액과 150 μ l의 비장세포 현탁액을 혼합하고 이 혼합액 150 μ l을 즉시 culture plate에 가하고 microscopic cover glass를 덮어 굳힌 후 37°C 에서 3시간 동안 배양하였다.

배양 후 생성된 용혈반 형성 세포수를 측정하였다.

$$\text{Plaque Forming Cells}/10^6 \text{ spleen cells} =$$

$$\frac{N}{C \cdot V_m \cdot a} \times 10^6$$

$$\text{PFC/Total spleen'cells} = (\text{PFC}/10^6 \text{ spleen cells}) \times C \times V_s / 10^6$$

$$a = \frac{150(\text{비장세포 현탁액 용량})}{550(\text{혼합액 용량})}$$

N : cover glass에서 관측한 용혈반 형성 세포수

C : 1 ml 비장세포 현탁액에 존재하는 비장세포수

V_m : 한개의 cover glass에 가한 배양혼합액의 용량

V_s : 비장세포 현탁액의 총 용량

항암성분의 화학적 분석

원소 조성비를 알기위하여 각 시료를 Perkin-Elmer 원소분석기로 분석하였다. 산소량은 탄소, 수소, 질소량을 100에서 감하여 계산하고 이를 다시 mole 비율로 환산하였다.

IR spectrum은 1 mg을 KBr disc법으로 FT-IR(Perkin-Elmer)을 사용하여 측정하였다.

GC분석을 위하여 각 시료 5 mg과 표준당을 3% HCl-MeOH 2 ml에 용해시키고 시험관의 공기를 질소로 치환시킨 후 80 \pm 5°C 에서 20시간동안 분해시켰다. 반응액을 Whatmann paper No. 2로 여과하고 여액을 감압 농축하였다. 여기에 0.2 ml pyridine을 가하여 용해시킨 후, trimethyldisilazane과 0.1 ml trimethylchlorosilane을 가하고 격렬히 흔들었다. 조제 시료액을 Hewlett Packard Gas Chromatography 분석하였다. 표준당의 retention time을 기준으로 하여 각 시료의 단당류 함량을 area percentage로 환산하였다.

아미노산 조성을 확인하기 위하여 각 시료 5 mg과 표준 아미노산을 6N HCl 5 ml에 용해시키고 시험관의 공기를 질소로 치환시킨 후 100 \pm 5°C 에서 24시간동안 분해시켰다. 여과 후 여액을 감압농축하고 0.02 N HCl 2 ml에 재용해시켰다. 조제 시료액을 Hitachi amino acid analyzer 835로 분석하였다.

당함량 정량을 위하여 각 시료를 Hervert의 방법에 따라 anthrone 시험을 실시하여 정량하였다. 표준당을 glucose, mannose 및 glucose, mannose, galactose, fucose, xylose의 혼합물을 사용하여 anthrone반응을 시킨 후 625 nm에서 흡광도를 측정함으로써 검량선을 작성하여 당의 함량을 측정하였다.

총 단백질의 함량측정은 Bradford법으로 구하였다. 각 시료를 1 mg/ml로 조제하여 1 ml을 취하여 Bradford 반응을 실시한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준물로 bovine serum albumin을 사용하여 작성한 검량선으로 부터 총 단백질 함량을 측정하였다.

각 시료의 free hexosamine과 N-acetylhexosa-

mine량은 Elson-Morgan법²⁴⁾에 준하여 실시하였다. 표준 glucosamine에 대한 시약 A-1에 0.5 N Na₂CO₃ 50 ml에 acetylacetone 1.5 ml를 가하였다. 시료의 glucosamine 정량에 대한 시약 A-2에는 1.25 N Na₂CO₃ 50 ml를 가하였다. 반응 시약 B에는 p-dimethylamino benzaldehyde 1.6 g을 c-HCl 30 ml에 용해시킨 후 96% ethanol 30 ml를 가했다. 각 시료 10 mg을 3 N HCl 1 ml와 함께 capped test tube에 넣고 공기를 질소 가스로 치환한 후 teflon으로 밀봉하여 100°C에서 15시간 가수분해 후 여과한 여액을 감압 농축하여 증류수 1 ml에 용해시켰다. 표준 glucosamine과 시료액에 시약 A-1 및 A-2를 1 ml씩 각각 가하고 96°C에서 1시간 반응 시킨 후 4°C 상에서 급냉하였다. 96% ethanol 10 ml와 시약 B 1 ml를 가하고 실온에서 1시간 방치 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준 glucosamine을 이용하여 작성한 검량선으로부터 hexosamine의 함량을 측정하였다.

분자량 측정—sepharose CL-4B gel filtration chromatography를 행하여 Fr. IV의 분자량을 측정하였다. 표준당으로는 dextran (Pharmacia Co., M.W. 2×10⁶), dextran(Sigma Chem. Co., M.W. 4.8×10⁵), dextran(Nakarai Chem, Ltd., M.W. 6×10⁴), dextran(Fluka Chem., M.W. 1/75×10⁴)을 이용하였다. 0.01 M Sod. phosphate buffer(pH 6.8)을 이용하여 0.5 ml/min의 유속으로 elution하고 625 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음식을 이용하여 분배계수 K_{av}를 구하고 분자량의 log값과 K_{av}를 이용하여 Fr. IV의 분자량을 측정하였다.

$$V_t = V_o + V_x$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_x}$$

V_t: column의 total volume

V_o: column의 void volume

V_x: gel bead의 volume

V_e: elution volume

결 과

만가닥버섯의 자실체로부터 항암성분의 추출, 분리 및 정제—자실체 2.5 kg을 열수추출하여 진한 갈색

건조분말(Fr. I) 10.3 g을 얻었고 Fr. I을 DEAE-cellulose ion chromatography 행하였을 때, 탈이온수로 elution하여 중성분획인 흰색분말(Fr. II) 1.2 g을 분리하였고 2 M NaCl로 elution하여 산성분획인 갈색분말(Fr. III) 2.1 g을 분리하였다. elution pattern은 Fig. 1에 나타나있다. Fr. III 600 mg을 sepharose CL-4B filtration chromatography를 행하여 미갈색 분말(Fr. IV)을 분리하였다. 그 elution pattern을 Fig. 2에 나타나있다.

종양 억제력

각 분획의 종양 억제효과는 모두 유의성있게 나타났으며 Fr. IV의 sarcoma 180에 대한 종양 억제율은 73.8%로 가장 높게 나타났다. 그 결과는 Table I에 정리하였다.

항암성분의 면역반응 효과

대식세포의 활성화—활성화된 대식세포가 분비하는 SOA양을 측정하였을 때 유의성있는 결과를 얻지 못하였다.

용혈반 형성 세포수 측정—총 비장세포당 용혈반 형성 세포수는 항암성분 투여군이 대조군에 비하여 3.2배 증가하였다. 그 결과는 Table II에 표시하였다.

항암성분의 화학적 분석—각 분획의 원소 조성비는 다당체의 일반식인 C₆H₁₀O₆와 유사하였다. Fr. II에 비하여 Fr. IV는 질소 비율이 상당히 높게 나타났다. 그 결과는 Table III에 나타나 있다. IR분석 결과는 일반적인 단백질 다당체의 결과와 일치하였다(Fig. 3). IR 측정결과 모든 분획은 3440 cm⁻¹에서 O-H신축진동, 2950 cm⁻¹에서 C-H 신축진동, 1660 cm⁻¹에서 C=N 신축진동, 1080 cm⁻¹에서 C-O 변각진동을 나타내었다. 다당체를 구성하는 단당류 분석결과 각 분획은 glucose를 주성분으로 하는 heteroglucan임을 확인할 수 있었으며, FR. IV는 glycine, aspartic acid, glutamic acid 함량이 상대적으로 높았다. 그 결과는 Table V에 나타나 있다. Fr. IV의 다당체 함량은 76.61%였고 단백질 함량은 4.85%로 다른 분획에 비해 높았다. 각 분획의 총 다당체와 단백질 함량은 Table VI에 나타나 있다. Hexosamine분석 결과 각 분획에서 hexosamine이 확인되었고 그 결과는 Table VII에 표시하였다.

분자량 측정—Fr. IV의 분자량을 standard dextran

Table I—Antitumor activity of the protein-bound polysaccharides obtained from *Hypsizigus mamoreus*

Group	Dose (mg/kg/day)	Tumor weight ^a (g)	Inhibition ratio (%)	Complete regression (No. of mice)
Control	Saline	1) 7.86 ± 0.84	—	0/8
		2) 5.69 ± 0.70	—	0/7
Krestin	20	1) 2.94 ± 1.08 ^b	57.3	0/8
		2) 2.75 ± 1/03 ^b	51.7	0/7
Fr. I	20	1) 2.71 ± 1.15 ^b	62.8	0/8
Fr. II	20	1) 4.61 ± 1.60 ^c	36.8	0/8
Fr. III	20	1) 2.36 ± 1.47 ^b	67.6	1/8
		2) 2.80 ± 1.81 ^c	52.9	0/7
Fr. IV	20	2) 1.49 ± 1.24 ^b	73.8	0/7

^a The results of two separate experiments(1,2) were summarized in this table.

Each value represents the mean+SD for 8(7) mice.

1) Control, Krestin, Fr. I, II, III.

2) Control, Krestin, Fr. III, IV.

^b Significantly different compared to the corresponding control group(student's t-test, p<0.001)

^c Significantly different compared to the corresponding control group(student's t-test, p<0.01)

Table II—Effects of Fr. IV on the hemolytic plaque forming cells(PFC) in the spleen of ICR mice immunized with SRBC

	Control group ^a		Treated group	
Body weight(g)	21.36 ± 2.37	24.31 ± 3.40 ^b		
Spleen weight(mg)	123.12 ± 25.03	139.22 ± 10.61 ^b		
Spleen cell count(×10 ⁷)	8.06 ± 1.16	12.00 ± 4.47 ^b		
PFC/10 ⁶ spleen cells	390.93 ± 105.94	859.03 ± 40.72		
PFC/total spleen cells(×10 ⁴)	3.30 ± 1.31	10.57 ± 4.75 ^d		

^a Each value represents the mean ± SD.

^b Not significantly different compared to the corresponding control group(student's t-test, p>0.05).

^c Significantly different compared to the corresponding control group(student's t-test, p<0.001).

^d Significantly different compared to the corresponding control group (student's t-test, p<0.05).

Table III—Elemental composition of each fraction

Fraction	C	H	O	N
I	3.69 ^a	6.23	2.90	0.22
II	3.29	5.40	3.43	0.04
III	1.13	2.02	5.22	0.06
IV	3.59	6.22	3.04	0.14

^a Expressed as mole percentage

Table IV—Monosaccharide contents of the polysaccharide moiety of each fraction by G.L.C. analysis

Fraction	Fucose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
I	1.11 ^a	0.50	5.62	6.73	85.30
II	1.39	0.87	11.10	8.32	78.32
III	0.48	1.23	6.04	3.37	87.35
IV	1.32	0.82	3.97	2.44	88.90

^a Expressed as area percentage

(MW 1.75 × 10⁴, 6 × 10⁴, 4.8 × 10⁵, 2 × 10⁶)을 이용하여 측정된 결과 그 분자량은 약 3 × 10⁴ dalton 이었다(Fig. 4).

고 찰

만가닥버섯의 자실체로부터 분리한 4개의 분획은 모두 ICR 마우스의 sarcoma 180 고형암에 대하여 종양 저지능을 나타내었다. 그 중산성 분획을 gel chromatography로 정제한 Fr. IV는 그 종양 저지율이 73.8%로 가장 높게 나타났다. 그에 반해서 중성분획인 Fr. II는 종양 저지율이 36.8%로 가장 낮게 나타났다.

분리한 항암성분이 마우스의 면역능에 미치는 영향을 연구하여 보았을 때 마우스의 복강세포에 존재하는 대식세포의 활성화를 확인하기 위하여 supero-

Table V—Amino acid contents of the protein moiety of each fraction

Amino acid	Fr. I	Fr. II	FR. III	Fr. IV
Aspartic acid	8.96 ^a	4.28	10.80	7.94
Threonine	5.54	9.95	6.84	6.05
Serine	5.89	9.45	7.65	5.63
Glutamic acid	7.67	3.73	8.13	6.61
Proline	1.21	0.84	0.68	0.50
Glycine	10.52	3.73	12.59	11.22
Alanine	9.22	5.61	8.34	9.98
Cysteine	N.D. ^b	N.D.	N.D.	N.D.
Valine	6.48	4.06	5.58	6.48
Methionine	1.31	N.D.	1.40	1.57
Isoleucine	4.11	1.96	3.17	3.63
Leucine	5.43	2.48	4.13	5.65
Tyrosine	1.08	N.D.	1.17	1.46
Phenylalanine	2.27	1.34	1.75	2.20
Lysine	4.83	2.57	3.79	4.36
Histidine	N.D.	0.65	0.58	0.85
Arginine	2.28	1.03	1.74	1.79

^a Expressed as area percentage^b N.D.: not detected**Table VI**—Polysaccharide and protein contents of each fraction

Fraction	Polysaccharide (%)	Protein (%)
I	92.25 ± 12.24 ^a	2.60 ± 0.14
II	89.12 ± 5.43	0.42 ± 0.18
III	21.62 ± 1.99	1.38 ± 0.20
IV	76.61 ± 2.28	4.85 ± 0.20

^a Mean ± standard deviation**Table VII**—The contents of free hexosamine and N-acetylhexosamine of each fraction

Fraction	Hexosamine + N-acetylhexosamine (% W/W)
I	0.69 ± 0.07 ^a
II	0.48 ± 0.10
III	0.40 ± 0.13
IV	0.64 ± 0.16

^a Mean ± standard deviation

xide anion의 양을 측정하였는데 유의성있는 결과를 얻지 못하였다. 항원인 SRBC에 대하여 생성되는 항체의 양을 용혈반 형성 세포수를 측정함으로써 확인하였을 때 유의성 있는 결과를 얻었으며 항암성분 투여군이 대조군에 비하여 총 비장세포당 생성되는

용혈반 형성 세포수가 3.2배 증가하였다. 이는 항암성분이 마우스의 B세포를 활성화시켰다는 것을 의미하며 담자균류에서 분리한 항암성분들이 종양세포에 직접 작용하기 보다는 자기방어 기능을 활성화 시킴으로써 항암효과를 나타낸다고 알려져 있는 사실과 일치한다.

가장 높은 종양 억제율을 나타낸 Fr. IV의 원소조성은 C : H : O : N의 비율이 3.59 : 6.22 : 3.04 : 0.14로 다당체의 일반식인 C₆H₁₀O₆와 거의 유사하였다. 중성분획인 Fr. II에 비해 산성 분획인 Fr. III와 Fr. IV는 1660 cm⁻¹에서 peak가 sharp하게 나타났다. 이는 Fr. II에 비해 Fr. III와 Fr. IV가 단백질 함량이 높기 때문인 것으로 사료된다.

Fr. IV의 다당체 함량은 76.1%, 단백질 함량은 4.9%로 단백질 함량은 다른 분획에 비해 높았다. 여기서 다당체 함량 측정은 Herbert 등의 방법을 이용하여 다당체의 구성 단당류 혼합 용액을 표준하여 함량을 측정하였다. 이들 단백질과 다당체가 서로 결합되어 있는지를 확인하기 위하여 각 분획을 가수분해하여 hexosamine의 양을 측정하였을 때 모든 분획에서 hexosamine이 검출되었고 이는 이들 항암성분이 단백질 결합 다당체임을 입증하여 주었다. Lentinan이 다당체만으로 이루어진 항암성분인데 반하여 PS-K는 단백질 결합 다당체인데 만가닥 버섯에서 분리한 항암성분도 PS-K와 비슷한 형태인 것으로 생각된다.

항암성분의 다당체를 구성하는 단당류 분석 결과 모든 분획에서 fucose, xylose, mannose, galactose, glucose가 확인되었고 Fr. I, Fr. III, Fr. IV에서는 Fr. II에서 볼수 없었던 peak가 retention time 10.95 min에서 나타났는데 glucuronic acid로 사료되나 확인할 수 없었다. 항암성분의 단백질을 구성하는 아미노산 분석결과 crude분획인 Fr. I에서 확인되지 않은 histidine이 Fr. I으로부터 분리한 나머지 분획에서 확인된 것으로 보아 확인되지 않은 cysteine과 tryptophan도 미량 존재할 가능성도 존재한다.

Fr. IV의 분자량을 측정하기 위하여 sepharose CL-4B filtration chromatography를 이용하였다. 각 표준 dextran과 Fr. IV의 elution volume은 peak로 치달는 부분을 의심한 후 half maximum point로 정하였고 이로부터 산출한 분배계수 K_{av}값과 분자량간에 좋은 상관관계가 있었으므로 대략의 분자량을 측정할 수 있었다.

Fr. IV의 분자량은 3×10^4 dalton이었고 이 분자량은 다른 담자균류에서 분리된 항암성분에 비하여 비교적 작은 편이며 분자량이 9.4×10^4 인 PS-K와 같이 경구 투여시에도 항암효과가 있을 것으로 기대된다.

결 론

만가닥버섯의 자실체 열수 추출물을 DEAE-cellulose 이온 교환수지와 sepharose CL-4B gel filtration chromatography를 이용하여 분리, 정제하여 Fr. I, Fr. II, Fr. III, Fr. IV를 얻었다. Fr. IV는 sarcoma 180 고형암에 대하여 73.8%의 가장 높은 종양 억제율을 나타내었다.

Fr. IV의 분자량은 약 3×10^4 dalton이었으며, 76.6%의 다당체와 4.9%의 단백질 및 0.6% hexosamine으로 구성되었다. 그 다당체는 glucose, mannose, galactose, fucose 및 xylose로 구성된 heteroglucan이었으며 그 단백질은 glycine과 alanine을 위시한 16종의 아미노산을 함유하고 있었다. 이 항암성분은 마우스에서 용혈반 형성 세포수를 3.2배 증가시켰으며, 이는 이 항암성분이 면역세포를 활성화 시켜 항암 효과를 나타냄을 의미한다.

감사의 말씀

이 연구에 소요된 경비의 일부는 서울대학교 신의약품개발연구센터 및 농촌진흥청의 연구비로 충당되었으며 이에 깊이 감사드리는 바입니다.

문 헌

- 1) Nakahara, W., Fukuoka, F., Maeda, Y. and Aoki, K.: The host mediated antitumor effect of some plant polysaccharide. *Gann* **55**, 283 (1964).
- 2) Chihara, G., Hamuram J., Maeda, Y.Y., Arai, Y and Fukuoka, F.: Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman), *Nature* **225**, 943 (1970).
- 3) Bradner, W.T., Clarke, D.A. and Stock, C.C.: Stimulation of host defense against experimental cancer I. zymosan and sarcoma 180 in mice. *Cancer Res.* **18**, 347 (1958).
- 4) Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. and mutai, M.: Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann* **72**, 517 (1981).
- 5) Ringler, R.L., Buerrum, R.U., Stevens, T.A., Clarke, P.A. and Stock, C.C.: Studies on antitumor substance produced by *basidimycetes*. *Antibiot. Chemotherapy* **7**, 1 (1975).
- 6) Chihara, G., Maeda, Y., Hamura, T., Sasaki, T. and Fukuoka, F.: Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Nature* **222**, 687 (1969).
- 7) Chihara, G., Hamura, T., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.: Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res* **30**, 2276 (1970).
- 8) Sasaki, T. and Takasuka, N.: Further studies of the structure of lentinan, An antitumor polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Carbohydr. Res.* **47**, 99 (1976).
- 9) Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G and Sasaki, S.: Host mediated antitumor action of *Schizophyllum commune*, *Gann* **60**, 557 (1971).
- 10) Tsugagoshi, S. and Ohash, F.: Protein-bound polysaccharides preparation, PS-K, effective against sarcoma 180 and rat asites hepatoma AH-13 by use. *Gann* **65**, 557 (1974).
- 11) Maeda, Y.Y. and Chihara, G.: Lentinan, A new immunoad accelerator of cell-mediated response. *Nature* **229**, 634 (1971).
- 12) Dennert, G. and Lennox E.S.: Rat thoracic duct cells as a substrate for T cells and carrier in the antibody response of mouse spleens deficient in the thymus cells. *Nature (London), New Biol.* **243** (128), 214 (1973).
- 13) Kim, B.K., Park, E.K. and Shim, M.J.: Studies on constituents of higher fungi of Korea(XXIV), Anti-neoplastic activities of *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel. *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145 (1979).
- 14) Shim, M.J.: Studies on constituents and culture

- of the higher fungi of Korea(XXV). Stimulating effects of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Mycol.* **8**, 115 (1980).
- 15) Shim, M.J.: Studies on constituents and culture of the higher fungi of Korea(LXVII). *Kor. J. Mycol.* **9**, 49 (1981).
- 16) Hyun, J.W., Choi, E.C. and Kim, B.K.: Studies on constituents of the higher fungi of Korea *Kor. J. Mycol.* **18**, 58 (1990).
- 17) Ito, M., Suzuki, H., Nakaho, N., Yamaochita, N., Sunggima, E., Maruima, M., Hoshin, K. and Yano, S.: Superoxide anion and hydrogen peroxide release by macrophages from mice treated with *Nocardia rubra* cellwall skeleton. Inhibition of macrophage cytotoxicity by a protease inhibitor but by superoxide dismutase and catalase. *Gann* **74**, 128 (1983).
- 18) Sabato, G.D. and Everse, J.: Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader. *Meth. Enzymol.* **132**, 407 (1988).
- 19) Hiroika, N. and Hisatora, K.: Antitumor mechanisms of orally administered Shiitake fruit bodies. *Chem. Pharm. Bull.* **132**, 407 (1987).
- 20) Jerne, N.K., Nordin, A.A. and Henry, C.: Cell-Bound Antibodies. Wister Institute Press, Philadelphia, 109 pp. (1963).
- 21) Chaplin, M.F. and Kenedy, J.F.: Carbohydrate Analysis. IRL press, Oxford, 174 pp. (1987).
- 22) Scopes, R.K.: Protein purification 2nd., Springer-berlag, New York, 306 pp. (1978).
- 23) Cooper, T.G.: The Tools of Biochemistry. A Wiley-Interscience Publication, New York, 169 pp. (1977).
- 24) Dische, Z.(1962): Color reactions of hexosamines. *Methods in carbohydrate chemistry 1*, Academic Press, 507-508.