

말불버섯 추출물의 Topoisomerase 저해 효과

박미정 · 조강진 · 김정봉 · 김동헌 · 김양섭* · 석순자* · 김선여** · 황영수
농촌진흥청 농업과학기술원 생화학과, *응용미생물과,
**잠사곤충연구소

Inhibition of Topoisomerase-mediated DNA Cleavage by *Lycoperdon perlatum*

Mijung Park, Kang-Jin Cho, Jung-Bong Kim, Donghern Kim, Yang-Sub Kim*,
Soon-Ja Seok*, Sun Yeou Kim** and Young-Soo Hwang

Biochemistry Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA

*Applied Microbiology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology

**National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA

Abstract

In the course of searching for anticancer agents from 32 mushrooms, it was found that methanol extract of *Lycoperdon perlatum* showed inhibitory effect on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. This active methanol extract was sequentially fractionated with hexane, chloroform, n-butanol and water. Among the solvent-fractionated extracts, 1 µg/mL hexane fraction of *L. perlatum* inhibited on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. The effect of hexane fraction of *L. perlatum* was dose- and reaction time-dependent. The hexane fraction of *L. perlatum* was found to have inhibitory activity on relaxation assay of DNA topoisomerase I. The hexane fraction of cultured *L. perlatum*, however, had no inhibitory effect on either type of topoisomerase.

Key words: anticancer, mushroom, topoisomerase, *Lycoperdon perlatum*

서 론

최근 식용으로 사용되고 있는 버섯들의 영양학적 가치뿐만아니라 그 의약적 가치에 대한 관심이 증가하고 있다. 몇 종의 버섯은 항암작용 및 면역증강 작용이 연구보고되고 있고⁽¹⁻³⁾ 영지버섯, 상황버섯, 신령버섯 등이 건강보조 식품 및 질병치료제로 주목을 끌고 있다. 그러나 수많은 버섯 중에서 이러한 의약학적 효용성에 대해 관심을 갖고 연구되는 버섯은 그 종류가 제한적이어서 그 이용 가치가 높은 버섯이 아직까지 개발되지 못한 채 있다. 따라서 본 연구에서는 32종류의 버섯을 채집하여 이들의 항암효과를 검사하려 하였다.

천연자원에서부터 항암물질을 찾기위하여 각 종 암세포주를 이용하여 항암작용 물질을 검색하는 방법이

많이 이용되고 있다^(4,5). 그러나 이러한 암세포주만을 이용하여 항암물질을 검색하는 것은 실제로 작용 기전의 규명이 어려워 질병치료제로 사용하거나 의약품으로 개발하기 위해서는 그에 따른 기전 연구와 함께 부수적으로 나타나는 독성문제의 규명 및 해결에 대한 연구도 진행되어야 한다. 따라서 국외에서는 항암물질을 찾고자하는 방법 중 암세포주를 이용한 세포수준의 검색법과 함께 분자수준의 각종 검색법을 이용하여 새로운 가치를 지닌 항암물질을 개발하려하고 있으며^(6,8), 국내에서도 점차 이러한 움직임이 일어나 미생물 배양액으로부터 topoisomerase I 억제제를 찾아내는 등의 연구가 수행되었다⁽⁹⁾. 그러나 아직 국내에서 topoisomerase II 활성 검색을 통한 항암물질 개발에 관한 연구는 보고되고 있지 않으며, 또한 버섯에 대해 topoisomerase 활성 억제 효과를 검색하여 이들의 항암효과를 검사한 연구결과가 보고된 바 없다.

Topoisomerase를 이용한 항암물질 검색 방법은 DNA를 대상으로하여 암세포의 비정상적인 증식을

Corresponding author: Sun Yeou Kim, National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon 441-707, Korea

막아보자는데 기초를 두고 있다. Topoisomerase는 생체내에서 DNA 복제시 DNA를 일시적으로 자른 후 다시 DNA 골격으로 재결합시키는 작용을 하는 효소로⁽¹⁰⁾, 차세대 유망 항암제인 camptothecin 같은 약물은 topoisomerase I에 의한⁽¹⁰⁻¹²⁾, etoposide는 topoisomerase II에 의한 DNA 골격으로의 재결합을 차단하여 암세포의 증식을 막는다⁽¹²⁻¹³⁾. 본 연구에서는 실험방법이 단순하면서 결과가 확실하며 작용기전을 확실히 알 수 있다는 장점을 가지고 있는 topoisomerase II를 이용한 항암작용 검색 방법을 이용하여 한국에서 자생하고 있는 버섯류의 항암 작용을 검색하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 26속 32종의 버섯을 칠갑산에서 1995년 9월에 채집한 후 음건하여 사용하였다.

시약

Topoisomerase II 및 I의 활성검사에 사용된 효소 및 완충액은 TopoGEN, Inc (Columbus, USA)에서, pBluescript SK은 Stratagene (La Jolla, USA)에서, Potato Dextrose Agar는 Difco Laboratories (Detroit, USA)에서, 그 외 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

버섯 메탄올 엑기스의 제조

건조 버섯 각각 50 g씩을 80% 메탄올로 5시간 동안 열탕추출하고 감압하에서 농축하여 메탄올 엑기스를 조제하였다. 각각의 메탄올 엑기스를 10% DMSO/H₂O로 녹여 200 mg/mL 농도의 용액으로 만들고 이것을 다시 희석하여 topoisomerase 활성 억제 검사에 사용하였다.

버섯 분획물의 제조

버섯의 메탄올 엑기스를 다시 핵산, 클로로포름, 부탄올 및 물로 분획하여 핵산, 클로로포름, 부탄올 및 물 분획물을 만들었다. 각각의 분획물을 10% DMSO/H₂O로 녹여 200 mg/mL 농도의 용액으로 만들고 이것을 다시 희석하여 topoisomerase 활성 억제 검사에 사용하였다.

Topoisomerase II 활성 검사⁽¹⁴⁾

0.2 µg pBluescript SK에 10X 반응 완충액(30 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 mM APT, 15 mM 2-mercaptoetha-

nol, 8 mM MgCl₂, 60 mM NaCl) 2 µL를 가하고 버섯 메탄올 엑기스의 경우 20 mg/mL 용액 1 µL, 분획물의 경우 2 mg/mL 용액 1 µL를 각각 넣고 human topoisomerase II 4 unit와 물을 가해 총 부피를 20 µL로 만들었다. 총 반응물을 37°C 항온조에서 30분간 반응시킨 후 10% SDS 용액 2 µL를 가하여 반응을 중단시켰다. Proteinase K 50 µg/mL을 가하고 37°C 항온조에서 20분간 반응시킨 다음, 반응액의 총량과 동일한 양의 클로로포름-이소아밀알콜(24:1)을 가하고 진탕(vortex) 후 원심분리하였다. 상층액을 모은 후 gel loading dye (0.25% bromophenol, 40% glycerol)를 넣고 ethidium bromide (0.5 µg/mL)가 함유된 1% 아가로즈 겔에서 1시간(100 volt) 동안 전기영동한 후 UV하에서 band를 관찰하였다.

Linear DNA marker의 제조

pBluescript SK 20 µg에 EcoR I 100 unit를 가한 후 37°C에서 1시간 30분간 반응시켜 linear DNA marker를 제조하였다.

Topoisomerase I 활성 억제 검사⁽⁶⁾

0.2 µg pBluescript DNA에 10X 반응 완충액 2 µL (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 50 µg/mL bovine serum albumin)를 가하고 버섯 분획물 200 mg/mL 용액 1 µL를 각각 넣고 human topoisomerase I 4 unit와 물을 가해 총 부피를 20 µL로 만들었다. 총 반응물을 37°C 항온조에서 30분간 반응시킨 후 10% SDS 용액 2 µL를 가하여 반응을 중단시켰다. Proteinase K 50 µg/mL을 가하고 37°C 항온조에서 20분간 반응시킨 다음, 반응액의 총량과 동일한 양의 클로로포름-이소아밀알콜(24:1)을 가하고 진탕(vortex) 후 원심분리하였다. 상층액을 모은 후 gel loading dye (0.25% bromophenol, 40% glycerol)를 넣고 ethidium bromide가 함유되지 않은 1% 아가로즈 겔에서 3시간(30 volt) 동안 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5 µg/mL) 용액에서 30분간 staining하고 다시 destaining한 후 UV하에서 band를 관찰하였다.

균사체의 배양 및 추출, 분획

말벌버섯의 균사체는 야생 말벌버섯으로부터 채집 당시 순수 분리하여 Potato Dextrose Agar를 배지로 사용하여(100×20 mm culture dish) 25°C로 유지되는 배양기에서 7일간 배양되었다. 균사체만을 분리하여 버섯 메탄올 엑기스 및 분획물 제조법과 동일한 방법으로

로 추출, 분획하였다.

결과 및 고찰

Human topoisomerase II를 이용한 버섯 메탄올 엑기스들의 항암성 검색

Human topoisomerase II 활성을 저해하는 버섯을 검색하기 위해 이미 topoisomerase II 활성 저해제라고 알려져 항암제로의 사용 가능성이 임상적으로 타진되고 있는 etoposide 및 DNA intercalator인 4'-(9-acridinylamino)methane- sulfon-m-anisidide(mAMSA)을 대조군으로 사용하였다^(13,15,16). Topoisomerase II의 활성을 억제하여 항암제로 사용되고 있는 약물의 경우 그 작용 기전이 직접적으로 효소 활성을 저해하는 경우와 약물이 topoisomerase II에 의해 cleavage된 DNA와 결합하여 효소와 DNA와의 결합을 저해하는 작용을 하는 것으

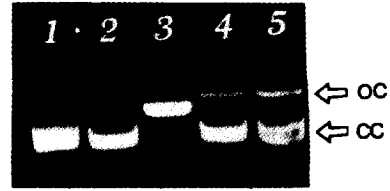


Fig. 1. DNA cleavage by human topoisomerase II in the presence of inhibitors. Lane 1: no enzyme control, lane 2: topoisomerase II, lane 3: linear DNA marker, lane 4: 50 μM etoposide, lane 5: 50 μM m-AMSA. The abbreviations oc and cc refer to open circular (nicked) and closed circular forms of duplex DNA, respectively.

로 알려져 있다⁽¹⁰⁾. 또한 어떤 DNA intercalator는 topoisomerase와는 직접적으로 작용함이 없이 topoisomerase catalytic site에 결합하거나 DNA conformation을 변화시켜 topoisomerase의 binding을 방해하여 topoisomerase

Table 1 Effects of methanol extracts of 32 mushrooms and their fractions on topoisomerase II-mediated DNA cleavage

Mushrooms	Methanol extract ¹⁾	Hexane fraction	Chloroform fraction	Butanol fraction	Aqueous fraction
<i>Agaricus brazei</i>	-	-	-	-	-
<i>Agaricus campitris</i>	-	-	-	-	-
<i>Amanita abrupta</i>	-	-	-	-	-
<i>Amanita pseudophorphyrea</i>	-	-	-	-	-
<i>Amanita spissacea</i>	-	-	-	-	-
<i>Amanita subjunquillea</i>	-	-	-	-	-
<i>Bjerkandera adusta</i>	-	-	-	-	-
<i>Boletopsis lucomeles</i>	-	-	-	-	-
<i>Boletus ballouii</i>	-	-	-	-	-
<i>Calostoma japonocum</i>	-	-	-	-	-
<i>Cerrena unicolor</i>	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius vibratilis</i>	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius nigrosquamosus</i>	-	-	-	-	-
<i>Cortinarius psueosalor</i>	-	-	-	-	-
<i>Daedalea dickinsii</i>	-	-	-	-	-
<i>Flammuline velutipes</i>	-	-	-	-	-
<i>Formitella fraxinea</i>	-	-	-	-	-
<i>Gomphus floccosus</i>	-	-	-	-	-
<i>Hericicum erinaceus</i>	-	-	-	-	-
<i>Laccaria amethystea</i>	-	-	-	-	-
<i>Lactarius chrysorrheus</i>	-	-	-	-	-
<i>Lepista nuda</i>	-	-	-	-	-
<i>Lycoperdon perlatum</i>	+	+	-	-	-
<i>Macrotepiota procera</i>	-	-	-	-	-
<i>Mycena haematopus</i>	-	-	-	-	-
<i>Naeamtoloma fasciculare</i>	-	-	-	-	-
<i>Odemallsjella radicata</i>	-	-	-	-	-
<i>Pulveroboletus ravenellii</i>	-	-	-	-	-
<i>Rhodophyllus sinuatus</i>	-	-	-	-	-
<i>Russula emetica</i>	-	-	-	-	-
<i>Suillus bovinus</i>	-	-	-	-	-
<i>Tylopilus neofelleus</i>	-	-	-	-	-

¹⁾80% total methanol extract of mushrooms.

-: no inhibition, +: inhibition.

merase의 작용을 억제하여 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그 예가 saintonin으로 DNA 특정 위치에 작용하여 topoisomerase I과 II의 활성을 모두 억제하는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다^(10,17).

Etoposide와 mAMSA의 경우 topoisomerase II의 활성을 저해하여 open circular DNA와 linear DNA의 생성을 증가시켰다(Fig. 1). Fig. 1의 lane 1은 topoisomerase II없이 DNA만을 같은 실험조건에서 반응시킨 대조군이며, lane 2는 topoisomerase II 억제제를 처리하지 않고 효소만을 반응시킨 대조군으로 두 대조군 모두 relaxed DNA band만이 강하게 나타나는 것을 알 수 있었다. 이는 DNA를 topoisomerase II와 일정 시간 동안 반응시키면 open circular DNA와 linear DNA가 생성되었다가 다시 relaxed DNA로 되는 과정이 반복되나 실제로 open circular DNA와 linear DNA의 반감기가 짧아 전기 영동시 검출되기 힘들며, 특히 linear DNA의 경우는 검출되지 않는다. 그러나 topoisomerase II 억제제를 처리한 경우는 open circular DNA와 linear DNA가 다시 relaxed DNA로의 돌아가는 것이 억제되기 때문에 전기 영동시 open circular DNA와 linear DNA band가 나타나며 relaxed DNA의 band의 양은 감소하게 되어 나타나는 결과이다.

Topoisomerase II 억제 활성이 있는 버섯을 검색하기 위하여 26속 32종의 버섯의 메탄올 엑기스 및 hexan, 클로로포름, 부탄올, 물분획물을 만들어 메탄올엑기스의 경우는 100 µg/mL, 분획물들의 경우 10 µg/mL의 농도로 처리하여 효소 활성 억제 여부를 알아보았다(Table 1). 32종 버섯 중 오직 말불버섯(*Lycoperdon perlatum*)만이 open circular DNA 및 linear DNA의 양을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A). 말불버섯은 Lycoperdales속에 속하는 식용버섯으로 종창이나 지혈, 해독등의 목적으로 사용되고 있으나 아직 항암효과에 대한 연구는 보고된 바가 없는 버섯이다⁽¹⁸⁾.

말불버섯의 human topoisomerase II에 대한 작용

말불버섯의 총 메탄올 엑기스로부터 활성이 있는 분획을 찾기 위하여 hexan분획물, 클로로포름분획물, 부탄올분획물 및 물분획물로 분획하여 hexan분획물을 처리한 결과 open circular DNA 및 linear DNA의 양이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 말불버섯 hexan분획물이 어느 정도의 농도에서부터 효과가 있는 지를 알기위하여 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 topoisomerase II 활성 억제 여부를 알아보았다. 말불버섯 hexan분획물은 1 µg/mL 농도 이상에서 확실하게 open circular DNA 및 linear DNA를

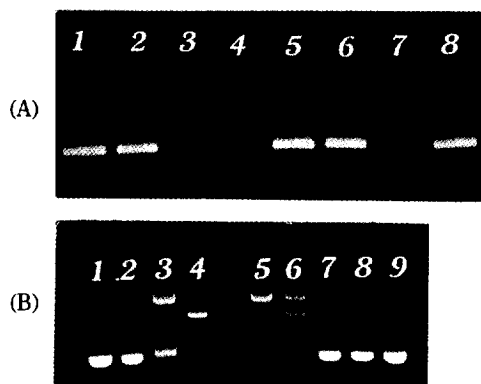


Fig. 2 Inhibition of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by various mushroom extracts(1 mg/mL) and their fractions(100 µg/mL). Lane 1: no enzyme control, lane 2: topoisomerase II, lane 3: linear DNA marker. A) Methanol extract of mushroom. Lane 5: *Amanita pseudophoryrea*, lane 6: *Mycena haematopus*, lane 7: *Lycoperdon perlatum*, lane 8: *Gomphus floccosus*. B) Lane 5: methanol extract of *L. perlatum*, lane 6-8: hexane, chloroform, butanol and aqueous fractions of *L. perlatum*, respectively.

생성하였으며(Fig. 3) 반응시간을 60분으로 연장한 경우에는 생성된 open circular DNA와 linear DNA의 양이 증가하여 band가 좀 더 진하게 나타나는 것을 알 수 있어 반응시간이 길어짐에 따라 hexan분획물로 인해 만들어지는 open circular DNA와 linear DNA의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 또한 100 µg/mL 농도에서는 이미 반응 시간 10분 후부터 open circular DNA가 생성되어 고농도일수록 많은 양의 open circular DNA를 빠른 시간안에 생성되며, 반응시간이 증가함에 따라 생성되는 open circular DNA와 linear DNA의 양이 증가되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B).

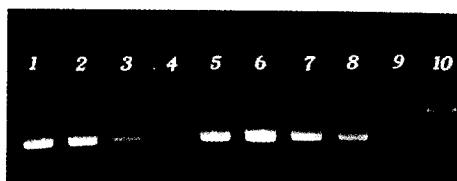


Fig. 3. Inhibition of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by hexane fraction of *L. perlatum* with increasing concentration. Lane 1: no enzyme control, lane 2: topoisomerase II, lane 3: 50 µM etoposide, lane 4: linear DNA marker, lane 5-10: increasing concentration of *L. perlatum* (lane 5: 0.01 µg/mL, lane 6: 0.1 µg/mL, lane 7: 1 µg/mL, lane 8: 10 µg/mL, lane 9: 100 µg/mL, lane 10: 1 mg/mL).

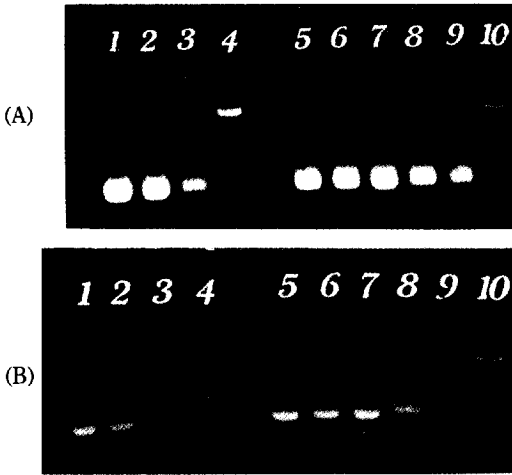


Fig. 4. Reaction time-dependent inhibition of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by hexane fraction of *L. perlatum*. Reaction mixtures were incubated with 1 µg/mL (A) or 100 µg/mL(B) hexane fraction of *L. perlatum* at 37°C for various time. The duration of reaction was 30 min in lanes 1-3 and 1, 5, 10, 20, 30, 60 min in lane 5-10, respectively. Lane 1: no enzyme control, lane 2: topoisomerase II, lane 3: 50 µM etoposide, lane 4: linear DNA marker, lane 5-10: hexane fraction of *L. perlatum*.

배양한 말뚝버섯 균사체의 human topoisomerase II에 대한 작용

말뚝버섯을 배양하여 활성이 있는 이차대사산물을 버섯배양체로부터 쉽게 생산할 가능성을 타진하기 위해서 균사체를 배양하여 핵산분획물의 topoisomerase II 활성 억제 여부를 검사해 보았다. 핵산분획물 500 µg/mL의 고농도에서도 topoisomerase II 활성을 억제

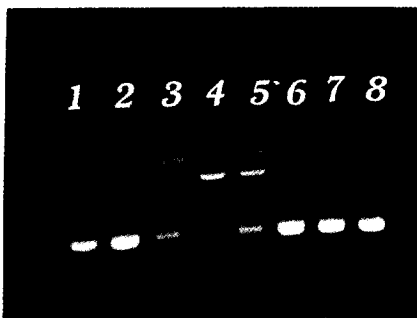


Fig. 5. Effect of hexane fraction of cultured *L. perlatum* on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. Lane 1: no enzyme control, lane 2: topoisomerase II, lane 3: 50 µM etoposide, lane 4: linear DNA marker, lane 5: 10 µg/mL hexane fraction of *L. perlatum*, lane 6-8: increasing concentration of hexane fraction of cultured *L. perlatum* (lane 6, 10 µg/mL; lane 7, 100 µg/mL; lane 8, 500 µg/mL).

하는 효과가 뛰어나지 않는 것으로 보아(Fig. 5) 배양한 버섯 균사체에서는 topoisomerase II의 활성을 억제하는 이차대사산물의 생성이 거의 없는 것으로 여겨진다. 이는 야생하는 버섯의 경우는 버섯 전체를 사용하였으나 배양한 것은 단지 균사체만을 사용하여 사용 부위의 차에 의한 결과라 생각할 수 있으나, 그외 야생하는 버섯의 경우 외부의 자극이나 적으로부터의 공격에 대한 반응으로 이러한 활성이 있는 이차대사산물을 생산하게 되나 배양기에서 외부의 자극없이 안전하게 배양된 균사체의 경우는 이런 이차대사산물을 생산할 필요성이 없기 때문에 나타난 결과라 추측된다. 따라서 버섯 균사체를 배양하여 이런 약리작용이 있는 이차대사산물을 대량생산하기 위해서는 배지의 조성을 바꾼다든가 외부의 자극을 가한다든가의 연구를 진행해야 할 것으로 사료된다.

말뚝버섯의 topoisomerase I에 대한 작용

말뚝버섯이 topoisomerase II에 특이하게 작용하는 것이 아니면 saintopin, intoplicine, azailQD^(®)와 같이 topoisomerase II와 I 모두에 작용하는 지를 확인하기 위하여 말뚝버섯의 핵산분획물의 topoisomerase I에 대한 효과를 알아보았다. 대조군으로는 이미 topoisomerase I의 작용을 억제하는 것으로 알려져 그 유도체들이 항암제 치료제로 사용되고 있는 camptothecin을 사용하였다. Topoisomerase I만을 처리하였을 경우에는 topoisomer들이 생성되었으며 억제제인 camptothecin을 처리한 경우는 50 µM의 농도에서 topoisomer들의 생성이 감소하고 open circular DNA의 양이 증가함을 관찰할 수 있었으며(Fig. 6A), 말뚝버섯 핵산분획물 1 µg/mL은 topoisomerase I 작용을 억제하여 topoisomer들의 생성을 감소시켰으며, 10 µg/mL의 농도에서는 더욱 그 작용이 강하여 open circular DNA band가 더 짙어진 것을 확인 할 수 있었으나(Fig. 6B) 배양한 말뚝버섯의 균사체는 topoisomerase I의 작용에도 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다(Fig. 6C).

본 연구에서는 말뚝버섯 핵산층이 topoisomerase II 뿐만아니라 I의 작용을 억제함을 밝혔다. 따라서 말뚝버섯 핵산층에 함유되어 있는 topoisomerase 작용 억제물질의 분리 및 구조 규명을 위한 연구가 현재 수행 중에 있다. 또한, 말뚝버섯의 이러한 작용이 topoisomerase II 및 I에 대한 작용인지 아니면 DNA intercalator로서 작용하는 지를 확인하기 위하여 DNA unwinding study같은 연구와 함께 실제로 암세포주에 작용을 하는 지를 확인하는 연구도 수행되어야 할 것으로 여겨진다.

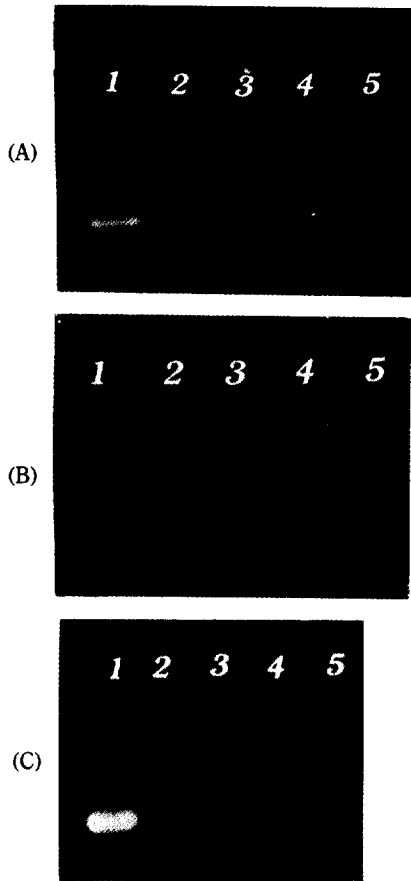


Fig. 6. Effect of hexane fraction of *L. perlatum* on relaxation assay of topoisomerase I. Lane 1: no enzyme control, lane 2: topoisomerase I. A) lane 3-5, 0.5, 5 and 50 μM camptothecin, respectively. B) Lane 3-5, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$ of hexane fraction of *L. perlatum*, respectively. C) Lane 3-5, 1, 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of hexane fraction of cultured *L. perlatum*, respectively.

요 약

26속 32종의 버섯의 topoisomerase II 작용 억제 여부를 검색한 결과 말불버섯이 topoisomerase II 작용을 억제하며 그 유효 성분이 핵산분획물에 존재함을 확인하였다. 말불버섯의 핵산분획물은 linear DNA와 open circular DNA를 생성시켰으며 농도와 반응시간에 의존적인 반응 양상을 나타냈다. 또한 말불버섯의 핵산분획물은 topoisomerase I의 작용도 억제하였다. 그러나 배양한 말불버섯의 균사체는 topoisomerase 작용에 아무런 영향을 미치지 않았다.

문 헌

1. Fujimoto, H., Nakayama, Y. and Yamazaki, M.: Identification of immunosuppressive components of a mushroom, *Lactarius flavidulus*. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 654 (1993)
2. Zhang, J., Wang, G. and Li, H.: Antitumor active protein-containing glycans from the chinese mushroom Songshan Lingzhi, *Ganoderma tsugae mycelium*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1202 (1994)
3. Wang, H.X., Liu, W.K., Ng, T.B., Ooi, VEC and Chang, S.T.: The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom, *Tricholoma mongolicum*. *Immunopharmacology*, **31**, 205 (1996)
4. Ali, NAA, Jansen R., Pilgrim, H., Liberra, K. and Lindquist, U., Hispolon, T.: A yellow pigment from *Inonotus hispidus*. *Phytochemistry*, **41**, 927 (1996)
5. Lee, I., Kim, C., Song, K., Kim, H., Koshino, H., Uramotto, M., and Yoo, I.: Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania Tricuspidata*. *Phytochemistry*, **41**, 213 (1996)
6. Vidari, G., Vita-Finzi, P., Zancocchi, A.M.: A bioactive tetraprenylphenol from *Lactarius lignyotus*. *J. Nat. Prod.*, **58**, 893 (1995)
7. Suffness, M. and Pezzuto, J.M.: Assays related to cancer drug discovery. In *Methods on plant biochemistry*, Academy Press, New York, vol. 6, p.71 (1991)
8. Ray, S., Majumder, H.K., Chakravarty, A.K. and Mukhopadhyay, S.: Amarogentin, a naturally occurring secoiridoid glycosides and a newly recognized inhibitor or topoisomerase I from *Leishmania donovani*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 27 (1996)
9. 이동선, 하상철, 이상용, 김종국, 홍순덕 : 방사선균주 7489가 생산하는 DNA topoisomerase I 저해제에 관한 연구. *산업미생물학회지*, **24**, 101 (1996).
10. Gupta, M., Fujimori, A., Pommier, Y.: Eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1262**, 1 (1995)
11. Wall, M.E. and Wani, M.C.: Camptothecin and taxol: From discovery to clinic. *J. Ethnopharm.*, **51**, 239 (1996)
12. Drlica, K. and Franco, R.J.: Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry*, **27**, 2253 (1988)
13. Lee, K.H. and Wang, H.K.: Antitumor agents 165. Current status of Bioanalysis of etoposide and related compounds. *J. Food Drug. Anal.*, **3**, 209 (1995)
14. Marini, J.C., Miller, K.G., and Englund, P.T.: Decatenation of kinetoplast DNA by topoisomerases. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4976 (1980)
15. Fox, M.E. and Smith, P.J.: Long-term inhibition of DNA synthesis and the persistence of trapped topoisomerase II complexes in determining the toxicity of the antitumor DNA intercalators mAMSA and mitoxantrone. *Cancer Res.*, **50**, 5813 (1990)
16. Jehn U.: New drugs in the treatment of acute and chronic leukaemia: current role of mAMSA. *Bone Marrow Transplant*, **4** (Suppl 3), 53 (1989)
17. Baguley, B.C.: DNA intercalating anti-tumour agents. *Anti-Cancer Drug Des.*, **6**, 1 (1991)
18. Jianzhe, Y., Xiaolan, MAO, Qiming, M.A. Yichen, Z. and Huaan, W.: *Lycoperdon perlatum*. In *Icones of Medicinal Fungi from China*, Science Press, Beijing. p.516 (1987)

(1997년 6월 27일 접수)