

무우자갈버섯 (*Hebeloma crustuliniforme*) 배양 균사체로부터 분리한 단백다당체 분획 HCA의 항암 및 백혈구감소증 억제효과

조경주 · 정경수*

충남대학교 약학대학 미생물면역학교실
(Received July 23, 1999)

Antitumor and Antileukopenic Activity of HCA, the Protein-polysaccharide Fraction of Cultured Mycelia of *Hebeloma crustuliniforme*

Kyung-Joo Cho and Kyeong-Soo Chung*

Laboratory of Microbiology & Immunology, College of Pharmacy, Chung-Nam National University

Abstract — A protein-polysaccharide fraction was isolated from the mycelial culture of a Korean basidiomycetous fungus, *Hebeloma crustuliniforme*, and was named HCA (*Hebeloma crustuliniforme* fraction A). When intraperitoneally injected at 200 mg/kg/day once daily for 10 days, HCA inhibited the growth of sarcoma 180 solid tumor in ICR mice by 65.1% ($p < 0.05$). HCA also exerted protective effect against leukopenia induced by cyclophosphamide with the protection ratio of 39.7% ($p < 0.01$).

Keywords □ *Hebeloma crustuliniforme*, polysaccharide, HCA, antitumor, antileukopenic.

Roland 등¹⁾에 의해 담자균류의 항암효과가 입증된 이후 다양한 담자균류로부터 항암성 다당체 혹은 단백질다당체가 분리 연구되었다. 이들은 뚜렷한 부작용이 없을 뿐만 아니라 항암제의 부작용을 경감시키는 효과도 있어서 암의 치료에 보조적으로 사용될 수 있으며 그 대표적인 예로 표고버섯의 β -glucan인 lentinan,²⁾ 구름버섯의 단백질다당체,³⁻⁶⁾ 치마버섯배양 균사체로부터 분리된 schizophyllan⁷⁾ 그리고 상황버섯(*Phellinus linteus*)⁸⁻¹²⁾ 등의 항암성 단백질다당체 등을 들 수 있다. 그러나 그 동안 연구된 것은 전체 담자균류 중 일부에 지나지 않으며, 특히 우리나라는 기후 조건상 풍부한 야생 담자균류 자원을 갖고 있기 때문에 새로운 검색 방법을 사용한 폭넓은 연구를 수행하면 기존의 것보다 강력하고 효과적인 항암면역요법체의 개발도 가능하리라고 추정된다. 이에 본 연구자 등은 flow cytometry

를 이용하여 영지버섯 생장점 다당체의 항암 면역활성에 관해 연구 보고한 바 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 본보에서는 무우자갈버섯(*Hebeloma crustuliniforme*) 으로부터 균주를 분리하고 이를 배양한 후 그 단백질다당체 분획을 추출하여 항암효과 및 백혈구감소증 억제효과를 밝혔기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

무우자갈버섯의 채집 — 본 연구에 사용한 무우자갈버섯은 충청북도 문동 지역 혼합수림에서 채집하였다. 주로 늦여름부터 가을까지 발생하며, 갈색 포자가 떨어져 하부의 식물이나 어린 자실체 갓 표면을 갈색으로 보이게 하는 특징을 가지고 있다. 국내 각처에 두루 자생하며 독버섯의 하나로 알려져 왔으나 그 독성분은 보고된 바가 없던 중 최근에 본 연구자 등이 그 용혈독성을 최초로 확인하여 보고한 바 있다.¹⁷⁾ 그러나 인공 배양한 균사체에서는 용혈독성이 확인되지 않

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5900 (팩스) 042-823-6566



Fig. 1 - Fructification of *H. crustuliniforme* in a culture flask. The mycelia of the fungus was stock-cultured on potato-dextrose medium for 15 days before fructification.

았다(자료 제시 생략).

균주 분리 및 분리균주의 특징 - 오염되지 않은 자실체로부터 조직 절편을 취하여 감자-포도당-한천배지(potato-dextrose-agar, PDA)에 올려 놓고 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 7일간 배양한 후 조직 절편으로부터 성장해 나온 균사체 선단부를 절취하여 다시 신선한 PDA 평판배지에 이식하고 이로부터 2차로 성장한 균사체를 PDA 사면배지에 이식하여 무우자갈버섯 균주로 사용하였다. 이상의 조작은 모두 clean bench 내에서 무균적으로 시행하였다. 분리된 균주는 PDA 또는 감자-포도당 배지 상에서 15일 정도 정지 배양하면 배양용기 내부에서 자실체를 형성하는 특징이 있다(Fig. 1).

균사체 배양 - 정¹⁸⁾에 의해 이미 보고된 바와 같이 PDA 사면 배지상에 보존 중인 균주를 소량의 담자균 배양용 액체 배지(배지 1 L 당 성분: 포도당 50 g, 펩톤 10 g, yeast extract 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.07 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg, 이하 '액체배지'라 칭함)와 함께 균질화하고 이를 액체배지 50 ml가 담긴 250 ml-플라스크에 약 5 ml씩 접종한 후, 27°C 에서 170 rpm으로 5-7일간 진탕 배양하였다. 얻어진 배양물을 균질화한 후 다시 액체배지

50 ml 당 5 ml씩 접종하고 7일간 진탕 배양하여 균사 배양물을 획득하였다.

단백다당체의 분획의 분리 정제 - 균사배양물을 끓는 수욕상에서 2시간동안 열탕 추출하고 추출 여액을 감압 농축한 후 3배량의 95% EtOH을 가하여 4°C 에 하룻밤 방치하였다. 생성된 침전을 원심분리하여 소량의 증류수에 재용해시킨 후 투석막(molecular cut off: 12,000, Sigma Chemical Co., USA)에 넣고 증류수에 대하여 4°C 에서 7일간 투석을 시행하여 저분자 물질을 제거하였다. 이어서 투석 내용물을 동결 건조하여 수용성 건조 분말을 획득하였다. 이를 HCA (*Hebeloma crustuliniforme* fraction A)라 칭하기로 한다.

다당체 및 단백질 함량 측정 - 다당체 함량은 Norris 등¹⁹⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 포도당을 표준당으로 하여 anthrone 시약과 반응시킨 후 625 nm에서 발색도를 측정하여 정량하였다. 단백질 함량 측정은 Sedmak 등²⁰⁾의 Coomassie brilliant blue를 이용한 발색법에 의거하였으며 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하였다.

실험 동물 - ICR 마우스는 대한실험동물센터로부터 생후 약 4주령의 것을 분양 받아 7일 이상 안정화시킨 후 실험에 사용하였으며 실험 기간 동안 사료와 물은 자유로이 먹게 하고 실온은 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 50%를 유지하였으며 하루에 12시간씩 조명을 시행하였다.

항암 실험 - 본 연구자 등¹³⁾이 이미 보고한 과정에 준하여 암컷 ICR 계 마우스의 서혜부 피하에 이식한 sarcoma 180 암세포에 대하여 항암실험을 시행하였다. 단 암 이식 24일만에 종양 지지 백분율(% tumor inhibition ratio)을 산출하였다.

백혈구 감소증 억제 실험 - 암컷 ICR 계 마우스를 실험동물로 하고 정상 대조군은 생리식염수만을, cyclophosphamide 투여군은 생리식염수 및 cyclophosphamide (75 mg/kg, i.p.)를, 시료 투여군은 HCA (200 mg/kg, i.p.) 만을, 병용 투여군은 HCA 및 cyclophosphamide를 각각 복강내 주사하였다. 투여 일정은 제 1일부터 제 7일까지 시료를 매일 1회 투여되 제 6일에는 시료 및 cyclophosphamide를 투여하고 제 8일에 실험동물의 하지 동맥으로부터 말초혈액을 채취하여 해파린 처리 후 자동 혈액분석기(Coulter JT, Coulter, USA)를 이용하여 분석하였다. 또한 혈액을 채취한 직후 실험동물을 치사시키고 비장을 적출하

여 평량하였다.

결과 및 고찰

HCA의 물리화학적 성상 - 무자갈버섯 배양균사체로부터 분리한 HCA는 중류수나 생리식염수에 잘 녹는 암갈색의 무정형 분말로서 12회 중복 실험 결과 다당체 및 단백질 함량이 각각 평균 42.39%, 28.57%로 확인되었다. 한편 제조 과정 중에 투석을 통하여 분자량 12,000미만의 저분자 물질을 제거하였기 때문에 HCA는 다당체와 단백질이 주성분인 고분자 분획으로 볼 수 있다(Table I). 한편 HCA의 다당체와 단백질의 합이 70.96%에 불과하나 목질진흙버섯의 단백다당체의 경우 68.1%,⁹⁾ 영지버섯 생장점으로부터 분리한 단백다당체 GLB-A 및 GLB-B의 경우 각각 57.3% 및 62.5%인 것¹⁶⁾과 비교할 때 일반적인 범위에 속하는 것으로 보인다. 이처럼 버섯 단백다당체들의 다당체와 단백질 함량을 합한 수치가 100%에 크게 미달하는 것은 혼재할 수 있는 소량의 회분이나 핵산 보다는 주로 분석방법의 한계성 때문으로 사료된다. 일례로 다당체 함량 분석시, 6탄당이나 glycogen, starch,

dextrin, glucan, cellulose 등의 다당류와 이들의 인산 유도체들은 황산 존재하에서 가열할 때 furfural 유도체를 형성하여 anthrone 시약과 반응하여 정량성을 나타내지만 triose tetrose 그리고 hexosamine 등의 amino sugar나 glycerol, mannitol, ribitol 등의 sugar alcohol은 furfural을 형성할 수 없으므로 anthrone과 반응하지 않는다. 또한 pentose는 2~3분 이내에 연두 노랑색을 나타내다가 금방 감소되어 10분간 가열한 이후에는 거의 남지 않으므로 정량할 수 없다.²¹⁾ 이러한 점들을 감안하면 HCA에는 anthron 법으로 적절히 측정되지 않는 다당류 및 다당류 또는 당자균류 자체특이성 다당류가 상당량 함유되어 있을 것으로 추정된다.

항암 효과 - HCA는 ICR 마우스 피하에 이식한 sarcoma 180 고형암에 대해 투여용량 100, 200 및 400 mg/kg에서 각각 종양저지율 62.2%, 64.9% 및 58.9%의 유의적인($p < 0.05$) 항암효과를 나타내었다(Table II). 그러나 항암효과의 농도의존적 경향은 관찰되지 않았다. HCA의 종양저지율이 65%를 상회하지는 못하였으나 이는 항암효과가 널리 인정되고 있는 영지버섯이¹³⁾ 100 mg/kg 및 200 mg/kg에서 각각 56.3% 및 41.6%의 종양저지율을 나타낸 것과, 문 등⁶⁾의 연구에서 구름버섯의 단백다당류 Copolang이 50 mg/kg 및 250 mg/kg의 용량에서 각각 58.79% 및 79.9%의 종양저지율을 나타낸 점 그리고 같은 실험에서 대조약물로 사용한 Krestin이 각각 60.43% 및 70.48%의 종양저지율을 나타낸 점을 감안할 때 HCA의 항암효과는 비교적 양호한 것으로 판정된다. 그러나 보다 비교를 위해서는 다른 버섯들과의 동시 비교실험이 이루어져야만 할 것이다.

백혈구 감소증 억제 효과 - cyclophosphamide는 암의 화학요법에 널리 사용되고 있으나 대표적인 부작용

Table I - Chemical composition of HCA

	% Composition ^a	
	Polysaccharide	Protein
1st exp.	46.64 ± 3.88 ^b	34.50 ± 8.20
2nd exp.	38.14 ± 3.22	22.65 ± 4.88
mean (n ^c =12)	42.39 ± 5.55	28.57 ± 8.98

^a Polysaccharide and protein content was analysed, respectively, by using anthrone reagent and Coomassie brilliant blue as described in Materials and Methods.

^b mean ± S.E.

^c the number of experiments.

Table II - Antitumor activity of HCA^a against sc implanted sarcoma 180 tumor cells^b in ICR mice

Dose (mg/kg)	No. of mice	Body Weight (g)	Spleen Weight (mg)	Tumor Weight ^c (g)	% Tumor Inhibition
-	11	34.2 ± 1.2 ^d	480 ± 40	3.70 ± 0.04	-
100	10	31.1 ± 0.8	390 ± 40	1.41 ± 0.45*	62.2
200	10	31.6 ± 0.6	420 ± 30	1.29 ± 1.29*	64.9
400	10	31.8 ± 0.6	500 ± 40	1.52 ± 0.43*	58.9

^a HCA, a protein-polysaccharide fraction separated from the mycelial culture of *Hebeloma crustuliniforme*, was i.p. injected once daily for 10 consecutive days starting from 24-hr after the tumor implantation

^b 1×10^6 cells of the tumor were s.c. implanted into the left groin of a mouse.

^c The solid tumors were excised and weighted 24-day-after the tumor implantation.

^d mean ± S.D.

* Significantly different from control ($p < 0.05$).

Table III – Protective effect of HCA against cyclophosphamide-induced leukopenia in ICR mice

Group	No. of mice	Body wt. (g)	Spleen wt. (mg)	Leukocyte (10^3 cells/mm ³)
Control	11	25.4 ± 0.5 [†]	174 ± 11	3.136 ± 0.282
HCA [§] (200 mg/kg)	11	26.7 ± 10.6	357 ± 2 ^a	5.378 ± 0.782 ^a
Cyclophosphamide [#] (75 mg/kg)	11	25.2 ± 0.6	118 ± 5 ^a	1.382 ± 0.092 ^a
HCA +Cyclophosphamide	11	25.0 ± 0.6	181 ± 21 ^b	1.930 ± 0.164 ^b

[§] HCA, a protein-polysaccharide fraction separated from the mycelial culture of *Hebeloma crustuliniforme*, was i.p. injected once daily for seven days from day 1 to day 7.

[#] cyclophosphamide was i.p. injected once on day 7.

[†] Each value represents the mean ± S.D.

^a Significantly different from control ($p < 0.01$).

^b Significantly different from the cyclophosphamide group ($p < 0.01$).

의 하나로 골수억제가 나타나게 된다.²²⁾ 특히 마우스에서는 연속 투여로 백혈구감소증을 지속시킬 수 있을 뿐만 아니라 치사율도 낮아서 백혈구감소증 실험 모델로서 cyclophosphamide 투여 마우스를 자주 사용한다.²³⁾ 본 연구에서는 Table III에 나타낸 바와 같이 cyclophosphamide 1회 투여 후 2일 안에 말초혈액을 분석한 결과 백혈구 수치가 1.382×10^3 cells/mm³로 대조군의 3.136×10^3 cells/mm³에 비해 56% 정도 감소하였다($p < 0.01$). 그러나 HCA를 cyclophosphamide 투여 전후에 투여한 실험군은 1.930×10^3 cells/mm³로 cyclophosphamide 단독 투여군보다 백혈구 수치가 유의적($p < 0.01$)으로 높았다. 이는 HCA가 cyclophosphamide로 인한 백혈구 감소를 상당 수준(39.7%) 억제한 것으로 해석된다. 한편 HCA 단독 투여 결과 백혈구 수치가 5.378×10^3 cells/mm³로 나타나 정상 마우스군에 비해 높았으며($p < 0.01$) 이는 HCA가 백혈구 생성 촉진 효과를 발휘하고 있음을 암시한다. 이와 유사한 연구 결과로, 본 연구자 등¹³⁾은 영지버섯 생장점 단백다당체 GLB가 cyclophosphamide 투여로 인한 백혈구감소증을 억제함을 보고한 바 있으며, Tsuzuki 등²⁴⁾은 (1→3)-β-D-glucan인 sonifilan이 conformation에 관계 없이 조혈반응을 촉진하여 cyclophosphamide 단독 투여군 보다 병용투여군의 경우 IL-6 mRNA가 증가됨을 확인하였다. 이외에도 Uchida 등²⁵⁾은 면역증강 물질 bestatin이 cyclophosphamide 투여로 인한 골수억제로부터의 회복을 촉진함을 관찰하였다. 따라서 항암제 투여시 HCA를 병용 투여할 경우 HCA의 항암효과는 물론 항암제로 인한 백혈구감소증의 완화 효과도 기대할 수 있을 것으로 추정된다. 한편 말초혈

액 백혈구 수치에서 관찰된 이러한 경향은 비장 중량에서도 동일하게 관찰되었다. 그러나 HCA 투여군과 정상 대조군은 체중에서 거의 차이를 보이지 않음으로써 HCA가 뚜렷한 면역활성을 지님에도 불구하고 체중감소 등의 현저한 장애는 주지 않는 것으로 판단된다.

결 론

한국산 무우자갈버섯으로부터 균사체를 분리하고 이를 진탕 배양하여 그 배양물로부터 단백다당체 분획 HCA를 분리하였다. HCA는 ICR 마우스에 이식한 sarcoma 180 고형암에 대하여 유의성 있는 항암 효과를 발휘하였고 cyclophosphamide 유도 백혈구 감소증을 효과적으로 억제하였다.

감사의 말씀

이 연구의 일부는 1996년도 충남대학교 약학대학 부설 의약품개발연구소 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 한편 본 연구에 많은 도움을 준 정수현 박사, 오정연 석사와 김진향 석사 및 박소영 학사에게 감사드립니다.

문 헌

- 1) Roland, J. F., Chiniolowicz, Z. F., Weiner, B. A., Gross, A. M., Boening, O. P., Luck, J. V., Bardos, T. J., Reilly, H. C., Sugiura, K., Stock, C. C., Lucas, E. H.,

- Byerrum, R. U. and Stevens, J. A. : Calvacin, a new antitumor agent. *Science* **23**, 1897 (1960).
- 2) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fraction of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**, 2776 (1970).
 - 3) Tsugagoshi, S. and Oh-hashi, F. : Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**, 557 (1974).
 - 4) Usui, S., Urano, M. and Kobayashi, Y. : Effect of PS-K, a protein polysaccharide, on pulmonary metastases of a C3H mouse squamous cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Res.* **56**, 185 (1976).
 - 5) Nomoto, K., Yoshikumi, C., Matsunaga, K., Fujii, T. and Takeja, K. : Restoration of antibody-forming capacities by PS-K in tumor bearing mice. *Gann* **66**, 365 (1975).
 - 6) Moon, C. K., Lee, H. S., Mock, M. S. and Kim, D. O. : Antitumor activity of the polysaccharide fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its effects on the immune function. *Yakhak Hoeji* **31**, 126 (1987).
 - 7) Komatsu, N., Okubo, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S. : Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann*. **60**, 137 (1969).
 - 8) Ikegawa, T., Nakanishi, Y., Uehara, N., Chihara, G. and Fukoka, F. : Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155 (1968).
 - 9) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Han, M. W. and Kim, B. K. : Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji* **38**, 158 (1994).
 - 10) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. W. and Kim, B. K. : Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 336 (1993).
 - 11) Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S. and Yoo, I. D. : B-Lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 2105 (1995).
 - 12) Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. : Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 213 (1996).
 - 13) Chung, K. S., Kim, S. B. and Chung, S. H. : Immunoactivities of the protein-polysaccharides of the tips of the growing carpophores of *Ganoderma lucidum* *Yakhak Hoeji* **41**, 105 (1997).
 - 14) Chung, K. S. and Oh, J. Y. : Protective effect of GLB-A, an acidic protein-polysaccharide fractions of *Ganoderma lucidum*, against UV irradiation. *J. Pharm. Res. (C.N.U.)* **13**, 1 (1997).
 - 15) Oh, J. Y., Cho, K. J., Chung, S. H., Kim, J. H., Lillehoj, H. S. and Chung, K. S. : Activation of macrophages by GLB, a protein-polysaccharide of the growing tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji* **42**, 302 (1998).
 - 16) Oh, J. Y. and Chung, K. S. : Flow cytometrical analysis of the antitumor and immunomodulatory activities of GLB-A and GLB-B, the protein-polysaccharide fractions of the growing tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji* **42**, 487 (1998).
 - 17) Yang, H. J., Chung, S. H., Kim, J. H. and Chung, K. S. : A preliminary screening of 46 Korean basidiomycetes including *Hebeloma crustuliniforme* for their hemolytic activities. *Kor. J. Mycol.* **25**, 253 (1997).
 - 18) Chung, K. S. : Studies on the constituents and cultures of the fungi of Korea : The antitumor components and culture of *Lentinus edodes* (Berk). *Singer. Kor. J. Mycol.* **10**, 33 (1982).
 - 19) Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (Eds.) : *Methods in Microbiology* (Vol. 5B), Academic Press, New York, p. 209 (1971).
 - 20) Sedmak, J. J. and Grossberg, S. E. : A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* **79**, 544 (1977).
 - 21) Norris, J. R. and Ribbons, D. W. (Eds.) : *methods in microbiology* (Vol. 58), Academic Press, New York, p. 265 (1971).
 - 22) Dorr, R. T. and Von Hoff, D. D. (Eds.) : *Cancer Chemotherapy Handbook* 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk. p. 325 (1994).
 - 23) O'Reilly, T., Cleeland, R. and Squires, E. L. :

- Evaluation of antimicrobials in experimental animal infections. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* 4th ed. by V. Lorian (ed.), Williams and Wilkins, Baltimore. p. 644 (1996).
- 24) Tsuzuki, A., Tateishi, T., Ohno, N., Adachi, Y. and Yadomae, T. : Increase of hematopoietic responses by triple or single helical conformer of an antitumor (1→3)- β -D-glucan preparation, Sonifilan, in cyclophosphamide-induced leukopenic mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 101 (1999).
- 25) Uchida, K., Kohi, F., Yorimitsu, S., Takahashi, I., Kitajima, K. and Kimura, I. : Recovery from cyclophosphamide-induced myelosuppression accelerated by bestatin. *Gan To Kagaku Ryoho* **9**, 220 (1982).