

상황버섯 추출물이 정상 마우스와 cyclophosphamide로 처리된 마우스의 체액성 면역기능에 미치는 영향

표명윤* · 현수미 · 양기숙
숙명여자대학교 약학대학

Effects of *Phellinus linteus* Extracts on the Humoral Immune Response in Normal and Cyclophosphamide-treated Mice

Myoung-Yun PYO*, Su-Mi HYUN, and Ki-Sook YANG

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

(Received July 21, 2001; accepted September 11, 2001)

Abstract – *Phellinus linteus* (PL)-hot water extract (PL-W) or- methanol extract (PL-M) was orally administered alone (single dose of 400, 800, 1600 mg/kg; 800 mg/kg/day for 5 days) or with cyclophosphamide (CY, 20 mg/kg, i.p.) to female ICR mice. Within PL alone-treated group, WBC and plaque forming cells (PFC) to SRBC were slightly and significantly enhanced when compared with control group. The relative thymus and spleen weights, WBC and PFC numbers were significantly decreased by the treatment of CY, whereas those values were markedly increased by the concomitant treatment of CY and PL when compared with CY administration alone. To assess the effects of PL and/or CY on the mitogen response of splenocytes to LPS, mouse splenocytes were stimulated with or without LPS in the presence of various concentration of PL and/or CY *in vitro* and splenocytes proliferation (SP) was measured by MTT assay. PL alone increased both SP and LPS-stimulated SP. Moreover, SP and LPS-induced SP suppressed by the treatment of CY alone were significantly restored by PL-treatment. These activities were higher by PL-M than by PL-W. These results indicated that PL was able to increase humoral immunity and to inhibit immunotoxicity induced by CY.

Key words □ *Phellinus linteus*, cyclophosphamide, plaque forming cells, splenocytes proliferation, lipopolysaccharides

최근 환경오염물질, 의약품의 부작용 및 노화로 인하여 유발되는 생체 면역기능의 변화를 조정하여 정상으로 회복시키거나 이러한 변화를 경감시킬 수 있는 생리활성물질 탐색 연구가 활발히 진행되고 있다. Cyclophosphamide(CY)는 알킬화제로 장기이식 후 나타나는 거부반응의 억제 및 악성종양 치료목적으로 사용되고 있는데 비선택적인 독성으로 인하여 암세포 뿐만 아니라 정상세포에도 똑같은 독성을 발현하여 빈혈, 탈모증, 백혈구 감소, 혈소판 감소 등 부작용(Balmer와 Valley, 1992)을 주고 있다. 또한, CY는 동물실험과 임상적인 사용에서 CY의 투여용량과 항원주사와의 관계 등 투여시기의 조건에 따라서는 면역기능을 억제(Diasio 등, 1996)할 뿐만 아니라 항진(Berd 등, 1982; Mastrangelo 등; 1986, Tzai 등, 1996)시킬 수도 있는 면역독성 작용이 강한 물질로 많은 연구에서 보고되어 있다.

따라서 이와같은 부작용이나 면역독성 작용을 경감시킬 수 있는 물질 발굴이 절실히 요구되고 있다.

상황버섯(*Phellinus linteus*)의 자실체 열수 추출물은 소화기 계통의 암에 저지효과(Ikekawa 등, 1968)가 있다고 알려지면서 많은 연구가 진행되어 항암활성(Chung 등, 1994) 및 대장암과 방광암 등의 원인효소인 장내세균 유해효소 저해효과(Kim 등, 1998) 등 상황버섯의 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 상황버섯의 열수 추출물이 B 세포기능을 증가시키고(Oh 등, 1992), 상황버섯에서 추출된 다당체가 체액성 및 세포성 면역반응을 항진시킨다(Kim 등, 1996)는 연구보고도 있어 민간에서 많이 사용되고 있다. 또한, Song 등(1998)은 인공재배 상황버섯과 자연 상황버섯의 자실체 열수추출 다당체의 항보체 활성이 비슷하여 면역활성 측면으로는 인공 상황버섯의 이용가능성이 있다고 보고하였다.

그러므로, 본 연구에서는 상황버섯 추출물이 정상 마우스의 체액성 면역기능과 CY처리로 억제된 체액성 면역기능

*To whom correspondence should be addressed.

을 조절할 수 있는지를 검토하고자, 인공재배 상황버섯 자실체의 열수 또는 메탄올 추출물을 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 단독처리하거나 CY와 병용처리하여 면역장기 무게, 혈액학적 parameter, IgM 용혈반 형성세포수 및 비장세포 증식능을 측정하였다.

실험방법

시약

본 실험에서 사용한 시약은 Sigma 제품인 sodium pyruvate, concanavalin A(ConA), lipopolysaccharides(LPS), 3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium(MTT), trypan blue, Gibco제품인 HBSS medium, sodium bicarbonate, guinea pig complement, RPMI 1640 medium, fetal bovine serum(FBS), HEPES, MEM-nonessential amino acid, antibiotic-antimycotic agent, Coulter 제품인 Isoton T액, Clenz액, Lyze액, 4C Plus 및 Wako제품인 2-mercapto-ethanol 등이며, 그외의 시약은 모두 세포배양용 또는 특급을 사용하였다.

실험동물

3~4주령인 ICR계 암컷 마우스를 유한양행 중앙연구소로부터 분양받아 고형사료와 물을 자유롭게 공급하면서 실험 동물실에 적응시킨 후, 건강상태가 양호한 6~8주령(25±2 g)의 마우스를 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는 21~24°C, 습도는 40~60%로 유지하였고, 조명은 12시간 간격으로 조정하였다.

실험물질 및 추출

실험재료인 상황버섯은 경기도 여주군에 있는 금사상황버섯농원에서 인공재배한 것을 구입하여 사용하였으며, 상황버섯 25 g을 열수 또는 methanol로 4시간동안 추출하는 조작을 4회 반복하고 추출물을 합하여 각각 감압농축하였다. 이를 동결건조하여 얻은 열수 추출물(PL-W)과 methanol 추출물(PL-M)의 수득율은 각각 12.4%와 14.3%이었으며, 실험에 사용할 때까지 냉장 또는 냉동보관하였다. 또한 면역억제제인 cyclophosphamide(CY, Alkylloxan®)는 중외제약(주)에서 구입하여 사용하였다.

실험물질 용액의 제조 및 투여

in vivo 실험에서는 상황버섯의 추출물을 증류수에 용해 또는 현탁시키고, 1회 투여시에는 마우스 체중 kg 당 400, 800, 1600 mg을, 반복 투여시에는 마우스 체중 kg당 800 mg을 매일 1회 연속 5일간 경구투여하였다. Cyclophosphamide(CY)는 투여직전 주사용 생리식염수에 용해하여 20 mg/kg을 복강내에 1회 주사하였으며, 대조군에는 생리식염

수를 동일하게 투여하였다.

in vitro 실험에서는 상황버섯의 추출물을 RPMI-1640 배지액에 현탁시킨 다음, 0.22 µm membrane filter를 사용하여 여과 멸균하고, 실험하고자 하는 농도가 되도록 희석하여 사용하였다.

면역장기무게 측정

실험일에 체중 및 장기무게를 측정하기 위하여 실험일 16시간 전부터 물을 자유롭게 공급하면서 절식시킨 후 체중을 측정하고, 경추탈골로 치사시킨 마우스에서 비장, 흉선을 적출하여 각각의 무게를 실험일의 체중에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

혈액학적 측정

실험군과 대조군의 안정맥총에서 heparinized capillary로 채혈하여 EDTA(K3)가 들어있는 시험관(Sherwood medical)에 취하고 Five roll mixer로 혼합한 후 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), HCT(hematocrit), MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration), PLT(platelet)를 Coulter counter(T-890, Coulter)로 측정하였다. Coulter counter는 사용 전에 4C Plus 액으로 WBC, RBC, HGB, HCT, PLT값을 표준 용액에 맞게 보정한 후 실험동물의 혈액을 분석하였다.

비장세포중의 IgM 용혈반 생성 세포(PFC)수 측정

비장세포의 IgM 용혈반 생성 세포수 (plaque forming cell, PFC)를 측정하기 위한 항원으로 한국유니온랩에서 구입한 면양혈액을 냉장보관하여 3주 이내에 사용하였다. 사용 직전 PBS용액으로 3회 원심세척(2500 rpm, 5 min, 4°C)한 후, 면양적혈구(sheep red blood cell, SRBC) 농도가 2 × 10⁹ cells/ml가 되도록 PBS용액으로 조정하여 이 부유액 0.2 ml(4 × 10⁸ cells)을 면역일(day 0)에 모든 실험동물의 복강내에 주사하였다.

비장세포의 PFC수는 Cunningham의 방법(Cunningham와 Szenberg, 1968)을 약간 변형시킨 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, 비장세포 현탁액은 면역일로부터 4일 후에 모든 실험동물군의 비장을 적출하여 빙냉의 HBSS에 넣고 teflon pestle을 이용하여 100 mesh stainless sieve를 통과시키고 이 세포액에 RBC lysis buffer를 가한 후 원심분리(1000 rpm, 10 min, 4°C)하여 적혈구를 용혈시킨 후 상등액을 제거하였다. 침전된 비장세포에 일정량의 HBSS용액을 가하여 viable cell을 trypan blue exclusion method(Mischell 와 Shiigi, 1980)로 측정하여 1P106 cells/ml의 비장세포 현탁액을 만들었다. SRBC 부유액은 냉장보관된 면양혈액을 사용직전에 HBSS용액으로 3회 원심세척(2500 rpm, 5

min, 4°C)한 후 5×10^9 cells/ml의 농도로 부유시켜 만들었다. SRBC 부유액(5×10^9 cells/ml) 0.5 ml, guinea pig complement 0.3 ml, 10% FBS-HBSS용액 2.0 ml를 혼합한 액 50 μ l와 비장세포 현탁액(1×10^6 cells/ml) 50 μ l를 혼합하여 microchamber에 35 μ l씩 주입하고, vaseline과 paraffin(1:1) 혼합액으로 밀봉하여 37°C에서 1시간 방치한 후 형성되는 용혈반 생성 세포수를 현미경하에서 측정하였다. 측정된 PFC수를 비장세포 10^6 개중의 IgM항체 생성 세포수로 환산하여 나타내었다.

비장세포 증식능 측정

마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 빙냉의 RPMI-1640 배지액에 넣고 teflon pestle을 이용하여 200 mesh stainless sieve를 통과시키고 이 세포액에 RBC lysis buffer를 가하여 원심분리(1000 rpm, 10 min, 4°C)하여 적혈구를 용혈시킨 후 상등액을 제거하였다. 침전된 비장세포에 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지액을 가하여 trypan blue exclusion method로 1×10^6 cells/ml의 비장세포액이 되도록 조정후 96 well plate에 well 당 100 μ l씩 가하였다. 또한 96 well plate의 각 well에서 최종농도가 상황버섯의 열수 추출물(PL-W)과 methanol 추출물(PL-M)은 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml가, CY는 6 mM이 되도록 10% FBS-RPMI 배지액에 녹여 well 당 50 μ l씩 가하고 LPS액(50 μ g/ml) 50 μ l(10 μ g/well)를 가한 후 48시간동안 배양(37°C, 5% CO₂)하였다. 비장세포의 증식정도는 생존세포의 효소작용에 의해 MTT 시약이 환원되어 생성되는 formazan의 양을 측정함으로써 세포독성 연구에 자주 사용되며 ³H-thymidine uptake assay의 결과와 유사한 것으로 보고(Roh 등, 1991)된 MTT assay (Mosmann, 1983; Konic과 Fleischmann, 1990)를 이용하여 측정하였다. 즉, 배양 후 각 well에 MTT용액(5 mg/ml)을 50 μ l씩 (250 μ g/ml) 가하고 4시간 동안 배양한 후에 원심분리(400 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액을 제거하였다. dimethyl sulfoxide(DMSO)원액을 well당 50 μ l씩 가하고 10분 이내에 ELISA reader(Dynatech MR5000)로 흡광도(570 nm)를 측정하였다.

통계학적 처리

각 실험군의 측정값의 평균과 표준편차를 구하고, 대조군과의 차이를 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

면역장기 무게에 미치는 영향

상황버섯의 메탄올 추출물(PL-M)과 열수 추출물(PL-W)

Table I. The relative weight of organ in mice administered *Phellinus linteus* extracts and/or cyclophosphamide

Exp. Group (mg/kg)	Thymus/B.W. (%)	Spleen/B.W. (%)
PL-M		
Control	0.17 ± 0.02	0.64 ± 0.09
PL400	0.19 ± 0.02	0.58 ± 0.08
PL800	0.16 ± 0.03	0.62 ± 0.13
PL1600	0.18 ± 0.05	0.59 ± 0.07
PL800 × 5	0.16 ± 0.09	0.56 ± 0.06
CY20	0.12 ± 0.07*	0.40 ± 0.06*
PL800 × 5 + CY20	0.14 ± 0.05	0.59 ± 0.06
PL-W		
Control	0.21 ± 0.04	0.62 ± 0.11
PL400	0.19 ± 0.04	0.62 ± 0.05
PL800	0.22 ± 0.07	0.62 ± 0.05
PL1600	0.21 ± 0.04	0.61 ± 0.03
PL800 × 5	0.20 ± 0.05	0.61 ± 0.08
CY20	0.15 ± 0.01*	0.34 ± 0.04*
PL800 × 5 + CY20	0.14 ± 0.02	0.39 ± 0.03

Phellinus linteus-methanol extract (PL-M) or -hot water extract (PL-W) was orally administered single (PL400: 400 mg/kg, PL800: 800 mg/kg, PL1600: 1600 mg/kg, day 0) or once a day for 5 days (PL800 5: 800 mg/kg, day -4~day 0) in mice. Cyclophosphamide (CY) was i.p. injected with dose 20 mg/kg on day 0. Mice were sacrificed on day 2 following administration of experimental materials. Each group consists of 3~5 mice. Results are the mean ± S.D. of 3 different experiments. Significant difference from control (*p<0.05).

을 마우스에 단독 또는 cyclophosphamide(CY, 20 mg/kg, i.p., day 0)와 병용으로 1회(400, 800, 1600 mg/kg, day 0) 또는 반복(800 mg/kg/day, 1일 1회 5일간, day -4~day 0)하여 경구적으로 투여한 후 2일째(day 2)에 면역장기 무게를 측정하여 체중에 대한 백분율로 면역장기 무게변화를 나타내었다(Table I). PL-M과 PL-W는 투여일수나 투여용량에 관계없이 흉선과 비장의 중량비(%)가 대조군과 비슷하여 면역장기 무게에 큰 영향을 주지 않았으며, 이는 Kong 등(1991)의 실험 결과와도 유사하였다. 그러나, CY 투여군은 Turk와 Poulter(1972)의 보고와 유사하게 체중에 대한 흉선과 비장의 중량비가 각각의 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05)감소되었고, CY와 PL-M을 반복 병용투여 시(0.59 ± 0.06)에는 CY로 감소된 비장의 중량비(0.40 ± 0.06)가 통계적인 유의성은 없으나 증가되는 현상이 나타나 CY의 면역장기에 대한 독성작용을 다소 감소시키는 경향을 나타내었다.

혈액학적 parameter에 미치는 영향

상황버섯의 메탄올 추출물(PL-M)과 열수 추출물(PL-W)

Table II. The variation in hematological parameter of mice administered *Phellinus linteus* extracts and/or cyclophosphamide

Hematological parameter	Control	PL400	PL800	PL1600	PL800×5	CY	PL800×5+CY
PL-M							
WBC (10 ³ /mm ³)	5.1±1.5	6.7±1.3	7.7±1.5	7.5±1.5	7.1±2.5	3.4±0.2*	5.0±1.4 [#]
RBC (10 ³ /mm ³)	7.7±0.5	7.8±0.4	7.4±0.3	7.5±0.5	7.6±0.4	6.8±0.2	7.1±0.3
HGB (g/dl)	13.7±0.7	13.8±0.6	13.7±0.5	13.7±0.6	13.7±0.4	11.6±1.1	12.5±0.7
HCT (%)	43.6±5.5	43.2±5.6	42.9±5.5	42.0±6.1	43.1±5.0	34.6±1.5	36.3±1.5
MCV (μm ³)	56.7±6.8	55.9±4.9	56.6±5.4	57.0±5.8	57.2±6.4	50.6±2.7	51.0±2.3
MCH (pg)	17.8±0.6	17.9±0.4	18.3±0.5	18.3±0.6	18.1±0.7	16.9±1.8	17.6±0.8
MCHC (g/dl)	31.8±3.8	32.2±3.3	32.2±3.7	32.4±3.8	32.0±3.5	33.4±2.7	34.5±2.0
PLT (10 ³ /mm ³)	954±165	702±185	782±111	840±108	934±239	742±282	1077±109
PL-W							
WBC (10 ³ /mm ³)	6.0±2.7	5.7±2.0	6.4±1.7	5.2±2.0	5.3±1.8	2.9±0.9*	5.1±1.5 [#]
RBC (10 ³ /mm ³)	7.9±0.4	7.5±0.7	7.7±0.4	7.6±0.4	7.4±0.2	7.1±0.4	7.2±0.3
HGB (g/dl)	13.6±0.6	13.2±1.0	13.6±0.3	13.8±0.7	13.4±0.3	12.4±1.3	13.0±0.7
HCT (%)	44.0±4.0	42.2±5.0	42.7±4.7	42.7±3.0	41.2±4.4	39.8±5.8	41.1±5.3
MCV (μm ³)	56.2±6.5	55.5±6.3	55.7±6.8	56.3±6.0	55.5±5.4	55.5±5.7	56.6±6.2
MCH (pg)	17.4±0.8	17.7±1.6	17.8±0.7	18.2±0.5	18.0±0.5	17.3±1.5	17.9±0.8
MCHC (g/dl)	31.2±3.3	31.6±3.8	32.3±3.8	32.6±3.4	32.9±3.7	31.4±2.9	31.8±3.2
PLT (10 ³ /mm ³)	879±328	693±145	788±237	804±185	1049±127	829±267	962±205

See legend to Table I for experimental details. Results are the mean ± S.D. of 3 different experiments. WBC (white blood cell), RBC (red blood cell), HGB (haemoglobin), HCT (hematocrit), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular haemoglobin), MCHC (mean corpuscular haemoglobin concentration), PLT (platelet). Significant difference from control (*p<0.05). Significant difference from CY group ([#]p<0.05).

을 마우스에 단독 또는 cyclophosphamide(CY, 20 mg/kg, i.p., day 0)와 병용으로 1회(400, 800, 1600 mg/kg. day 0) 또는 반복(800 mg/kg/day, 1일 1회 5일간, day -4~day 0)하여 경구적으로 투여한 후 2일째(day 2)에 순환말초혈관내의 혈액학적 성상을 분석한 결과는 Table II와 같다.

본 실험에서 실험물질을 투여하지 않은 대조군의 혈액학적 분석결과는 Guest 등(1991)이 본 실험방법과 동일한 방법으로 분석한 결과와 거의 일치하였다.

백혈구수는 PL-M 투여시에는 투여용량에 관계없이 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었고, PL-W 투여시에는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나, Kong 등(1991)은 흰쥐에 상황 배양 균 사체의 열수 추출물을 15일간 경구투여 후 Coulter counter를 이용하지 않고 다른 방법으로 측정된 혈액검사에서 백혈구수에서만 유의성 없는 증가현상을 보고하였다. CY처리군은 대조군에 비하여 백혈구수가 현저히 유의성있게(p<0.05) 저하되어 Turk와 Poulter(1972)가 보고한 바와 비슷하게 독성이 나타났으며, CY투여로 감소된 백혈구수가 PL-M 또는 PL-W의 반복 병용투여로 CY처리군에 비해 모두 유의성있게(p<0.05) 상승되어 거의 대조군의 수준으로 회복됨을 알 수 있었다. 백혈구 이외의 혈액학적 parameter에서는 상황버섯 추출물의 투여군이나 CY처리군이 모두 대조군과 유

의한 차이를 보이지 않았다.

비장세포종의 IgM 항체 생성 세포수에 미치는 영향

상황버섯 추출물의 1회 투여군에는 항원주사 2일전(day -2)에 400 mg/kg 또는, 800 mg/kg을 마우스에 1회 경구투여하고, 반복 투여군에는 항원주사 2일전까지 800 mg/kg을 5일동안 매일 1회 경구투여하였으며, CY처리군은 CY 20 mg/kg을 항원주사 2일전에 복강내에 주사하였다. IgM항체 생성 세포수는 SRBC로 1차 면역 후 4일째에 최고에 도달하므로(Robert와 Richard, 1966), 항원 주사 후 4일째에 비장세포종의 PFC 수를 측정하였다. 그 결과를 Fig. 1에서 보면, 비장세포 10⁶개당 PFC수는 400 mg/kg의 투여군에서 메탄올 추출물(PL-M)이나 열수 추출물(PL-W) 모두 대조군과 거의 비슷하였으나, 800 mg/kg과 800 mg/kg의 반복 투여군에서는 통계학적인 유의성은 없으나 증가하는 경향을 보였다. CY투여의 경우에는 대조군에 비하여 PFC수가 유의성 있게(p<0.01) 현저히 낮아졌는데 이러한 현상은 이미 알려진 CY의 체액성 면역반응의 저해작용(Lagrange, 1974)이라 볼 수 있다. CY처리군에 PL을 병용투여시에는 감소된 PFC수가 대조군에는 미치지 못하나 CY 처리군에 비해 유의성있게(p<0.05) 증가되어 CY로 인한 체액성 면역반응 저해가 PL을 투여함으로써 감소되었음을 알 수 있었다.

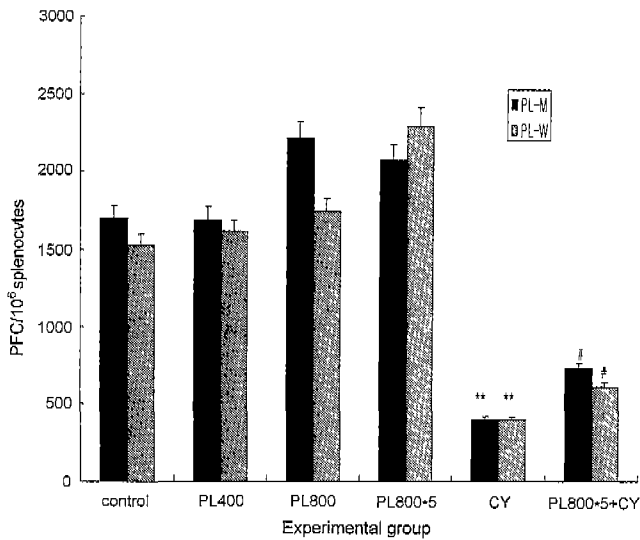


Fig. 1. Plaque forming cells to SRBC in mice administered *Phellinus linteus* and/or cyclophosphamide. *Phellinus linteus*-methanol extract (PL-M) or -hot water extract (PL-W) was orally administered single (400 mg/kg, 800 mg/kg, day -2) or once a day for 5 days (PL800*5; 800 mg/kg/day, day -6~day -2) and cyclophosphamide (CY) was *i.p.* injected with dose 20 mg/kg on day -2. Mice were *i.p.* immunized with SRBC-antigen on day 0 and sacrificed on day 4. Each group consists of 3~5 mice. Results are the mean \pm S.D. of 3 different experiments. Significant difference from control (** $p < 0.01$). Significant difference from CY group (# $p < 0.05$).

비장세포 증식능에 미치는 영향

*In vitro*에서 정상 마우스의 비장세포에 상황버섯의 열수 추출물(PL-W) 및 메탄올 추출물(PL-M)만을 가하여 증식능

을 실험하고, B 세포를 자극하는 LPS mitogen과 상황버섯 추출물을 동시에 처리하여 배양한 후 비장세포의 증식정도를 MTT assay로 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

LPS에 대한 비장세포 증식의 최적조건을 결정하기 위하여 LPS 농도별(25, 50, 100 μ g/ml)로, 배양시간별(24, 48, 72 hr)로 분열능을 예비실험한 결과, LPS 50 μ g/ml의 농도와 48 시간 배양에서 최고의 임파구 분열이 관찰되었다.

Fig. 2A에서는 비장세포에 PL-M만을 농도별로 가하여 2 일간 배양 후 측정된 O.D.값이 PL-M을 가하지 않고 비장 세포만을 배양한 대조군의 O.D.값에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.01$) 농도의존적으로 현저히 증가되었다. 또한, 비장세포에 LPS를 첨가하여 배양한 대조군(Fig. 2B)의 O.D.값이 LPS를 첨가하지 않은 비장세포만을 배양한 대조군(Fig. 2A) 보다 높아 LPS에 의해 비장세포 증식이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. PL-M과 LPS를 가하고 배양후 측정된 O.D.를 비장세포에 LPS만을 배양한 대조군의 O.D.와 비교해 보면 모든 농도에서 유의성 있게 ($p < 0.01$) 현저하게 증가되었다. 열수 추출물의 실험결과에서는 고농도에서 이러한 현상을 보이기는 하였으나 그 작용이 현저히 낮게 나타났다. 이러한 실험결과로 상황버섯의 추출물은 그 자체가 비장세포를 자극하여 증식을 증가시키고, LPS로 유도되는 비장세포 증식에도 작용하는 것으로 추측이 되며, 이러한 작용은 메탄올 추출물에서 더욱 뚜렷함을 알 수 있었다.

상황버섯의 열수 추출물 및 메탄올 추출물이 CY로 억제되는 비장세포 증식능에 영향을 미치는지를 실험하기 위하여 *in vitro*에서 CY와 상황버섯의 추출물을 혼합배양 후 마우스 비장세포 증식능을 MTT assay로 실험한 결과는

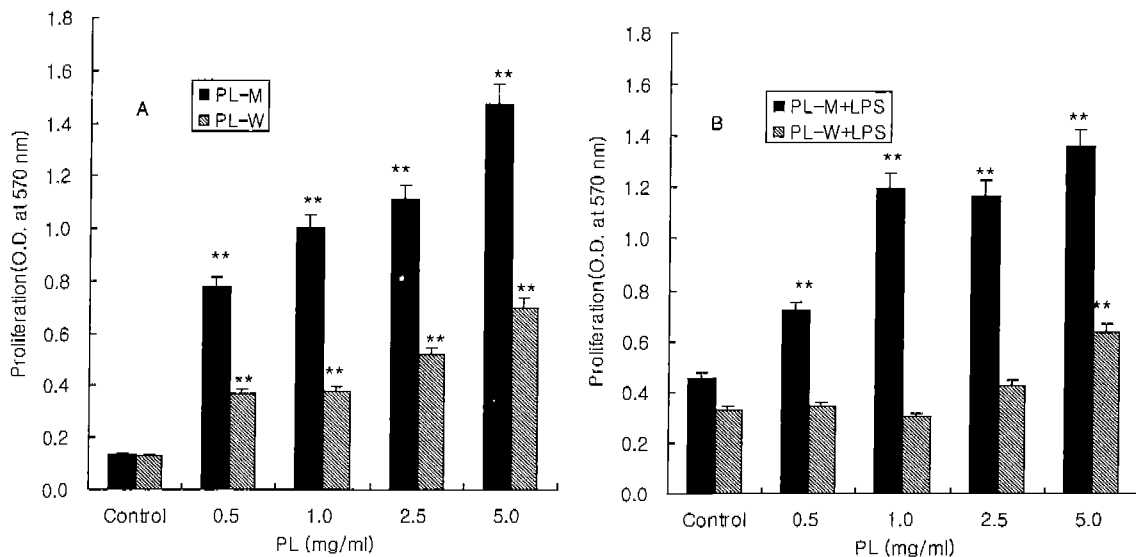


Fig. 2. Effect of PL on the proliferation of mouse splenocytes *in vitro*. Mouse splenocytes (1×10^6 cells/ml) were stimulated without(A) or with(B) LPS (50 μ g/ml) in the presence of various concentration of *Phellinus linteus* (PL)-methanol extracts (PL-M) for -hot water extracts (PL-W) for 48 hrs. Splenocytes proliferation was assessed by MTT assay. Results are the mean \pm S.D. of 4 different experiments and all experiments were done in triplicate. Significant difference from control (** $p < 0.01$).

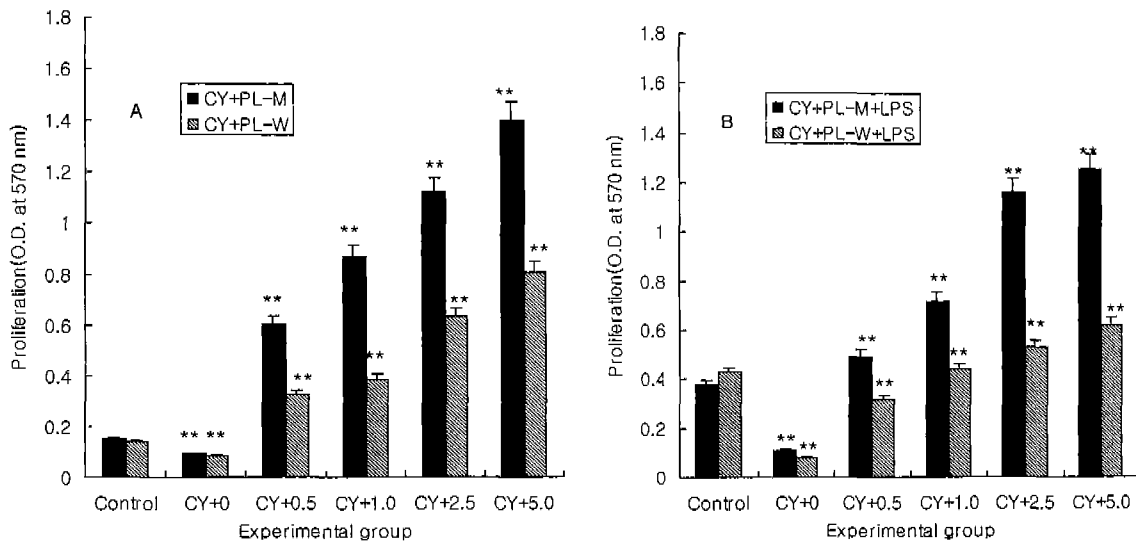


Fig. 3. Effect of PL and CY on the proliferation of mouse splenocytes *in vitro*. Mouse splenocytes (1×10^6 cells/ml) were stimulated without(A) or with(B) LPS (50 μ g/ml) in the presence of various concentrations (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/ml) of *Phellinus linteus* (PL)-methanol extracts (PL-M) or -hot water extract (PL-W) and CY (6 mM/well) for 48 hrs. Splenocytes proliferation was assessed by MTT assay. Results are the mean \pm S.D. of 4 different experiments and all experiments were done in triplicate. Significant difference from control (** $p < 0.01$).

Fig. 3에 나타낸 바와 같다.

Fig. 3A에서는 마우스 비장세포에 CY를 가하고 배양후 측정된 O.D가 비장세포만을 배양한 대조군의 O.D.보다 유의성있게 조금 낮아져 약간의 세포독성이 나타났으나, CY와 PL-M을 혼합배양후 관찰된 O.D.는 Fig. 2A에서 관찰된 바와 같이 PL-M의 농도에 의존적으로 유의성 있게 증가되었다. 또한, Fig. 3B에서 보면 비장세포에 LPS와 CY를 가하여 배양후 측정된 O.D.를 비장세포에 LPS만을 가한 대조군의 O.D.와 비교해 보면 현저히 유의성 있게 감소되어 LPS로 유도되는 임파구 증식능이 CY로 인하여 억제되는 것이 확인되었다. PL-M이 이와같은 CY의 마우스의 비장세포 증식능 억제를 경감시키는지 알아보기 위하여 비장세포에 LPS와 CY 및 PL-M을 혼합배양 후 측정된 O.D.는 PL-M을 병용처리하지 않은 CY군의 O.D.와 비교해 보면 PL-M의 모든 농도에서 유의성있게 현저히 증가되었다. 열수 추출물에서도 메탄올 추출물의 효과와 비슷하게 나타났으나 메탄올 추출물에 비하여 그 작용이 낮았다. 이와 같은 본 연구의 결과로 상황버섯의 추출물은 LPS로 유도되는 비장세포 증식능을 억제하는 CY의 면역독성을 경감시킬 수 있는 것으로 사료되어 더욱 많은 연구가 진행되어야 할 필요가 있다.

결 론

재배 상황버섯 자실체의 열수 추출물(PL-W) 또는 메탄올 추출물(PL-M)을 농도별로 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 단독 처리하거나 CY와 병용처리하여 면역병리, IgM 용혈반 형

성세포수(PFC), 비장세포 증식능을 측정하여 상황버섯의 추출물이 정상 마우스와 CY 처리로 억제되는 체액성 면역기능에 미치는 영향을 알아보았다.

PL-M 또는 PL-W를 마우스에 단독 또는 CY(20 mg/kg)와 병용으로 1회(400, 800, 1600 mg/kg) 또는 반복(800 mg/kg/day, 5일간)하여 경구적으로 투여한 후 면역장기 무게변화, 혈액학적 변화 및 SRBC에 대한 IgM PFC수를 측정한 결과, PL-M을 단독 투여시에는 대조군에 비하여 백혈구수는 다소 증가되는 경향이 보였으나 면역장기 무게와 다른 혈액학적 성상에는 별 변화가 없었고, PFC 수는 증가되었다. CY 투여로 감소된 비장의 중량비, 백혈구수 및 PFC수가 상황버섯 추출물의 반복 병용투여로 상승되었으며, 이러한 효과는 PL-M에서 더 뚜렷이 나타났다.

PL-M 또는 PL-W를 *in vitro*에서 농도별로 단독 또는 CY와 혼합처리하여 배양후 마우스 비장세포 증식능을 MTT assay로 측정한 결과, 상황버섯의 추출물은 비장세포 증식과 LPS로 유도되는 비장세포 증식을 증가시켰으며, CY의 비장세포 증식 억제를 감소시키고, 이러한 작용은 메탄올 추출물에서 더욱 뚜렷함을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과, 상황버섯의 추출물은 마우스의 체액성 면역기능을 증가시키고 CY와 병용투여로 체액성 면역기능을 억제하는 CY의 면역독성을 경감시킬 수 있는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부의 여자대학교 연구기반 확충사업

의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Balmer, C. and Valley, A.W. (1992). Basic principles of cancer treatment and cancer chemotherapy. In Pharmacotherapy (J. T. Dipiro et al, Ed.), pp. 1902-1904. Elsevier, New York.
- Berd, D., Mastrangelo, M. J., Engstrom, P. F., Paul, A., Maguire, H. (1982). Augmentation of the human immune response by cyclophosphamide. *Cancer Res.* **42**, 4862-4866.
- Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y. and Han, M. W. (1994). Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji* **38**(2), 158-165.
- Cunningham, A. and Szenberg, A. (1968). Ruther improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *J. Immunol.* **14**, 599- 601.
- Diasio, R. B., Lo Buglio, A. F. (1996). Immunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants. In: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (J. G. Hardman et al, Ed.), pp. 1291-1308, MacGraw-Hill, New York.
- Guest, T., Paik, N. W., Ryu, J. C., Park, J. S. and Chang, I. M. (1991). Hematological value in normal laboratory mice (ICR and ddY strains). *Kor. J. Toxicol.* **7**(1), 47-50.
- Ikekawa, T., Nakanish, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. (1968). Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155-157.
- Kim, D. H., Choi, H. J. and Bae, E. A. (1998). Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal α -glucosidases. *J. Fd. Hyg. Safety* **13**(1), 20-23.
- Kim, H. M., Han, S. B., Oh, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong, N. D. and Yoo, I. D. (1996). Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmac.* **18**(5), 295-303.
- Kong, Y. Y., Lee, K. K., Nam, S. Y. and Hong, N. D. (1991). Experimental studies on activity of the cultivated mycelia of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Pharmacogn.* **22**(4), 233-239.
- Konic, V. and Fleischmann, J. W. R. (1990). A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol Methods* **129**, 23-30.
- Lagrange, P. H., Mackanness, G. B. and Miller, T. E. (1974). Potentiation of T cell-mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. *J. Exp. Med.* **139**, 1529-1539.
- Mastrangelo, M. J., Berd, D., Maguire, H. J. (1986). The immunoaugmenting effects of cancer chemotherapeutic agents. *Semin Oncol.* **13**, 186-194.
- Mishell, B. B. and Shiigi, S. M. (1980). Preparation of mouse cell suspensions. In *Selected methos in cellular immunology* (B. B. Mishell and S. M. Shiigi, Ed.), pp. 1-27. Freeman, San Francisco.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunolo. Methods* **65**, 55-63.
- Oh, G. T., Han, S. B., Kim, H. M., Han, M. W. and Yoo, I. D. (1992). Immunostimulating activity of *Phellinus linteus* extracts to B-lymphocyte. *Arch. Pharm. Res.* **15**(4), 379-381.
- Robert, I. and Richard, W. (1966). Immunization of normal mouse spleen cell suspensions *in vitro*. *Science* **153**, 1004-1005.
- Roh, J. K., Chung, H. C., Koh, E. H., Lee, W. Y., Hahn, J. S. and Kim, B. S. (1991). *In vitro* cytotoxicity of various anticancer drugs to short-term cultured gastric adenocarcinoma cell lines, *J. of Korean Cancer Association* **23**(3), 495-516.
- Song, C. H., Ra, K. S., Yang, B. K. and Jeon, Y. J. (1998). Immuno-stimulating activity of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* **26**(1), 86-90.
- Turk, J. L. and Poulter, L. W. (1972). Selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Clin. exp. Immunol.* **10**, 285-296.
- Tzai, T. S., Lin, J. S., Chow, N. H. (1996). Modulation of antitumor immunity of tumor-bearing mice with low-dose cyclophosphamide. *J. Surg. Res.* **65**, 139-144.