

## 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)에서 추출한 조다당류의 면역 활성 및 항암 효과

심성미 · 임경환 · 김정완 · 이우윤 · 김하월<sup>1</sup> · 이민웅<sup>2</sup> · 이태수\*

인천대학교 생물학과, <sup>1</sup>서울시립대학교 생명과학과, <sup>2</sup>동국대학교 응용생물학과

### The Immuno-Modulatory and Antitumor Effects of Crude Polysaccharides Extracted from *Daedaleopsis tricolor*

Sung-Mi Shim, Kyung-Hoan Im, Jung-Wan Kim, U-Youn Lee, Ha-Won Kim<sup>1</sup>,  
Min-Woong Lee<sup>2</sup> and Tae-Soo Lee\*

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

<sup>1</sup>Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

<sup>2</sup>Department of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

(Received October 25, 2003)

**ABSTRACT:** Neutral salt soluble [0.9% NaCl (Fr. NaCl)], hot water soluble (Fr. HW) and methanol soluble (Fr. MeOH) materials were extracted from *Daedaleopsis tricolor*. *In vitro* cytotoxicity tests, Fr. HW was not cytotoxic against cancer cell lines such as Sarcoma 180, HepG2 and HT-29 at the concentration of 0~2,000 µg/ml, while Fr. NaCl and Fr. MeOH were cytotoxic to the cell lines. Intraperitoneal injection with Fr. NaCl showed antitumor effect with life prolongation of 77.4% in mice inoculated with Sarcoma 180. Fr. NaCl and Fr. HW improved proliferation of spleen cells and the immunopotentiation activity of B lymphocyte by increasing spleen cells and the alkaline phosphatase activity by 1.7~2.4 and 2.2~8.7 folds, respectively. Fr. NaCl generated 90 µM of nitric oxide (NO) when cultured with RAW 264.7 at the concentration of 50 µg/ml, while lipopolysaccharide, a positive control, produced 79 µM. Intraperitoneal injection with Fr. NaCl (50 mg/kg body weight) increased the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes by 10 folds and two folds, respectively, than in the control group. The antitumor effect of *D. tricolor* was likely due to immunopotentiation activity.

**KEYWORDS:** Antitumor, Crude polysaccharides, *Daedaleopsis tricolor*, Immuno-modulatory effect

삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*(Bull. ex Fr.) Bond. et Sing.)은 여름부터 가을까지 활엽수의 고목, 마른 가지 및 줄기 위에 기와 모양으로 군생하는 갈색의 목재 부후성 버섯으로 한국, 일본, 중국, 유럽 및 북아메리카에 분포하며 항종양과 항 aldehydeoxidase 작용 및 superoxidizedismutase의 활성을 증가시키는 효과가 알려져 있다(박 등, 1998).

버섯의 항암 성분에 관한 연구는 1960년 Roland 등이 큰말징버섯(*Calvatia gigantea*)으로부터 calvacin을 분리함을 시작으로, 표고(*Lentinus edodes*)의 자실체로부터 lentinan(Chihara *et al.*, 1970)을, 치마버섯(*Schizophyllum commune*)의 배양액으로부터 schizophyllan(Komatsu *et al.*, 1969)을, 구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 배양균사로부터 PSK[krestin(Tsugagoshi *et al.*, 1974)]를 분리하였고 이들은 현재 의약용으로 상용화되어 있다. 버섯의 항암 성분을 분리하고 화학 조성을 밝히는 연구가 많이 진행되면서 이들 성분들이 주로 산 가수분해에 의해 D-glucose

를 생성하는 β-D-glucan임이 밝혀졌다(Whistler *et al.*, 1976; 水野 卓., 1992).

항암 활성능을 가진 버섯 유래의 고분자 다당류는 암세포에 직접 작용하기보다는 숙주의 보체(complement)와 대식세포(macrophage)를 활성화시켜 면역기능을 촉진함으로써 암세포의 생물학적 반응을 변화시켜 치료 효과를 나타내므로 독성 및 부작용이 거의 없다는 장점을 갖고 있다(Sugihara *et al.*, 1972). Suzuki 등(1982)은 schizophyllan이 숙주의 대식세포와 T 임파구 등의 활성에 영향을 미치는 것임을 밝혔고, Kishida 등(1989)은 풀버섯(*Volvariella volvacea*)의 자실체에서 분리한 다당체인 항암 성분 VVG가 숙주의 보체계, 대식세포, 항체, T 임파구 및 NK 세포 등의 체액성 면역과 세포성 면역에 영향을 주어 현저히 저하된 면역 활성을 증강시킴으로서 항암 효과를 나타낸다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 삼색도장버섯으로부터 중성염용액(0.9% NaCl), 80% 메탄올 및 열수로 추출한 성분을 이용하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 항암능 및 면역조절능에 대한 실험을 수행하였다.

\*Corresponding author <E-mail: pdyma@daum.net>

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)은 2002년 10월에 인천광역시 인천대공원에서 신선한 자실체를 채집해 균(IUM00782)을 분리한 후 50°C 건조기에서 24시간 동안 건조시키고 분쇄하여 실험에 사용하였다.

### 성분의 추출 및 분리

조 등(1995)의 방법에 따라 중성염용액(0.9% NaCl), 80% 메탄올 및 열수로 추출하였으며, 추출한 물질은 각각 수율을 조사하였다.

분쇄한 자실체 500 g을 80% 메탄올 용액에 침지하여 48시간 동안 상온에서 추출한 후, 메탄올 추출물을 여과한 다음 감압 농축하고 동결건조하여 메탄올 추출물(Fr. MeOH)을 얻었다. 메탄올 추출물을 제거하고 남은 자실체에 0.9% NaCl 용액을 2 l 첨가하여 24시간 동안 침지시켜 2회 반복 추출하였다. 이 추출물을 여과한 다음 동결건조하고 300 ml의 3차 증류수를 가하여 용해시킨 후 투석막을 사용하여 4°C에서 48시간 동안 투석하였다. 투석막 내 액에 4배 용량의 에탄올을 가한 뒤 4°C에서 24시간 동안 정치시킨 후 원심 분리하여 침전물을 얻었고 이 침전물은 증류수 300 ml로 용해시켜 위의 방법으로 재투석하고 동결건조하여 중성염용액 추출물(Fr. NaCl)을 얻었다. 중성염용액으로 추출한 후 회수한 자실체에 3차 증류수 5 l를 첨가하여 95°C에서 10시간 동안 추출하였다. 추

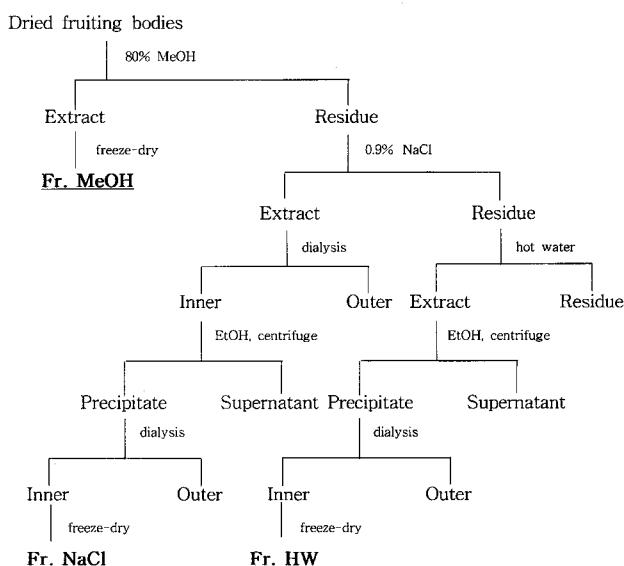


Fig. 1. The extraction procedures to obtain crude extracts from *Daedaleopsis tricolor*. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol.

출액에 4배의 에탄올을 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 정치시킨 후 원심 분리하였다. 침전물은 3차 증류수 500 ml에 용해시켜 4°C에서 48시간 동안 투석한 후 투석막 내 액을 동결건조하여 실험에 사용한 열수 추출물(Fr. HW)을 얻었다(Fig. 1).

### 항암 효과

**암세포에 대한 세포독성:** 실험에 사용한 세포주는 정상세포로는 마우스 섬유아세포 NIH3T3, 암세포로는 인간 간암세포 HepG2, 인간 대장암세포 HT-29 및 마우스 육종암세포 Sarcoma 180을 사용하였으며, 세포독성 실험은 Denizot 등(1986)의 방법에 따라 수행하였다. HepG2, HT-29와 NIH3T3 세포는  $1 \times 10^5$  cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 주입한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 조정한 후 100  $\mu\text{l}$ 씩 세포에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하고, 5 mg/ml의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) solution을 10  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 dimethylsulfoxide(DMSO) 100  $\mu\text{l}$ 로 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Sarcoma 180은  $2 \times 10^5$  cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 50  $\mu\text{l}$ 씩 주입하고 각 추출물의 최종 농도를 10~2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 암세포에 처리하여 최종 용적이 100  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis(2-methoxyl-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT) solution 당 25  $\mu\text{M}$  phenazine methosulfate가 포함된 용액을 well 당 30  $\mu\text{l}$ 씩 처리하여 암 조건에서 2시간 배양한 후 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였고, 50% inhibition concentration(IC<sub>50</sub>)은 실험군이 대조군에 비해 생존율이 50% 감소하는 값을 의미한다.

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

T : 실험군의 평균 흡광도

C : 대조군의 평균 흡광도

**Sarcoma 180에 대한 항암 실험:** Sarcoma 180을  $5 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 부유시켜 0.2 ml(1  $\times 10^6$  cells/mouse) ICR 마우스의 복강에 이식하여 복수암을 유발시키고 Sarcoma 180을 이식한 24시간 후부터 20 mg/kg body weight<sup>2</sup>의 추출물을 생리식염수에 용해시켜 0.22  $\mu\text{m}$ 의 membrane filter로 여과시킨 후 각각의 추출물을 매일 1회 10일간 복강 내에 0.2 ml씩 투여하였다. 대조

군에는 같은 기간, 동량의 생리식염수를 투여하였으며, Sarcoma 180 죄종 투여 후 32일까지 관찰하여 평균 수명 일수를 계산하고 다음 식으로 increase of life span(ILS)을 계산하여 암세포의 성장 억제 효과를 평가하였다.

$$ILS = (T - C/C) \times 100$$

T : 실험군의 평균 수명 (일)

C : 대조군의 평균 수명 (일)

### 면역 활성 효과

**비장세포의 증식능:** 20~25 g의 ICR 계열 웅성 마우스로부터 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망 위에서 분쇄하고 이 세포 부유액에 2배 부피의 lymphocyte separation medium을 첨가하여 원심분리하였다. 단핵 세포층만 조심스럽게 취하여 3회 세척한 후 세포수가  $2 \times 10^5$  cells/ml이 되도록 조정하여 96 well microtiter plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 50, 200, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 희석한 각각 추출물과 양성 대조군으로 5, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 lipopolysaccharide(LPS)를 100  $\mu\text{l}$ 씩 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양한 후, 위의 MTT법과 동일한 방법으로 처리한 다음 흡광도를 측정하였다(Mossman, 1983).

**마우스의 B 입파구 활성화에 미치는 영향:** Ohno 등(1986)의 방법을 수정하여 실시하였다. 준비된 비장세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 조정하여 well 당 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 50, 200, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 추출물과 양성 대조군으로 5, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS를 가함으로써 최종 부피가 200  $\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양한 후, 세포 배양액을 원심분리하고 침전물에 1 mM MgCl<sub>2</sub>를 포함한 50 mM sodium carbonate buffer(pH 9.0)에 1 mg/ml이 되도록  $\rho$ -nitrophenyl phosphate를 첨가한 용액을 100  $\mu\text{l}$ 씩 가한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 반응시켰다. 냉동의 0.3 N NaOH 용액 50  $\mu\text{l}$ 를 가하여 반응을 종결시킨 후 ELISA plate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음 식에 따라 계산하였다.

### Alkaline phosphatase activity

$$(\rho - \text{nitrophenol } \mu\text{mol}/1 \times 10^5 \text{ lymphocytes}/60 \text{ mins}) \\ = 1.15 \times \text{optical density at } 405 \text{ nm}$$

**대식세포의 활성화에 미치는 영향:** 마우스 대식세포 주인 RAW 264.7을 96 well microtiter plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 추출물의 최종 농도가 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 세포주에 첨가하였으며, 양성 대조군으로 LPS를 1, 10, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가하였다. 각 농도의 추출물을 첨가한 실험군과 양성 대조군은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양한 후, 10%가 되도록 FBS를 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

배양 상등액 100  $\mu\text{l}$ 에 100  $\mu\text{l}$ 의 Griess reagent(50  $\mu\text{l}$  of 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 50  $\mu\text{l}$  of 0.2% N-naphthylethylenediamine 2HCl)를 첨가하고 10분간 실온에서 방지한 후 ELISA plate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide(NO)의 대사체인 nitrite의 농도는 sodium nitrite의 검량선으로부터 계산하였다(Choi et al., 1993).

**총 복강세포 수에 미치는 영향:** 6주령의 ICR 웅성 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 장기 중량에 미치는 영향:** 6주령의 ICR 웅성 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 심장체혈한 혈액을 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

삼색도장버섯의 추출 방법에 따른 각 추출물의 수득율을 비교하였을 때 중성염용액 추출물과 열수 추출물은 각각 0.43%와 0.95%의 수득율을 나타냈으며 메탄올 추출물은 2.73%로 가장 높은 수득율을 나타내었다(Table 1).

#### 항암효과

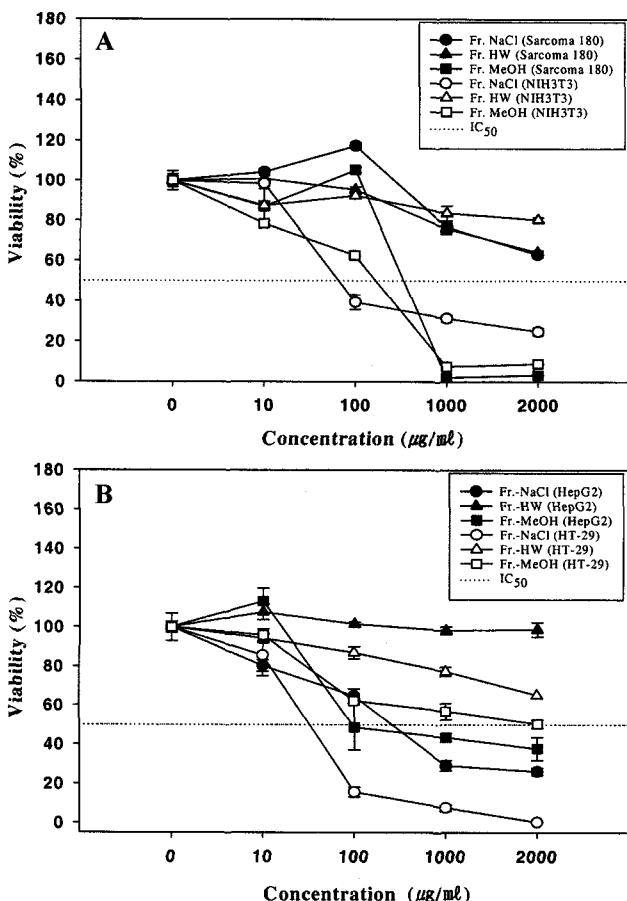
**암세포에 대한 세포독성:** 시험관에서의 실험에 사용된 암세포주에 대한 버섯 추출물의 직접적인 독성을 확인

**Table 1.** Recovery rate of crude extracts from *Daedaleopsis tricolor* by various extraction methods

Fraction <sup>a</sup>	Weight of the used mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery rate <sup>b</sup> (%)
Fr. NaCl	500	2.17	0.43
Fr. HW	500	4.75	0.95
Fr. MeOH	500	13.65	2.73

<sup>a</sup>Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water, Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol.

<sup>b</sup>Recovery rate (%) = [Weight of extract (g)/Weight of the used mushroom (g)] × 100.



**Fig. 2.** *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from *Daedaleopsis tricolor* against (A) Sarcoma 180 and NIH3T3, (B) HepG2 and HT-29. Cytotoxicity was measured after 48 hours of incubation. Concentration of cells was  $1 \times 10^4$  cells/well. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. IC<sub>50</sub> means 50% inhibition concentration.

한 결과(Fig. 2), 열수 추출물들은 0~2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 정상세포와 암세포에 대한 직접적인 독성을 나타내지 않았으나, 중성염용액 추출물은 NIH3T3와 HT-29에 대해 다소 낮은 농도인 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 농도에서 독성을 나타내었다. 메탄올 추출물은 특히, 마우스 육종암세포인 Sarcoma 180에 대해서 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 50% 이하의 세포 생존율을 나타내었다.

**생명 연장 효과:** 각 버섯 추출물이 생체에서 마우스 육종암세포인 Sarcoma 180에 미치는 효과를 분석한 결과 (Table 2), 대조군의 평균 생존 일수는 15.5일이었으며 중성염용액 추출물을 투여한 실험군의 평균 생존 일수는 27.5일로 77.4%의 매우 높은 생명 연장 효과를 나타내었다.

담자균류에서 분리한 다당체가 Sarcoma 180에 대해 높은 항암력을 나타낸다는 연구 결과는 이미 많이 보고된

**Table 2.** Effect of crude extracts from *Daedaleopsis tricolor* on the life span of ICR mice inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection<sup>a</sup>)

Group <sup>b</sup>	Dose (mg/kg body weight)	Survival days <sup>c</sup>	ILS (%) <sup>d</sup>
Control	0	15.5±0.00	—
Fr. NaCl	20	27.5±1.79	77.4
Fr. HW	20	15.5±6.08	0.0
Fr. MeOH	20	16.5±2.48	6.5

<sup>a</sup>i.p. injection; intraperitoneal injection.

<sup>b</sup>Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water, Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol.

Each experimental group consisted of 8 mice.

<sup>c</sup>Survival days of each animal in experimental group were counted individually and the mean survival days (M±S.E.; mean±standard error) of each group were calculated.

<sup>d</sup>ILS; Increase of life span.

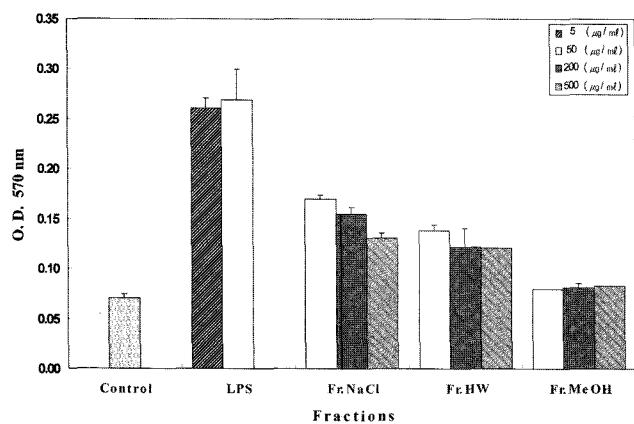
바 있고(Chihara *et al.*, 1969; Komatsu *et al.*, 1969; Tsugagoshi *et al.*, 1974), 본 실험의 삼색도장버섯 중성염용액 추출물 또한 Sarcoma 180 복수암에 대해 항암효과를 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 위의 세포독성 실험 결과와 비교하였을 때 Sarcoma 180 세포의 중식 억제 효과보다는 면역 활성 증가에 의한 것으로 판단된다.

### 면역 활성 효과

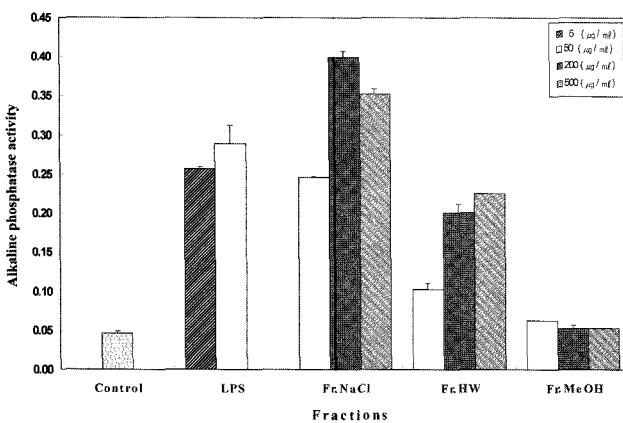
**비장 세포의 중식능:** 각각의 버섯 추출물에 의한 비장세포의 중식에 대한 영향은 중성염용액 추출물과 열수 추출물이 50~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군보다 약 1.7~2.4배의 높은 중식능을 나타내었고 양성대조군으로 사용된 LPS는 5~50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 3.7배의 중식능을 나타내었다(Fig. 3).

**마우스 B 임파구 활성화에 미치는 영향:** B 임파구 활성 시 분비되는 alkaline phosphatase의 양을 측정한 결과 (Fig. 4), 중성염용액 추출물과 열수 추출물이 50~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 각 농도에서 대조군의 alkaline phosphatase에 비해 2.2~8.7배 높은 활성을 나타내었고, 특히 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 삼색도장버섯의 중성염용액 추출물은 양성 대조군인 LPS의 alkaline phosphatase 활성과 유사한 수치를 보였다.

B 임파구는 B cell mitogen에 의해 직접적으로 자극 받거나, T cell mitogen에 의한 임포카인(lymphokine)에 의해 간접적으로 자극받음으로써 B 임포아구가 형성되는 경우에 alkaline phosphatase가 활성화된다(Ohno *et al.*, 1986). 본 실험의 중성염용액 추출물과 열수 추출물은 비장세포 중식과 특히 비장세포 내의 B 임파구의 alkaline phosphatase 활성에 효과를 나타내는 것으로 사료되며 이는 잣버섯 균사체로부터의 열수 추출물인 lepidan이 비장세포에 작용하여 대조군에 비해 10배 이상의 비장세포 중식능과 alkaline phosphatase의 활성을 나타낸 보고(진,



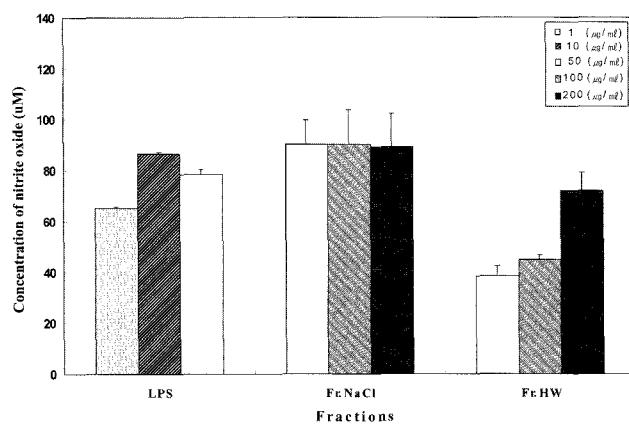
**Fig. 3.** Effect of fractions extracted from *Daedaleopsis tricolor* on proliferation of murine spleen cells. Concentration of spleen cells was  $2 \times 10^5$  cells/ml. Proliferation of murine spleen cells was measured after 48 hours of incubation by MTT method. Fr. NaCl fraction was extracted with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



**Fig. 4.** Effect of fractions extracted from *Daedaleopsis tricolor* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows : Alkaline phosphatase activity ( $\rho$ -nitrophenol  $\mu\text{mol}/1 \times 10^5$  lymphocytes/60 mins) =  $1.15 \times$  optical density at 405 nm. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. Fr. MeOH fraction was extracted with 80% methanol. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

1996)와 유사한 결과를 나타내었다.

**대식세포의 활성화에 미치는 영향:** 위 실험에서 효과를 나타낸 중성염용액 추출물과 열수 추출물의 대식세포의 활성화 효과를 조사한 결과(Fig. 5), 대조군의 RAW 264.7에 의해 발생된 nitric oxide(NO) 농도가  $2 \mu\text{M}$ 인 것에 비해 삼색도장버섯의 중성염용액 추출물과 열수 추출



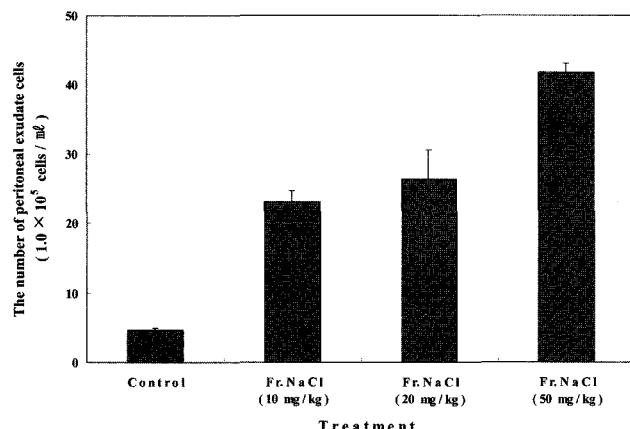
**Fig. 5.** Effect of fractions extracted from *Daedaleopsis tricolor* on nitrite oxide production in RAW 264.7. Concentration of RAW 264.7 cell was  $1 \times 10^6$  cells/ml. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

물을  $50\sim200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 대식세포주는  $38\sim98 \mu\text{M}$ 의 NO를 발생시켰다. 특히, 중성염용액 추출물은  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 양성대조군인 LPS에 의해 생성된  $79 \mu\text{M}$ 의 nitric oxide 농도에 비해 다소 높은  $90 \mu\text{M}$  농도의 NO를 생성하였다.

활성화된 대식세포만이 분비한다고 알려진 nitric oxide는 산소 중간 물질 등에 내성을 보이는 기생체와 미생물에 대한 유효한 작용을 나타내며, 종양세포의 대사기능을 상실하게 하거나 2차적인 사이토카인을 분비하게 하는 전달체로 작용하여 암세포의 증식을 억제시키며(Jan *et al.*, 1992), 담자균류의  $\beta$ -glucan성 다당류가 대식세포를 활성화시켜 nitric oxide 생성을 촉진한다는 보고가 있다(한 등, 1998). 따라서 삼색도장버섯의 중성염용액 추출물과 열수 추출물이 대식세포를 활성화시켜 NO 생성을 촉진시킨 것으로 사료된다.

**복강 세포와 혈 중 백혈구 수 및 면역 장기 중량에 미치는 영향:** 생체에서의 항암 효과와 실험관에서의 면역 활성 효과에 대한 실험 결과를 종합하여 삼색도장버섯 중성염용액 추출물이 가장 높은 효과를 보인 것으로 판단되어 이 물질을 이용하여 생체에서의 면역 활성 효과를 실험한 결과, 중성염용액 추출물을  $50 \text{ mg/kg body weight}$ 의 농도로 투여한 실험군은 복강 세포 수가 대조군의  $4.67 \times 10^5 \text{ cells}/\text{ml}$ 인 것에 비해  $41.80 \times 10^5 \text{ cells}/\text{ml}$ 로서 약 10 배 증가하였고(Fig. 6), 혈액 내 백혈구 수는 대조군의  $2.33 \times 10^3 \text{ cells}/\text{mm}^3$ 에 비하여  $5.84 \times 10^3 \text{ cells}/\text{mm}^3$ 로 2배 이상 증가하였으며(Table 3), 면역 관련 장기인 비장의 체 중에 대한 중량비는 대조군이 0.43%인데 비하여 0.70%로 1.6배 증가된 것이 관찰되었다.

혈액 내 백혈구는 식균작용과 염증반응(leukocytosis)을



**Fig. 6.** Effect of Fr. NaCl extracted from *Daedaleopsis tricolor* on the number of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fr. NaCl fraction was extracted with 0.9% NaCl solution.

**Table 3.** Effect of Fr. NaCl<sup>a</sup> extracted from *Daedaleopsis tricolor* on the number of circulating leukocytes in ICR mice

Treatment	Dose (mg/kg body weight)	No. of mice	No. of leukocytes ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )
Control	-	4	2.33±0.88 <sup>b</sup>
Fr. NaCl	10	4	2.86±0.68
Fr. NaCl	20	4	3.31±1.18
Fr. NaCl	50	4	5.84±1.43

<sup>a</sup>Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution.

<sup>b</sup>Mean±S.E.

통해 생체를 감염으로부터 방어하여 면역반응에 관여하는 1차적 작동세포로서 기능을 하고 있고(Arthur *et al.*, 1986), 복강 세포 내의 다핵형 백혈구와 대식세포 또한 식균작용 및 항원을 인지해 T 및 B cell과 반응하여 채액성과 세포성 면역을 담당하고 있다(Gross *et al.*, 1980).

한국산 영지를 열수 추출하여 얻어낸 고분자 단백성 다당류를 마우스의 복강에 투여하였을 때 복강 세포, 대식세포 및 다핵형 백혈구의 수가 증가하였고(신 등, 1985),

**Table 4.** Effect of Fr. NaCl<sup>a</sup> extracted from *Daedaleopsis tricolor* on the body and immunoorgan weight of ICR mice

	Treatment			
	Control	Fr. NaCl	Fr. NaCl	Fr. NaCl
Dose (mg/kg body weight)	-	10	20	50
No. of mice	4	4	4	4
Body weight (g)	34.81±3.71 <sup>b</sup>	34.29±1.52	36.15±0.87	34.48±2.96
Liver weight (g)	2.13±0.16	2.18±0.07	2.40±0.26	2.35±0.29
Liver/Body (%)	6.12±0.06	6.36±0.41	6.64±0.57	6.81±0.25
Spleen weight (g)	0.15±0.01	0.16±0.02	0.20±0.02	0.24±0.05
Spleen/Body (%)	0.43±0.08	0.47±0.08	0.55±0.04	0.70±0.11
Thymus weight (g)	0.05±0.00	0.05±0.01	0.06±0.02	0.06±0.01
Thymus/Body (%)	0.15±0.01	0.15±0.01	0.16±0.04	0.17±0.02

<sup>a</sup>Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution.

<sup>b</sup>Mean±S.E.

신령버섯(*Agaricus blazei*)에서 분리한 단백다당체를 1회 마우스의 복강에 투여하였을 때 백혈구의 수가 증가하였으며 그 중 호중구의 수가 증가하였음을 보고하였다(구 등, 1999). 이는 본 실험 결과와 일치하며 결과적으로 삼색도장버섯 중성염용액 추출물이 복강 세포수와 백혈구의 수를 증가시킴으로써 1차적 면역기능 활성에도 효과가 있는 것으로 판단된다.

## 적 요

삼색도장버섯으로부터 중성염용액, 열수, 및 메탄을 추출물을 분리하였다. 세포독성 실험 결과, 열수 추출물은 0~2,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 암세포에 대한 세포독성이 없었으나, 중성염용액 추출물과 메탄을 추출물에서는 약간의 독성을 나타내었다. Sarcoma 180 복수암에 대한 항암 효과는 중성염용액 추출물을 투여한 실험군에서 77.4%의 높은 생명 연장 효과를 나타내었다. 삼색도장버섯의 중성염용액 추출물과 열수 추출물은 대조군에 비해 비장세포를 1.7~2.4배 증가시켰고, B 임파구의 alkaline phosphatase 활성을 2.2~8.7배 증가시킴으로써 비장세포의 증식능과 B 임파구의 면역 활성을 증가시켰다. 대식세포주 RAW 264.7에 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 중성염용액 추출물을 처리하였을 경우, 양성 대조군이 79  $\mu\text{M}$ 의 nitric oxide (NO)를 발생시킨 것에 비해 다소 높은 90  $\mu\text{M}$ 의 NO를 발생되었다. 또한 중성염용액 추출물을 50 mg/kg body weight의 농도로 마우스 복강에 투여하였을 시 대조군에 비하여 복강세포수가 10배 증가하였으며 혈액 내 백혈수 또한 2배 증가를 나타내었다. 따라서 삼색도장버섯의 중성염추출물을 항암 효과와 숙주의 면역을 활성화시키는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 과학재단이 지원하는 특수소재은행인 인천대학교 “야생버섯균주은행”을 통해 수행되었으며, 지원에

감사드립니다.

## 참고문헌

- 구현옥, 김인천, 박신자, 정상희, 박종명, 이재진, 유한상, 이영순. 1999. 신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)에서 분리한 다당체의 *Staphylococcus aureus* 감염 및 마우스 Sarcoma 180 종양세포에 대한 방어효과. 한국실험동물학회지 **15**(2): 155-158.
- 박상신, 유국현, 민태진. 1998. 버섯추출물의 항산화 활성에 관한 연구. 한국균학회지 **26**(1): 69-77.
- 신혜원, 김하원, 최용칠, 도상학, 김병각. 1985. 한국산 영지의 무기 성분 및 면역 증강 작용에 관한 연구. 생약학회지 **16**(4): 181-190.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환복, 유승현, 유익동. 1995. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I)-중성염 용액 추출 다당류의 특성. 한국균학회지 **23**(4): 332-339.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_, \_\_\_\_, \_\_\_\_, \_\_\_\_, \_\_\_\_. 1995. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(II)-열수추출 다당류의 분리 및 특성. 한국균학회지 **23**(4): 340-347.
- 진미람. 1996. 잣버섯 성분의 면역세포 및 전사인자의 활성화 작용에 관한 연구. 서울대학교 대학원 논문집. Pp. 1-121.
- 한만덕, 이은숙, 김영권, 이중우, 정훈, 윤경하. 1998. 영지의 균사체성  $\beta$ -glucan에 의한 Raw 264.7 대식세포의 Nitric Oxide 생성. 한국균학회지 **26**(2): 246-255.
- 水野 韶, 川合正允. 1992. キノコの化學?生物學. 學會出版センタ. pp. 372.
- Arthur, C. and Guyton, M. D. 1986. *Textbook of medical physiology*. 7th Ed. W. B. Saunders company. pp. 51-59.
- Chihara, G., Hamuro, G., Meada, Y., Arai, Y. and Fukoka, F. 1970. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachman). *Nature* **225**: 973-948.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* **222**: 687-688.
- 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**(1): 188-302.
- Jan, A. M., Marielle, E. B., Peter, H. N., Pieter, S. H. and Ralph, V. F. 1992. INF- $\gamma$  induced 1-arginine-dependent toxoplasmasitic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* **148**: 568-571.
- Kishida, E., Sone, Y., Shibata, S. and Misaki, A. 1981. Preparation and immunochemical characterization of antibody of branched  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan of *Volvariella volvacea* and its use in studies of antitumor actions. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 1849-1859.
- 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**(2): 137-144.
- Mossman, B. T. 1983. *In vitro* approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ. Health Perspect.* **53**: 155-161.
- Ohno, N., Arai, Y., Suzuki, I. and Yadomae, T. 1986. Induction of alkaline phosphatase activity in murine spleen cells treated with various mitogens. *J. Pharmacobi-Dyn.* **9**: 593-599.
- Roland, J. F., Chmielewicz, Z. F., Weiner, B. A., Gross, A. M., Boenong, O. P., Luck, J. V., Bardos, T. J., Rerly, H. C., Sugiyura, K., Stock, C. C., Lucas, E. H., Byerrum, R. U. and 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.
- Tsugagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**: 557.
- Whistler, R. L., Bushway, A. A., Singh, P. P., Nakahara, W. and Tokuzen, R. 1976. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides, edited by Tipson, R. S. and Horton, D. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, New York. Vol. 32. pp. 235-275.