



목질진흙버섯 에탄올 추출물의 세포독성에 따른 항암활성

한기원¹ · 이수원¹ · 한광수² · 이대진³ · 이병익⁴ · 장원철

¹성균관대학교 식품생명자원학과, ²대한자생식품, ³허니머쉬 연구소, ⁴(주)오스코텍, 단국대학교 첨단과학대학

Antitumor Activities to Cytotoxicity of *Phellinus linteus* Ethanol Extract

Ki Won Han¹, Soo Won Lee¹, Koang Soo Han², Dae Jin Lee³, Byung Eui Lee⁴ and Won Cheoul Jang

¹Department of Food and life Science, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

²Dae Han Jaseang Food Co. LTD., Sokcho 217-070, Korea

³Honeymush Research Center, Ipjang Cheonan, Chungnam 330-820, Korea

⁴OCT Inc. 2-17 Omok-ri, Seonggeo, Cheonan, Chungnam 330-831, Korea
Department of Chemistry, Dankook University, Chungnam 330-714, Korea

Received March 28, 2003; Accepted June 10, 2003

ABSTRACT: We investigated antitumor activities of the ethanol extract from mushroom *Phellinus linteus* and *Phellinus baumii* on mulberry, oak and elm. *In vitro* test, the ethanol extract of mushroom cultivated on oak of *Phellinus linteus* showed highest activities about SK-OV-3, HCT15, XF498, SK-MEL-2 and A549. SK-OV-3 cell line showed 100% cytotoxicity in 100 µg/ml and HCT15 (98.39%), XF498 (89.62%), SK-MEL-2 (84.07%) and A549 (79.92%) cytotoxicity respectively. Also IC₅₀ showed 3.99 µg/ml to SK-OV-3 cell line and HCT15 (4.37 µg/ml), A549 (5.48 µg/ml), SK-MEL-2 (6.72 µg/ml), XF 498 (6.88 µg/ml). As those results, cultivated oak of *Phellinus linteus* showed a very low IC₅₀ value against SK-OV-3, HCT15, XF498, SK-MEL-2 and A549 cancer cell lines.

Keywords: *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii*, Cytotoxicity.

서 론

목질진흙버섯은 대표적인 약용버섯으로 최근 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 생리활성은 다른 버섯류와 마찬가지로 주로 다당체 또는 단백다당체에 의한 면역활성이 가장 많이 보고되어 있어, 치마버섯(*Schizophyllum commune*)에서 schizophyllan이 분리되었으며 표고(*Lentinus edodes*)에서 분리된 다당체 렌티난(*Lentinan*)은 현재 일본 면역관련 항암제 시장에서 상당한 부분을 차지하고 있다(Ikegawa 등, 1969; Chihara 등, 1970; Komatsu 등, 1969). 국내에서는 운지(*Coriolus versicolor*) 및 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)에서 분리된 다당체가 의료용

으로도 사용되고 있다(Tsugagoshi 등, 1974; Chung 등, 1994). 이외에도 송이, 느타리, 팽이등 대부분의 식용버섯과 영지 등 오랫동안 사용되어온 약용버섯에서 다양한 종류의 다당류가 분리되어 그들의 활성이 알려져 있다(Ikegawa 등, 1969). 이와 같은 다당류에 의한 활성은 정상세포에는 영향을 주지 않고 면역활성에 의한 간접적인 활성을 나타내므로 암 뿐만 아니라 현대의 다양한 질병이 면역과 관련이 있으므로 그의 중요성이 커지고 있다. 다당류의 면역활성은 여러 연구를 통해 표고나 운지 같은 대부분 한 종류의 다당류로 이루어진 것과 목질진흙버섯 같이 여러 종류의 다당류로 이루어진 것이 있다(Komatsu 등, 1969; Kim 등, 1994; Lee 등, 1995).

그러나 버섯류의 알려진 활성은 천연물에서 연구의 중요성이 큰 버섯류에서 볼 때 대부분 다당류에 집중되어 있어서 앞으로 더 많은 생리활성을 탐색하기 위하여 수용성 물질인 다당류에 집중된 연구소재에서 상대적으로 분

Correspondence to: Won Cheoul Jang, Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Dankook University, San 29, Anseo-Dong, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea
E-mail: wcjang@dankook.ac.kr

자량이 적은 일반 유기물질에 대한 연구가 필요한 시점이다(Cho 등, 1995). 따라서 본 연구에서는 알콜 추출물인 에탄올 분획에서 분자량이 작은 유기성분에 대한 생리활성을 연구하고자 한다. 특히 목질진흠버섯은 현재 가장 높은 면역증강 활성으로 그 중요성이 크나 다른 버섯류보다 알려진 다른 생리활성 및 그들의 구성성분에 대한 연구가 미비하여 목질진흠버섯에 대한 연구가치가 대단히 높으며 버섯류의 다당체는 배지의 조성에 따라 다당체의 구성성분에 있어서 상당한 차이를 나타내는 것이 잘 알려져 있으며 목질진흠버섯도 배지의 조성에 따라 다당체의 일종인 단백다당체 중 단백질을 구성하는 아미노산의 구성성분의 차이가 이미 알려져 있으며 따라서 본 연구에서는 다양한 배지에서 재배한 목질진흠버섯의 에탄올 추출물의 생리활성을 탐색하여 앞으로 그 중요성이 커진 목질진흠버섯의 다양한 이용방법에 대하여 연구하고자 한다(Sasaki 등, 1971; Song 등, 1995; Oh 등, 1992; Lee 등, 1996; Chung 등, 1993; Song 등, 1998; Kim 등, 2000).

이러한 연구는 배지조성에 따른 유기물이 생리활성에서 차이를 나타낸다면 이는 앞으로 중요한 의약품 또는 식품의 소재로서 각광을 받을 버섯류의 연구에 있어 그 중요성이 더 클 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 일반에서 현재 재배중인 두 종류의 목질진흠버섯을 균주로 목질진흠버섯의 기주식물로 잘 알려진 뽕나무와 재배시 가장 많이 이용되는 참나무, 그리고 뽕나무와 더불어 항암 활성이 있다고 잘 알려진 느릅나무등 세 가지 종류의 기주식물을 이용하여 재배한 목질진흠 버섯의 에탄올 추출물에 대한 다양한 생리활성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험 균주는 국내에서 채취한 목질진흠버섯을 서울대학교 자연과학대학 균류 전문가에 의뢰하여 동정하였으며 본 실험에 사용된 목질진흠버섯(*Phellinus linteus*, *Phellinus baumii*)은 2종의 균주를 각각 뽕나무, 참나무, 느릅나무에서 재배된 것을 경북 안동의 버섯 연구가인 우병찬 씨에서 분양 받았다.

세포독성실험

Solid tumor에 대한 세포독성은 sulforhodamine-B(SRB)assay법을 사용하였다. 2종의 균주를 각각 뽕나무, 참나무, 느릅나무에서 재배한 목질진흠버섯 자실체의 에탄올 추출물을 사람의 다양한 암 세포주인 A549(human non-small cell lung), SKOV-3(human ovarian), SKMEL-2

(human melanoma), HCT 15(human colon), XF 498 (human CNS) 등에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 계대중인 5종의 세포주들을 실험에 사용하기 위하여 trypsin-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시키고 96-well flat-bottom microplate(Falcon)에 well당 세포수 $4 \sim 5 \times 10^4$ 개가 되도록 분주하고 분주된 세포들은 분주된 세포들을 CO₂ incubator내에서 24시간 배양하여 바닥면에 부착시킨 후 aspirator로 media를 제거하고, medium에 목질진흠 버섯의 에탄올 추출물을 6가지 농도(1.0, 3.0, 10.0, 30.0, 100.0, 300.0 μM/ml)의 dose로 희석된 시료 용액들을 암세포가 들어 있는 well에 각각 100 μl씩 3배수로 넣어주고 48시간 동안 더 배양한다. 시료는 가하기 전에 0.22 μm filter로 여과하여 실험의 무균상태를 유지하여 약물과 함께 48시간 배양이 끝난 후, 각 well의 medium을 제거하고 50% trichloroacetic acid(TCA)를 well당 20 μl씩 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다.

세포의 고정이 끝난 후 plate를 물로 5~6회 세척하여 남아 있는 TCA 용액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well당 250 μl의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색 용액을 가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid용액으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB를 제거하였다.

염색된 cell plate 들은 다시 실온에서 건조 시킨 후 control의 O.D.(optical density)값이 520 nm에서 0.8~1.0A(흡광도)값이 되도록 일정량의 10 mM Tris로 염색액을 잘 녹여 낸 다음 520 nm에서 0.8~1.0A(흡광도)값을 구하여 ED₅₀값을 얻었다. 암 세포들에 대한 약물의 효과를 평가하기 위하여 세포수의 측정은 약물을 가할때의 세포수(Tz)와 약물이 들어 있지 않은 medium을 가하여 48시간 동안 배양했을 때의 세포수(C) 및 각 농도의 약물과 함께 48시간 배양했을 때의 세포수(T) 등을 측정하였다.

대조군으로는 Doxorubicin을 6가지 농도(0.0001, 0.0010, 0.0100, 0.1000, 1.0000, 10.000 μg/ml)로 사용하였다.

$$\text{세포증식율(\%)} = \frac{T - T_z}{C - T_z} \times 100$$

결과 및 고찰

다당체에 의한 면역활성으로 잘 알려진 *Phellinus*류의 저분자 물질에 의한 새로운 생리활성을 탐색하고자 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii* 등 2가지 균주를 뽕나무, 참나무 그리고 느릅나무에서 재배한 자실체의 에탄올

추출물을 인간유래 5종의 cell lines인 A549(human non-small cell lung), SK-OV-3(human ovarian), SK-MEL-2(human melanoma), XF498(human CNS) 그리고 HCT15(human colon)에서 *in vitro* antitumor 활성 검정을 실시하였다.

6종의 시료군 중 가장 높은 효과를 나타낸 것이 *Phellinus linteus* 참나무 자실체의 에탄올 추출물이었다. 이 시료군은 10 µg/ml 투여시 SK-OV-3 cell line에서는 세포

증가율을 15.65%으로 감소시켰으며 30 µg/ml 투여시는 HCT15 cell line은 97.39%의 cell death를 보여주었으며 10 µg/ml에서 가장 좋은 효과를 나타낸 SK-OV-3 cell line은 78.28%의 cell death, A549 61.42%, XF43.45%의 cell death를 보였으나 SK-MEL-2는 1.2%의 세포증가를 나타내었다. 100 µg/ml에서 SK-OV-3는 100% cell death를 나타내었고 HCT15 98.39%, XF498 89.62%, SK-MEL-2 84.07%, A549 79.92%의 cell death를 보여

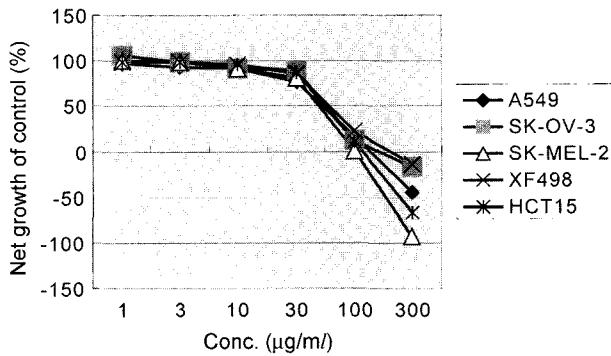


Fig. 1. Net growth as percent of control for ethanol extraction from mushroom *P. linteus* cultivated mulberry.

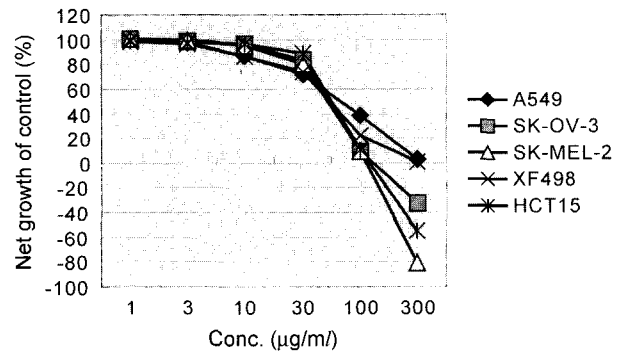


Fig. 4. Net growth as percent of control for ethanol extraction from mushroom *P. baumii* cultivated mulberry.

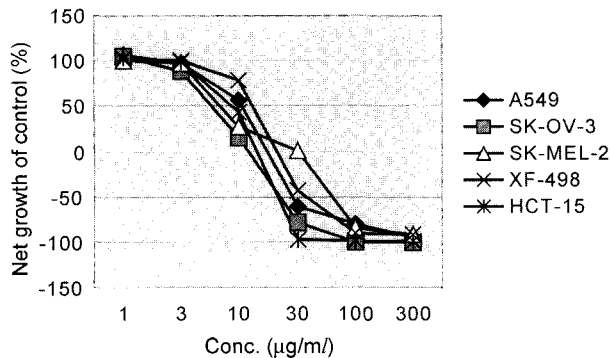


Fig. 2. Net growth as percent of control for ethanol extraction from mushroom *P. linteus* cultivated oak.

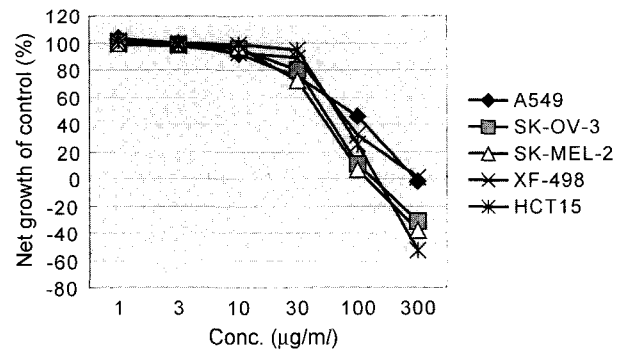


Fig. 5. Net growth as percent of control for ethanol extraction from mushroom *P. baumii* cultivated oak.

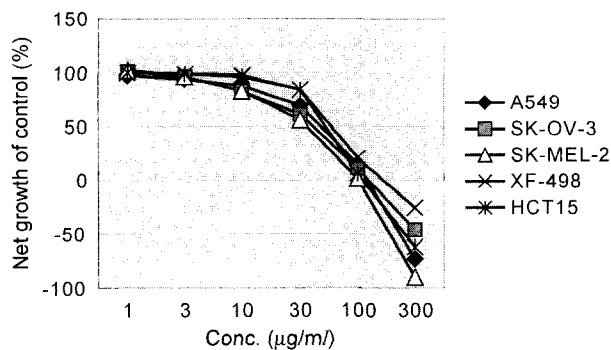


Fig. 3. Net growth as percent of control for ethanol extraction from mushroom *P. linteus* cultivated elm.

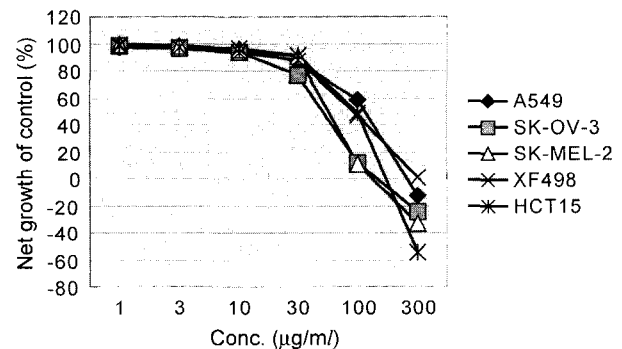


Fig. 6. Net growth as percent of control for ethanol extraction from mushroom *P. baumii* cultivated elm.

주었다.

IC₅₀ 값이 SK-OV-3 cell line에서 3.99 µg/ml로 가장 좋은 효과를 나타내었으며 HCT15 4.37 µg/ml, A549 5.48 µg/ml, SK-MEL-2 6.72 µg/ml, XF 498 6.88 µg/ml를 나타내었다. 대조군으로 사용한 doxorubicin의 SK-MEL-2 cell line에서 0.02 µg/ml, A549 0.03 µg/ml, HCT15 0.06 µg/ml, XF498 µg/ml 0.10 µg/ml, SK-OV-3 0.17 µg/ml에 비하면 높은 IC₅₀ 값이지만 일반적인 천연물 추출물이 좋은 활성을 보이는 농도가 20 µg/ml 정도임을 감안한다면 괜찮은 항암성을 가진다고 사료된다.

In vitro cytotoxicity antitumor 활성 검정결과 가장 우수한 효과를 나타낸 *Phellinus linteus* 참나무 재배 자실체의 에탄올 추출물이 가장 암세포 저해능이 우수하였다. 이 에탄올 추출물을 CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH 그리고 수층으로 각각 분획 추출하였다.

각각의 분획에 대하여 활성을 검정한 결과 CH₂Cl₂ 분획과 EtOAc 분획이 가장 좋은 결과를 나타내었으나 에탄올 조추출물보다 활성이 현저하게 떨어졌으며 이는 수치적으로 다른 에탄올 조추출물의 활성과 비슷하였다.

CH₂Cl₂ 분획의 결과 30.0 µg/ml의 농도까지는 억제력을 크게 나타내지 않았으며 100.0 µg/ml 농도에서는 SK-

OV-3 cell line에서 25.17%의 cell 증가를 나타내어 가장 효과를 나타내었으며 SK-MEL-2 cell line에서는 39.51%의 cell 증가를 A549 cell line에서는 44.76%, HCT15 44.91%, XF498 66.52%의 cell 증가를 나타내었다. 그리고 실험 중 가장 고농도인 300.0 µg/ml에서는 SK-MEL-2 cell line에서 98.50%의 cell death를 나타내어 가장 좋은 효과를 나타내었으며 HCT14 cell line은 97.94%의 cell death를 나타내어서 대부분의 cell death를 나타내었다. 100.0 µg/ml에서 가장 좋은 효과를 나타낸 SK-OV-3 cell line은 80.61%의 cell death를 나타내었으며 A549 cell line은 72.08%, XF498 cell line은 61.61%의 cell death를 보여주었다.

IC₅₀ 값은 HCT15 cell line이 38.67 µg/ml를 나타내어 가장 낮은 값을 보여주었으며 SK-MEL-2 cell line은 40.42 µg/ml, A549 cell line 41.45 µg/ml, XF498 cell line은 52.76 µg/ml를 나타내어서 *Phellinus linteus* 참나무 재배 자실체의 에탄올 추출물 메틸렌 클로라이드 분획 중 IC₅₀ 값이 가장 높았다.

EtOAc 분획 중 가장 활성이 잘 나타난 cell line은 SK-MEL-2 cell line으로 10.0 µg/ml 농도까지는 별다른 효과가 없었으나 30.0 µg/ml 농도에서는 cell 증가율이 50.72%로 상당히 낮아졌으며 100.0 µg/ml 농도에서는 cell 증가율이 8.13%를 나타내었으며 300.0 µg/ml의 고농도에서는 51.44%의 cell death를 보여 주었다.

SK-OV-3 cell line은 SK-MEL-2와 비슷한 경향을 나타내었으며 300.0 µg/ml의 고농도에서는 cell death가 57.69%로 가장 높은 효과를 보여주었다. HCT15 cell line은 100.0 µg/ml의 농도에서는 가장 좋은 효과를 나타내어 cell 증가율이 0.39%로 cell의 증식을 거의 억제시켰으나 300.0 µg/ml의 고농도에서는 38.72%의 cell death를 나타내어 SK-MEL-2, SK-OV-3의 cell line 다음의 효과를 나타내었다. A549 cell line은 30.0 µg/ml의 농도에서는

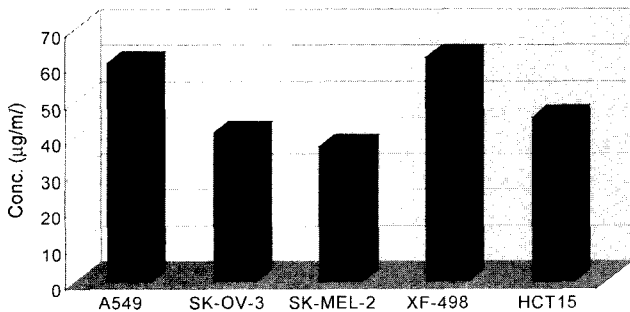


Fig. 7. IC₅₀ ethanol extraction from mushroom *P. linteus* cultivated oak.

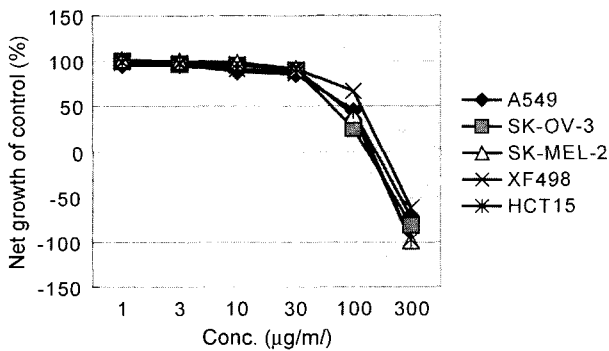


Fig. 8. Net growth as percent of control for Methylene Chloride fraction of ethanol extraction from mushroom *P. linteus* cultivated oak.

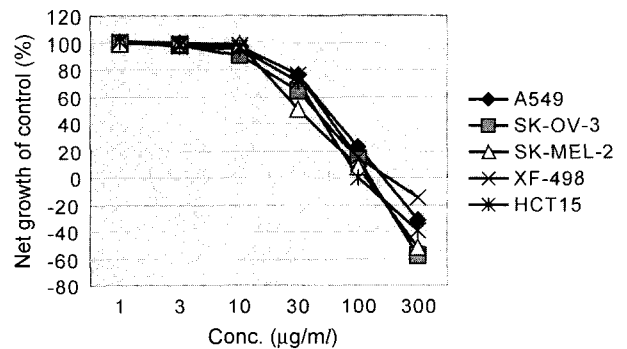


Fig. 9. Net growth as percent of control for Ethyl acetate fraction of ethanol extraction from mushroom *P. linteus* cultivated oak.

76.44%의 cell 증가를 나타내었으며 100.0 µg/ml의 농도에서는 22.65%의 cell 증가를 보여주었으며 300.0 µg/ml의 농도에서는 30.78%의 cell death를 보여주었다. XF498 cell line은 30.0 µg/ml의 농도에서는 cell 증가율이 75.12%, 100.0 µg/ml 농도에서는 14.91%를 나타내었으며 300.0 µg/ml의 농도에서는 14.52%의 cell death를 나타내었다.

IC₅₀ 값은 SK-MEL-2 cell line이 31.63 µg/ml로 가장 낮았으며 SK-OV-3 cell line은 32.84 µg/ml, HCT15 cell line 35.62 µg/ml, A549 cell line 43.86 µg/ml, XF498 cell line 45.38 µg/ml를 나타내었다.

고 찰

이상의 결과들로부터 *Phellinus linteus* 참나무재배 자실체의 활성이 가장 좋았다. 그러나 용매 분획물의 활성은 감소하였으며 비교적 높은 활성을 보여준 CH₂Cl₂와 EtOAc의 분획물중 CH₂Cl₂의 분획을 컬럼 크로마토그래피를 적용하여 활성을 점검한 결과 활성이 용매 분획물보다 증가하였으나 에탄올 조추출물 보다는 감소하였다. *Phellinus linteus*의 에탄올 추출물에 대한 세포독성 따른 항암활성은 단일물질이 아닌 몇가지의 물질에 의한 복합활성으로 추측되며 다른 원목배지에 비하여 *Phellinus linteus* 참나무 배지 자실체의 활성이 특이적으로 높았던 것은 주목할 결과이다. 시료에 대한 재배특성으로는 *Phellinus linteus*는 *Phellinus baumii* 보다 자실체의 성장이 크게 늦었으나 *Phellinus linteus*는 참나무 배지에서는 다른 배지보다 월등히 성장이 빨랐다. 이러한 점으로 에탄올 추출물의 저분자 물질은 수용성 물질에 비하여 성장에 따른 화학적 성분이 차이가 클 것으로 추측되며 또한 저분자 물질의 배지에 대한 화학적 성분의 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구수행에 목질진흙버섯을 공급하여 주신 경북 안동의 우병찬 선생님께 감사의 말씀을 드립니다

참고문헌

Komatsu, N., Okuba, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakaki, S. (1969): Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann*, **60**, 137-144.

Ikegawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M. and Fukuoka, F. (1969): Antitumor activity of aqueous extract of

some edible mushrooms. *Cancer Res.*, **29**, 734-740.

Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970): Fractionation of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776-2781.

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**, 557-558.

Sasaki, T., Arai, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Fukuoka, F. (1971): Antitumor polysaccharides from some Polyporaceae, *Ganoderma applanatum* (Pers) Pat and *Phellinus linteus* (Berk. et Curt) Aoshima, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 821-826.

Song, K.S., Cho, S.M., Lee, J.H., Kim, H.M., Han, S.B., Ko, K.S. and Yoo, I.D. (1995): B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from Mushroom *Phellinus linteus*, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 2105-2108.

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**, 379-381.

Lee, J.H., Cho, S.M., Song, K.S., Hong, N.D. and Yoo, I.D. (1996): Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic hetero-glycopeptide with immuno-stimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1093-1095.

Chung, K.S., Kim, S.S., Kim, H.S., Han M.W. and Kim, B.K. (1994): Antitumor activity of Kp, a Protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus*, *Yakhak Hoechi*, **38**, 158-165.

Kim, Y.S., Park, K.S., Park, H.K. and Kim, S.W. (1994): Compositional sugar analysis of antitumor polysaccharides by high performance liquid chromatography and gas chromatography, *Arch. Pharmacol Res.*, **17**, 337-342.

Chung, K.S., Kim, S.S., Kim, H.S., Kim, K.Y., Han, M.W. and Kim, K.H. (1993): 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**, 336-338.

Rubinstein, L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. (1989): Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines, *Proceeding of the American Association for Cancer Research*, **30**, 2418-2423.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monk, A., McMahon, J.D., Vista, J., Warren, T., Kenney, S. and Boyd, M.R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, N. and Boyd, M. (1989): Evaluation of colorimetric protein and biomass strains for assaying *in vitro* drug effects upon human tumor cell lines, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, **30**, 2436-2442.

Cho, S.M., Lee, J.H., Han, S.B., Kim, H.M., Yu, S.H. and Yoo, I.D. (1995): Immuno-stimulating Polysaccharides from the Fruiting Bodies of *Fomitella fraxinea* (L), *Kor. J. Mycol.*,

- 23**, 332-339.
- Lee, J.H., Cho, S.M., Ko, K.S. and Yoo, I.D. (1995): Effect of Cultural Conditions on Polysaccharides Production and its Monosaccharide Composition in *Phellinus linteus* L13202, *Kor. J. Mycol.*, **23**, 325-331.
- Song, C.H., Ra, K.S., Yang, B.K. and Jeon, Y.J. (1998): Immuno-stimulating Activity of *Phellinus linteus*, *Kor. J. Mycol.*, **26**, 86-90.
- Kim, Y.S., Lee, B.E., Cho, K.B., Lee, Y.T. and Lee, D.J. (2000): Antitumor and Immunomodulatory Activities of Mushroom (*Phellinus linteus*) cultured on Oak and Mulberry. *Kor. J. Immunol.*, **22**, 165-171.