

## 자궁경부암동물세포에서 표고버섯의 *in vitro* 및 *in vivo* 항암효과 - Apoptosis에 의한 종양세포주의 성장억제 -

박정민 · 이성현<sup>1</sup> · 김정옥 · 박홍주<sup>1</sup> · 박재복 · 신정임\*  
대구가톨릭대학교 의과대학 의학과, <sup>1</sup>농촌생활연구소 농산물가공이용과

## *In vitro* and *in vivo* Effects of Extracts of *Lentinus edodes* on Tumor Growth in a Human Papillomavirus 16 Oncogenes-transformed Animal Tumor Model - Apoptosis-mediated Tumor Cell Growth Inhibition -

Jeong-Min Park, Sung Hyun Lee<sup>1</sup>, Jung-Ok Kim, Hong-Ju Park<sup>1</sup>,  
Jae-Bok Park, and Jeong-Im Sin\*

Department of Medicine, College of Medicine, Catholic University of Daegu  
<sup>1</sup>Agriproduct Science Division, National Rural Living Science Institute

Fungal products indirectly mediate anti-tumor effects *in vitro* and *in vivo*. To investigate whether *Lentinus edodes* might possess direct anti-tumor substance, *L. edodes* was extracted and tested on human papillomavirus (HPV) 16 oncogenes-associated animal tumor cells (TC-1) and in an animal tumor model. Only water extract displayed direct anti-proliferative effects in TC-1 tumor cells *in vitro*. This inhibition was dose-dependent, and inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was 800 µg/mL. Fungal extracts also showed growth inhibition to human cervical cancer cells (CaSki and HeLa) similarly to TC-1 tumor cells. When fungal extracts were added at a high dose (1.5 mg/mL), cell growth was inhibited within 6 hr following extract treatment. Cell growth inhibition was blocked by heat treatment, but not by low pH, which is indicative of heat sensitivity of this anti-proliferative substance. Cell growth suppression was mediated by apoptosis, as determined by Annexin V and propidium iodide staining. When challenged with TC-1 cells, direct intratumoral injection of fungal extracts resulted in some positive effect on tumor growth inhibition, as compared to oral delivery. Results suggest that heat labile substance of *L. edodes* suppresses growth of HPV oncogenes-associated tumor cells through apoptosis.

**Key words:** *Lentinus edodes*, apoptosis, anti-tumor activity, human papillomavirus-associated tumor cells

### 서 론

버섯은 담자균류에 속하는 균식물로 지금까지 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있으며, 생리활성 기능으로 항암 및 항균, 혈압강하, 항바이러스, 콜레스테롤 저하 등에 대한 연구가 진행되고 있다. 그 중 항암효과에 대하여서는 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 경우 액체 배양한 균사체로부터 분리한 단백질단백체 (protein-bound polysaccharide, PBP)가 항암효과를 가진다고 알려져 있다(1-4). 이들 연구에서는 표고버섯의 다당체 성분인 β-1,3 glucan(상품명: lentinan)은 직접 종양세포에 작용하여 항암

효과를 나타내는 것보다도 간접적으로 체내 면역체계의 기능을 활성화시켜 간접적으로 항암효과를 나타낸다고 발표하고 있다. 그 항암방어기전으로는 체내의 보체계 활성화(5) 및 macrophage의 활성화(6), 인터페론 생성의 촉진(7) 등과 같은 면역활성기전에 기인하여 항암효과를 나타낸다고 보고 되고 있다. 또한, lentinan의 임상적 사용은 화학요법중인 암환자에 보이는 불면증, 식욕부진, 체중감소, 통증, 불안감등을 감소시켜 삶의 질을 증가시키는 것으로 보고 되고 있다(8-9). 최근, 아가리쿠스버섯 추출물의 임상적 이용에 대해서도 화학치료요법중인 자궁경부암환자에서 경구 투여시 보조적인 효과에 대한 보고도 있다(10). 하지만 이들 연구에서 표고버섯 성분들의 직접적인 종양세포주에 대한 세포성장 억제기능 및 그 기전에 대한 연구는 극히 제한적이다.

본 연구는 표고버섯 추출물이 자궁경부암세포주의 성장을 직접적으로 억제할 수 있는지를 조사하였고 그 억제기전에 대해서도 고찰하였다. 이를 위하여 다양한 추출용매를 이용하여 표고버섯을 추출하였고 이들 추출물들이 가질 수 있는 항암효과

\*Corresponding author : Jeong-Im Sin, Department of Medicine, College of Medicine, Catholic University of Daegu, 3056-6, Daemyung-4-Dong, Namku, Daegu 705-718  
Tel: 82-53-650-4338  
Fax: 82-53-651-8327  
E-mail: jsin1964@hanmail.net

를 *in vitro*에서 자궁경부암세포주를 대상으로 탐색하였으며, 직접 동물에 주사 또는 투여하여 종양세포의 성장억제 효과가 있음을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 표고버섯 용매별 추출

표고버섯(경북 문경산)에서 항종양물질을 추출하기 위하여 믹스기(큐피터폴드, 엔젤, 한국)를 이용해 작은 입자로 분쇄하여 정량한 후 1g당 증류수(물) 또는 유기용매(80% methanol 및 ethanol, acetone, isopropanol) 20 mL를 각각 첨가하였다. 상온에서 24시간 진탕한 후 Whatmann filter를 이용하여 잔사를 제거하고 여과액을 얻었다. 이를 진공건조기(Rotavapor, Buchi, Switzerland)를 이용해 수분을 상당부분 제거한 후 농축된 샘플을 각각 동결건조기(Freezezone plus 6, Labconco, USA)를 이용해 분말화한 후 정량하였다.

### 세포주

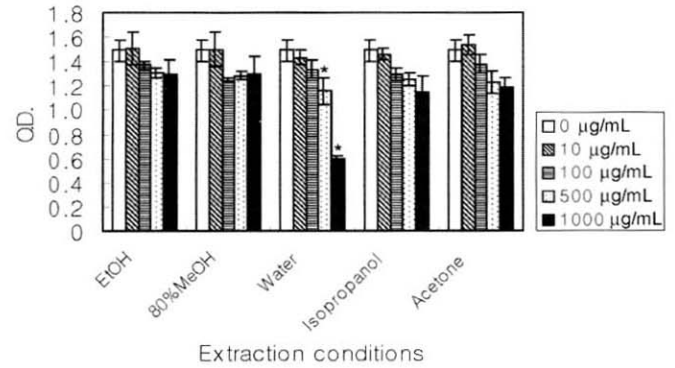
동물자궁경부암 세포는 TC-1세포주로 C57 BL/6 생쥐의 정상 폐 상피세포에 human papillomavirus 타입 16 oncogenes (E6 및 E7) 및 ras oncogene을 발현시켜 종양 세포화하였으며 종양항원의 발현 때문에 여러 면역치료 연구에 이용되고 있다(11-13). 휴먼 자궁경부암 세포(CaSki 및 HeLa)는 각각 HPV 16 및 18에 감염된 휴먼자궁경부암 세포주들이며 기존 연구에 이용된 세포주들이다(14). 특히, TC-1은 400 µg/mL의 G418이 첨가된 cRPMI(10% fetal bovine serum 및 1% glutamine, 1% streptomycin/penicillin이 첨가됨)에 계대배양하였고, CaSki 및 HeLa세포주는 cRPMI에 계대배양하였다.

### 세포성장 저해 시험

세포성장의 저해정도를 측정하기 위하여 MTT 방법을 이용하였다(15). 먼저, 종양세포주에 15 µL의 MTT(5 mg/mL)를 각 well당 첨가 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 배양시켰다. 배양 후 용액을 제거하고 150 µL의 DMSO를 첨가하여 형성된 formazan 침전물을 용해시키고 ELISA reader(ELx800, Bio-Tek, USA)를 이용하여 490 nm에서 optical density(O.D.)를 측정하였다. Inhibitory concentration(IC<sub>50</sub>)는 표고버섯 미 처리군의 O.D. 수치에서 MTT 미 처리 대조군 O.D. 수치를 제거한 수치의 50%에 상응하는 표고버섯 추출물 첨가 농도로 하였다.

### Fluorescence activated cell sorter(FACS) 시험

Apoptosis 유도 정도를 확인하기 위하여 표고버섯추출물이 처리된 세포를 trypsin 처리 후 생리식염수를 이용해 2번 세척한 다음 Annexin V-FITC로 염색하고 flow cytometer(BD, San Jose, USA)상에서 세포의 염색정도를 측정하였다. 또한, cell cycle arrest 유무 및 정도를 확인하기 위하여 표고버섯추출물이 처리된 세포를 trypsin 처리 후 생리식염수를 이용해 2번 세척하고 0.5 mL 생리식염수에 resuspension 하였다. 이들 세포들을 4°C의 70% ethanol로 fixing 한 후 800×g에서 10분간 원심분리하여 세포를 세척하여 1 mL 생리식염수에 용해시킨 후 RNase A(10 mg/mL) 및 propidium iodide(400 µg/mL)를 첨가하고 37°C에서 1시간 shaking하였다. 교반 후 flow cytometer상에서 세포 DNA의 분포(G0/G1, S, G2/M)를 측정하였다(16,17).



**Fig. 1. Anti-proliferative effects of *Lentinus edodes* extracts vs different extraction methods in TC-1 cells *in vitro*.**

Each well of a 96 well plate was seeded with  $3 \times 10^4$  TC-1 cells. The cells were then treated with the extracts obtained under different extraction conditions. After 3 days incubation, the cells were reacted with MTT for counting cell proliferation levels. The assay was performed in triplicate. Values and bars represent mean O.D. and standard deviation (SD), respectively. Statistically significant at  $p < 0.05$  using the paired Student's t test compared to untreated control.

### 동물실험

처리군당 5-10 마리의 생쥐(C57 BL6, H-2b)에  $1.5 \times 10^4$  TC-1 세포 (동종 상피종양세포주)를 피하주사한 후 표고버섯 추출물을 일정 농도로 종양에 직접 주사하거나 또는 주입기(gavage)를 이용하여 매일 0.2 mL씩 경구 투여한 다음 종양의 성장 정도나 크기를 caliper를 이용하여 매주 2회씩 측정하였다. 또한, 종양 세포주를 주사한 동물의 종양에 직접 표고버섯 추출물 일정 농도를 주사하여 종양의 성장정도를 측정하였다. 종양크기는 종양가로길이 + 종양세로길이/2로 계산한 값으로 cm를 단위로 하였다.

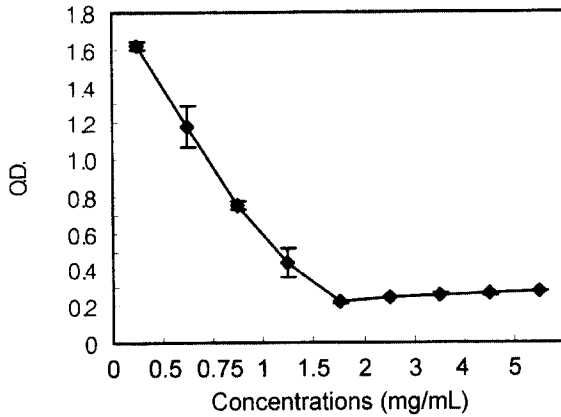
## 결과 및 고찰

### 용매별 표고버섯 추출물의 *in vitro* 항암력 검증

여러 추출용매 조건에 따른 표고버섯추출물의 *in vitro* 상에서 종양세포주에 대한 성장억제력을 확인하기 위하여 MTT 방법으로 측정된 결과는 다음의 Fig. 1과 같다. 즉, 여러 용매로 추출된 표고버섯추출물을 종양세포( $3 \times 10^4$ /well)에 다양한 농도(10-1000 µg/mL)로 첨가하고 3일간 배양 후 MTT assay를 시행한 결과, 물 추출물에서만 표고버섯추출물의 농도에 상응하는 항암효과가 관찰되었다( $p < 0.05$ ). 반면, 기타 다른 추출용매에서는 현저한 종양세포주 성장억제효과가 관찰되지 않았다. 이는 표고버섯 내 종양세포 성장 억제물질이 가용성임을 의미하며 동물 자궁경부암 세포주에 대한 직접적인 성장저해효과가 있음을 알 수 있었다. 이들 결과는 표고버섯 균사체의 열수 추출물이 mouse leukemia cells 및 휴먼 장암세포에 직접적으로 세포성장을 억제한다는 보고와 일치하였다(1).

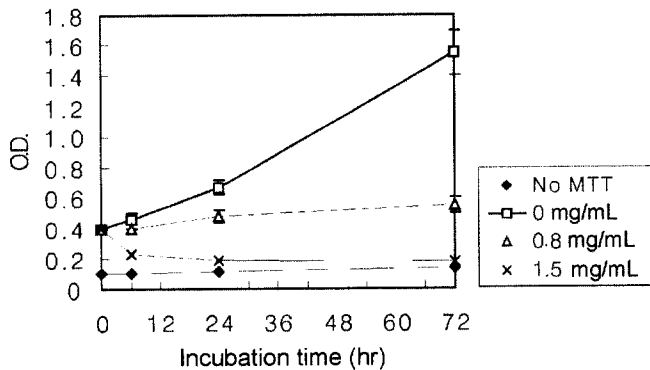
### 표고버섯추출물 농도에 따른 항암효과 및 IC<sub>50</sub> 계산

표고버섯 물 추출물의 처리 농도에 따른 종양세포주의 성장억제정도를 측정된 결과 Fig. 2에서 보듯이 O.D.수치가 1.5 mg/mL 이상에서는 종양세포의 완전한 성장억제가 탐지되었고 반



**Fig. 2.** Dose-dependent growth inhibitory effects of *Lentinus edodes* extracts in TC-1 cells.

Each well of a 96 well plate was seeded with  $3 \times 10^4$  TC-1 cells. The cells were then treated with water extracts of *Lentinus edodes* over a different dose. After 3 days incubation, the cells were reacted with MTT for counting cell proliferation levels. The assay was performed in triplicate. Values and bars represent mean O.D. and SD, respectively.



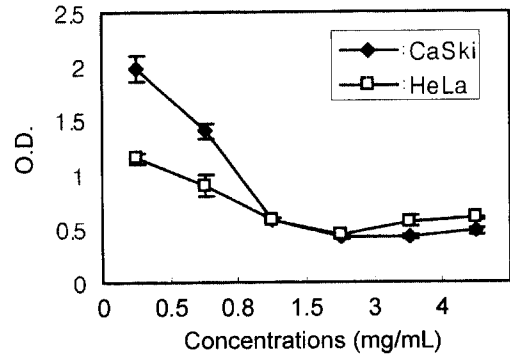
**Fig. 3.** TC-1 tumor cell growth inhibitory effects of *Lentinus edodes* extracts over the treatment time.

Each well of a 96 well plate was seeded with  $3 \times 10^4$  TC-1 cells. The cells were then treated with water extracts of *Lentinus edodes* at two doses (800  $\mu$ g/mL and 1.5 mg/mL). The cells were reacted with MTT for counting cell proliferation levels at the incubation time points indicated. The assay was performed in triplicate. Values and bars represent mean O.D. and SD, respectively.

면 500, 750, 1000  $\mu$ g/mL 농도에서는 이들 농도에 따른 종양세포의 성장 억제가 각각 18.9, 48 및 70%로 탐지되었다. 따라서, 종양세포의 성장이 50% 억제되는 800  $\mu$ g/mL의 농도를  $IC_{50}$ 로 하였다.

#### $IC_{50}$ 및 1.5 mg/mL 농도에서 첨가시간별 항종양효과

표고버섯 물 추출물을  $IC_{50}$  및 1.5 mg/mL 농도로 첨가한 후 배양시간에 따른 동물 자궁경부암 종양세포의 성장억제정도를 MTT방법으로 측정된 결과는 다음과 같다. 즉, Fig. 3에서 보듯이 O.D.수치가 1.5 mg/mL에서는 모든 배양 시간에서 종양세포의 완전한 성장억제가 탐지되었고,  $IC_{50}$ 인 800  $\mu$ g/mL에서는 배양시간 24시간부터 약 50%의 종양세포 억제 효과가 탐지되었다. 이는 이들 표고버섯추출물이 고농도로 첨가 시 가장 빠른 초기시간인 6시간 이전에 벌써 종양세포의 cell death를 유도하는 것으로 판단된다.



**Fig. 4.** Dose-dependent growth inhibitory effects of *Lentinus edodes* extracts in human cervical cancer cell lines (Caski and HeLa).

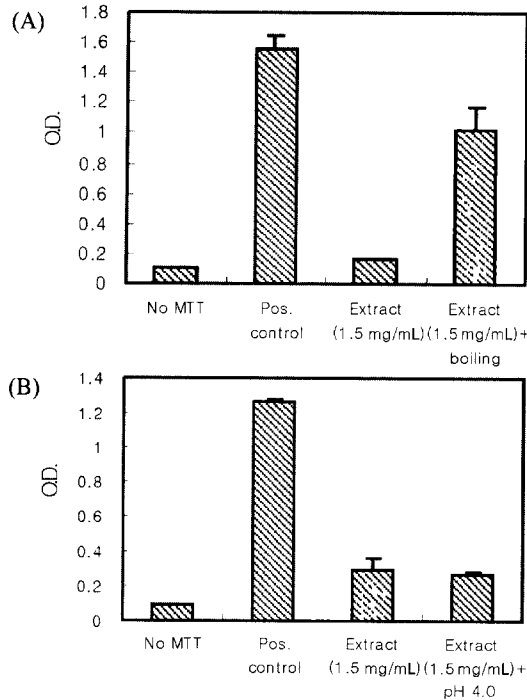
Each well of a 96 well plate was seeded with  $3 \times 10^4$  CaSki and HeLa cells. The cells were then treated with water extracts of *Lentinus edodes* over a different dose. After 3 days incubation, the cells were reacted with MTT for counting cell proliferation levels. The assay was performed in triplicate. Values and bars represent mean O.D. and SD, respectively.

#### CaSki 및 HeLa 종양세포주에 대한 표고버섯 추출물의 항종양 억제 효과

휴먼 자궁경부암 세포주인 CaSki(HPV 16-positive cells) 및 HeLa(HPV 18-positive cells) 에서 종양세포 성장억제 효과가 동일하게 탐지되는지를 확인하였다(Fig. 4). 표고버섯추출물을 0.5 및 1.5, 3, 4 mg/mL의 농도로 휴먼종양세포주에 첨가하고 3일간 배양 후 MTT방법으로 측정된 결과 Fig. 4에서 보듯이 동물자궁경부암세포주에서처럼 휴먼자궁경부암세포주에서도 유사하게 항종양효과가 탐지되었고  $IC_{50}$ 수치(CaSki: 700  $\mu$ g/mL, HeLa: 900  $\mu$ g/mL) 도 유사한 수준으로 나타났다. 이는 표고버섯추출물이 휴먼자궁경부암세포주에서도 직접적인 세포성장억제의 효과가 있음을 나타내었다.

#### 표고버섯추출물의 열처리 및 pH에 따른 항종양효과

표고버섯 추출물 내에 존재하는 항종양물질의 열안정성을 조사하기 위해서 표고버섯추출물을 boiling water에서 15분간 열처리 후 1.5 mg/mL의 첨가농도에서 열처리군과 비열처리군을 3일간 배양 종양세포주에 첨가하여 종양세포의 성장억제정도를 MTT방법을 통해 측정하였다. Fig. 5A 에서 보듯이 표고버섯추출물 첨가시 O.D. 값이 1.5 mg/mL에서 완전한 TC-1종양세포의 성장억제가 탐지되었다. 반면, 열처리군에서는 그러한 종양세포성장의 억제가 관찰되지 않았다. 이는 표고버섯추출물 내에 존재하는 종양세포 성장억제물질이 열에 민감하다는 것을 의미한다. 이전의 보고에서는 버섯류 균사체에서 단백당체를 추출시 높은 온도를 이용하였다(1,18,19). 이는 이전 보고에서 열수 추출법에 의해 얻어진 단백당체에 비교해 본 연구실에서 탐지된 항종양물질이 그 특성상 완전히 다르다는 것을 보여주며, 또한 이는 표고버섯내에 여러 다양한 항종양 성분이 존재함을 시사한다. 또한, 항종양물질이 pH에 민감한지를 확인하기 위하여 표고버섯추출물의 pH를 4로 조정 후 TC-1 종양세포주에 1.5 mg/mL농도로 첨가하여 실험한 결과 Fig. 5B 와 같이 1.5 mg/mL농도로 첨가 시 pH 변화에 관계없이 종양세포의 성장을 대조군과 유사한 수위에서 억제하여 pH에 의한 표고버섯 추출물의 항종양물질이 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.



**Fig. 5. Heat and pH sensitivity of *Lentinus edodes* extracts in the anti-tumor cell growth effect.**

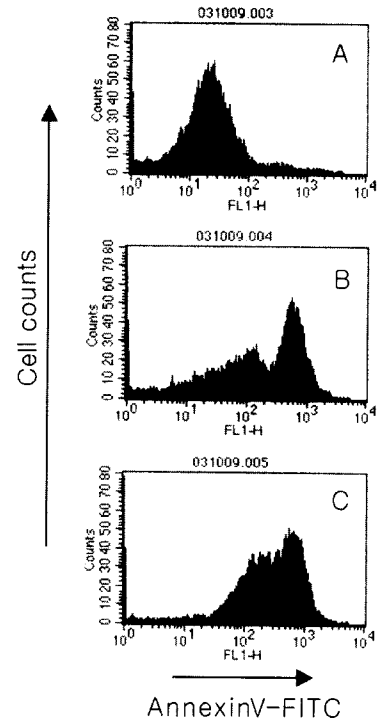
Each well of a 96 well plate was seeded with  $3 \times 10^4$  TC-1 cells. The cells were then incubated with either heat-treated (A) or pH-adjusted (B) water extracts of *Lentinus edodes* at a final concentration of 800  $\mu\text{g/mL}$  and 1.5 mg/mL. After 3 days incubation, the cells were reacted with MTT for counting cell proliferation levels. The assay was performed in triplicate. Values and bars represent mean O.D. and SD, respectively.

**표고버섯추출물의 TC-1 종양세포주에 대한 apoptosis 효과**

표고버섯 물 추출물의 직접적인 항종양효과가 apoptosis 과정에 의해 야기되는지를 확인하기 위하여 TC-1 종양세포주에 표고버섯 추출물을 800  $\mu\text{g/mL}$  및 1.5 mg/mL의 농도로 첨가하고 24시간 배양후 Annexin V-FITC를 이용하여 staining한 다음 FACS 분석하였다. Fig. 6은 표고버섯 추출물의 농도에 따라 apoptosis가 유도됨을 보여준다. 특히, Annexin V-stained 세포들이 대조구 (A)에 비해, 800  $\mu\text{g/mL}$  표고버섯추출물 (B) 처리 시 더 많은 세포들이 염색되었고 1.5 mg/mL 표고버섯추출물 (C) 첨가 시 대부분의 세포들이 염색되었다. 이는 표고버섯추출물이 종양세포주의 apoptosis를 유발하여 TC-1종양세포주의 성장을 억제함을 의미하며, 이는 Fig. 2 및 3의 표고버섯 추출물 농도에 의존하는 종양세포주 성장억제 패턴과 일치한다. 또한, 앞으로 종양세포내 apoptosis에 관여 하는 bcl-2, bax, caspase, p21 유전자의 발현 양상과 표고버섯 추출물이 어떤 상관 관계가 있는지를 규명하는 것은 의미가 있다고 본다.

**종양세포주에 대한 표고버섯추출물의 cell cycle arrest에 대한 효과**

표고버섯 추출물 첨가 시 종양세포주의 cell cycle에 어떠한 영향을 주는지를 확인하기 위하여 FACS 분석한 결과 Fig. 7과 같이 표고버섯추출물이 cell cycle에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. 즉, 대조구의 경우 G1 phase에 62.5%, G2/M phase에 15.5%의 세포들이 탐지되었고(Fig. 7A), 800  $\mu\text{g/mL}$  표고버섯추출물 처리 시 G1 phase에 55.2%, G2/M phase에 19.2%의 cell population이 탐지되었으며(Fig. 7B), 1.5 mg/mL 표고버섯추출물



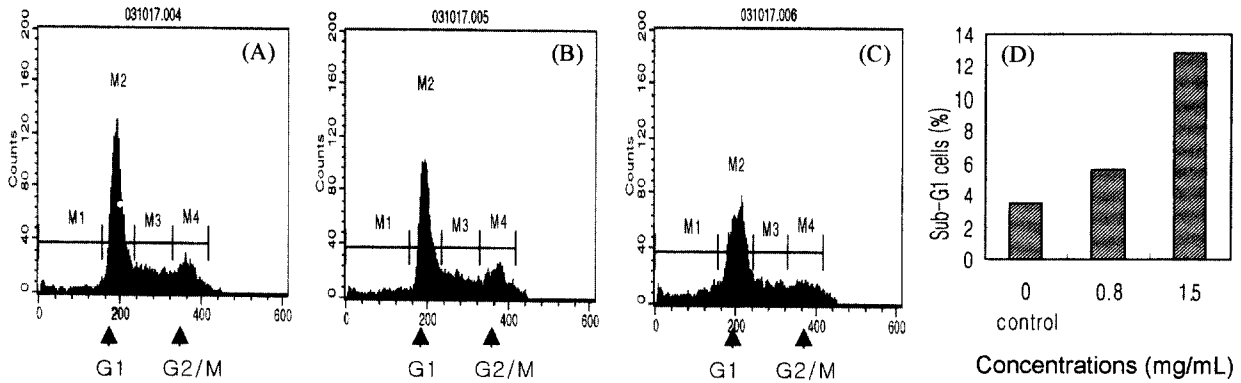
**Fig. 6. Dose-dependent induction of apoptosis by *Lentinus edodes* extracts in TC-1 cells.**

Sixty mm well plate was seeded with  $1 \times 10^6$  TC-1 cells. The cells were then treated with water extracts of *Lentinus edodes* at a final concentration of 800  $\mu\text{g/mL}$  and 1.5 mg/mL. After 24 hr incubation, the cells were reacted with Annexin V-FITC conjugates. The assay was repeated with similar results.

출물 처리 시 G1 phase에 55.0 %, G2/M phase에 14.4%의 cell population이 탐지되었다(Fig. 7C). 이는 표고버섯추출물 첨가 시 G1 phase에서 세포수가 감소함을 알 수 있었고 또한, sub-G1 phase에서는 대조구의 경우 3.5%, 800  $\mu\text{g/mL}$ 의 경우 5.6%, 1.5 mg/mL의 경우 12.8%로 표고버섯 추출물의 첨가농도가 증가함에 따라 apoptotic cells이 증가됨을 보여 주었다(Fig. 7D). 이와 같이 표고버섯 추출물은 apoptosis유발하여 종양세포의 성장을 억제하는 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.

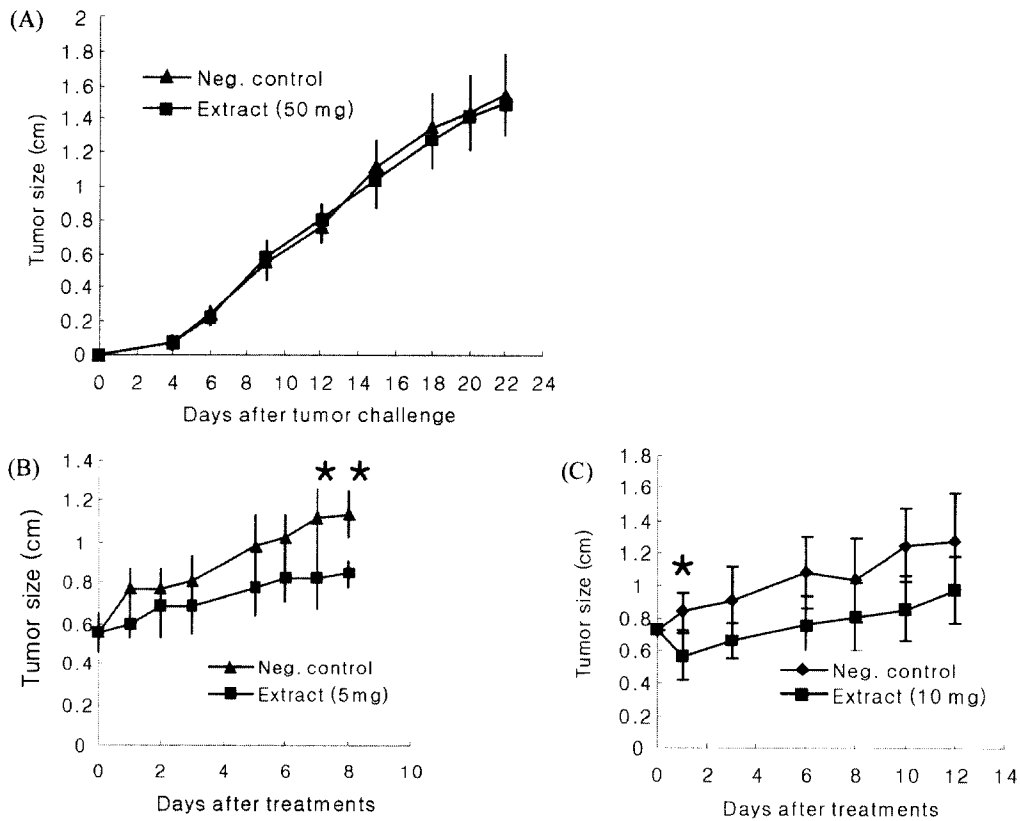
**표고버섯 추출물의 in vivo 종양억제 효과**

실험동물에 종양세포를 주사한 후 고농도의 표고버섯 추출물을 매일 주입기를 이용, 위장에 직접 투여하여 종양성장에 미치는 효과를 관찰한 결과 Fig. 8A에서 보듯이 고농도(50 mg/mouse)의 표고버섯추출물을 투여한 경우에도 대조구에 비해 어떠한 종양성장억제에 효과를 보이지 않았고 모든 시험군에서 종양이 형성되었다. 따라서, 표고버섯 물 추출물의 oral delivery시에는 항종양효과가 나타나지 않음을 확인하였다. 이전의 연구에서는 액체 배양한 표고버섯 균사체로부터 분리한 단백질이 면역활성을 통해 여러 종양세포의 성장을 억제한다고 보고되었다(1-4). 이들 연구 결과의 차이는 본 연구에서 추출된 항종양물질이 이전의 열수 추출물인단백다당체와 다를 수 있다. 다음으로, 표고버섯 물 추출물을 생리식염수에 녹여 직접 생성된 종양에 주사하여 종양성장억제 효과가 나타나 있는지를 확인하였다. 이를 위하여 표고버섯추출물을 주사 시 유도될 수 있는 종양성장억제 정도를 확인하기 위하여 5 및 10 mg의 표고버섯 추출물이 함유된 생리식염수 100  $\mu\text{L}$ 를 종양에



**Fig. 7. Evaluation of cell cycle arrests by *Lentinus edodes* extracts in TC-1 cells.**

Sixty mm well plate was seeded with  $1 \times 10^6$  TC-1 cells. The cells were then treated with water extracts of *Lentinus edodes* at a final concentration of 800  $\mu$ g/mL and 1.5 mg/mL. After 24 h incubation, the cells were reacted with propidium iodide for analyzing cell cycle arrests using flow cytometer. The assay was repeated with similar results.



**Fig. 8. Oral delivery vs intratumoral delivery of *Lentinus edodes* extracts in tumor growth suppression *in vivo*.**

(A) Each group of animals ( $n = 8-9$ ) was challenged subcutaneously with  $3 \times 10^4$  TC-1 cells per mouse and then fed via gavage with 100  $\mu$ L of water extracts of *Lentinus edodes* at a dose of 50 mg per mouse everyday. Tumor growth and size were measured twice per week. The mean tumor size was recorded. (B) Each group of animals ( $n = 5$ ) was challenged s.c. with  $3 \times 10^4$  TC-1 cells per mouse. When the mean tumor size reaches 6-7 cm, animals were injected intratumorally with 100  $\mu$ L of 5 mg water extracts of *Lentinus edodes* per mouse every 2 day (B) and 10 mg water extracts of *Lentinus edodes* per mouse once (C). Tumor size were measured twice per week. The mean tumor size was recorded. Values and bars represent mean tumor size and SD, respectively. Statistically significant at  $p < 0.05$  using the paired Student's t test compared to control group.

주사한 후 시간별로 종양크기를 caliper로 측정하였다. 시간별 동물의 종양크기를 측정한 결과 Fig. 8B 및 8C와 같이 대조구에 비교해 표고버섯 투여군에서 전반적으로 종양크기의 감소를 보여 주었다( $p < 0.05$ ). 이는 농도도의 표고버섯추출물을 동물의 종양에 직접 주사 시 종양크기의 감소를 유도함을 의미한다. 이들 연구결과는 이전의 연구결과로 표고버섯 열수 추출물

인 단백질다당체의 간접적 효과인 체내의 보체계 활성화(5), macrophage의 활성화(6), 인터페론 생성의 촉진(7) 등과 같은 면역활성 기전을 통한 항암효과와 다르게 작용하는 수용성 물질로 표고버섯내에 존재하는 유기산이나 폴리페놀류의 물질일 수 있으며 이 물질은 직접적으로 종양세포의 apoptosis(세포사멸)를 유도하여 항암효과를 유도할 수 있음을 증명하였다.

## 요 약

여러 발표에서 버섯추출물의 간접적 항종양효과에 대해 보고 되고 있다. 본 연구는 표고버섯의 직접적인 종양세포주 성장억제효과를 탐지하기 위하여 휴먼자궁경부암바이러스 타입 16의 종양유전자가 발현된 동물종양세포주(TC-1)를 이용하였다. 여러 추출용매 중 물을 이용한 추출액에서 TC-1 세포주의 성장억제효과를 탐지할 수 있었다. 이들 세포성장저해는 추출물첨가농도에 상응하며  $IC_{50}$ 는  $800 \mu\text{g/mL}$ 로 계산되었다. 또한, 표고버섯 물 추출물은 휴먼자궁경부암세포주(CaSki and HeLa)에서도 유사한 세포성장억제효과를 보여 주었다. 첨가농도가  $1.5 \text{ mg/mL}$ 에서는 첨가후 6시간째에 벌써 완전한 종양세포주(TC-1)의 성장억제가 탐지되었다. 이들 추출물을 열처리시 종양세포주성장억제가 소실되었으나 pH의 변화에서는 그대로 종양세포주성장억제효과가 탐지되었다. 이는 표고버섯 물 추출물 내에 있는 항종양물질이 열에 민감함을 의미한다. Annexin V 및 propidium iodide 염색에 의해 이들 TC-1종양세포주의 성장억제효과는 apoptosis에 의해 매개됨을 보여 주었다. 동물실험에서 표고버섯 물 추출물의 구강투여시 TC-1유래 종양의 성장 및 생성에 아무 효과를 주지 못하였다. 반면, 형성된 종양에 직접 주사시 종양크기의 감소가 탐지되었다. 요약하면 이들 연구에서 표고버섯 물 추출물에 존재하는 항암물질은 열에 민감하며 apoptosis에 의해 휴먼자궁경부암종양유전자에 의해 종양화된 세포주의 세포성장을 직접 억제하는 기능이 있음을 증명한다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 2003년 대형공동연구사업 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Lee BW, Park KM. Anti-tumor activity of protein-bound polysaccharides extracted from mycelia of *Lentinus edodes*. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 665-671 (1998)
- Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, Nakanishi M, Fukuoka F. Anti-tumor activities of aqueous extracts of some edible mushrooms. Cancer Res. 29: 734-735 (1969)
- Takuma S, Nobuo T. Further study of the structure of lentinan, antitumor polysaccharides from *Lentinus edodes*. Carbohydr. Res. 47: 99-104 (1976)
- Park MH, Oh KY, Lee BW. Anti-cancer activity of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 702-708 (1998)
- Dennert G, Tucker D. Antitumor polysaccharide lentinan a T cell adjuvant. J. Natl. Cancer. Inst. 51: 1727-1735 (1973)
- Hamuro G, Wagner H.  $\beta$ -1,3-glucan-mediated augmentation of alloreactive murine cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. Cancer Res. 38: 3080-3088 (1978)
- Chihara G. Immune modulation agents and their mechanisms (lentinan, a T cell oriented immunopotentiator). Basel 19: 409-436 (1985)
- Nakano H, Namatame K, Nemoto H, Motohashi H, Nishiyama K, Kumada K. A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. Hepatogastroenterology 46: 2662-2668 (1999)
- Kimura Y, Iijima S, Kato T, Tsujie M, Naoi Y, Hayashi T, Tanigawa T, Yamamoto H, Kurokawa E, Kikkawa N, Matsuura N. Usefulness of TS-1 and lentinan combination immunotherapy in advanced or recurrent gastric cancer-pilot study aiming at a randomized trial. Gan To Kagaku Ryoho 30: 1125-1130 (2003)
- Ahn WS, Kim DJ, Chae GT, Lee JM, Bae SM, Sin JI, Kim YW, Namkoong SE, Lee IP. Natural killer cell activity and quality of Life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus Blazei* Murill *Kyowa* in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. Int. J. Gynecol. Cancer. 61: in press (2004)
- Kim TY, Myoung HJ, Kim JH, Moon IS, Kim TG, Ahn WS, Sin JI. Both E7 and CpG-ODN are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7)-immortalized tumor cells: Involvement of CD4+ and CD8+ T cells in protection. Cancer Res. 62: 7234-7240 (2002)
- Ahn WS, Bae SM, Kim TY, Kim TG, Lee JM, Namkoong SE, Kim CK, Sin JI. A therapy modality using recombinant IL-12 adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. Hum. Gene Ther. 14: 1389-1399 (2003)
- Kim TW, Hung CF, Ling M, Juang J, He L, Hardwick JM, Kumar S, Wu TC. Enhancing DNA vaccine potency by coadministration of DNA encoding antiapoptotic proteins. J. Clin. Invest. 112: 109-117 (2003)
- Ahn WS, Han YJ, Bae SM, Kim TH, Rho MS, Lee JM, Namkoong SE, Park YS, Kim CK, Sin JI. Differential suppression of human cervical cancer cell growth by adenovirus delivery of p53 *in vitro*: arrest phase of cell cycle is dependent on cell line. Jpn. J. Cancer Res. 93: 1012-1019 (2002)
- Romijn JC, Verkoelen CF, and Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines *in vitro*: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. Prostate 12: 99-110 (1988)
- Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide induces apoptosis in pancreatic cancer cells via changes in cell cycle, caspase activation, and GADD expression. Pancreas 27: 174-179 (2003)
- Ahn WS, Huh SW, Bae SM, Namkoong SE, Park YS, Kim CK, Sin JI. A major constituent of tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cervical cancer cell growth through apoptosis, cell cycle arrest and regulation of gene expression. DNA Cell Biol. 22: 217-224 (2003)
- Park KM, Lee BW. Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from mycelia of *Lentinus edodes*. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 1236-1242 (1998)
- Rhee YK, Han MJ, Park SY, Kim DH. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 477-480 (2000)

(2003년 11월 24일 접수; 2004년 1월 20일 채택)