

## 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*) 조다당체의 면역세포 활성화 효과

강혜인<sup>2</sup> · 김재용<sup>3</sup> · 문광덕<sup>3</sup> · 서권일<sup>2</sup> · 조영숙<sup>2</sup> · 이상대<sup>4</sup> · 이성태<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 생물학과, <sup>2</sup>식품영양학과  
<sup>3</sup>경북대학교 식품공학과, <sup>4</sup>경남농업기술원

### Effect of the Crude Polysaccharide of *Pleurotus eryngii* on the Activation of Immune Cells

Hye-In Kang<sup>2</sup>, Jae-Yong Kim<sup>3</sup>, Kwang-Deog Moon<sup>3</sup>, Kwon-Il Seo<sup>2</sup>,  
Young-Sook Cho<sup>2</sup>, Sang-Dae Lee<sup>4</sup> and Sung-Tae Yee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biology and <sup>2</sup>Food and Nutrition,

Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 750-701, Korea

<sup>4</sup>GyeongNam Agricultural Research and Extension Services, Jinju 660-360, Korea

#### Abstract

The objective of the current study was to determine the effects of the crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* on mouse splenocytes, B cells, and macrophages *in vitro*. The crude polysaccharides directly induced the proliferation of spleen cells in a dose-dependent manner and increased IL-6 and IFN- $\gamma$  synthesis. The crude polysaccharides also increased the proliferation of B cells in a dose-dependent manner. The production of immunoglobulin G1, G2a and IgG3 in the presence of the crude polysaccharides was increased progressively in the culture supernatant. When the crude polysaccharide were used in macrophage cell line (RAW264.7) stimulation, there were marked induction of NO synthesis in a dose-dependent manner and IL-6, TNF- $\gamma$  and GM-CSF synthesis. These results suggest that the crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* seem to act as a potent immunomodulator causing augmentation of immune cell activity, and thus could be used as a biological response modifier having possible therapeutic effects against immunological disorders, without any side effects.

**Key words:** *Pleurotus eryngii*, B cells, cytokines, nitric oxide, immunoglobulins

#### 서 론

고도성장기에 따른 식생활의 변화와 의학의 발달로 인간의 평균수명이 연장되었지만, 문명의 발달에 따른 운동부족으로 성인병, 만성퇴행성 질환, 노인성 질환 등이 증가되고 있는 실정이다(1). 이러한 문제를 해결하기 위한 최신 의학의 연구와 더불어 천연물질 중 암 예방 성분이나 생리활성 조절 물질(biological response modifier: BRM) 및 식품 중 기능성 성분을 밝혀내어 이를 건강의 유지와 증진을 위해 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(2,3).

버섯(mushroom)은 분류학상으로 고등균류 중 진균류(Eu-mycetes)에 속하며, 대부분은 담자균류(Basidiomycetes)에 속한다(4). 이러한 버섯은 독특한 맛과 향이 뛰어나 기호성이 높은 식품으로 이용되어져 왔고, 당질, 단백질, 비타민, 아미노산, 무기질 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양소를 골고루 함유하고 있으며, 광범위한 약리 작용도 나타내므로 예로부터

부터 전통식품 및 민간약의 제제로서 널리 이용되어져 왔을 뿐만 아니라 항암활성, 면역증강 등의 효능작용 때문에 최근에는 기능성 식품 및 의약품 소재로 많이 이용되고 있다(5,6).

담자균류의 항암 성분에 관한 연구는 1960년 Roland 등(7)이 *Calvatia gigantea*로부터 담자균 최초의 항암성분인 Calvacine를 분리하였으며, 최근에는 표고버섯인 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 sarcoma-180세포에 강력한 종양억제 효과가 있는 Lentinan을 보고하였고(8), *Coriolus versicolor*(구름버섯, 운지버섯)에서 Krestin(PSK)(9), Copolang(10)과 Licovk(11)가 분리되었으며, *Schizophyllum commune*(치마버섯)에서 Schizophyllan(12)과, *Phellinus linteus*(상황버섯)에서 Meshima 등(13)의 다당체가 분리되어 항암 및 면역요법제로 이용되고 있다.

큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)은 프랑스, 이탈리아, 체코, 헝가리 및 러시아 등의 유럽 남부지역, 중앙아시아, 아프리카 북부와 아메리카 등의 주로 아열대 건조 목초지 토양에

\*Corresponding author. E-mail: sungtae@sunchon.ac.kr  
Phone: 82-61-750-3618, Fax: 82-61-750-3608

단생 또는 군생하고 있다(14-16). 큰느타리버섯은 분류학적으로 담자균아문(Basidiomycotina), 주름버섯목(Agaricales), 느타리버섯과(Pleurotaceae), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속하는 식용버섯이다(17,18). 이 버섯은 육질이 치밀하여 씹는 맛이 자연송이와 비슷하고, 일반느타리버섯에 비해 대가 굵고 길며 저장성이 좋아 예부터 유럽에서도 “초원의 꿀맛버섯”(19) 또는 “King oyster mushroom”(20)이라 하여 대중적 인기가 높다. 우리나라에서는 야생으로 채집된 기록은 없으나, 1997년경부터 인공재배된 것이 “새송이”라는 상품명으로 시판되어 그 인기가 급증하고 있다(21). 최근 상황버섯(목질진흙버섯)과 구름버섯 등은 암치료 의약품 등으로 이용되고 있으며, 영지, 신령버섯, 동충하초 등은 건강식품으로 개발되고 있다. 그리고 팽이버섯, 느타리버섯 등 식용버섯에 관한 연구도 진행되고 있으나, 큰느타리버섯의 기능성에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 큰느타리버섯 자실체에서 조다당체를 추출하여 기능성 식품으로서 활용도를 높이기 위해 면역세포 활성화에 미치는 효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

실험동물은 대한실험동물센터(충북 음성군)에서 특정병원체부재(specific pathogen free) Balb/c 생쥐를 공급받아 사용하였다. 이들 생쥐는 2주일간 실온에서 물과 사료(실험동물용 사료, 삼양유지사료, 한국)를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 생후 8~12주된 암컷을 사용하였다.

### 실험재료

본 실험에 사용한 동결 건조된 큰 느타리버섯 자실체는 경남농업기술원 농산물 가공 센터(경남, 진주)에서 제공받아 사용하였다. 동결 건조된 큰 느타리버섯 자실체 50 g을 잘게 부순 다음 증류수를 첨가하여 100°C에서 9시간 동안 열수추출한 후 여과하여 여과액을 evaporator로 농축한 후 3배량의 에탄올(95%)을 넣고 4°C에서 24시간 동안 침전시켰다. 12,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하여 침전물을 분리하고 소량의 증류수로 침전물을 녹인 후 투석막(MWCO: 12,000 Da)에 넣고 3일간 투석을 실시하였다. 투석 후 침전물을 제거하고 동결 건조하여 조다당체를 추출 분리하였다. 추출한 조다당체는 인산식염수(PBS)에 현탁하여 37°C에서 1시간 진탕한 다음, 2,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 회수하여 필터(0.45 µm)를 통과시켜 최종 추출물을 얻었다. 추출물은 110°C에서 충분히 건조시킨 후 건조중량을 측정하여 사용하였다.

### 사용 시약

세포배양에 필요한 배지 RPMI 1640과 배지에 첨가하는

항생제(antibiotic-antimycotic), FCS(fetal calf serum)는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였고, sodium bicarbonate(NaHCO<sub>3</sub>), 2-ME(2-mercaptoethanol), sulfanilamide, N-1-naphthyl-ethylen-diamine은 Sigma(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다. 또한 세포증식을 측정하는데 사용한 시약(Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)은 Promega(Madison, USA) 제품을 사용하였고, cytokine 측정에 필요한 항체는 Pharmingen(San Diego, USA) 제품을 사용하였다(22).

### 비장세포 분리법

면역세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 생쥐의 비장세포를 이용하였다. 생쥐를 경추탈골로 희생시킨 뒤 비장을 무균적으로 분리하여 핀셋이나 메쉬를 이용하여 단일세포 부유액을 만들었다. 단일세포 부유액을 RPMI 1640 배양액으로 3회 원심 침전하여 세척한 다음, 10% FCS-RPMI 1640 배지로 5×10<sup>6</sup> cells/mL 농도가 되게 희석한 후 96 well plate에 well당 100 µL씩 첨가하였다. 이때, 실험재료를 농도별로 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 일정시간 배양한 다음, Cell Titer 96<sup>®</sup> solution을 이용하여 세포증식을 측정하였다(23).

### B세포 분리법

B세포는 비장세포 부유액을 10 mL의 10% FCS-RPMI 1640에 희석한 후에 anti-Thy1.2 mAb ascites를 넣고 4°C에서 60분간 incubation하였다. 그 후에 rabbit complement를 첨가하여 37°C water bath에서 45분간 incubation하여 T세포를 제거하였다. 그 다음 Sephadex G-10 column을 이용하여 나머지 부착세포를 제거하여 분리하였다(22). 분리한 B세포는 실험재료와 같이 배양한 후, 증식정도는 Cell Titer 96<sup>®</sup> solution을 이용하여 측정하였다.

### 세포증식 측정법

세포증식 측정은 분리한 비장세포 및 B세포를 96 well plate에 넣고 여기에 조다당체 추출물을 농도별로 넣어 배양한 다음 증식정도를 측정하였다. 즉 세포배양 well에 Cell titer 96<sup>®</sup> solution을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 4~8시간 동안 배양한 다음 Microplate reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 사이토카인 측정법

조다당체 추출물, Con A 또는 lipopolysaccharide(LPS)를 비장세포에 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 IL-2, 4, 6, IFN-γ, TNF-α, GM-CSF의 양을 측정하였다. 즉 일차 항체를 coating buffer(0.1 M NaHCO<sub>3</sub>)에 희석하여 plate에 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 다음 washing 용액(0.05% Tween 20/PBS)으로 세척한 다음, 소혈청이 포함된 인산완충액(10% FCS/PBS)으로 blocking한 후 배양 상층액을 적절하게 희석하여 첨가한 다음, biotin과 결합한 이차 항체를 첨가하였다. 일정한 시간 후에 avidin-

peroxidase를 첨가하고, 기질(2,2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 넣어 발색시키는 효소 항체법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 이용해 Microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 각 cytokine의 측정 한계치는 10 pg/mL이었다(24).

#### 면역글로블린 농도 측정

비장세포에서 분리한 B세포에 조다당체 추출물 또는 LPS를 첨가하여 48시간 배양한 배양액 내의 IgM, G1, G2a, G2b, G3 농도를 효소항체법을 이용해 Microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 일산화질소 측정

안정된 일산화질소 산화물인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite)는 Griess 반응을 이용하여 측정하였다. 대식세포주(RAW264.7)를 조다당체 추출물 또는 LPS와 함께 48시간 배양한 후 배양 상층액을 96 well plate에 100 µL씩 넣고 여기에 Griess 시약(0.1% N-1-naphthyl-ethylenediamine in H<sub>2</sub>O : 1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, Microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 64 µM에서 0.5 µM까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다(25).

#### 통계처리

실험결과는 평균값±SD로 나타내었고 student t-test를 이용하여 통계처리한 후 p<0.05, p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 비장세포의 증식

비장세포의 증식능에 대한 영향을 알아보기 위하여 생쥐에서 분리한 비장세포에 큰느타리버섯 조다당체 추출물을 농도별로 첨가하여 72시간 배양한 후에 증식능을 측정하였다. 그 결과 B세포의 증식을 특이적으로 유도하는 LPS와 T세포의 증식을 특이적으로 유도하는 Con A(concanavalin A)에 의해서 비장세포는 농도 의존적으로 증식하는 것을 확인할 수 있었으며, 조다당체 추출물을 첨가하였을 때 저농도

에서는 비장세포의 증식을 확인할 수 없었으나, 고농도인 300, 1,000 µg/mL에서는 무처리 대조군에 비해 비장세포가 증식하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 즉 큰느타리버섯 조다당체 추출물은 고농도에서 비장세포의 증식반응을 유도하였으며, 최대농도인 1,000 µg/mL에서 최대 증식반응이 일어나는 것으로 나타났다.

#### 비장세포의 사이토카인 생산

비장세포의 증식반응이 일어나면, 증식하는 세포는 여러 종류의 면역반응을 매개하는 사이토카인을 분비한다. 즉, 비장세포의 증식반응이 일어날 때 분비되는 사이토카인의 종류를 알면 사이토카인이 매개하는 면역반응과 증식하는 세포의 종류를 알 수 있다. 따라서 조다당체 추출물이 비장세포의 증식반응을 유도할 때 어떤 종류의 사이토카인을 분비하는지 알아보았다. 비장세포 중에서 B세포의 증식을 유도하는 LPS는 대조군에 비해 소량의 IL-2와 IL-4 분비를 유도하였지만, T세포의 증식을 유도하는 Con A는 많은 양의 IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ 분비를 유도하였다(Table 1). 조다당체 추출물로 자극하였을 때 무처리 대조군에 비해 소량의

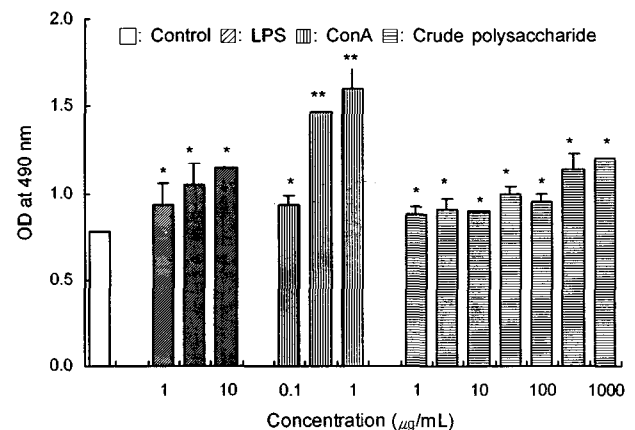


Fig. 1. The effect of crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* on the proliferation of spleen cells.

The spleen cells (Balb/c,  $5 \times 10^5$  cells/well) were stimulated for 72 hours, with various doses of LPS, Con A or crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii*.

\*p<0.05, \*\*p<0.01: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

Table 1. Effect of crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* on the production of various cytokines in spleen cells

Conditions	Cytokines, pg/mL			
	IL-2	IL-4	IL-6	IFN-γ
Control	<10	<10	964.0±35.4	1,066.0±66.0
LPS (10 µg/mL)	23.3±0.0*	72.7±5.9*	2,214.0±106.1*	1,001.0±120.2
ConA (1 µg/mL)	6,215.0±292.7**	1,270.0±61.3**	3,624.0±35.4**	48,942.0±4200.2**
Crude polysaccharide (1,000 µg/mL)	31.6±19.8*	<10	2,379.0±42.4*	4,478.0±339.4**

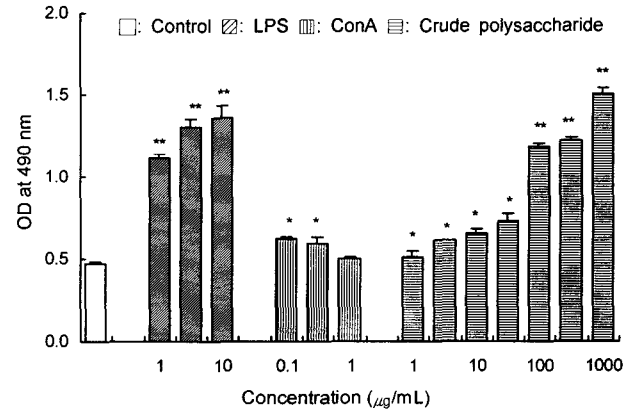
Spleen cells ( $5 \times 10^6$  cells/well) were stimulated with LPS, Con A or crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine activities in culture supernatants were determined as described under materials and methods. The results are expressed as means±SD of triplicate assays.

\*p<0.05, \*\*p<0.01: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

IL-2와 IL-4를 분비하였지만 IL-6는 약 2.5배, IFN- $\gamma$ 는 약 4배 정도 많은 양의 분비를 유도하였다. IL-2와 IL-4는 항원 자극에 대해 T세포가 분비하는 사이토카인으로, IL-2는 적응면역반응에 관여하는 보조 T세포와 세포독성 T세포의 증식을 유도하는 역할을 하며(26), IL-4는 역시 적응면역반응에 관여하는 B세포의 항체 생산을 유도하는데 필요한 사이토카인으로 알려져 있다(27). 그리고 IFN- $\gamma$ 는 내재면역반응에 관여하는 대식세포를 활성화시키는 중요한 역할을 하는 사이토카인이다(28). 이상의 결과 큰느타리버섯 조다당체 추출물은 비장세포 중에서 T세포의 증식을 유도하지는 않는 것을 간접적으로 알 수 있었다.

**B세포의 증식**

앞 실험에서 조다당체 추출물에 대한 비장세포의 증식 유도 효과를 알아본 결과 고농도에서 증식을 유도하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이때 증식하는 비장세포가 분비하는 사이토카인의 종류를 알아본 결과 조다당체 추출물이 직접적으로 T세포의 증식을 유도하지 않는 것을 알 수 있었다(Table 1). 따라서 비장세포 중에서 증식하는 세포는 B세포일 가능성이 높기 때문에 비장세포에 포함되어 있는 B세포만을 분리하여 조다당체 추출물의 B세포 증식 유도 효과를 측정하였다. B세포는 비장세포 부유액을 T세포 특이적 항원인 Thy 1.2에 대한 항체와 토기 보체로 처리하여 T세포를 제거하고 sephadex G-10 column을 이용하여 대식세포와 같은 부착세포를 제거하여 순수하게 분리하였다. 분리한 B세포에 조다당체 추출물을 농도별로 첨가하여 72시간 배양한 후 B세포의 증식정도를 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 T세포의 증식반응을 유도하는 Con A에 대해서는 반응하지 않고, B세포의 증식반응을 유도하는 LPS에 대해서만 증식반응이 유도되는 것으로 나타나 B세포가 순수하게 분리된 것을 알 수 있었다. 그리고 무처리 대조군에 비해 조다당체 추출물을 처리한 실험군에서 농도 의존적으로 B세포의 증식을 유도하는 것으로 나타났으며, 특히 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 고농도에서 강력한 증식 유도 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 즉 큰느타리버섯 조다당체 추출물은 비장세포 중에서 특히 B세포의 증식을 직접적으로 유도하는 것을 알 수 있었다.



**Fig. 2. The effect of crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* on the proliferation of B cells.** Purified B cells ( $3 \times 10^5$  cells/well) were stimulated for 72 hours, respectively, with various doses of LPS, Con A or crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* and assayed for proliferation. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Significant difference between untreated control and other experimental groups.

**B세포의 면역글로불린 생산**

앞 실험에서 B세포의 증식 유도 효과를 측정할 결과 조다당체 추출물이 B세포의 증식을 강력하게 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 분열 증식하는 B세포는 면역글로불린을 생산 분비하는데, 조다당체 추출물이 B세포의 면역글로불린 생산을 유도하는 효과가 있는지 알아보았다. 먼저 B세포가 생산하는 IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3의 양을 측정하기 위해 비장세포에서 분리한 B세포에 조다당체 추출물을 첨가하여 48시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 각각의 면역글로불린 양을 측정하였다(Table 2). 그 결과 무처리 대조군에 비해 조다당체 추출물을 첨가하였을 때 모든 종류의 면역글로불린 양이 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히 IgG1은 약 2배, IgG2a는 약 7배, IgG3는 약 6배 정도의 많은 양을 생산 분비하는 것으로 나타났다. 즉 큰느타리버섯 조다당체 추출물은 B세포의 증식뿐만 아니라 IgG1, IgG2a, IgG3의 생산량을 증가시켜 체액성 면역반응을 유도하는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

**일산화질소 생산**

대식세포는 박테리아와 같은 항원이 침입하였을 때, 일차

**Table 2. Effect of crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* on the production of immunoglobulin isotypes in B cells**

Conditions	Immunoglobulin isotypes, $\mu\text{g}/\text{mL}$				
	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Control	4,837.5 $\pm$ 95.5	2,377.0 $\pm$ 169.7	875.0 $\pm$ 0.0	608.0 $\pm$ 0.0	195.0 $\pm$ 0.0
LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5,467.5 $\pm$ 530*	2,662.0 $\pm$ 63.6	2,062.5 $\pm$ 53.0*	808.3 $\pm$ 0.0*	2,910.0 $\pm$ 176.8**
Crude Polysaccharide (1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	5,160.0 $\pm$ 424.3*	5,226.0 $\pm$ 84.9*	612.5 $\pm$ 194.5	725.0 $\pm$ 23.6*	1,120.0 $\pm$ 35.4**

Purified B cells ( $3 \times 10^6$  cells/well) were stimulated with LPS or crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* for 48 hours and the supernatants were assayed for immunoglobulin isotypes. Concentrations of immunoglobulins in culture supernatants were determined as described under materials and methods. The results are expressed as means  $\pm$  SD of triplicate assays.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Significant difference between untreated control and other experimental groups.

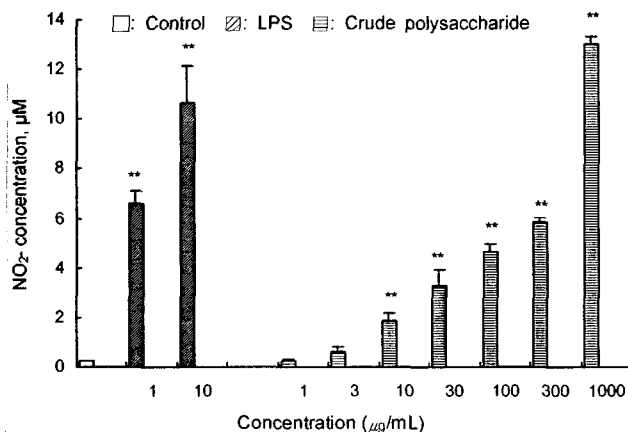
**Table 3. Effect of crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* on the secretion of various cytokines in a macrophage cell line**

Conditions	Cytokines, pg/mL		
	IL-6	TNF- $\alpha$	GM-CSF
Control	337.0 $\pm$ 10.6	<10	<10
LPS (10 $\mu$ g/mL)	3,186.0 $\pm$ 31.8**	720.0 $\pm$ 424.3**	92.0 $\pm$ 16.5**
Crude Polysaccharide (1,000 $\mu$ g/mL)	1,955.0 $\pm$ 28.3**	1,190.0 $\pm$ 466.9**	10.3 $\pm$ 9.4

RAW264.7 cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were stimulated with LPS or crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* for 24 hours and the supernatants were assayed for various cytokines. Cytokine levels in culture supernatants were determined as described under materials and methods. The results are expressed as mean $\pm$ SD of triplicate assays.

\*p<0.05, \*\*p<0.01: Significant difference between untreated control and other experimental groups.

적인 면역반응을 담당하는 세포로서, 우선 침입한 박테리아를 잡아먹는 식세포 작용을 한다. 이때, 잡아먹힌 박테리아는 급방 죽는 것이 아니라 대식세포 내 살균작용에 의해 죽고 분해된다. 박테리아를 죽이기 위해 대식세포가 분비하는 물질은 여러 가지가 알려져 있지만, 그 중에서 최근에 밝혀진 것으로 일산화질소(nitric oxide)가 있다(25). 따라서 조다당체 추출물이 대식세포의 일산화질소 생산에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다. 대식세포주(RAW264.7)에 조다당체 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 배양액 중 대식세포가 생산한 NO가 산화된 형태인 NO $_2^-$  농도를 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 무처리 대조군에 비해 조다당체 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 대식세포의 일산화질소 생산을 유도하였다. 특히 10  $\mu$ g/mL 이상의 고농도에서 현저히 많은 양의 일산화질소를 생산하는 것으로 나타났다. 즉 큰느타리버섯 조다당체 추출물은 단독으로 대식세포를 활성화시켜서 일산화질소 생산을 유도하는 것을 알 수 있었다.

**Fig. 3. Effect of crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* on the production of nitric oxide in a macrophage cell line.**

RAW264.7 ( $5 \times 10^4$  cells/well) were cultured either in medium alone or in medium that contained LPS or crude polysaccharide isolated from fruit body of *Pleurotus eryngii* for the production of nitric oxide. After 48 hours of culture, the amounts of NO production were measured by the Griess method as described under materials and methods.

\*p<0.05, \*\*p<0.01: significant difference between untreated control and other experimental groups.

### 대식세포의 사이토카인 생산

대식세포는 항원의 자극을 받아 활성화되면 IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF 등을 분비하여 면역반응을 조절한다. 특히 TNF- $\alpha$ 는 종양괴사인자(tumor necrosis factor)로 알려진 물질로 종양세포를 파괴하는 사이토카인이고(29), IL-6는 간세포가 피브리노겐과 같은 몇 가지 혈장단백질을 합성하도록 유도하며 B세포 분화를 유도하는 B세포 성장인자로 작용한다(30). 그리고 GM-CSF(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)는 골수전구세포의 분화와 증식을 유도하여 과립구와 대식세포를 만드는 작용을 한다. 따라서 조다당체 추출물이 대식세포가 생산하는 이들 사이토카인의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 검색하였다. 분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여 대식세포주에 조다당체 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 사이토카인의 분비량을 측정하였다(Table 3). 대식세포를 활성화시키는 물질인 LPS에 의해서 많은 양의 IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF 생산이 유도되는 것으로 나타났다. 그리고 조다당체 추출물을 처리하였을 때 무처리 대조군에 비해 IL-6, TNF- $\alpha$ 의 분비가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 이러한 대식세포 사이토카인 생산량은 대식세포를 활성화시키는 LPS보다 높게 나타났다. 따라서 큰느타리버섯 자실체 추출물은 대식세포를 활성화시켜 다양한 사이토카인을 분비하여 항종양 및 면역 활성을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

### 요 약

큰느타리버섯의 기능성 식품으로서 활용도를 높이기 위해 동결 건조된 자실체에서 분리한 조다당체 추출물이 면역세포 활성화에 미치는 효과를 조사한 결과는 다음과 같다. 조다당체 추출물은 300 및 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서 비장세포의 증식을 유도하였으며, 이때 비장세포는 IL-6와 IFN- $\gamma$  분비를 유도하는 것으로 나타났다. 조다당체 추출물은 농도 의존적으로 B세포의 증식을 유도하였으며, 특히 100  $\mu$ g/mL 농도 이상에서는 B세포의 증식이 현저히 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 조다당체 추출물 1,000  $\mu$ g/mL 농도에서 B세포가 생산하는 IgG1, IgG2a, IgG3의 분비량이 현저히 증가

하였다. 또한 농도 의존적으로 대식세포주의 일산화질소 생산을 유도하였으며, 대식세포가 분비하는 IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF의 생산도 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

## 문 헌

1. 문수재. 1995. 영양과 건강. 3th. 이용하. 지구문화사, 서울.
2. 최동성, 고하영. 1995. 식품기능화학. 2판. 주병오. 지구문화사, 서울.
3. Kim SW, Kim ES. 1997. Studies on the immunomodulating effect of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *Korean J Sci Nutr* 26: 148-153.
4. Lee BW, Lee MS, Park KM, Kim CH, Ahn PU, Choi CU. 1992. Anticancer activities of extract from the Mycelia of *Coriolus versicolor*. *Korean J Microbiol Biotechnol* 20: 311-315.
5. Choi SH. 2000. Extration and purification of physiologically active materials from agaricus blazei fruiting bodies. *MS Thesis*. So Gang University.
6. Lee JW, Bang KW. 2001. Biological activity of *Phellinus spp.* *Food Industry and Nutr* 6: 25-33.
7. Roland JF, Chmielwewicz ZF, Weiner BA, Gross AM, Boening OP, Luck JV, Bardos TJ, Really HC, Sugiura K, Stock CC, Lucas EH, Byerrum RU, Stevens JA. 1960. Calvacine, a new antitumor agent. *Sci* 132: 1987-1988.
8. Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (an edible mushroom). *Cancer Res* 30: 2776-2781.
9. Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayshi H, Nomoto K, Orita K. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treat Rev* 11: 131-155.
10. Moon CK, Lee SH, Mock MS, Kim DO. 1987. Antitumor activity of the polysaccharide-fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its effects on the immune function. *Yakhak Hoeji* 31: 126-132.
11. Park YM, Yoon SK, Park SH, Baeg NJ, Kim BS. 1993. Efficacy and safety of *Coriolus versicolor* polysaccharide (Licovek) in the treatment of chronic type B hepatitis. *Korean J Pharmacol Ther* 1: 45-48.
12. Komatsu N, Okubo S, Kikumoto S, Kimura K, Satio G. 1969. Host-mediated antitumor action of *schizophyllan*, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* 60: 137-144.
13. Han MW, Ko KS, Chung KS. 1995. Liquid cultivation of *Phellinus linteus* mycelium and preparation of antitumor and immunostimulating substance. *Korea Patent Open No* 95: 7860.
14. Dermar A. 1974. *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel in Slovakia. *Ceske Mykologie* 28: 57-59.
15. Zadrazil F. 1974. The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus eryngii*. *Mushroom Science IX*(Part 1): 621-655.
16. Rajarathnam S, Bano Z. 1987. *Pleurotus* mushroom. Part 1. A morphology, lifecycle, taxonomy, breeding and cultivation. *CRC Crit Food Sci Nutr* 26: 157-222.
17. Hilber O. 1989. Valid, invalid and confusing taxa of the enus *Pleurotus*. *Mushroom Sci* 12: 241-248.
18. Boekhout T. 1990. *Pleurotus*. *Flora Agaricina Neerlandica* 2: 20-24.
19. Eger G. 1978. Biology and breeding of *Pleurotus*. In *The biology and cultivation of edible mushroom*. Chang ST, Hayes WA, eds. Academic Press, New York.
20. Vasilkov PB. 1995. *Abriss der geographischen Verbreitung der Hutpilze in der Sowjetunion*. Moskau, Leningrad.
21. Kim HK, Cheong JC, Seok SJ, Kim GP, Cha DY, Moon BJ. 1997. The artificial cultivation of *Pleurotus eryngii* (II). *The Korean J Mycology* 25: 311-319.
22. Jeong SJ, Yee ST, Jo WS, Yu SH, Lee SH, Lim YJ, Yoo YH, Kim JM, Lee JD, Jeong MH. 2000. A novel factor isolated from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates mouse B cells and human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity* 68: 5132-5138.
23. Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Jo SK, Byun MW, Cho HW, Seo KI, Yee ST. 2000. Immunosuppressive effects of herbal plant extracts alloantigen reactive cell proliferation and cytotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1133-1138.
24. Kato T, Morokata T, Igarashi O, Yee ST, Inobe M, Uede T, Azuma M, Okumura K, Nariuchi H. 1997. Costimulatory effect of IL-2 on the activation of naive, memory CD4<sup>+</sup> T cells, and Th1 clone. *Cellular Immunology* 176: 50-58.
25. Yee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extract in mouse macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.
26. Jain J, Loh C, Rao A. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 7: 333-342.
27. Osmond DG, Rolink A, Melchers F. 1998. Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today* 19: 65-68.
28. Hayward AR, Chmura K, Cosyns M. 2000. Interferon-gamma is required for innate immunity to *Cryptosporidium parvum* in mice. *J Infect Dis* 182: 1001-1004.
29. Wajant H, Grell M, Scheurich P. 1999. TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 10: 15-26.
30. Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L. 1999. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 23: 217-230.

(2004년 4월 28일 접수; 2004년 8월 10일 채택)