

금사상황버섯 추출물이 사람의 natural killer 세포 활성화에 미치는 영향

엄상용 · 장연위 · 김남식 · 강종원 · 한윤수¹ · 신경섭²
송형근³ · 박순영⁴ · 김정수⁵ · 김 현 · 김용대*

충북대학교 의과대학 예방의학교실, ¹소아과학 교실, ²진단검사의학교실, ³병리학교실,
⁴경희대학교 의과대학 예방의학교실, ⁵알라바마 의과대학 생리 및 생물물리학과

Effects of Keumsa Sangwhang (*Phellinus linteus*) Mushroom Extracts on the Natural Killer Cell Activity in Human

Sang-Yong Eom, Yan Wei Zhang, Nam-Sik Kim, Jong-Won Kang, Youn-Soo Hahn¹, Kyeong-Seob Shin²,
Hyung-Gen Song³, Soon-Young Park⁴, Jeong-Su Kim⁵, Heon Kim, and Yong-Dae Kim*

Department of Preventive Medicine, ¹Department of Pediatrics, ²Department of Laboratory Medicine,
³Department of Pathology, College of Medicine, Chungbuk National University,
⁴Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Kyung-Hee University,
⁵Department of Physiology & Biophysics, College of Medicine, University of Alabama at Birmingham

Abstracts A randomized, double blind, placebo-controlled human intervention study involving 62 healthy volunteers was performed to investigate the effects of Keumsa sangwhang (*Phellinus linteus*) mushroom extracts (KPLE) on natural killer (NK) cell activity in peripheral blood. The volunteers were randomly distributed into two groups, one receiving KPLE (3.3 g/day) and the other a placebo by oral administration for 8 weeks. In this study, the number of NK cells did not increase with KPLE administration, however the cytotoxic activity of NK cells against the Jurkat leukemia cell line increased significantly. This result suggests that administration of KPLE induces cell-mediated immunity by increasing NK cell activity in humans.

Key words: Keumsa sangwhang (*Phellinus linteus*) mushroom extracts, human intervention study, natural killer cell activity

서 론

상황버섯(*Phellinus linteus*)의 자실체 추출물은 소화기 계통의 암에 억제효과가 있다고 알려지면서(1) 많은 연구가 진행되어 항암활성(2) 및 대장암과 방광암 등의 원인효소인 장내세균 유해효소 저해 작용 등(3) 상황버섯의 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 상황버섯의 추출물이 B-cell의 기능을 증진시키고(4), 상황버섯에서 추출된 다당체가 체액성 및 세포성 면역반응을 항진시킨다는 연구보고도 있다(5). 한편, Pyo 등(6)은 상황버섯의 추출물이 마우스의 체액성 면역기능을 향상시키고, 양성종양의 치료제인 cyclophosphamide와의 병용 투여 시 cyclophosphamide에 의해 나타나는 면역독성을 경감시킨다고 보고한 바 있으며, Song 등(7)은 인공재배 상황버섯과 자연 상황버섯의 자실체 열수추출 다당체의 항보체 활성이 비슷하여 면역활성 측면으로는 인공 상황버섯의 이용가능성이 있다고 보고한 바 있다. 한편, Kim 등(8)은 상황버섯의 추출물이 마우스의 비장세포에서 IL-2의 역할과 유사한 기능이 있음을 밝힘으로써 상황버섯 추출물이 NK(natural killer)

세포의 활성화에 영향을 줄 가능성에 대해 언급하였다. NK 세포는 large granular lymphocytes(LGLs)로서 특성의 암세포나 바이러스에 감염된 세포 등을 파괴하며 종양의 형성이나 바이러스 감염에 대한 숙주방어에 관여할 뿐 아니라 체액성 면역이나 조절작용에도 매우 중요한 역할을 하고 있다(8-10). 따라서, 상황버섯 추출물에 의한 면역력 증강 및 항암 기전에 NK 세포가 관여하고 있을 가능성이 매우 높다. 그러나, 사람을 대상으로 상황버섯 추출물의 면역증강 효과를 입증한 연구는 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 재배 상황버섯의 추출물이 natural killer(NK) 세포 활성화에 미치는 영향을 인체 실험을 통해 조사하였다.

연구대상 및 방법

피험자 선정 및 투약

금사상황버섯은 금사상황버섯농원(경기도 여주군 소재)으로부터 제공받아 인체 시험에 사용하였다. 피험자는 건강한 지원자로서 20~75세 남성 및 임신 가능성이 없는 비수유부 여성으로 하였으며, 투여군과 대조군 각각 31명씩 모집하였다. 시험에 들어가기 전 2주간의 스크리닝 기간을 갖고 마지막 날에 환자가 시험의 대상환자요건에 적합한지를 판단하였다. 투약군 배정은 block randomization 기법에 의하여 무작위 배정표를 이용하였다.

피험자 선정 시 다음의 경우는 제외하였다. 1) 기능성식품 또는 버섯류에 과민증 또는 그 병력이 있는 피험자 2) 활성 간질 환, 면역관련 질환 또는 중증의 간, 신부전 피험자 3) 악성종양,

*Corresponding author: Yong-Dae Kim, Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, 12 Gaeshin-dong Heungduk-gu Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
Tel: +82-43-261-2845
Fax: +82-43-274-2965
E-mail: ydkim@chungbuk.ac.kr
Received April 13, 2006; accepted October 7, 2006

폐질환, 백혈병, 교원질증, 다발성경화증, 알레르기성피부질환 및 기타 자가면역질환 등의 전신질환이 진행되고 있는 피험자 4) 최근 1개월 이내에 다른 기능성식품 또는 면역관련 약물을 복용한 경험이 있거나 최근 1개월 이내 염증관련 질환의 경험이 있는 피험자 5) 기타, 의사가 부적합하다고 판단하는 피험자 모집 결과, 피험자의 평균 연령은 40.9 ± 9.7 세였으며 남자가 19명 여자가 43명이었다. 각 피험자들은 금사상황버섯 추출물을 8주간 하루 3캡슐씩 2회, 총 6캡슐 (3.3 g/일) 또는 위약을 투여 받았다. 투여기간 및 투여용량은 금사상황버섯 추출물의 랫드에 대한 13주 경구 반복투여독성시험 결과에 따라 독성이 나타나지 않는 농도에서 중간차이에 대한 불확실성계수를 감안하여 결정하였다. 피험자로부터 서면동의서를 얻고 기초조사, 생명징후, 과거력, 약물복용 및 치료경험 등을 측정하고 이를 충북대학교 의과대학 예방의학교실에서 분석하였다.

NK 세포의 활성 및 세포 수 측정

대상자들의 말초 정맥혈을 채혈하여 EDTA-tube에 넣은 다음 Ficoll-Hypaque을 이용한 gradient sedimentation 방법으로 단핵세포(peripheral mononuclear cells, PMBC)를 분리하였다(11). Effector 세포의 분리는 제품에 표기된 방법에 따라 시행하여 NK 세포의 활성 분석에 이용하였다.

NK 세포의 활성은 최근에 Nociary 등(12)이 개발한 형광염색약을 이용한 방법을 사용하여 측정하였다. 먼저, 표적세포(Jurkat, Human leukemia cell line)를 1×10^5 cells/mL의 농도로 희석하여 96-well culture plate에 100 μ L씩 분주한 후 분리한 effector 세포를 1×10^4 cells/mL의 비율(10:1)로 섞어주고 형광염료인 Alamar-Blue 20 μ L를 각 well에 첨가하여 5% CO₂의 가습한 배양기 내에서 37°C의 온도로 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액의 형광의 세기를 excitation 530, emission 590 nm의 파장에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 이것에 의한 %세포독성은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\% \text{ lysis} = 100 \times \{[(\text{AF of targets alone})] - [(\text{AF of mix}) - (\text{AF of effectors alone})]\} \times \{\text{AF of targets alone}\}^{-1}$$

(AF: absolute fluorescence units for the triplicate - fluorescence units of media alone)

한편, NK 세포의 수는 (주)다이노나(서울, 대한민국)에 의뢰하여 flow cytometric analysis를 이용한 CD56⁺인 세포의 개수로 정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 모집된 62명의 지원자는 남자가 19명, 여자가 43명으로 여자의 수가 월등히 많았으나 무작위 방법에 의한 배정 결과, 금사상황버섯 투여군과 위약군의 남녀 비율은 χ^2 -test 결과, 통계적으로 유의한 차이가 없었다(p -value = 0.2705, Table 1). 대상자들의 평균 연령도 금사상황버섯 투여군과 위약군이 각각 41.4 ± 9.4 와 40.4 ± 10.1 세로 유의한 차이가 없었으며, 연령대별 분포도 양군간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한, 면역력에 영향을 미칠 수 있는 피험자의 현재 또는 과거 흡연력 및 음주력의 경우도 양군간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타나(Table 1), 이것들에 의한 교란작용(bias)은 없음을 알 수 있었다.

본 연구의 결과에서, NK 세포의 지표로 알려진 CD56⁺ 세포의 수는 상황버섯 추출물 복용 전 $1.78 \pm 0.40 (\times 10^3/\mu\text{L})$ 에서 8주 투여 후 1.81 ± 0.56 으로 0.03 ± 0.46 의 증가를 보였고, 대조군에서는 0.13 ± 0.47 의 증가를 나타내 NK 세포의 수적인 증가는 두 군간에 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다. 또한, paired t -test를 이용하여 상황버섯 추출물 복용 전과 후의 변화를 분석한 결과에서도 유의한 변화가 나타나지 않았다(Table 2). 이 결과는 금사상황버섯추출물의 복용이 사람의 NK 세포의 수적인 변화에는 영향을 주지 않았음을 의미한다.

한편, 피험자의 말초혈액으로부터 분리한 NK 세포의 활성을

Table 1. General characteristics of subjects included in the study

	KPLE ¹⁾ (31)	Placebo (31)	Total (62)	p -value ²⁾
	No. (%) or mean \pm SD			
Gender				
Male	12(38.7)	7(22.6)	19(30.7)	0.2705
Female	19(61.3)	24(77.4)	43(69.3)	
Age (year)	41.4 ± 9.4	40.4 ± 10.1	40.9 ± 9.7	0.7067
≤ 30	3(9.4)	4(12.5)	7(11.1)	0.944
40~50	15(46.9)	12(38.7)	27(42.8)	
50~60	10(31.3)	11(35.5)	21(33.3)	
$60 \leq$	4(12.5)	4(12.5)	8(12.7)	
Smoking				
Non-smoker	24(77.4)	25(80.65)	49(79.0)	0.8433
Ex-smoker	4(12.9)	3(9.68)	7(11.3)	
Current smoker	3(9.7)	3(9.68)	6(9.7)	
Alcohol drinking				
Never	17(58.9)	19(61.3)	36(58.0)	0.7051
≤ 1 times/week	11(35.5)	9(29.0)	20(32.3)	
1 times/week <	3(9.7)	3(9.7)	6(9.7)	

¹⁾Keumsa sangwhang (*Phellinus linteus*) mushroom extracts.

²⁾ p -value by χ^2 -test or Fisher's exact test or t -test.

Table 2. The number of NK cells in peripheral blood after administration of extracts of *Keumsa sangwhang (Phellinus linteus)* mushroom extracts

	KPLE ¹⁾ (31)	Placebo (31)	<i>p</i> -value ²⁾
	Cell No. ($\times 10^3/\mu\text{L}$, mean \pm SD)		
Before	1.78 \pm 0.40	1.65 \pm 0.38	NS ⁴⁾
After 8 weeks	1.81 \pm 0.56	1.77 \pm 0.48	NS
<i>p</i> -value ³⁾	NS	NS	

¹⁾Keumsa sangwhang (*Phellinus linteus*) mushroom extracts.²⁾*p*-value by *t*-test.³⁾*p*-value by paired *t*-test.⁴⁾Not significant.**Table 3. The cytotoxicity of NK cells in peripheral blood after administration of extracts of *Keumsa sangwhang (Phellinus linteus)* mushroom extracts**

	KPLE ¹⁾ (31)	Placebo (31)	<i>p</i> -value ²⁾
	Cytotoxicity (%), mean \pm S.D)		
Before	48.25 \pm 10.31	48.45 \pm 8.21	NS ⁴⁾
After 8 weeks	55.65 \pm 6.39	48.17 \pm 8.17	<0.001
<i>p</i> -value ³⁾	<0.001	NS	

¹⁾Keumsa sangwhang (*Phellinus linteus*) mushroom extracts.²⁾*p*-value by *t*-test.³⁾*p*-value by paired *t*-test.⁴⁾Not significant.

세포독성(cytotoxicity)을 통해 측정하였다. 그 결과, 상황버섯 추출물을 복용한 군에서는 48.25 \pm 10.31에서 55.65 \pm 6.39(%)로 Jurkat 세포주에 대한 활성이 상황버섯 복용에 의해 유의하게 증가한 반면, 대조군의 경우는 48.45 \pm 8.21에서 48.17 \pm 8.17(%)로 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 3). 이와 같은 결과는 상황버섯 추출물을 8주간 복용한 사람에서 INF- γ 및 TNF- α 의 발현이 유의하게 증가되었던 본 연구자의 선행연구 결과와 일치하는 소견이라 할 수 있다. 왜냐하면, NK 세포가 활성화되면 INF- γ 와 TNF- α 등의 다양한 cytokine이 분비되면서 이들의 상호작용으로 target 세포를 효율적으로 죽이는 것으로 알려져 있기 때문이다(13). 따라서, 본 연구의 결과를 종합해보면, 상황버섯 추출물의 복용은 NK 세포의 수적인 증가를 유도하지는 않지만 그 기능의 활성화를 통해 세포성면역을 향상시키는 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

금사상황버섯의 추출물이 NK 세포 활성화에 미치는 영향을 인체 실험을 통해 조사하였다. 대상자는 금사상황버섯 추출물 복용군과 위약 복용군 각각 31명씩이었으며 총 8주간 상황버섯 추출물 및 위약을 하루 3캡슐씩 2회, 총 6캡슐 (3.3g/일) 매일 경구 복용하였다. 연구 결과, NK 세포의 지표로 알려진 CD56⁺ 세포의 수는 금사상황버섯 추출물 복용에 의해 근소한 증가를 나타

냈으나 통계적인 유의성은 없었고, 대조군과의 비교에서도 유의한 차이를 나타내지 않았다. 한편, NK 세포의 활성은, 금사상황버섯 추출물을 복용한 군에서는 Jurkat 세포주에 대한 세포독성이 복용 전에 비해 유의하게 증가한 반면, 대조군의 경우는 차이가 없는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과로부터 금사상황버섯 추출물의 복용은 NK 세포의 수적인 증가를 유도하지는 않지만 그 기능의 활성화를 통해 세포성면역을 향상시키는 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

문 헌

- Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially cultured *Phellinus linteus*. Gann 59: 155-157 (1968)
- Chung KS, Kim SS, Kim HS, Kim KY, Han MW. Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus*. Yakhak Hooji 38: 158-165 (1994)
- Kim DH, Choi HJ, Bae EA. Effect of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal α -glucosidases. J. Food Hyg. Safety 13: 20-23 (1998)
- Oh GT, Han SB, Kim HM, Han MW, Yoo ID. Immunostimulating activity of *Phellinus linteus* extracts to B-lymphocytes. Arch. Pharm. Res. 15: 379-381 (1992)
- Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Int. J. Immunopharm. 18: 295-303 (1996)
- Pyo MY, Hyun SM, Yang KS. Effects of *Phellinus linteus* extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide treated mice. J. Appl. Pharm. 9: 194-200 (2001)
- Song CH, Ra KS, Yang BK, Jeon YJ. Immuno-stimulating activity of *Phellinus linteus*. Korean J. Mycol. 26: 86-90 (1998)
- Orange JS, Ballas ZKK. Natural killer cells in human health and disease. Clin. Immunol. 118: 1-10 (2006)
- Kim GY, Han MG, Song YS, Shin BC, Shin YI, Lee HI, Moon DO, Lee CM, Kwak JY, Bac YS, Lee JD, Park YM. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF-kappaB. Biol. Pharm. Bull. 27: 1656-1662 (2004)
- Kim GY, Oh YH, Park YM. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 309: 399-407 (2003)
- Kang CI, Kim JD, Ryu H, Chung HI. The effect of recombinant human growth hormone on NK cell activity in children. Korean J. Immunol. 18: 463-469 (1996)
- Nociary MM, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. J. Immunol. Methods 213: 157-167 (1998)
- Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. Clin. Immunol. 118: 1-10 (2006)