

차가버섯 추출물의 종양 전이 억제 효과

윤택준* · 문원국** · †이광호

*유한대학 식품영양학과, ** (주)내추럴에프엔피, 건국대학교 의료생명대학 생명공학전공

Anti-Tumor Metastasis Activity by Extracts of *Inonotus obliquus*

Taek-Joon Yoon*, Won-Kook Moon** and †Kwang-Ho Lee

*Dept. of Food & Nutrition, Yuhan College, Bucheon 422-749, Korea

**Natural F&P Co, Seoul 138-200, Korea

†Dept. of Biotechnology, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

Abstract

In experimental lung metastasis of colon26-M3.1 carcinoma cells, we found that the prophylactic or therapeutic administration of *Inonotus obliquus* extracts significantly inhibited lung metastasis. In an *in vitro* cytotoxicity analysis, the extracts did not affect colon26-M3.1 cell growth at concentrations up to 1000 $\mu\text{g/ml}$. Peritoneal macrophages that were stimulated with the extracts produced TNF- α . These data suggest that *Inonotus obliquus* extract has antitumor activity to inhibit tumor metastasis, and its antitumor effects are partially associated with macrophages activation.

Key words: *Inonotus obliquus*, metastasis, cytotoxicity, macrophage, TNF- α .

서 론

암세포에 대한 면역 감시 체계는 크게 두 가지로 분류하고 있다. 즉, 선천적 면역계(innate immunosurveillance)와 획득면역계(adaptive immunosurveillance)이다¹⁾.

선천적 면역계는 감염에 대한 1차 방어선으로 숙주가 외래 물질에 감염 전에 이미 가지고 있는 기구로서 외래물질에 대한 적응면역이 발생하기 전에 외래물질에 대하여 신속하게 반응하는 특징을 가진다. 선천적 면역계를 구성하는 구성요소는 상피 장벽, 대식세포(macrophage) 및 자연살해세포(natural killer cell; NK cell) 등을 포함하는 백혈구, 보체 등의 순환단백질 및 cytokines 등으로 구성된다²⁾. 선천적 면역계에서 암세포에 대하여 살해력을 가지는 대표적 작동세포로는 주로 대식세포(macrophage) 및 자연살해세포(natural killer cell) 등이 있으며, macrophage가 생산하는 cytokines는 주로 이들 작동세포의 활성화에 관여한다. 활성화된 macrophage는 반응성 산소 중간 대

사산물(reactive oxygen intermediates; ROIs), 산화질소(nitric oxide; NO) 및 효소 등을 생산하여 암세포를 살해시키는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다³⁾. 특히 활성화된 macrophage가 생산하는 TNF- α 는 감염 부위에 백혈구를 보충하기 위한 세포 간의 접착분자(adhesion molecule)의 활성화에 작용하는 등 감염 부위에 면역세포의 귀소(homing)에 결정적으로 작용하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 또한, 활성화된 대식세포는 TNF- α 외에도 IL-12와 같은 cytokine들을 생산하여 작동력을 가지는 면역세포의 활성화에 기여한다⁵⁾.

종양에 대한 숙주의 면역계를 자극시키는 biological response modifier(BRM)의 개념이 확립된 후, 면역 자극물질에 의한 숙주의 자연 면역능 증진에 의한 예방 혹은 치료를 위한 노력은 우리나라를 비롯하여 세계 각국에서 활발하게 진행되고 있다. 실제 실험보고에 의하면 면역 자극물질에 의하여 활성화된 작동세포인 NK cell, LAK cells 및 macrophages는 암의 증식 및 전이를 유의하게 억제하는 것으로 보고되고 있

† Corresponding author: Kwang-Ho Lee, Dept. of Biotechnology, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea.

Tel: +82-43-840-3613, Fax: +82-43-851-5235, E-mail: kwangho@kku.ac.kr

다⁶⁾. 따라서 최근 세계 각국에서 암의 극복을 위하여 전통적으로 사용한 약제 등 천연물로부터 이들 세포를 활성화시키는 작용을 가지는 물질의 탐색에 관한 연구가 고조되고 있다.

선천적 면역능을 자극하는 물질인 겨우살이(mistletoe: *Viscum album coloratum*)는 가장 대표적인 종양치료제로서 이미 유럽에서는 Helixor, Isocador 및 Abnoba 등의 이름으로 임상에 적용되고 있으며⁷⁻⁹⁾, 인삼(Ginseng) 및 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*) 추출물 및 그의 단백질 다당체 역시 강한 면역 자극 활성을 유도함으로써 동물실험에서 유의한 항암 활성이 인정되었다^{10,11)}. 버섯류에 대한 연구도 많이 진행되어 운지버섯, 영지버섯, 상황버섯, 아가리쿠스버섯 등에서 분리한 다당체는 면역 자극 활성이 있음이 보고되었다¹²⁾.

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 자작나무에 착생하여 자작나무의 수액을 먹고 자라는 버섯으로 북위 45도 이상의 시베리아, 몽골, 캐나다, 미국 및 유럽의 스칸디나비아반도 지역의 자작나무 삼림지대에서 자생한다. 시베리아 지방의 민간에서는 오래전부터 차가버섯 추출물을 암 및 소화기 질병에 사용하여왔고, 그에 의한 독성은 없는 것으로 보고하였다¹³⁾. 그 밖에도 차가버섯의 여러 성분은 항 바이러스¹⁴⁾ 및 항산화 활성¹⁵⁾ 등 여러 생물학적 활성이 있는 천연물질로 알려져 왔다. 본 연구는 차가버섯의 껍질부와 속부위별로 면역 자극 활성 및 항종양 활성을 규명하고 활성을 비교 조사하였다.

재료 및 방법

1. 차가버섯 추출물 조제

본 실험에서 사용한 차가버섯은 러시아산으로 (주)Natural F&P(Seoul, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 시료의 준비를 위한 건조된 차가버섯의 껍질부(겉은부위) 및 속부위(안쪽 부분의 엷은색 부위)를 각각 준비하였다. 준비된 각 시료는 믹서기(Hanil Co Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 입자 크기가 0.1 mm 이하로 분쇄 후, 중량의 10배가 되는 증류수를 넣고 4°C에서 12시간 magnetic stirring bar를 이용하여 교반하였으며, 원심분리(1800×g/30 min)를 통하여 상등액을 얻은 후, 0.22 μm의 pore size를 가지는 필터(Whatman, Philadelphia, PA, USA)를 통과 후 동결건조(freeze dryer, EYELA FDU-540, Tokyo, Japan)하여 조 추출물을 얻었다.

2. 실험동물

생후 6~8주령의 자성 BALB/c를 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 분양 받아 건국대학교 바이오식의약연구센터 실험동물장에서 무균상태로 사육하였다. 마우스는 사육조에 각 군별로 5마리씩 넣어 정수된 물과 실험 동물용 펠릿사료(Sam-

yang Co Ltd, Incheon, Korea)를 자유 공급하였고, 온도 22°C, 습도 50%, 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

3. 시약 및 세포배양

종양세포의 배양을 위한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium(EMEM) 배지, fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, non-essential amino acid, L-glutamic acid, thioglycollate 등은 Gibco(Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하였다.

종양세포주인 colon26-M3.1 colon carcinoma의 배양은 7.5% FBS, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 EMEM 배지를, lymphocytes 및 bone marrow cells의 배양은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하였으며, 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기에서 배양하였다.

4. 종양 전이 모델

시료의 항종양 효과는 colon26 세포로부터 얻은 고전이성 세포주인 colon26-M3.1 carcinoma를 이용하는 실험동물 종양 전이 모델을 이용하였다^{11,16)}. 실험동물로 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종은 colon26-M3.1 carcinoma 세포주 14일 후에 마우스당 2.7×10⁴을 정맥주사(i.v.) 하였다. 종양 접종 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 종양의 군집 수를 측정하였다. 한편, 시료에 의한 항종양 전이 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사하였고, 시료는 종양 접종 2일 전에 1회 정맥(5, 1, 0.2 mg) 또는 종양 접종 후 5일간 매일 경구투여(2 mg) 하였고, 군당 각각 5마리의 마우스를 이용하였다.

5. 차가버섯의 종양 세포주에 대한 세포 독성 조사

종양세포주인 colon26-M3.1 carcinoma는 1×10⁴/100 μl의 밀도로 96-well plate의 각 well에 plating 하였고 여러 농도로 조정된 차가버섯을 100 μl씩 첨가하고 2일간 배양하였다. 각 물질의 세포 독성 효과는 MTT assay법¹⁷⁾으로 조사하였다.

6. Macrophage로부터 Cytokine의 유도 분비 조사

BALB/c 마우스에 1% thioglycollate를 1 ml 복강주사하고 4일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10 ml를 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수집한 PEC를 24 well culture plate에 1.5×10⁶/ml의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착 후, 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 그 후 적정농도

로 조정된 차가버섯을 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 배양완료 후, macrophage의 배양 상등액을 회수하였고 배양 상등액에 유도 분비된 TNF- α 의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit(Pharmingen, San Jose, CA, USA)을 구입하여 조사하였다.

7. 통계처리

대조군에 대한 실험군 간의 통계적 유의성은 Microsoft Excel 프로그램의 Student's two-tailed *t*-test로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 차가버섯의 전신투여에 의한 종양 전이 억제 활성

차가버섯 추출물의 선천적 면역(innate immunity) 증진 활성을 조사하기 위하여 colon26-M3.1 carcinoma를 이용한 동물 실험모델에서 종양 전이에 미치는 활성을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 차가버섯 겉부위 추출물의 경우, 종양 접종 2일전에 5, 1 및 0.2 mg의 추출물을 각각 1회 정맥 투여한 결과, 1 mg의 투여는 약 80.5% 이상의 유의성($p=0.0004$) 있는 종양 전이 억제 효과를 보였으며, 5 및 0.2 mg의 투여군에서도 각각 42.7($p=0.072$) 및 59.1($p=0.012$)%의 유의성 있는 종양 전이 억제 활성을 보였다. 따라서 마우스를 이용한 실험 전이 모델에서 0.2~5 mg의 차가버섯 겉부위 추출물의 투여는 유의한 항종양 활성이 있는 결과를 보였으며, 항종양 활성을 유도하는 최적의 농도는 1회의 혈관 투여의 경우 1 mg 임을 암시하였다. 한편, 차가버섯 속부위 추출물의 경우, 흥미로웠던 결과를 보여 동일한 농도 처리에서 유의한 항종양 활성은 인정되지 않았다. 따라서 차가버섯에서 항종양 활성을 나타내는 성분은 버섯의 외부에 있을 것으로 생각되어 이후 동물 실험인 치료적활성은 겉부위 추출물에 의한 실험을 실시하였다. Table 1은 차가버섯의 예방적 투여에 의한 항종양 활성 유도를 근거로 치료적 활성을 조사한 결과이다. 치료적 활성의 유도를 위하여 종양 접종 1일부터 5일까지 0.2 mg의 추출물을 총 5회 투여한 결과, 유의한 항종양 활성(33.1%)을 유도

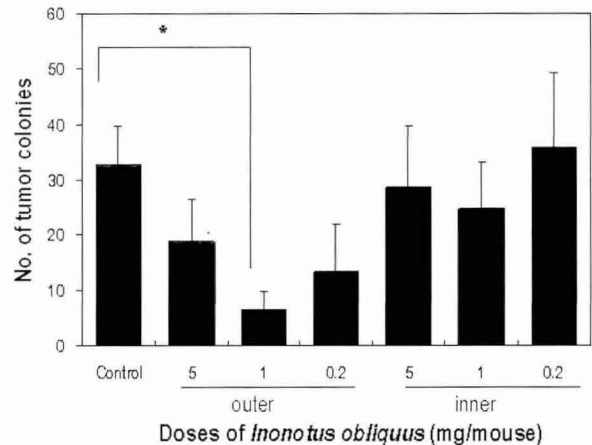


Fig. 1 Effect of intravenous administration of extracts from *Inonotus obliquus* on lung metastasis produced by i.v. inoculation of colon26-M3.1 cells. Five BALB/c mice per group were inoculated i.v. with 4×10^4 colon26-M3.1 cells and administered i.v. with the indicated doses of extracts from *Inonotus obliquus* on 2 days before tumor inoculation. Mice were killed 14 days after tumor inoculation. * $p < 0.05$, compared with the tumor control (by Student's two-tailed *t*-test).

하였다. 혈관을 통하여 전이되는 암은 숙주로부터 암의 제거에 작용하는 작동세포와 접촉하게 된다²²). 따라서 미리 면역 자극 물질로 자극된 숙주에 종양을 이식할 경우, 종양 이식 후에 치료적으로 면역 자극 물질을 투여한 경우에 비하여 높은 항종양 활성이 유도되는 것으로 보고되고 있다^{1,16}). 따라서, Table 1에 제시한 치료적 활성의 결과가 Fig. 1에 제시한 예방적 활성에 비하여 낮은 이유는 시료 투여 전에 이미 접종된 암세포가 조직에서 성장하고 있기에 활성화된 면역세포와의 접촉이 일부 제한된 것으로 사료되었다^{1,16}).

실험 전이 모델에서 시료의 투여에 의한 암전이 억제 효과의 작동 기전으로 생각할 수 있는 것은 시료에 의한 세포 독성, 시료에 의하여 종양세포에 대한 살해력을 획득한 탐식세포 및 NK-cells 등의 선천 면역계의 활성화에 기인되는 결과로 사

Table 1. Therapeutic effect of extracts from *Inonotus obliquus* administration on lung metastasis produced by i.v. inoculation of colon26-M3.1 cells

Treatment	Route	Doses (mg/mouse)	No. of lung metastasis	
			Mean \pm SD(inhibition %)	Range
Tumor control	-	-	136 \pm 10	124~150
<i>Inonotus obliquus</i>	i.p.	0.2	91 \pm 31(33.1)*	69~103

Five BALB/c mouse per group were inoculated i.v. with 4×10^4 colon26-M3.1 cells and administered i.p. with the indicated doses of PBS suspended *Inonotus obliquus* extracts on 5 days after tumor inoculation. Mice were killed 14 days after tumor inoculation.

* $p < 0.05$, compared with the tumor control (by Student's two-tailed *t*-test).

료되고 있으며⁵⁻⁷⁾, 이러한 면역세포의 활성화는 주로 탐식세포가 생산하는 여러가지 cytokines에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다^{5,6,9,11,16)}. 실험 결과에 따라 암세포에 대하여 세포 독성을 가지는 성분은 항암제로 개발하고 있으나, 이러한 경우 생체의 정상세포에 대한 세포 독성을 유도하는 부작용이 수반되기에 특히 천연물에서 면역계를 활성화 시키는 성분의 탐색은 암을 극복하기 위한 중요한 수단의 하나로 인식되고 있다^{1,18-20)}. 따라서 차가버섯 외피 추출물의 전신적 투여(systemic administration)에 의한 항종양 효과의 유도가 암세포에 직접적으로 작용하는 세포 독성에 기인되는 효과인지 혹은 선천적 면역계(innate immune system)의 활성화에 기인되는 효과에 의한 것인지 확인하는 실험이 요구되었다.

2. 차가버섯의 종양세포에 대한 세포 독성

차가버섯 겉부위 및 속부위 추출물의 종양세포에 대한 세포 독성 효과를 *in vitro*에서 조사하였다(Fig. 2). 그 결과, 실험에 적용한 최고농도인 1 mg/ml까지의 농도에서 종양세포에 직접적인 독성을 나타내지 않는 결과를 보임으로서 차가버섯은 종양세포를 직접 살해하는 독성 효과는 매우 낮은 결과를 보였으며, 결국 Fig. 1에 제시한 *in vivo*에서 차가버섯 1 mg의 투여에 의한 항종양 활성화는 차가버섯의 암세포에 대한 직접독성에 기인되는 활성화는 아닌 결과를 보였으며, 따라서 시료에 의한 선천 면역계의 활성화 측면에서의 실험이 요구되었다.

3. 차가버섯의 대식세포 활성화 유도 작용

면역 자극 활성을 가지는 생체 조절 물질(BRM)은 종양의

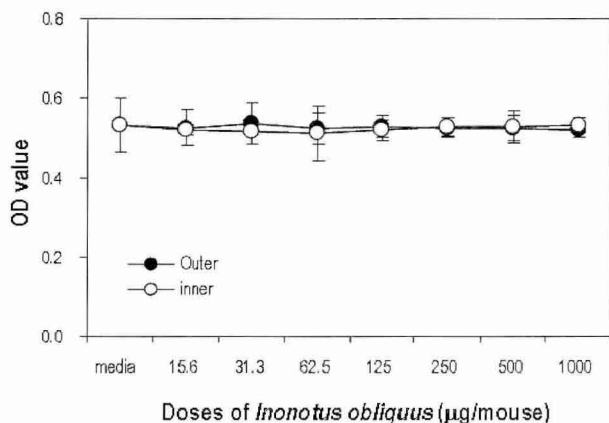


Fig. 2. Cytotoxic effect of extracts from *Inonotus obliquus* on colon26-M3.1 cells in *in vitro*. The colon26-M3.1 cells were co-incubated with the indicated doses of crude extracts from *Inonotus obliquus* for 48 hrs. The proliferation of these cells was measured by a MTT-based colorimetric assay.

증식 혹은 전이를 억제하기 위한 주요한 도구로 많이 사용되어 왔다^{1,18,19)}. 이러한 BRM은 천연물로부터 분리한 lectin, glucan과 같은 성분들^{8,10,11,20)} 혹은 MDP와 같은 합성 면역 증강제⁵⁾ 및 cytokine¹⁸⁾들을 포함하는데, 이러한 BRM들은 외래 물질에 대한 숙주의 방어력을 증진시킴으로서 종양에 대한 면역요법 제재로 이용하고 있다. 마우스를 이용한 종양의 실험 전이 모델에서 식물 추출물을 포함하는 BRM에 의한 종양의 억제 결과는 이들의 cytokine 생산능력(cytokine inducer) 및 macrophage 혹은 NK-세포 등의 선천적 면역 작동 세포의 활성화에 기인되는 효과임은 잘 보고되어 있다^{5,6,9,11,16)}. 이러한 비특이적 혹은 특이적 면역 세포의 증식 및 작동세포로서의 활성의 개시는 주로 면역 자극 물질에 의한 macrophage 및 NK cell의 활성화에 의한다^{5,6,16,18)}. 활성화된 macrophage는 여러가지 cytokines을 유도하고 이들은 면역 조절 능력을 가진다는 것은 잘 알려져 있다^{5,10,19)}. 또한, macrophage는 특정 자극을 받으면 종양세포에 대한 작동세포(effector cells)로서의 기능을 획득한다고 보고되고 있다²³⁾.

차가버섯의 면역 자극 효과를 조사하기 위하여 thioglycolate로 유도된 macrophage를 *in vitro*에서 직접 자극 후 TNF- α 의 유도능을 조사하였다(Fig. 2). TNF- α 는 자극에 의하여 활성화된 macrophages, T cells 혹은 내피세포에 의하여 생산되며, 백혈구의 염증 부위로 이동을 위한 접착분자의 발현, 국소부위의 염증유도, 항암 및 항 바이러스 활성화 등 여러 기능을 가지고 있다^{3,4,7,19)}. TNF- α 에 의한 종양세포에 대한 살해 기전은 macrophage의 종양세포 살해 매개 물질인 nitric oxides 혹은 hydrogen peroxide의 분비를 촉진하고, TNF- α 의 존재

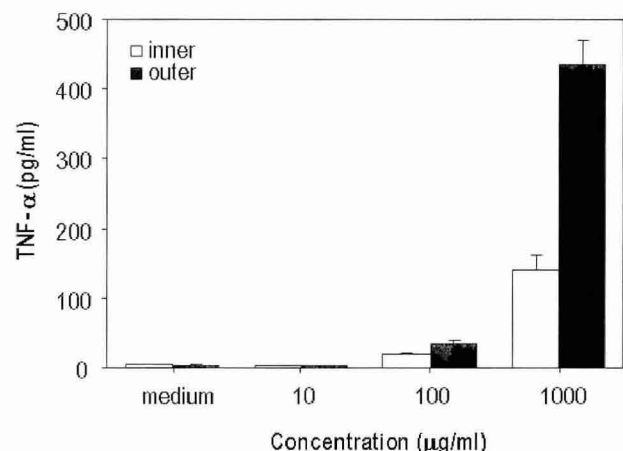


Fig. 3. Production of cytokines from peritoneal macrophages stimulated by crude extracts from *Inonotus obliquus*. Peritoneal macrophages were treated with the indicated doses of extracts from *Inonotus obliquus* in 24-well plate for 24 hrs. The level of each cytokine in the supernatants of the cultures was determined by ELISA kits.

하에서 살해 활성을 가지는 NK 세포의 증식에 직간접적으로 작용하는 것으로 보고되고 있다^{3,4)}. 또한, TNF- α 는 종양세포에 대한 T 세포를 활성화 시키는 주요한 기구로 알려져 있다⁵⁾. 실험 결과, 차가버섯 속부위 혹은 겉부위 추출물 모두 1~0.1 mg/ml의 농도로 macrophage를 자극한 결과, TNF- α 의 생산을 시료로 자극하지 않은 대조군에 비하여 유의하게 높게 생산하였으나, Fig. 1의 종양 전이 억제 활성의 결과와 일치하게 겉부위의 경우가 속부위에 비하여 높은 활성을 보였다. 따라서 차가버섯 겉부위 추출물이 속부위 추출물에 비하여 대식세포와 같은 선천적 면역계(innate immune system)를 일부 활성화시키는 능력이 우수함을 확인하였다. 따라서 차가버섯 겉부위 추출물에 의한 macrophage의 활성화는 Fig. 1 및 Table 1에 제시한 항종양 활성의 주요한 기구 중의 하나로 사료되었다.

4. 차가버섯의 경구 투여에 의한 종양 전이 억제 활성

차가버섯 추출물의 전신 투여는 실험 전이 모델에서 유의한 항종양 전이 효과를 보였기에 동일한 실험 모델에서 차가버섯의 경구 투여에 의한 항종양 효과를 조사하였다. 최근 점막 면역계를 통한 전신면역의 활성화에 대한 관심이 고조되고 있고, 천연물의 경구 투여는 점막 면역계를 통하여 선천적 전신 면역계를 활성화시켜 유의한 항종양 활성이 유도 등 전신적 생체 방어력을 증진시킨다는 보고가 발표되고 있다^{24~26)}. 시료의 경구 투여에 의한 항종양 활성 유도기구를 혈관 투여와 같은 전신적 투여에 의한 작동기전을 동일하게 적용할 수 없지만, 이후 식품으로 섭취 시 생체 방어력에 미치는 효과를 검토하기 위한 기초실험으로 실시하였다. 그 결과, colon26-M3.1 carcinoma 세포주의 접종 후 5일간 매일 2 mg의 차가버섯 추출물을 경구 투여한 결과, 약 30.8%의 유의한 항종양 활성을 유도함으로써 차가버섯 겉부위는 전신 투여(Fig. 1 및 Table 1) 뿐 아니라 경구 투여로도 동일한 항종양 활성을 유도한다는 것을 확인하였다(Table 2). 경구 투여에 의한 면역계의 활성화는 점막 면역계를 구성하는 특수기관인 소장 및 Peyer's patch를 통하는 것으로 알려져 있고, 이들을 통한 전신면역의 활성화는 앞으로 생체 방어력을 증진시키는 기능성

식품의 개발에 매우 중요한 요소로 고려되고 있다^{25,26)}. 따라서 이후 이에 대한 자세한 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

본 연구 결과로부터 차가버섯 추출물의 투여는 실험동물에서 전이암에 대하여 유의한 항암 활성을 유도한다는 것을 통하여 입증하였고, 그 작용기전으로 macrophage의 활성화에 기인되는 것으로 조사되었다. 동시에 차가버섯 겉부위 추출물의 경구투여가 유의한 항종양 활성을 나타낸 결과는 이 시료가 식품으로의 섭취로 인하여 점막 면역계를 자극한다는 기초 근거가 되므로 앞으로 차가버섯의 점막 면역계에 미치는 자세한 작동 기전의 확립에 대한 연구가 요구되었다.

요약 및 결론

차가버섯의 면역 자극 효과 및 항종양 효과를 실험동물을 이용하여 조사하였다. Colon26-M3.1 세포주를 이용하는 실험동물 전이 모델에서 1 mg의 차가버섯 추출물의 예방적 투여에 의한 항종양 효과를 조사한 결과, 대조군에 비하여 약 80% 이상, 치료적 활성을 조사한 결과, 약 33%의 유의한 종양 전이 억제 효과를 보였다. 차가버섯 추출물은 *in vitro*에서 colon26-M3.1 세포주에 대하여 1,000 μ g/ml의 농도까지 유의한 암세포주의 증식 억제능이 없는 결과를 보였고, 마우스 복강으로부터 얻은 macrophage를 차가버섯 추출물과 동시배양한 결과, 농도 의존적으로 TNF- α 를 생산하는 cytokine inducer로의 활성이 있었다. 한편, 종양접종 후 5일간 매일 2 mg의 차가버섯 경구투여도 유의한 항종양 효과를 유도하였다. 따라서 차가버섯 추출물은 전신 및 경구 투여에 의하여 선천적 면역자극계를 자극함으로써 유의한 항종양 활성을 유도하는 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Azuma, I and Seya, T. Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int. Immunopharmacol.* 1:1249-1259. 2001

Table 2. Effect of oral administration of crude extracts from *Inonotus obliquus* on lung metastasis produced by i.v. inoculation of colon26-M3.1 cells

Treatment	Route	Doses (mg/mouse)	No. of lung metastasis	
			Mean \pm SD(inhibition %)	Range
Tumor control	-	-	136 \pm 10	124~150
<i>Inonotus obliquus</i>	p.o.	2	94 \pm 31(30.8)*	60~138

Five BALB/c mouse per group were inoculated i.v. with 4×10^4 colon26-M3.1 cells and administered p.o. with the indicated doses of PBS suspended *Inonotus obliquus* extracts for 5 days after tumor inoculation. Mice were killed 14 days after tumor inoculation.

* $p < 0.05$, compared with the tumor control (by Student's two-tailed *t*-test).

2. Sfondrini, L, Balsari, A and Menard, S. Innate immunity in breast carcinoma. *Endocr. Relat. Cancer*. 10:301-308. 2003
3. Murray, HW and Nathan, CF. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* 189:741-746. 1999
4. Robinson, LA, Tu, L, Steeber DA, Preis, O, Platt, JL and Tedder, TF. The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine vascular endothelium: implications for xenotransplantation. *J. Immunol.* 161:6931-6938. 1998
5. Saiki, I, Saito, S, Fujita, C, Ishida, H, Iida, J, Murata, J, Hasegawa, A and Azuma, I. Induction of tumoricidal macrophages and production of cytokines by synthetic muramyl dipeptide analogues. *Vaccine*. 6:238-244. 1988
6. Fisher, M and Yang, LX. Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. *Anticancer Res.* 22:1737-1754. 2002
7. Yoon, TJ, Yoo, YC, Hong, EK, Cho, YH, Lee, SW, Azuma, I, Yoo, BI and Kim, JB. Effect of Korean Mistletoe extracts on the induction of IL-1 and TNF-alpha from mouse macrophages. *Kor. J. Pharmacogn.* 25:132-139. 1994
8. Hwang, SY, Yang, ET, Yeo, JH, Jin, JY, Kim, HS, Park, WB and Suh, JJ. Anti-tumor effect of Korean mistletoe extract intensified with mistletoe lectin against melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Kor. J. Pharmacogn.* 34:218-222. 2003
9. Stauder, H and Kreuser, ED. Mistletoe extracts standardised in terms of mistletoe lectins (ML I) in oncology: current state of clinical research. *Onkologie*. 25:374-380. 2002
10. Shin, JY, Song, JY, Yun, YS, Yang, HO, Rhee, DK and Phy, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 24:469-482. 2002
11. Ha, ES, Hwang, SH, Shin, KS, Yu, KW, Lee, KH, Choi, JS, Park, WM and Yoon, TJ. Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch. Pharm. Res.* 27:217-224. 2004
12. Ohno, N, Furukawa, M, Miura, NN, Adachi, Y, Motoi, M and Yadomae, T. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol. Pharm. Bull.* 24:820-828. 2001
13. Saar, M. Fungi in Khanty folk medicine. *J. Ethnopharmacol.* 31:175-179. 1991
14. Ichimura, T, Otake, T, Mori, H and Maruyama, S. HIV-1 protease inhibition and anti-HIV effect of natural and synthetic water-soluble lignin-like substances. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:2202-2204. 1999
15. Cui, Y, Kim, DS and Park, KC. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *J. Ethnopharmacol.* 96:79-85. 2005
16. Fidler, IJ. Macrophage and metastasis-a biological approach to cancer therapy: presidential address. *Cancer Res.* 45:4714-4726. 1985
17. Gerlier, D and Thomasset, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Meth.* 94:57-63. 1986
18. Kudo, C, Saito, M and Yoshida, T. Curative treatments of murine colon26 solid tumors by immunochemotherapy with G-CSF and OK-432. *Immunopharm.* 29:235-243. 1995
19. Shin, JY, Song, JY, Yun, YS, Yang, HO, Rhee, DK and Phy, S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 24:469-482. 2002
20. Yoon, TJ, Yoo, YC, Kang, TB, Her, E, Kim, SH, Kim, K, Azuma, I and Kim, JB. Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe(*Viscum album colaratum*). *Int. Immunopharmacol.* 1:881-889. 2001
22. Yoon, TJ, Lee, CK, Park, TK and Lee, KH. Immunostimulant and anti-tumor activity of crude extracts of *Galium aparine* L. *Kor. J. Pharmacogn.* 36:332-337. 2005
23. Wynn, TA, Freund, YR and Paulnock, DM. TNF-alpha differentially regulates Ia antigen expression and macrophage tumoricidal activity in two murine macrophage cell lines. *Cell Immunol.* 140:184-196. 1992
24. Holmgren, J, Czerkinsky, C, Eriksson, K and Mharandi, A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 21(Suppl 2):S89-95. 2003
25. Israf, DA, Lajis, NH, Somchit, MN and Sulaiman, MR. Enhancement of ovalbumin-specific IgA responses via oral boosting with antigen co-administered with an aqueous *Solanum torvum* extract. *Life Science* 75:397-406. 2004
26. Sung, JY, Yoon, TJ, Yu, KW, Lee, KH and Lee, H. Enhancement of immunological activities in mice by oral administration of pectic polysaccharides from *Eleutherococcus senticosus*. *Food Sci. Biotechnol.* 15:117-121. 2006

(2007년 7월 22일 접수; 2007년 8월 20일 채택)