

## 대향고(*Lentinus giganteus*)의 자실체에서 추출한 조다당류가 생쥐의 Sarcoma 180에 미치는 항암 및 면역 증강효과

이건우<sup>1</sup> · 김혜영<sup>1</sup> · 허현<sup>2</sup> · 이태수<sup>1</sup> · 이우윤<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>인천대학교 생물학과, <sup>2</sup>동국대학교 생물학과

### Antitumor and Immuno-potentiating activity against Mouse Sarcoma 180 by Crude Polysaccharides from Fruiting Body of *Lentinus giganteus*

Geon Woo Lee<sup>1</sup>, Hye Young Kim<sup>1</sup>, Hyun Hur<sup>2</sup>, U-Youn Lee<sup>1</sup> and Tae Soo Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, University of Incheon, Incheon 402-749, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

(Received May 20, 2008. Accepted June 8, 2008)

**ABSTRACT:** *Lentinus giganteus*, one of edible and medicinal mushroom belongs to Pleurotaceae of Agaricales, has been known to contain some inhibitive substances on Sarcoma 180 and curative effect on high blood pressure. Neutral saline soluble (0.9% NaCl), hot water soluble and methanol soluble substances (hereinafter referred to Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH, respectively) were extracted from fruiting body of the mushroom. *In vitro* cytotoxicity tests, crude polysaccharides were not cytotoxic against cancer cell lines such as Sarcoma 180 and HepG2 at the concentration of 10~2,000  $\mu\text{g/ml}$ , but crude polysaccharides from Fr. NaCl was toxic to NIH3T3 at the concentration of 10~2,000  $\mu\text{g/ml}$ . Intraperitoneal injection with crude polysaccharides showed life prolongation effect of 14.3~67.5% in mice previously inoculated with Sarcoma 180, respectively. Fr. NaCl exhibited the immuno-potentiating activity of B lymphocyte by increasing the alkaline phosphatase activity by 1.53~1.68 folds compared with control at the concentration of 50~200  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes were increased by 7.7 and 1.6 folds by injecting Fr. NaCl and Fr. MeOH into the mice at the concentration of 50 mg/ml body weight, respectively.

**KEYWORDS :** Antitumor effect, Crude polysaccharides, Immuno-potential, *Lentinus giganteus*

담자균류에 속하는 버섯에서 발견되는 다당체나 단백질은 일반 항암 화학요법제와는 달리 뚜렷한 부작용이 없고, 면역기능의 활성을 높임으로써 항암력을 증진시키기 때문에 기존의 항암요법제와 병용할 경우 그 치료효과를 증가시키고 부작용을 크게 완화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 이들 다당체 및 단백질은 종양세포를 직접 파괴하지 않고 다양한 면역체계를 활성화시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Fukuda, *et al.*, 1975; Yoshioka, *et al.*, 1973). 따라서 버섯의 다당류를 항암제로 이용하기 위한 연구가 최근에 활발하게 이루어지고 있다. 한국산 버섯의 항암 작용에 대한 초기의 연구는 Kim 등(1979)이 구름버섯, 표고 및 느타리 자실체의 열수 추출물을 생쥐의 Sarcoma 180 세포에 접종하여 항암효과를 밝혔으며, 이들 버섯의 항암성분은 다당류와 단백질로 구성된 고분자 물질임을 증명하였다. Shim 등(1980, 1981)은 구름버섯 배양 균사체로부터 단백질

을 분리하여 이 물질이 양의 비장세포수를 증가시켜 면역이 증강되는 효과가 있다고 보고하였다. 영지(*Ganoderma lucidum*)의 항암 성분에 대한 연구도 활발히 진행되었는데, Kim 등(1980)은 자실체로부터 항암 성분을 분리하였고, Kang 등(1981)은 배양 균사체로부터 항암 성분이 생성됨을 보고하였으며, 한 등(1998)은 영지 균사체에서 분리한  $\beta$ -glucan을 Raw 264.7에 처리하여 대식세포의 활성도가 증가한다는 것을 보고하였다. Shin 등(1985)은 영지 유래 추출물을 마우스의 복강에 투여한 결과 복강내 면역세포 수가 증가함을 보고하였으며, Hyun 등(1990)은 영지로부터 항암 성분을 분리, 정제하고 ICR 마우스에 투여하여 대식세포가 활성화된다는 것을 보고하였다.

대향고(*Lentinus giganteus*)는 주름버섯목, 느타리과(Pleurotaceae)에 속하는 식용버섯으로 중국에서는 큰갈매기버섯(*Clitocybe maxima*) 또는 저장고 등으로도 불린다. 자실체의 직경은 5~23 cm이며 어릴 때는 평판구형이나 후에 거의 편평형에 가깝게 되며 중앙이 아래쪽으로 오목

\*Corresponding author <E-mail : uylee@incheon.ac.kr>

형, 갈때기 또는 사발형을 이룬다. 갓의 표면에는 백색인편이 있으며, 갓의 가장자리에는 명료하거나 불명료한 조문이 있다. 살은 흰색이고 주름살은 흰색내지 옅은 황백색으로 주름살의 길이는 균일하지 않다. 대의 길이는 5~23 cm이며 직경은 1~2.5 cm로 원주형이고 속은 차있다. 살은 흰색 또는 탁한 백색이다. 이 버섯은 목재부후균으로 여름부터 가을까지 땅속에 묻힌 부목이나 재목에 단생 및 군생한다. 이 버섯의 자실체에는 항암효과는 물론 고혈압을 치료하는데 효과가 있는 물질이 함유되어 있다고 알려져 있다. 최근에 대향고는 중국의 복건성 및 광둥성 등 남부지역에서는 봄부터 가을까지 대규모로 재배되고 있다(卯曉嵐, 2000).

따라서 본 연구는 식·의약용 버섯인 대향고의 자실체로부터 중성염용액(0.9%), 메탄올(80%) 및 열수를 이용하여 조다당류를 추출한 후 이들 조다당류를 여러 세포주와 생쥐에 투여하여 세포독성, 면역증강 및 항암효과 등의 실험을 수행하고 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서는 2004년 6월 인천대학교 생물학과에 설치된 버섯균주 및 DNA은행에서 분양받은 대향고 균주 IUM 1387을 이용하여 참나무 톱밥배지(80% 참나무톱밥 + 20% 쌀겨)에서 인공 재배한 대향고(*Lentinus giganteus*)의 자실체를 사용하였다. 수확한 신선한 자실체는 50°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시키고 분쇄한 후 -65°C의 저온냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

### 성분의 추출 및 분리

조 등(1995a, 1995b)과 심 등(2003a)의 방법에 따라 중성염용액(0.9% NaCl), 80% 메탄올 및 열수로 추출하였으며, 추출한 물질은 각각 수율을 조사하였다.

### 세포독성 실험

실험에 사용한 정상세포는 마우스 섬유아세포 NIH3T3, 대식세포 RAW 309 Cr.1, 암세포는 마우스 육종암세포 Sarcoma 180, 인간 간암세포 HepG2이었다. 세포독성 실험은 Denizot와 Lang (1986)의 방법에 따라 수행하였다. NIH3T3, RAW 309 Cr.1 및 HepG2 세포는  $1 \times 10^5$  cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 100  $\mu$ l씩 주입한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2000  $\mu$ g/ml이 되도록 조정된 후 100  $\mu$ l씩 세포에 처리하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 5 mg/ml의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) solution 10  $\mu$ l를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면

dimethylsulfoxide(DMSO) 100  $\mu$ l로 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sarcoma 180은  $2 \times 10^5$  cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 50  $\mu$ l씩 주입하고 각 추출물의 최종 농도를 10~2000  $\mu$ g/ml이 되도록 암세포에 처리하여 최종 용적이 100  $\mu$ l가 되도록 하고 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis(2-methoxyl-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) solution 당 25  $\mu$ M phenazine methosulfate가 포함된 용액을 well 당 30  $\mu$ l씩 처리하여 암 조건에서 2시간 배양한 후 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 생존율을 구하였다.

$$\text{Viability (\%)} = (T - B)/(C - B) \times 100$$

T : 실험군의 평균 흡광도

C : 대조군의 평균 흡광도

B : Blank

### 수명연장 실험

Sarcoma 180을  $5 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 부유시켜 0.2 ml씩( $1 \times 10^6$  cells/mouse) ICR 마우스의 복강에 이식하여 복수암을 유발시키고 Sarcoma 180을 이식한 24시간 후부터 20 mg/kg bod weight 농도의 추출물을 생리식염수에 용해시켜 0.22  $\mu$ m의 membrane filter로 여과시킨 후 각각의 추출물을 매일 1회 10일간 복강 내에 0.2 ml씩 투여하였다. 대조군에는 같은 기간, 동량의 생리식염수를 투여하였으며, Sarcoma 180 최종 투여 후 32일까지 관찰하여 평균 수명 일수를 계산하고 다음 식으로 increase of life span(ILS)을 계산하여 암세포의 성장 억제 효과를 평가하였다.

$$\text{ILS} = [(T - C)/C] \times 100$$

C : 대조군의 평균 수명 (일)

T : 실험군의 평균 수명 (일)

### 비장세포의 증식에 미치는 영향

20~25 g의 ICR 계열 웅성 마우스로부터 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망 위에서 분쇄하고 이 세포 부유액에 2배 부피의 lymphocyte separation medium을 첨가하여 원심분리 하였다. 단핵 세포층만 조심스럽게 취하여 3회 세척한 후 세포수가  $2 \times 10^5$  cells/ml이 되도록 조정하여 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 분주하였다. 50, 200, 500  $\mu$ g/ml 농도로 희석한 각각 추출물과 양성 대조군으로 5, 50  $\mu$ g/ml 농도의 lipopolysaccharide(LPS)를 100  $\mu$ l씩 처리한 후 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양한 다음 위의 MTT법과 동일한 방법으로 처리한 후 흡광도를 측정하였다(Mossman, 1983).

**마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향**

Ohno 등(1986)의 방법에 따라 분화된 B 임파구의 표면에 발현되는 alkaline phosphatase를 측정하였다. 준비된 비장세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 조정하여 well 당  $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 50, 200,  $500 \mu\text{g/ml}$ 의 추출물과 양성 대조군으로 5,  $50 \mu\text{g/ml}$ 의 LPS(lipopolysaccharide)를 가함으로써 최종 부피가  $200 \mu\text{l}$ 가 되도록 하였다.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 48시간 배양한 후, 세포 배양액을 원심분리하고 침전물에 1 mM  $\text{MgCl}_2$ 를 포함한 50 mM sodium carbonate buffer(pH 9.0)에  $1 \text{ mg/ml}$ 이 되도록  $\rho$ -nitrophenyl phosphate를 첨가한 용액을  $100 \mu\text{l}$ 씩 가한 다음  $37^\circ\text{C}$ 의 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 1시간 반응시켰다. 차가운 0.3 N NaOH 용액  $50 \mu\text{l}$ 를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\begin{aligned} &\text{Alkaline phosphatase activity } (\rho\text{-nitrophenol } \mu\text{mol}/ \\ &1 \times 10^5 \text{ lymphocytes}/60 \text{ mins}) \\ &= 1.15 \times \text{O. D. at } 405 \text{ nm} \end{aligned}$$

**대식세포의 활성화에 미치는 영향**

마우스 대식세포주인 RAW 264.7을 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 추출물의 최종 농도가 50, 100,  $200 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 세포주에 첨가하였으며, 양성 대조군으로 LPS를 1, 10,  $50 \mu\text{g/ml}$  첨가하였다. 각 농도의 추출물을 첨가한 실험군과 양성 대조군은  $37^\circ\text{C}$ 의 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 4시간 동안 배양한 후, 10%가 되도록 FBS를 첨가하고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 상등액  $100 \mu\text{l}$ 에  $100 \mu\text{l}$ 의 Griess reagent( $50 \mu\text{l}$  of 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid,  $50 \mu\text{l}$  of 0.2% N-naphthylethylenediamine 2HCl)를 첨가하고, 10분간 실온에서 방치한 후 ELISA plate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitric oxide (NO)의 대사체인 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻은 표준곡선으로부터 계산하였다(Choi 등, 1993).

**Cytokine 분비에 미치는 영향**

준비된 비장세포  $1 \times 10^7$ 을 여러 가지 추출물, 각각의 농도와 함께 24 well plate에서  $37^\circ\text{C}$ 의 5%  $\text{CO}_2$  및 가습 조건으로 24시간 배양하였다. 이 배양액을  $300 \times \text{g}$ 에서 10분간,  $10,000 \times \text{g}$ 에서 30분간 원심 분리시킨 후, 그 상층액을 취하여  $-70^\circ\text{C}$  냉동기에 보관하였고(Weir 등, 1986), 분비된 cytokine(IL-2)은 ELISA Complete Kit(Koma Biotech Inc, Korea)로 측정하였다. 비장 임파구 자극의 양성 대조군으로 T cell mitogen(ConA) 및 B cell mitogen(LPS)이 첨가 되었다.

**총 복강세포 수에 미치는 영향 분석**

6주령의 ICR 웅성 마우스를 실험군과 대조군으로 나누

어 3일간 연속으로 10, 20,  $50 \text{ mg/kg}$  body weight의 농도로 추출물을 복강 내에 투여하였고, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 24시간 후 마우스를 경추탈골시켜  $10 \text{ ml}$ 의 PBS buffer(pH 7.2)로 복강 내를 세척한 다음 복강 세포를 채취하여 Turk's solution으로 염색한 후 혈구계수기를 이용하여 측정하였다.

**혈중 백혈구 수와 면역 장기의 증량에 미치는 영향 분석**

6주령의 ICR 웅성 마우스를 실험군과 대조군으로 나누어 10일간 연속으로 복강 내에 10, 20,  $50 \text{ mg/kg}$  body weight의 농도로 추출한 조다당류를 투여하였으며, 대조군은 생리식염수를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 2일 후 심장 채혈하여 혈액을 채취하여 Turk's solution으로 염색하여 혈구계수기로 백혈구 수를 측정하였다. 또한 간, 비장 및 흉선을 적출하여 증량을 측정하였다. 실험군과 대조군의 상대장기 증량은 장기의 증량을 부검 전 체중으로 나누어 백분율로 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**성분의 추출 및 분리**

3 종류의 용매를 이용한 추출방법에 따른 수득률은 80%의 메탄올에서 52.0 g이 추출되어 13.0%의 높은 수득률을 보였고, 중성염에서는 7.9 g이 추출되어 가장 적은 2.0%의 수득률을 나타내었으며, 열수에서는 9.38 g이 추출되어 2.3%의 수득률을 나타내었다(Table 1). 이 결과는 김 등(2006)이 뽕나무버섯의 자실체로부터 메탄올 및 열수를 이용하여 추출한 조다당류의 수득률인 13.0%와 2.4%와 오 등(2004)이 저령의 균핵에서 메탄올로 추출한 조다당류 수득률인 9.8%와 중성염에서의 1.5%에 비해서는 많이 추출되었으나 심 등(2003b)의 매미눈꽃동충하초의 자실체에서 메탄올로 추출한 30.6%에 비해서는 추출된 양이 적었다.

**평균 수명 연장효과**

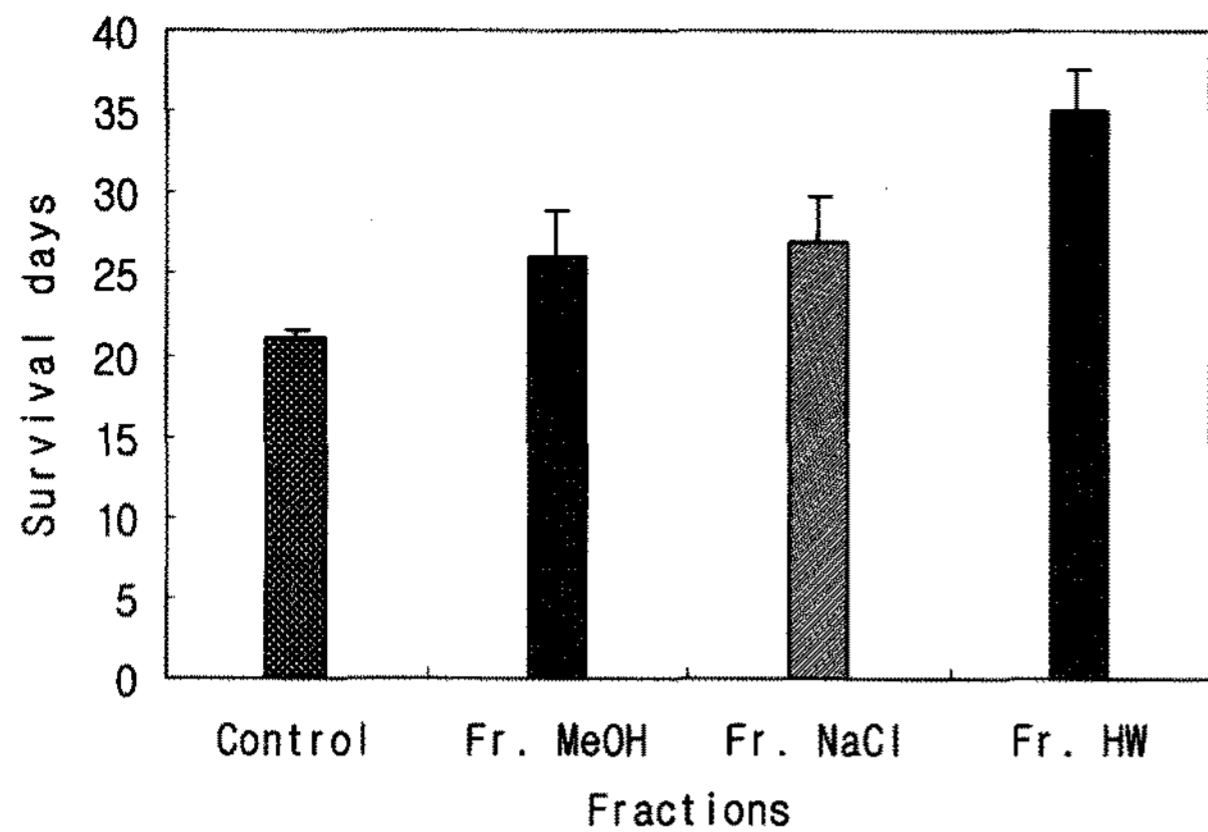
대향고의 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180

**Table 1.** Recovery ratio of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Lentinus giganteus*

Fraction <sup>a</sup>	Weight of the used mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery ratio <sup>b</sup> (%)
Fr. MeOH	400	52.0	13.0
Fr. NaCl	400	7.9	2.0
Fr. HW	400	9.38	2.3

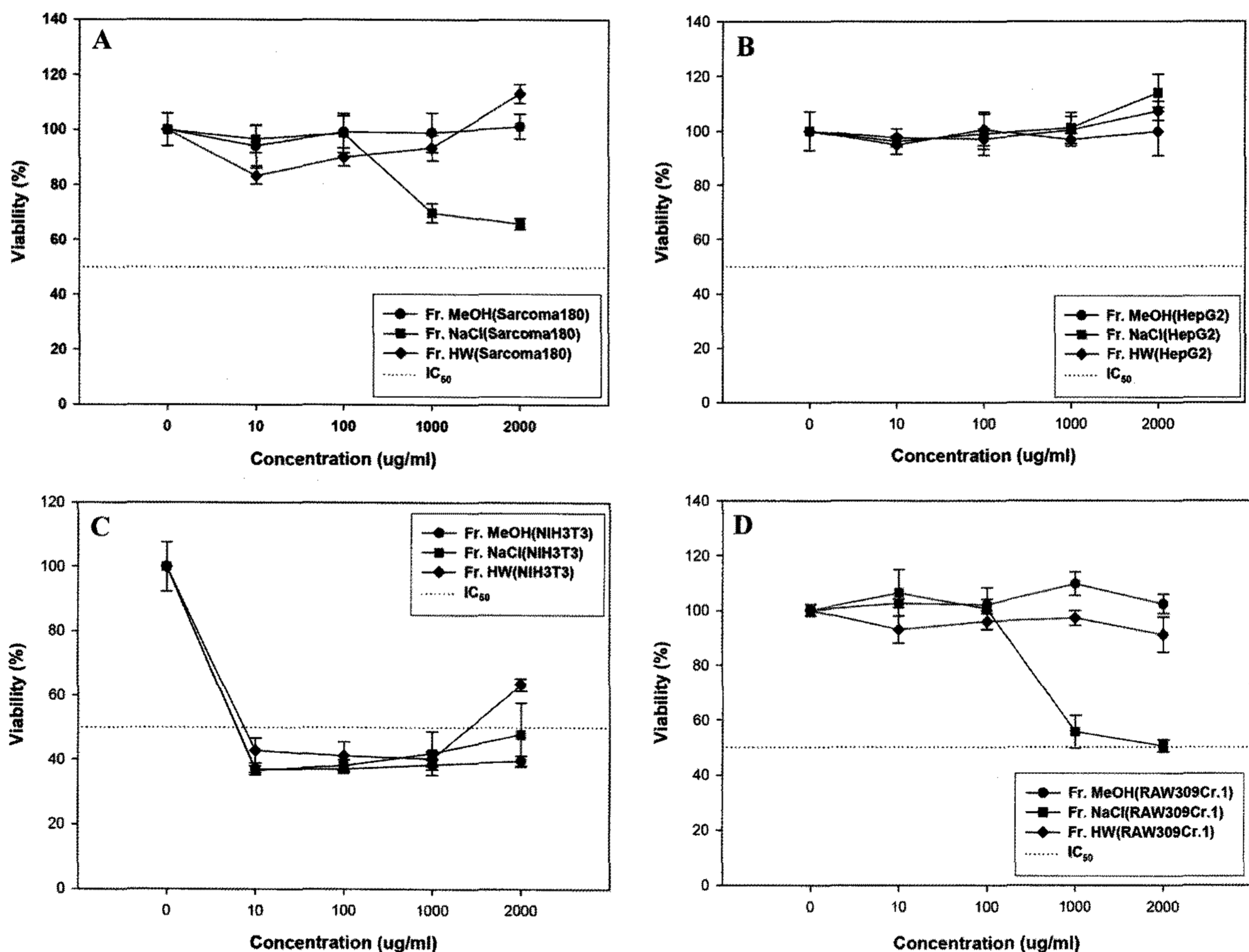
<sup>a</sup>Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water.

<sup>b</sup>Recovery ratio (%) = [Weight of extract (g)/Weight of the used mushroom (g)] × 100.



**Fig. 1.** Effect of crude polysaccharides<sup>a</sup> from fruiting body of *Lentinus giganteus* on the life elongation of ICR mice<sup>b</sup> inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection<sup>c</sup>). <sup>a</sup>Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water. <sup>b</sup>Each experimental group consisted of 10 mice. <sup>c</sup>i.p. injection intraperitoneal injection.

접종 생쥐에 주사하여 수명연장 효과를 분석한 결과, 3종류의 추출물이 각각 생쥐의 수명을 약 14.3~67.5% 연장시키는 효과가 있었다. 대조군의 생쥐는 평균 생존 일수가 21일이었으며, 열수 추출물을 20 mg/kg body weight로 투여한 실험군의 평균 생존일수는 35일로 나타나 수명연장효과가 67.5%로 높게 나타났다(Fig. 1). 심 등(2003a)은 매미눈꽃동충하초의 자실체로부터 중성염용액으로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종된 생쥐에 투여하여 조사한 결과 수명연장효과가 32.3%로 본 실험결과에 비해서는 낮게 나타났다. 그러나 삼색도장버섯의 중성염 추출 조다당류를 투여한 실험에서는 수명이 77.4% 연장되어 본 실험에서의 결과와 비교해서 수명연장 효과가 크게 나타났다(심 등, 2003b). 오 등(2006)은 Sarcoma 180을 접종한 생쥐에 흰목이 중성염용액으로 추출한 조다당류를 투여하여 생쥐의 수명이 53% 연장된다는 것을 보고하였다. 따라서 일반적으로 약용버섯에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 투여하면 수명이 연장될 수 있는 것으로 사료된다.



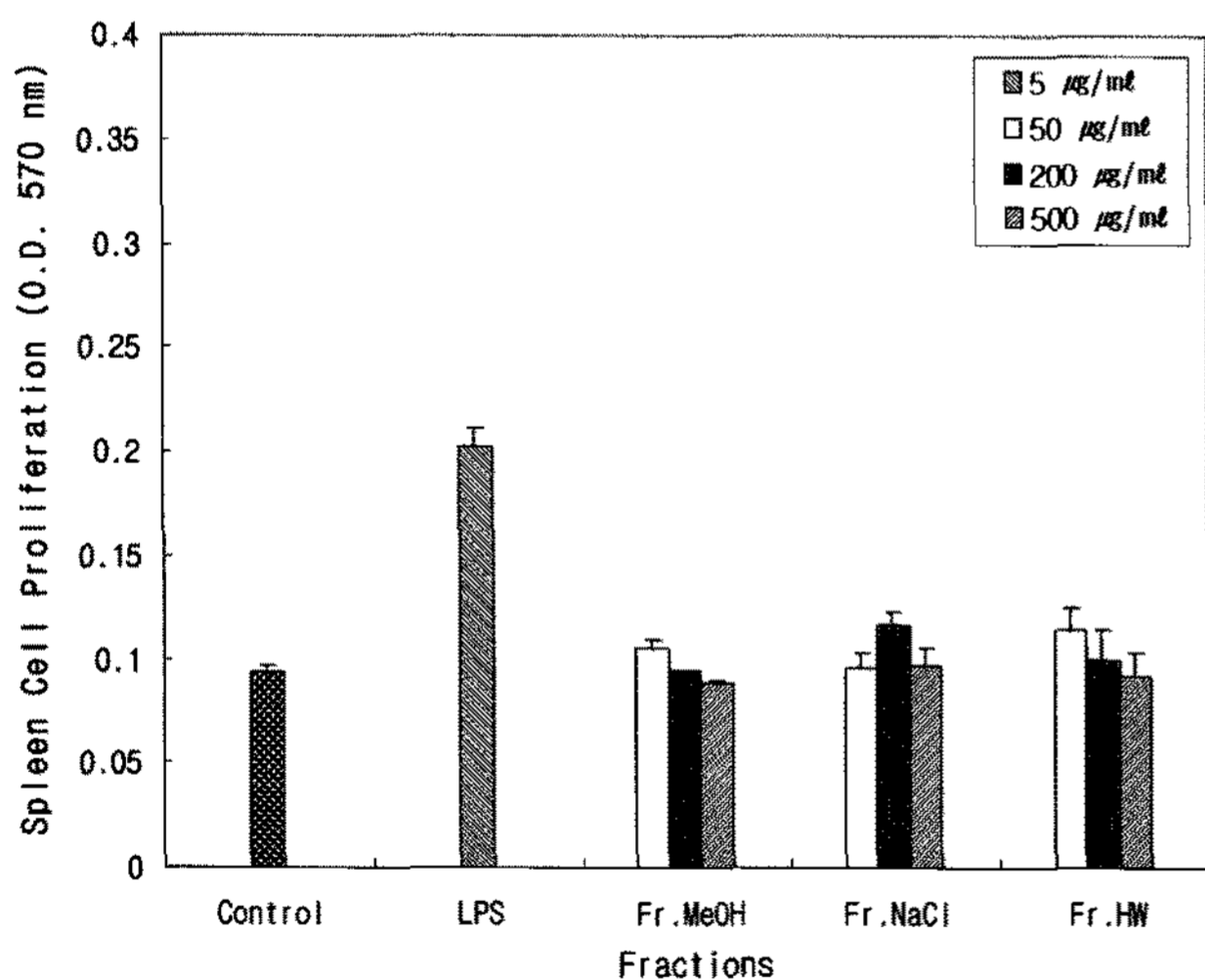
**Fig. 2.** *In vitro* cytotoxicity of fractions from fruiting body of *Lentinus giganteus* against (A) Sarcoma 180, (B) HepG2, (C) NIH3T3, (D) RAW 309 Cr.1. Concentration of each cell lines was adjusted to  $1 \times 10^5$  cells/well. Each cell lines was incubated in the fractions for 24 hr in 37°C of 5% CO<sub>2</sub> incubator. The Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. The Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW was extracted with hot water. IC<sub>50</sub> means 50% inhibition concentration.

### 세포에 대한 독성효과

정상세포와 암세포에 대한 대향고 추출물의 직접적인 세포독성 실험 결과 중성염 추출물은 1000~2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 Sarcoma 180에 대하여 약간의 독성을 보였다. HepG2에는 전혀 세포독성을 나타내지 않았으며, 정상세포인 NIH3T3에 대해서는 10~1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세 종류의 추출물 모두 현저한 독성을 나타내었다. 그리고 RAW 309 Cr.1에 대해서는 중성염 추출물이 1000~2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 현저한 독성을 보였다(Fig. 2). 이 실험 결과는 다르게 심 등(2003a)의 매미눈꽃동충하초의 조다당류를 이용한 세포독성 실험에서는 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 독성을 나타내지 않았으나 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 독성을 나타내었다. 그러나 삼색도장버섯(심 등, 2003b)과 흰목이(오 등, 2006)의 열수추출물 독성실험에서는 1000  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도실험에서 실험세포주인 NIH3T3와 Sarcoma 180에 독성이 없었다.

### 비장세포의 증식에 미치는 영향

3종류의 조다당류 추출물에 대한 비장세포의 증식 정도를 MTT법으로 관찰한 결과, 50~500  $\mu\text{g/ml}$  농도의 중성염 및 열수 추출 조다당류는 대조군에 비해 0.98~1.24배의 증식능을 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 LPS는 5~50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 2.17~2.57배의 증식능을 나타내었다(Fig. 3). 진(1996)은 잣버섯의 균사체

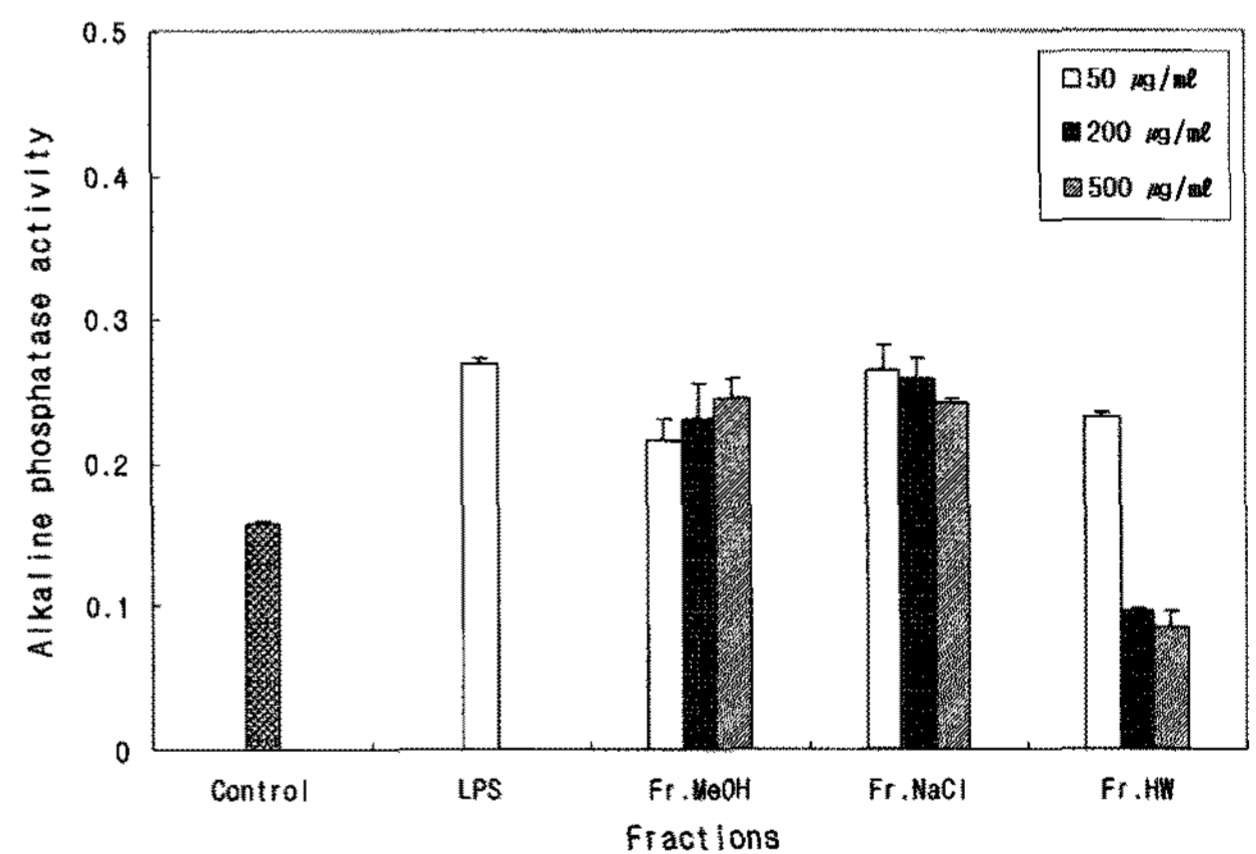


**Fig. 3.** Effect of fractions from fruiting body of *Lentinus giganteus* on proliferation of murine spleen cells. Concentration of murine spleen cells was adjusted to  $2 \times 10^5$  cells/ml. Murine spleen cells were incubated in the fractions for 48 hr in 37°C of 5% CO<sub>2</sub> incubator. Proliferation of murine spleen cells was measured by MTT method. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

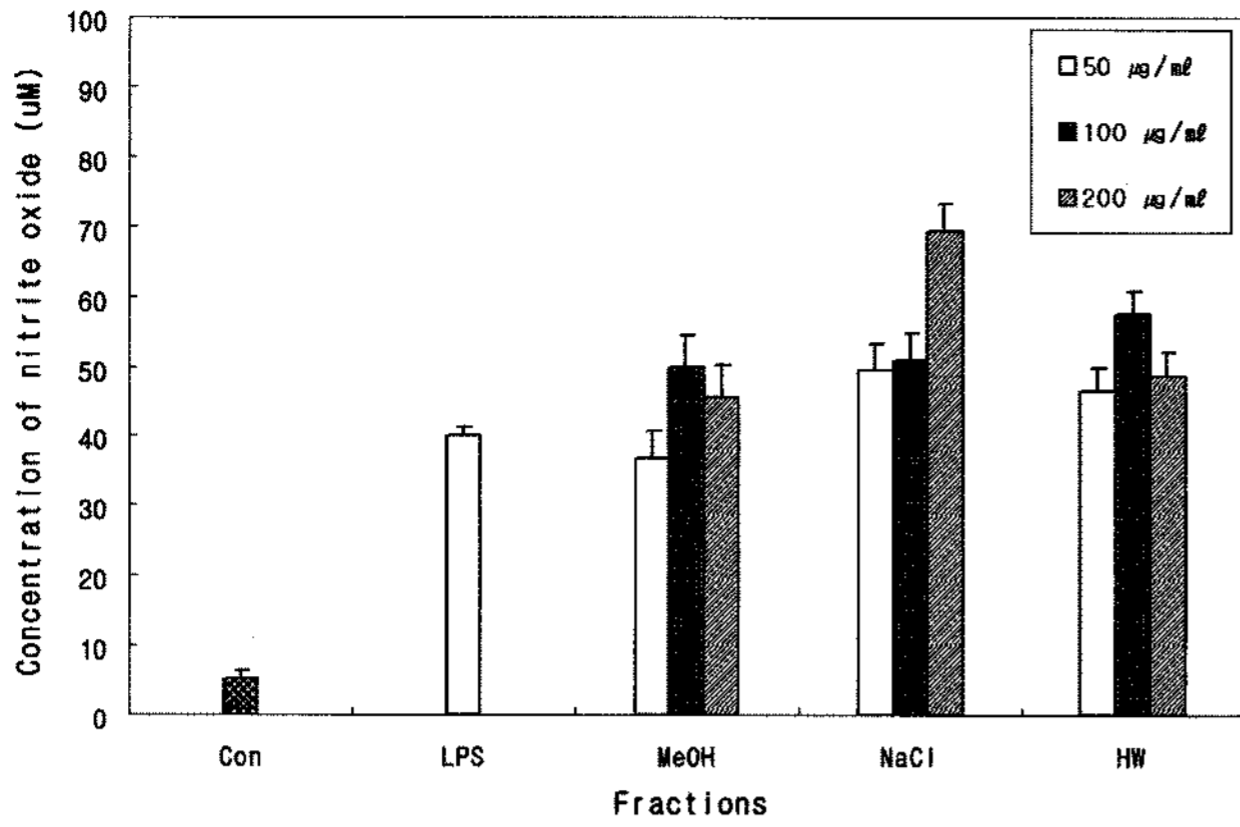
에서 추출한 lepidan이 대조군에 비해 비장세포를 10배 이상 증식시켰으며 또한 비장세포내의 B 림파구의 증식을 촉진시켰다고 보고하였다. 따라서 생체 내에서 면역 반응에 관여하는 면역세포와 항체를 생산하는 비장 세포의 증식 촉진은 면역의 증강을 위해서 매우 필요하다고 사료된다. 따라서 대향고의 자실체에서 추출한 다당류는 대조군에 비해서는 비장의 증식을 약간 증식시켰으나 양성대조군인 LPS에 비해서는 비장을 증식시키는 능력이 약간 못 미치는 것으로 나타났다.

### 생쥐의 B 림파구 활성화에 미치는 영향

Alkaline phosphatase는 B 림파구에서 분비되며 면역의 활성화에 영향을 미치는 효소이다. 금목이의 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수를 이용해 추출한 조다당류를 투여하여 alkaline phosphatase의 활성화된 양을 측정할 결과 메탄올 및 중성염 추출물이 50~500  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비해서 약 1.37~1.68배의 높은 활성을 보였다. 하지만 LPS 처리 양성대조군에 비해서는 약간 못미치는 alkaline phosphatase 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이 결과는 김 등(2007)이 민간뿌리버섯의 자실체에서 추출한 조다당류를 200~500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 양성 대조군에 비해 1.4배 높은 alkaline phosphatase의 활성을 보고한 것과 결과가 유사하였다. 따라서 대향고 자실체에서 추출한 조다당류는 생쥐의 B 림



**Fig. 4.** Effect of fractions from fruiting body of *Lentinus giganteus* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Murine spleen cells were adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/ml and incubated in the fractions for 48 hr in 37°C of 5% CO<sub>2</sub> incubator. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows: Alkaline phosphatase activity ( $p$ -nitrophenol  $\mu\text{mol}/1 \times 10^5$  lymphocytes/60 mins) =  $1.15 \times$  optical density at 405 nm. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.



**Fig. 5.** Effect of fractions from fruiting body of *Lentinus giganteus* on nitrite oxide production in RAW 264.7. Concentration of RAW 264.7 was adjusted to  $1 \times 10^5$  cells/ml. RAW 264.7 were incubated initially for 4 hr in the fractions and then incubated for another 48 hr in  $37^\circ\text{C}$  of 5%  $\text{CO}_2$  incubator with addition of 10% FBS. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

과구를 활성화하는 효과가 있는 것으로 보여진다.

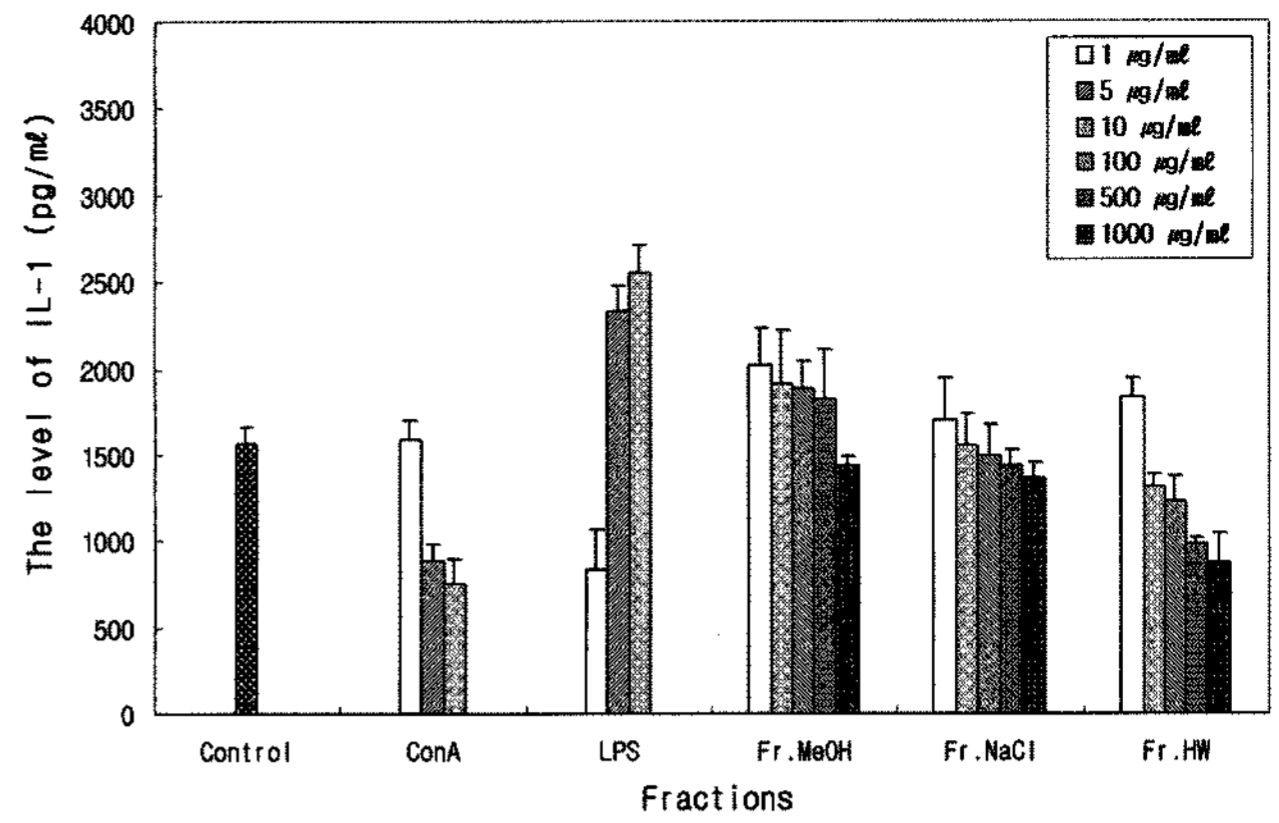
**대식세포의 활성화에 미치는 영향**

대조군의 RAW 264.7에 의해 발생된 nitric oxide(NO) 농도가  $5.12 \mu\text{M}$ 인 것에 비해 중성염 추출물을  $50\sim 200 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 대식세포주는  $49.5\sim 69.15 \mu\text{M}$ 의 nitric oxide(NO)를 발생시켰다. 특히, 중성염 및 열수 추출물은  $50 \mu\text{g/ml}$  농도에서 양성대조군인 LPS에 의해 생성된  $40 \mu\text{M}$ 의 nitric oxide 농도에 비해 다소 높은  $49.5\sim 46.62 \mu\text{M}$  농도의 NO를 생성하였다(Fig. 5). 김 등 (2006)이 뽕나무버섯의 열수추출 조다당류를  $50 \mu\text{g/ml}$  농도로 투여하였을 때 생성된 NO의 양이 대조군의 RAW 264.7에 비해 8.5배 증가하였고 양성대조군인 LPS에 비해서는 1.1배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 대향고의 자실체에서 메탄올, 중성염 및 열수를 이용하여 추출한 조다당류는 대식세포의 활성을 증가시켜 숙주세포가 항암 효과를 높이는 것으로 판단된다.

**Cytokine 분비에 미치는 영향**

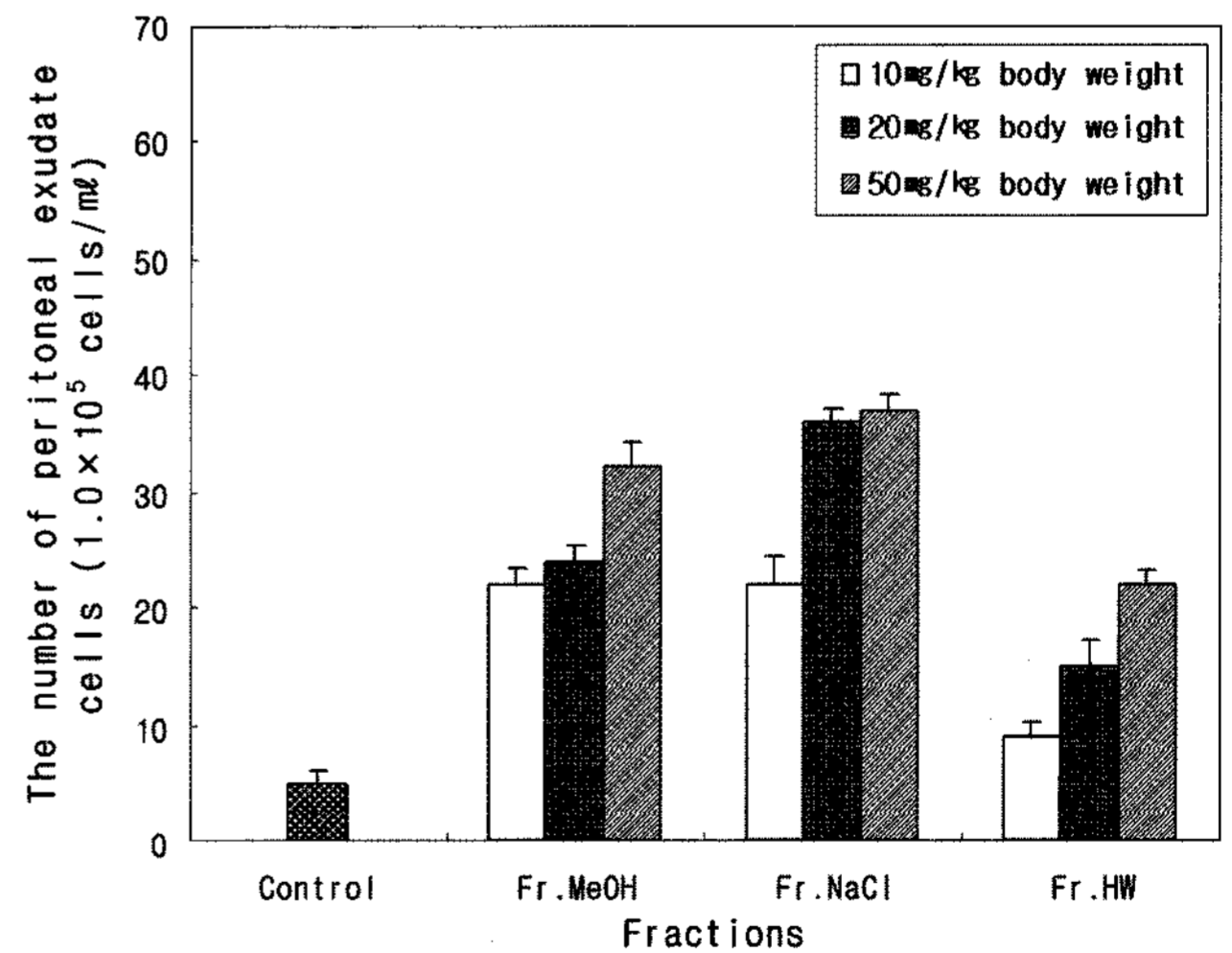
대향고에서 추출한 조다당류가 세포수준에서 면역조절에 끼치는 영향을 확인하기 위하여 생쥐의 비장 세포에서 분비하는 cytokine(IL-1)의 양을 ELISA assay kit로 측정하였다.

메탄올로 추출한 조다당류는  $1\sim 500 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군보다 높은 활성을 보였다. 그리고  $1 \mu\text{g/ml}$  농도의 메탄올, 중성염 및 열수 추출 조다당류는 같은 농도의 양



**Fig. 6.** Effects of fractions from fruiting body of *Lentinus giganteus* on cytokine (IL-1) production in splenocytes. Concentration of splenocytes was adjusted to  $1 \times 10^7$  cells/ml. Splenocytes were incubated in the fractions for 24 hr in  $37^\circ\text{C}$  of 5%  $\text{CO}_2$  incubator. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control on B cell. Con A(Concanavalin A) was used in positive control on T cell.

성대조군 Con A에 비해서 높은 활성을 보였다(Fig. 6). 따라서 본 실험의 결과 대향고에서 추출한 조다당류가 IL-1에 활성을 촉진한 것은 이들 물질이 생쥐의 항암효과와 면역을 증강시켜 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐의 수명을 연장시킨 것과 상관관계를 나타낸 것으로 판단된다.



**Fig. 7.** Effect of fractions from fruiting body of *Lentinus giganteus* on the numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fractions were injected into ICR mice for 3 consecutive day and numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice were measured 24 hr after final injection. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW was extracted with hot water.

**총 복강 세포 수에 미치는 영향**

대향고에서 추출한 3종류의 조다당류에 대한 복강 세포의 수는 메탄올과 중성염 추출 조다당류에서 농도에 따라 약 4.6~7.7배 증가하였다(Fig. 7). 이와 같은 결과는 메탄올과 중성염에서 추출한 조다당류가 복강 내 세포들을 활성화시켜 그 수를 증가시키는 데 큰 효과가 있는 것으로 판단된다. 김 등(2006)은 뽕나무버섯에서 열수로 추출한 조다당류를 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강 세포 수가 대조군에 비해 3.3배 증가했다고 보고하였고, 오 등(2006)은 흰목이의 중성염 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포 수 또한 대조군에 비해 7.4배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 대향고 자실체에서 추출한 다당류가 투여된 생쥐의 복강세포 수가 증가했다는 것은 이 버섯의 조다당류를 투여한 생쥐의 면적이 증강되었고 항암효과도 증가되었을 것으로 사료된다.

**혈액 중 백혈구 수에 미치는 영향**

백혈구는 외부의 감염으로부터 생체를 방어하는 면역반응에 1차적으로 관여하는 세포이다(Arthur and Guyton, 1986). 각각의 조다당류가 면역에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10, 20, 50 mg/kg body weight 농도의 추출된 조다당류를 투여한 생쥐의 백혈구의 수를 조사하였다. 혈액 내의 백혈구 수는 대조군  $2.31 \pm 0.88$ 에 비하여 메탄올 추출물 50 mg/kg body weight가  $3.71 \pm 0.75$ 으로 약 1.6배 증가하였으며, 중성염 추출 조다당류는 50 mg/kg body weight의 농도에서 1.58배의 증가를 보였다(Table 2). 이 결과를 통해 대향고의 메탄올, 중성염 및 열수 추출 조다당류는 10~50 mg/kg body weight의 농도에서 생쥐의 백혈구 수를 증가시키는 것으로 나타났다. 오 등(2006)은 중성염용액을 이용해 흰목이에서 추출한 조다당류를 50 mg/kg body weight 농도로 투여한 생쥐의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.6배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 위의 실험을 통해 대향고의 자실체에서 메탄올로

**Table 2.** Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Lentinus giganteus* on the numbers of circulating leukocytes in ICR mice

Group <sup>a</sup>	Dose (mg/kg body weight)	No. of mice	No. of leukocytes ( $\times 10^6/ml$ )
Control	-	10	$2.31 \pm 0.88^b$
Fr. MeOH	10	10	$2.29 \pm 0.52$
Fr. MeOH	20	10	$3.15 \pm 1.12$
Fr. MeOH	50	10	$3.71 \pm 0.75$
Fr. NaCl	10	10	$2.27 \pm 0.68$
Fr. NaCl	20	10	$3.51 \pm 0.32$
Fr. NaCl	50	10	$3.65 \pm 1.12$
Fr. HW	10	10	$2.54 \pm 0.89$
Fr. HW	20	10	$3.12 \pm 0.74$
Fr. HW	50	10	$2.61 \pm 1.23$

<sup>a</sup>Fr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water.

<sup>b</sup>Mean  $\pm$  S.E.

추출한 조다당류가 투여된 생쥐의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.6배 증가했다는 것은 이 버섯의 조다당류가 백혈구의 수를 증가시켜 생쥐의 면역을 높일 수 있는 가능성을 나타낸 것으로 사료된다.

**면역 장기 중량에 미치는 영향**

면역관련 장기의 중량변화는 전체적으로 소폭 증가하는 양상을 보였다. 간, 비장 및 흉선의 경우 중성염 추출물의 농도가 10~50 mg/kg body weight 일 때 대조군에 비해 무게가 증가하였다(Table 3). 오 등(2006)도 흰목이 중성염용액 추출 조다당류를 투여한 실험에서 실험군의 간, 비장, 흉선의 무게가 대조군에 비해 0.85~7.24% 증가된 것으로 조사되었으며, 김 등(2006)의 뽕나무버섯 중성염용액 추출 조다당류 투여 실험에서도 실험군의 간, 비장, 흉선의 무게가 대조군에 비해 소폭 증가된 것이 확인되었다. 따라서 대향고를 비롯한 버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 생쥐에

**Table 3.** Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Lentinus giganteus* on the body and immunoorgan weight of ICR mice<sup>a</sup>

	Group <sup>b</sup>			
	Control	10	20	50
Dose (mg/kg body weight)	-	10	20	50
No. of mice	10	10	10	10
Body weight (g)	$33.84 \pm 3.70^c$	$33.21 \pm 1.79$	$34.15 \pm 0.87$	$33.36 \pm 2.51$
Liver weight (g)	$2.05 \pm 0.15$	$2.09 \pm 0.11$	$2.35 \pm 0.25$	$2.31 \pm 0.28$
Liver/Body (%)	$6.11 \pm 0.05$	$6.29 \pm 0.40$	$6.88 \pm 0.51$	$6.92 \pm 0.21$
Spleen weight (g)	$0.14 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.02$	$0.19 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.05$
Spleen/Body (%)	$0.41 \pm 0.06$	$0.45 \pm 0.07$	$0.55 \pm 0.03$	$0.68 \pm 0.07$
Thymus weight (g)	$0.049 \pm 0.01$	$0.052 \pm 0.01$	$0.056 \pm 0.02$	$0.058 \pm 0.01$
Thymus/Body (%)	$0.14 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.01$	$0.16 \pm 0.02$	$0.17 \pm 0.01$

<sup>a</sup>Significant difference was not found in body and immunoorgan weight of ICR mice among control and treated groups ( $P = 0.05$ ).

<sup>b</sup>Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution.

<sup>c</sup>Mean  $\pm$  S.E.

투여하면 조다당류가 투여된 생쥐의 간, 비장, 흉선의 무게는 전체적으로 증가하는 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 대향고의 자실체로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올을 이용하여 조다당류를 추출하여 이를 ICR mice에 주사하여 항암 및 면역증강 효과를 조사하였다. Sarcoma 180, HepG2, RAW 309 Cr.1 등의 세포주에 대한 독성 실험결과, 각각의 세포주는 10~2000  $\mu\text{g/ml}$  조다당류 농도에서 세포독성을 나타내지 않았으나, NIH3T3 세포의 경우에는 열수와 중성염용액에서 추출한 조다당류 10~2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약간의 독성을 나타내었고, 메탄올에서 추출한 조다당류 2000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 독성을 나타내지 않았다. 각각의 조다당류가 투여된 실험군은 대조군에 비해 수명이 각각 14.3~67.5% 연장되었다. 중성염용액으로 추출한 조다당류는 B 임파구의 alkaline phosphatase 활성을 50~200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 약 1.53~1.68배 내외의 증가율을 나타냈다. 중성염 추출 조다당류를 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 생쥐의 총 복강 세포 수는 대조군에 비하여 최고 7.7배 증가하였으며, 메탄올 추출물을 50 mg/kg body weight의 농도로 투여하였을 때 혈액 중 백혈구의 수도 대조군에 비하여 약 1.6배 증가하였다. 또한 면역에 관련된 장기인 간, 비장 및 흉선의 체중이 대조군에 비하여 소폭으로 증가된 것을 확인하였다. 따라서 대향고 자실체에서 추출한 조다당류의 Sarcoma 180에 대한 항암작용은 이들 조다당류의 면역 증강효과에 의한 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 인천대학교 자체 연구비지원(2007년도)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

김상범, 이진우, 김혜영, 심미자, 노현수, 이현숙, 이민웅, 이우윤, 이태수. 2006. 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)의 자실체에서 추출한 조다당류가 생쥐의 Sarcoma 180에 미치는 억제효과. 한국균학회지 34:98-104.

김상범, 이진우, 이우윤, 이태수. 2007. 민긴뿌리버섯(*Oudemansiella radicata*)의 자실체로부터 추출한 조다당류의 항암 및 면역 활성 효과에 관한 연구. 한국균학회지 35:109-114.

박상신, 이갑득, 민태진. 1995. 버섯 중 항균물질의 검색 및 개발에 관한 연구. 그람음성균 및 곰팡이에 대한 항균물질의 검색 (2보). 한국균학회지 23:176-189.

박완희, 이호득. 1991. 한국의 버섯. 교학사.

박완희, 이호득. 1999. 한국약용버섯도감. 교학사.

심성미, 임경환, 이우윤, 김정완, 심미자, 이민웅, 이태수 2003a. 매미눈꽃동충하초(*Paecilomyces sinclairii*)에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과에 관한 연구. 한국균학회지 31:

155-160.

심성미, 임경환, 김정완, 이우윤, 김하원, 이민웅, 이태수 2003b. 삼색도장버섯(*Daedaleopsis tricolor*)에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암효과. 한국균학회지 31:161-167.

오윤희, 이우윤, 이민웅, 심미자, 이태수. 2004. 저령(*Grifola umbellata*)의 균핵에서 추출한 조다당류의 면역활성 및 항암 효과. 한국균학회지 32:23-30.

오윤희, 김상범, 이진우, 김혜영, 심미자, 노현수, 이현숙, 이민웅, 이우윤, 이태수. 2006. 흰목이(*Tremella fuciformis*)에서 추출한 조다당류의 면역 활성 및 항암 효과. 한국균학회지 34:105-111.

조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995a. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I)-중성염 용액 추출 다당류의 특성. 한국균학회지 23:332-339.

조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995b. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(II)-열수추출 다당류의 분리 및 특성. 한국균학회지 23:340-347.

진미림. 1996. 잣버섯 성분의 면역세포 및 전사인자의 활성화 작용에 관한 연구. 서울대학교 대학원 논문집. pp. 1-121.

한만덕, 이은숙, 김영권, 이종우, 정훈, 윤경하. 1998. 영지의 균사체성  $\beta$ -glucan에 의한 Raw 264.7 대식세포의 Nitric Oxide 생성. *Kor. J. Mycol.* 26:246-255.

卯曉嵐. 2000. 中國大型真菌. 河南科學技術出版社.

Anne, S., Kim, E. S. and Hong, W. K. 2004. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J. Clin.* 54:150-180.

Arthur, C. and Guyton, M. D. 1986. *Textbook of medical physiology. 7th Ed.* W. B. Saunder company. pp. 51-59.

Choi, S. H., Jun, C. D., Lee, B., S., Park, S. D., Oh, J. S. and Chung, H. T. 1993. Effect of various extrinsic and intrinsic factors on the nitric oxide production of murine macrophage. *Kor. J. BRM* 3:15-22.

Denizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89:271-277.

Fukuda, K., Uematsu, T., Hamada, A. and Akiya, S. 1975. The polysaccharide from *Lampteromyces Japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* 23:1955-1961.

Greenwald, P. 1996. Chemoprevention of cancer. *Sci. Am.* 275:96-102.

Hyun, J. W., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1990. Studies on constituents of higher fungi of Korea (LXVII), antitumor componets of the basidiocarp of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* 18: 58-69.

Kang, C. Y., Shim, M. J., Choi, E. C., Lee, Y. N. and Kim, B. K. 1981. Mycelial culture and antineoplastic component of *Ganoderma lucidum*. *Kor. Biochemical J.* 14:101-112.

Kim, B. K., Chung, H. S., Chung, K. S. and Yang, M. S. 1980. Studies on the antineoplastic components Korean Basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* 8:107-113.

Kim, B. K., Park, E. K. and Shim, M. J. 1979. Studies on constituents of higher fugni of Korea (XXIV), antineoplastic activities of *Coriolus vesicolor* (Fr.) Quél, *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* 2:145-149.

Mossman, B. T. 1983. *In vitro* approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ. Health Perspect.* 53:155-161.

Ohno, N., Arai, Y., Suzuki, I. and Yadomae, T. 1986. Induction of alkaline phosphatase activity in murine spleen cells treated



- with various mitogens. *J. Phamacobio-Dyn.* 9:593-599.
- Shin, H. W., Kim, H. W., Choi, E. C., Toh, S. H. and Kim, B. K. 1985. Studies on inorganic composition and immunopotentiating activity of *Ganoderma lucidum* in Korea (XLVI). *Kor. J. Pharmacogn.* 16:181-190.
- Shim, M. J. 1980. Stimulating effects of *Coriolus versicolor* constituents on immune response. *Kor. J. Mycol.* 8:115-116.
- Shim, M. J. 1981. Studies on constituents and culture of the higher fungi of Korea. *Kor. J. Mycol.* 9:49-66.
- Sporn, M. B., Suh, N. 2000. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 21:525-530.
- Weir, D. W., Herzenberg, L. A. and Blackwell, C. 1986. Handbook of experimental immunology. 4th ed. Blackwell Scientific Publications, Boston. p. 601
- Ying, J. Z., Mao, X. L., Ma, Q. M., Zong, Y. C. and Wen, H. A. 1987. Icons of medicinal fungi from China. Science Press, Beijing, China.
- Yoshioka, Y., Sano, T. and Ikekawa, T. 1973. Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. I. *Chem. Pharm. Bull.* 21:1772-1779.