

Immuno-stimulating and Antitumor Effects on Mouse Sarcoma 180 by Crude Polysaccharides Extracted from Fruiting Body of *Hericium erinaceus*

Yon Il Choi, Jae Seong Lee, U-Youn Lee and Tae Soo Lee*

Department of Biology, University of Incheon, Incheon 406-772, Korea

Received February 26, 2010 / Accepted April 12, 2010

Hericium erinaceus, an edible and medicinal mushroom belonging to the Basidiomycota family, has been used for curing gastric ulcers and stomach cancers in human beings and is also known to have good inhibitory effects on sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma in mice. Neutral saline soluble (0.9% NaCl), hot water soluble and methanol soluble substances (hereinafter referred to as Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH, respectively) were extracted from the fruiting body of the mushroom. In *in vitro* cytotoxicity tests, crude polysaccharides were not cytotoxic against cell lines such as Sarcoma 180, HepG2, HT-29 and NIH3T3 at concentrations of 10~2,000 µg/ml. Intraperitoneal injection with crude polysaccharides exhibited a life prolongation effect of 29.1~54.1% in mice previously inoculated with Sarcoma 180. Fr. Na increased the numbers of spleen cells by 2.9 fold at a concentration of 50 µg/ml compared with the control. Fr. Na improved the immuno-potentiating activity of B lymphocytes by increasing alkaline phosphatase activity by 5.5 fold compared with the control at a concentration of 200 µg/ml. Fr. NaCl increased the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes by 4 and 2.3 folds at a concentration of 50 mg/kg, respectively. Therefore, the crude polysaccharides extracted from the fruiting body of *H. erinaceus* could improve antitumor activities in mice.

Key words : Antitumor effect, crude polysaccharides, immunomodulation, *Hericium erinaceus*

서 론

버섯으로부터 추출한 생리활성 물질이 면역증강 및 항암효과를 나타낸다는 것이 보고되면서 버섯에서 추출한 성분에 대한 면역증강 및 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 우리나라에서 한국산 버섯의 항암효과에 대한 초기 연구는 구름버섯, 표고 및 느타리의 열수 추출물을 생쥐의 Sarcoma 180에 투여하여 항암효과를 증명하였으며 항암효과는 다당류와 단백질로 구성된 고분자 물질에 의한 것으로 밝혀졌다[13,25]. 최근 상황버섯의 자실체로부터 분리한 단백 다당체가 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암 작용을 나타내고 그 중 항암효과가 높은 물질의 유효성분은 β-D-glucan인 것으로 밝혀졌다[9,18]. 삼색도장버섯의 자실체에서 중성염용액으로 추출한 항암물질은 다당류의 함량은 93.89%이고 단백질의 함량은 3.1%이었으며, 저령의 균핵에서 중성염용액으로 추출한 항암물질의 다당체 함량은 98.25%, 단백질의 함량은 1.44%인 단백다당체인 것으로 보고되었다[21,27]. 따라서 버섯에서 추출된 항암물질의 대부분은 다량의 다당체와 소량의 단백질로 구성된 단백다당체인 것으로 사료된다. 또한 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암효과를 나타내는 표고, 매미눈꽃동충하초, 삼색도장버섯 및 저령의 자실체에서 추출한 조다당류

를 Sarcoma 180, HepG2, HT-29, MCF-7, HL-60 등의 암세포주에 배양하여 독성검사를 한 결과 이들 버섯의 조다당류는 일반적으로 농도를 증가함에 따라 실험 세포주에 대한 독성이 증가하는 경향을 보였으나 실험대상 세포주를 사멸시키지 않고 증식만 억제하는 것으로 나타났다[3,21,26,27]. 또한 뽕나무 버섯과 장미무당버섯의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류를 이용하여 수행한 세포주에 대한 독성 실험에서도 위와 유사한 결과를 얻었으며, 고농도의 조다당류를 생쥐의 복강에 주사할 경우, B 임파구의 활성, 총 복강세포의 수, 혈중 백혈구의 수가 크게 증가하여 면역을 증가시키는 효과가 있다는 것이 보고되었다[6,14]. 따라서 버섯에서 추출한 조다당류는 암세포에 직접적으로 작용하여 암세포를 사멸시키기 보다는 면역을 활성화하여 암세포의 증식을 억제하여 항암효과를 나타내는 것으로 사료된다. 이외에도 버섯이 함유한 다당류는 숙주의 면역 활성을 크게 높이고 또한 항암요법제 투여에 의한 부작용도 크게 줄여 치료효과를 높이는 것으로 보고되었다[8].

노루궁뎅이(*H. erinaceus*)는 분류학적으로 민주름버섯목(Aphyllphorales), 산호침버섯과(Hericaceae), 산호침버섯속(*Hericium*)에 속하는 버섯으로 가을에 활엽수의 고목이나 살아있는 굵은 줄기에 발생하는 백색부후균이다. 자실체의 지름은 5~25 cm의 반구형으로 윗면에는 짧은 털이 밀생해 있으며 앞면에는 길이 1~5 cm의 수염모양의 털이 아래쪽을 향하여 늘어져있다[24]. 중국에서는 이 버섯의 자실체가 인체의 면역 체계를 증강시키고 위궤양, 십이지장궤양, 만성장염, 위암 및

*Corresponding author

Tel : +82-32-835-8242, Fax : +82-32-835-0763

E-mail : tslee@incheon.ac.kr

식도암의 치료에 효과적이라고 보고되어 있다[28]. 또한 이 버섯의 자실체와 균사체에는 다당류 외에 erinacenes, 렉틴, 폴리페놀 등 여러 종류의 생리 활성물질이 함유되어 있어서 성인병의 치료에도 이용이 가능하다고 보고되었다[19]. 최근 이 버섯의 자실체에서 추출한 생리활성물질 중 파괴된 중추신경의 재생과 치매의 치료제로써 이용가능성이 높은 물질의 구조가 밝혀져 신경성장소(nerve growth factor)로 명명되었으며 이 물질에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다[12].

본 연구는 인천대학교에 소재한 “버섯균주 및 DNA은행”의 IUM 2257균주를 인공 재배하여 수확한 자실체를 실험에 사용하였다. 수확한 자실체는 80°C의 건조기에서 24시간 건조하고 마쇄한 후 증성염용액(0.9%), 메탄올(80%) 및 열수를 이용하여 자실체로부터 조다당류를 추출한 후 *in vitro*와 *in vivo*에서 여러 세포주에 대한 독성실험과 생쥐의 Sarcoma 180에 대한 항암 및 면역증강에 관한 연구를 수행하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서는 2007년 인천대학교 “버섯균주 및 DNA은행”의 버섯재배실에서 재배하여 수확한 노루궁뎅이(*Hericium erinaceus*)의 자실체를 사용하여 수행하였다. 수확한 자실체는 실험실로 운반한 뒤 80°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시키고 마쇄한 후 -70°C의 저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

Cho 등[4,5]과 Shim 등[26,27]의 방법에 따라 증성염용액(0.9% NaCl), 80% 메탄올 및 열수로 추출하였으며, 추출한 각각의 물질은 수율을 조사하였다.

수명연장 실험

실험에 사용한 생쥐는 5주령의 웅성 ICR mouse로 실험에 사용하기 위해 1주간 동물 사육실에서 적응시켰다. 생쥐에 복수암을 유발시키기 위하여 Sarcoma 180을 5×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켜 0.2 ml 씩(1×10^6 cells/mouse) ICR 마우스의 복강에 이식한 24시간 후부터 추출한 조다당류를 20 mg/kg body weight의 농도로 생리식염수에 용해시키고 pore size 0.22 μ m의 membrane filter로 여과시킨 후 각각의 추출물을 매일 1회 10일간 복강 내에 0.2 ml 씩 투여하였다. 대조군에는 같은 기간, 동량의 생리식염수를 투여하였으며, Sarcoma 180 최종 투여 후 32일까지 관찰하여 평균 수명 일수를 계산하고 아래의 식으로 increase of life span (ILS)을 계산하여 추출 조다당류가 암세포의 성장을 억제하여 수명을 연장시킨 효과를 평가하였으며 본 실험은 동물실험에 관한 윤리규정을 준수

하여 수행되었다.

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

C: 대조군의 평균 수명(일)

T: 실험군의 평균 수명(일)

세포독성 실험

실험에 사용한 정상세포는 마우스 섬유아세포 NIH3T3, 암세포는 마우스 육종암세포 Sarcoma 180, 인간 간암세포 HepG2, 인간 대장암세포 HT-29으로 모두 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포독성 실험은 Denizot와 Lang [7]의 방법에 따라 수행하였다. NIH3T3, HepG2 및 HT-29 세포는 1×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 100 μ l 씩 주입한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2,000 μ g/ml이 되도록 조정된 후 100 μ l 씩 세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 5 mg/ml의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma Co., USA) solution 10 μ l를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma Co., USA) 100 μ l에 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sarcoma 180은 2×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 50 μ l 씩 주입하고 각각의 조다당류 최종 농도를 10~2,000 μ g/ml이 되도록 암세포에 처리하여 최종 용적이 100 μ l가 되도록 하고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis (2-methoxyl-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT; Sigma Co., USA) solution 당 25 μ M phenazine methosulfate (Sigma Co., USA)가 포함된 용액을 well 당 30 μ l 씩 처리하여 암 조건에서 2시간 배양한 후 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 암세포의 생존율은 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 구하였다.

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

T: 실험군의 평균 흡광도

C: 대조군의 평균 흡광도

B: Blank

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 medium (Nalgene Co., Japan)을 첨가하여 원심분리 하였다. 단핵 세포층만 조심스럽게 취하여 3회 세척한 후 세포수가 2×10^5 cells/ml이 되도록 조정하여 96 well plate에 100 μ l 씩 분주하였다. 50, 200, 500 μ g/ml 농도로 희석한 각각의 조다당류와 양성 대조군으로 사용한

5, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 lipopolysaccharide (LPS; Sigma Co., USA)를 100 μl 씩 처리하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하고 위의 MTT법과 동일한 방법으로 처리한 후 흡광도를 측정하였다[20].

마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

Ohno 등[23]의 방법에 따라 분화된 B 임파구의 표면에 발현되는 alkaline phosphatase를 측정하였다. 준비된 비장세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 well 당 100 μl 씩 분주하고 50, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 조다당류와 양성 대조군으로 5, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 LPS (lipopolysaccharide)를 가함으로써 최종 부피가 200 μl 가 되도록 하였다. 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후, 세포 배양액을 원심분리하고 침전물에 1 mM MgCl₂ (Sigma Co., USA)를 포함한 50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.0; Sigma Co., USA)에 1 mg/ml이 되도록 p-nitrophenyl phosphate (Sigma Co., USA)를 첨가한 용액을 100 μl 씩 가한 다음 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시켰다. 차가운 0.3 N NaOH (Sigma Co., USA) 용액 50 μl 를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하고 다음 식에 따라 alkaline phosphatase activity를 계산하였다.

Alkaline phosphatase activity (p-nitrophenol $\mu\text{mol}/1 \times 10^5$ lymphocytes/60 min) = $1.15 \times \text{O.D. at } 405 \text{ nm}$

Cytokine 분비에 미치는 영향

노루궁뎅이 추출물이 생쥐의 비장세포를 자극하여 싸이토카인(Koma Biotech Inc., Korea)의 분비를 증가시키는지 조사하기 위하여 mouse TNF- α (Koma Biotech Inc., Korea)와 mouse interleukin-2 (IL-2) ELISA kit (Koma Biotech Inc., Korea)를 이용하여 측정하였다. 무균적으로 비장을 적출하여 complete medium (10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μg streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 medium)에서 스테인레스 스틸 망을 통과시켜 단핵세포를 만들었다. 이로부터 얻은 세포는 Ficoll-Paque Plus 용액(Sigma Co., USA) 3 ml에 넣은 후 현탁액을 7 ml까지 세포가 섞이지 않도록 넣은 후 400 \times g에서 30분간 원심 분리하였다. 이 후 가운데 위치한 유헤세포를 혈구계산기를 이용하여 세포의 수를 계수하였고, trypan blue exclusion 방법[1]으로 생존율(85% 이상)을 확인하였다. 유헤세포를 1×10^7

cells/ml로 맞추어 버섯추출 조다당류의 농도와 함께 24 well plate에서 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 상등액 중에서 분비된 싸이토카인(TNF- α , interleukin-2)을 ELISA kit (Koma Biotech Inc., Korea)로 측정하였다. 비장 임파구 자극의 양성 대조군으로 T 세포(concanavalin A; ConA; Sigma Co., USA) 및 B 세포 mitogen (lipopolysaccharide ; LPS)을 사용하였다. 실험에 사용된 노루궁뎅이의 추출 조다당류는 각각 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 비율로 첨가하여 비장 면역세포의 자극능을 조사하였다.

총 복강세포 수에 미치는 영향

6주령의 ICR 웅성 마우스를 실험군과 대조군으로 나누어 3일간 연속으로 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 노루궁뎅이에서 추출한 조다당류를 복강 내에 투여하였고, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 조다당류 투여 최종일로부터 24시간 후 마우스를 경추탈골시켜 10 ml의 PBS buffer (pH 7.2; Thermo Scientific, USA)로 복강 내를 세척한 다음 복강 세포를 채취하여 Turk's solution으로 염색 후 혈구계수기를 이용하여 총 복강세포의 수를 측정하였다.

혈중 백혈구 수와 면역 장기의 중량에 미치는 영향

6주령의 ICR 웅성 마우스를 실험군과 대조군으로 나누어 10일간 연속으로 복강 내에 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 조다당류를 투여하였으며, 대조군은 생리식염수를 투여하였다. 조다당류 투여 최종일로부터 2일 후 혈액을 심장에서 채혈하고 Turk's solution으로 염색하여 혈구계수기로 백혈구 수를 측정하였다. 또한 간, 비장 및 흉선을 적출하여 중량을 측정하였다. 실험군과 대조군의 상대 장기중량은 장기의 중량을 부검 전 체중으로 나누어 백분율로 산출하였다.

결과 및 고찰

성분의 추출 및 분리

3 종류의 용매를 이용하여 추출한 조다당류의 수득률은 80%의 메탄올에서 90.1 g이 추출되어 가장 높은 22.5%의 수득률을 보였고, 중성염에서는 8.3 g이 추출되어 2.1%의 수득률을 나타내었으며, 열수에서 3.2 g이 추출되어 0.8%의 가장 낮은 수득률을 나타내었다(Table 1). 이 결과는 매미눈꽃동충하초의

Table 1. Recovery rate of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus*

| Fraction ^a | Weight of the used mushroom (g) | Weight of extract (g) | Recovery rate ^b (%) |
|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Fr. MeOH | 400 | 90.1 | 22.5 |
| Fr. NaCl | 400 | 8.3 | 2.1 |
| Fr. HW | 400 | 3.2 | 0.8 |

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water.

^bRecovery rate (%) = [Weight of extract (g)/Weight of the used mushroom (g)] \times 100.

자실체에서 메탄올을 이용하여 추출한 수득물 30.6% [26], 장미무당버섯의 자실체로부터 메탄올로 추출한 수득물 24% [6] 및 뽕나무버섯부처 자실체로부터 메탄올로 추출한 수득물 23.6% [16]에 비해서는 낮았으나 흰목이의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류 수득물 8.8%에 비해서는 높았다[22]. 이와 같이 여러 종류의 버섯에서 추출된 조다당류의 수득율이 다른 것은 각각의 버섯이 함유하고 있는 다당류의 종류와 양도 다르고 또한 용매의 종류에 따라 추출되는 양상도 다르기 때문인 것으로 사료된다.

평균 수명 연장효과

노루궁뎅이의 자실체에서 3 종류의 용매를 이용하여 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종된 생쥐에 주사하여 수명이 연장된 효과를 조사한 결과, 이들 생쥐는 3 종류의 조다당류 투여에 의해 수명이 29.1~54.1% 연장되었다. 대조군의 생쥐는 평균 생존 일수는 20일이었으나 열수 추출 조다당류를 20 mg/kg body weight로 투여한 실험군 생쥐의 평균 생존일수는 가장 긴 31일로 나타나 수명을 54.1% 연장시킨 것으로 나타났다(Fig. 1). 본 실험 결과를 삼색도장버섯과 금목이의 자실체에서 각각 중성염용액과 메탄올을 이용해 추출한 조다당류를 Sarcoma 180 접종 생쥐에 투여한 후 나타난 수명연장효과와 비교한 결과 매미꽃뚝충하초의 자실체에서 추출한 조다당류를 투여하여 수명이 연장된 32.3% [26]에 비해서는 높았고, 흰목이의 자실체에서 중성염용액으로 추출한 조다당류를 투여한 53% [22]와는 유사하였으나 삼색도장버섯과 금목이의 수명연장효과인 77.4%와 66.7%에 비해서는 낮았다 [17,27]. 따라서 이제까지 여러 종류의 약용버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 투여할

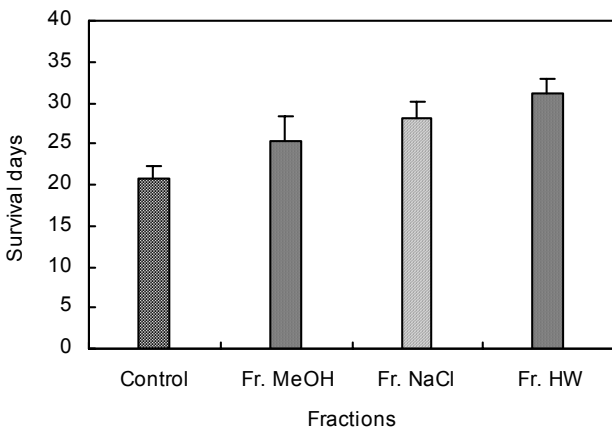


Fig. 1. Effect of crude polysaccharides^a extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus* on the life elongation of ICR mice^b inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection).
^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water.
^bEach experimental group consisted of 10 mice.
^ci.p. injection intraperitoneal injection.

경우 생쥐의 수명은 대조군에 비해 32.3~77.4%의 범위 내에서 연장이 가능할 것으로 보여 진다.

세포독성효과

노루궁뎅이의 자실체로부터 메탄올, 중성염 및 열수로 추출한 조다당류를 여러 세포주를 대상으로 세포독성 실험을 수행한 결과 메탄올 추출 조다당류 10~2,000 µg/ml의 농도에서 생쥐의 Sarcoma 180 암세포에 대해서만 약간의 세포독성을 나타낸 반면 중성염용액이나 열수로 추출한 조다당류는 동일한 농도에서 암세포주인 Sarcoma 180, HepG2 및 HT-29에 대해서 세포독성을 거의 나타내지 않았고 정상세포주인 NIH3T3에도 독성을 나타내지 않았다(Fig. 2). 장미무당버섯의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류를 이용한 세포독성 실험에서는 1,000~2,000 µg/ml 범위의 농도에서만 Sarcoma 180에 대해 약간의 독성을 나타내었고 다른 세포주인 HepG2, HT29 및 NIH3T3는 10~2,000 µg/ml의 농도범위에서 거의 독성을 나타내지 않았다[6]. 그러나 삼색도장버섯과 흰목이의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류 세포독성실험에서는 1,000 µg/ml 이하의 농도에서는 NIH3T3와 Sarcoma 180 세포주에 대한 독성은 없었으나 2,000 µg/ml의 농도에서는 독성이 약하게 나타났다[22,27]. 또한 민긴뿌리버섯의 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180과 NIH3T3를 대상으로 수행한 독성실험에서는 10 µg/ml의 농도에서는 독성을 나타내지 않았으나 100 µg/ml의 농도에서 각각 10~20% 내외의 세포주가 사멸되었으며, 1,000 µg/ml의 농도에서는 25~30%의 세포주가 사멸되어 약한 세포독성이 나타났다[15]. 따라서 버섯의 자실체에서 추출된 조다당류가 세포주에 대한 독성이 다른 것은 이들 버섯의 자실체를 구성하는 다당류의 성분과 다당류와 결합되어 있는 단백질의 성분이 다르기 때문인 것으로 사료된다.

비장세포의 증식에 미치는 영향

서로 다른 3종류의 용매로 추출한 조다당류가 비장세포의 증식에 미치는 영향을 MTT법을 이용하여 관찰하였다. 중성염과 메탄올로 추출한 조다당류는 50~500 µg/ml 농도에서 비장세포의 수를 대조군에 비해 1.6~2.9배 증식시키는 것으로 나타났다. 양성 대조군으로 사용된 LPS는 5~50 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 비장세포의 수를 각각 4.3배와 4.5배 증식시켜 LPS가 노루궁뎅이에서 추출한 조다당류보다는 비장세포의 증식 능력이 높게 나타났다(Fig. 3). 금목이의 자실체에서 메탄올, 중성염용액, 열수로 추출한 조다당류는 비장세포를 50~500 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 약 1.6~2.0배 높게 증식시켰으며, 반면 양성대조군으로 사용된 LPS는 5~50 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 2.2~2.6배 높게 증식시켜 금목이 추출 조다당류보다 비장세포의 증식능력이 높았다[17]. 또한 액체 배양한 잣나무버섯의 균사체에서 추출한 lepidan으로 명명

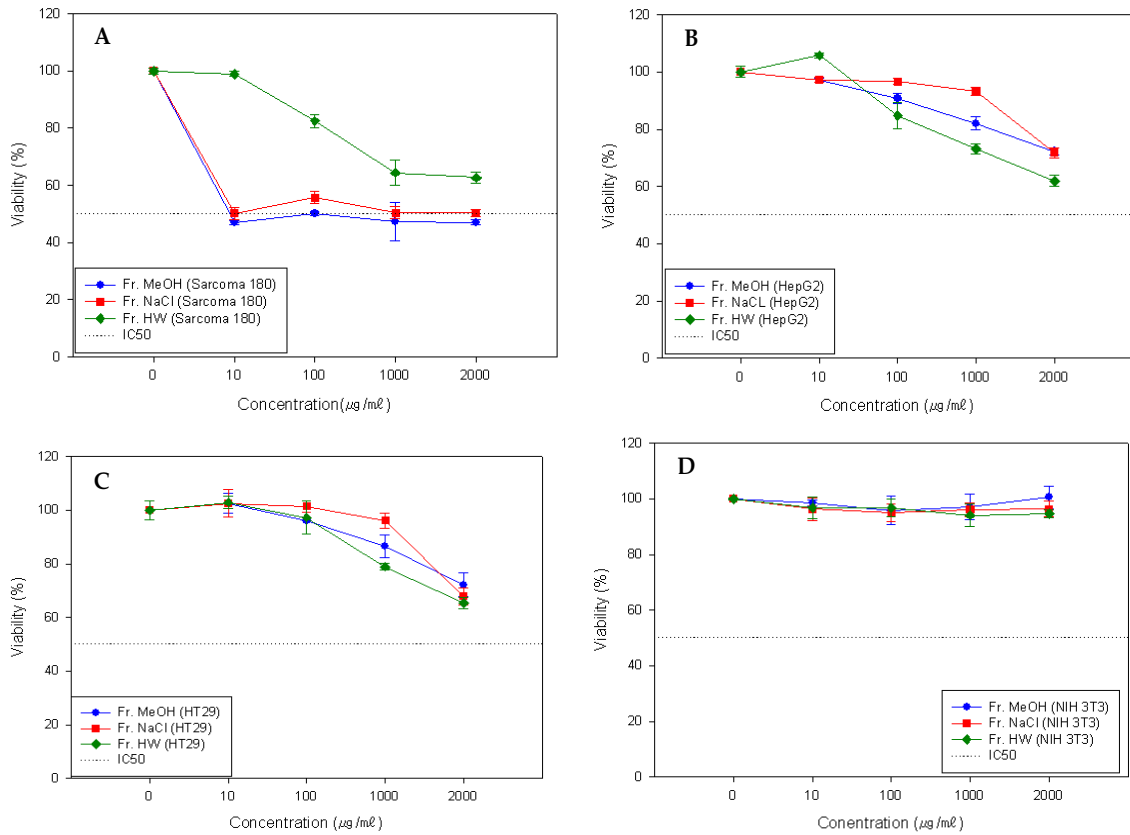


Fig. 2. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus* against (A) Sarcoma 180, (B) HepG2, (C) HT-29, (D) NIH3T3. Concentration of cells was 1×10^5 cells/ml. The Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. The Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW was extracted with hot water. IC₅₀ means 50% inhibition concentration of cells.

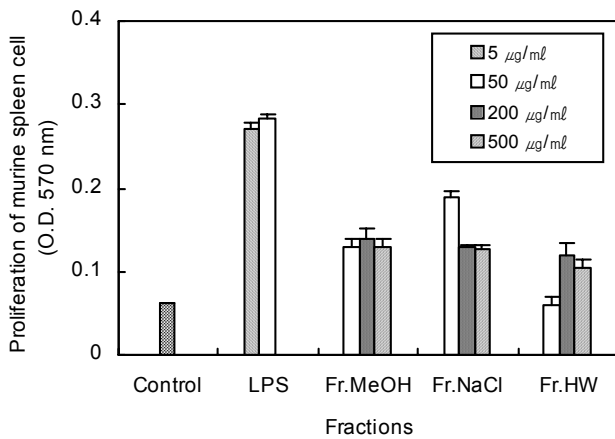


Fig. 3. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus* on proliferation of murine spleen cells. Concentration of spleen cells was 2×10^5 cells/ml. Proliferation of murine spleen cells was measured after 48 hours of incubation by MTT method. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. 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.

된 다당류는 비장세포를 대조군에 비해 10배 이상 증식시켰으며, 비장세포의 B 임파구 증식도 촉진한다고 보고되었다[11]. 따라서 Sarcoma 180을 주사한 후 노루궁뎅이에서 추출한 조다당류를 투여한 생쥐의 수명이 연장된 것은 노루궁뎅이에서 추출한 조다당류가 면역에 관여하는 비장 세포의 증식을 촉진시킨 것과 연관이 있을 것으로 사료된다.

생쥐의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

Alkaline phosphatase는 B 임파구로부터 분비되며 면역을 활성화에 영향을 미치는 효소이다[2]. 노루궁뎅이의 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수를 이용해 추출한 조다당류가 생쥐의 alkaline phosphatase를 활성화시킨 양을 측정하였다. 중성염 용액으로 추출한 조다당류는 50~500 µg/ml 농도에서 대조군에 비해서 약 4.6~5.5배의 높은 활성을 보였고, LPS는 중성염 용액보다도 10배 낮은 5~50 µg/ml의 농도에서도 alkaline phosphatase 활성이 5~5.2배 높게 나타나서 중성염 용액으로 추출한 조다당류보다 alkaline phosphatase에 대한 활성이 높았다(Fig. 4). 본 실험 결과는 뽕나무버섯의 자실체에서 중성염용액으로 추출한 조다당류를 50~500 µg/ml의 농도로

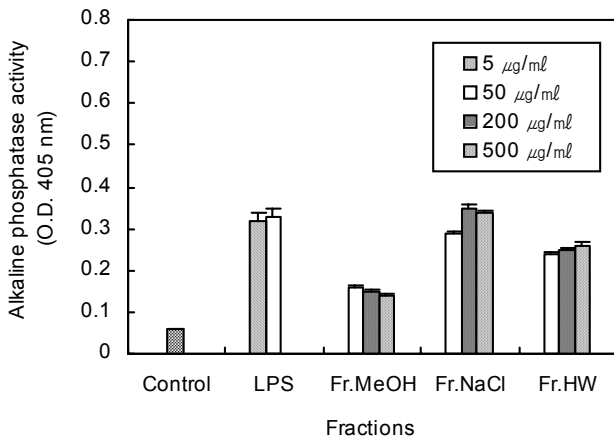


Fig. 4. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows : Alkaline phosphatase activity (ρ -nitrophenol $\mu\text{mol}/1 \times 10^5$ lymphocytes/60 min) $=1.15 \times$ 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 was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

처리한 후 측정된 alkaline phosphatase의 활성이 대조군에 비해 약 3배 높게 나타난 것보다는 높았다. 그러나 저령의 군에서 증성염 용액으로 추출한 조다당류를 위와 같은 농도로 처리했을 때에 나타난 대조군과 LPS의 7배와 6배에 비해서는 낮았다[21]. 따라서 노루궁뎅이를 비롯한 식의약용 버섯에서 추출한 조다당류는 생쥐의 B 임파구 활성을 높이는 데 큰 역할을 하는 것으로 보여 진다.

Cytokine 분비에 미치는 영향

노루궁뎅이의 자실체에서 추출한 조다당류가 세포수준에서 면역에 미치는 영향을 확인하기 위하여 생쥐의 비장 세포가 분비하는 TNF- α 와 IL-2 cytokine의 양을 ELISA assay kit로 측정하였다. 열수로 추출한 조다당류를 10~1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 세포의 경우 TNF- α 활성은 Con A와 LPS가 대조군에 비해 18배와 2.9배로 높게 나타났고, 열수추출 조다당류의 활성은 대조군에 비해 22.5~40.9배로 높게 나타나 Con A와 LPS에 비해 활성이 높았다. IL-2의 활성은 열수로 추출한 조다당류의 경우 10 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 세포는 모두 Con A와 LPS 보다 활성이 높았으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 Con A와 LPS에 비해 활성이 낮았다. 반면 메탄올 추출물은 대조군에 비해서 활성은 높았으나 Con A와 LPS에 비해서는 모든 농도에서 활성이 낮았다(Fig. 5). 송이의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류는 10~1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 범위에서 대조군에 비해서는 높은 TNF- α 활성을 보였으나 양성

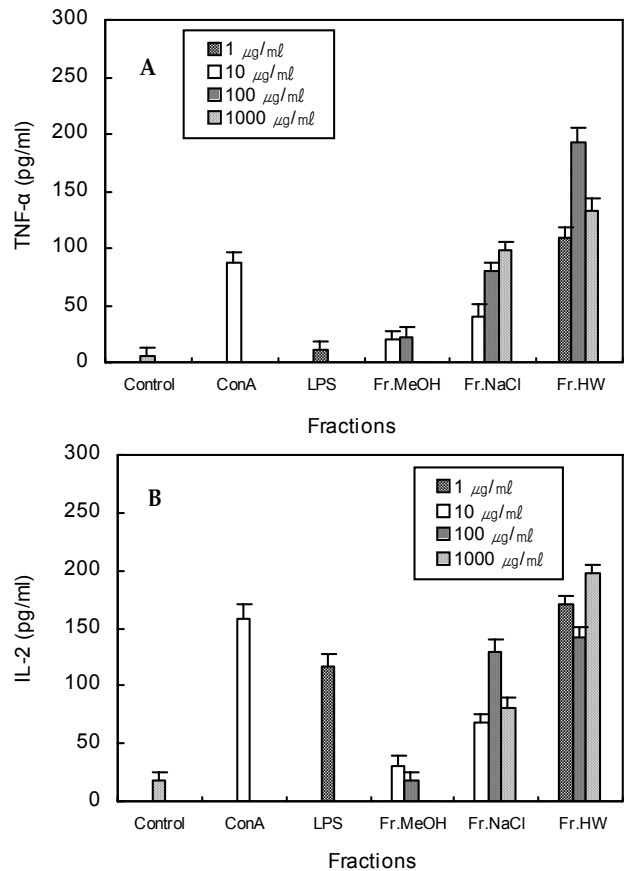


Fig. 5. Effects of fractions extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus* on cytokine (A: TNF- α , B: IL-2) production in splenocytes. Concentration of splenocytes was 1×10^7 cells/ml. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was 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.

대조군인 Con A나 LPS에 비해서는 낮았다. 그러나 증성염 용액이나 열수로 추출한 조다당류는 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 Con A나 LPS에 비해 활성이 높아지는 경향을 보였다[10]. 따라서 노루궁뎅이 조다당류는 TNF- α 와 IL-2를 활성화하여 생쥐에 면역을 증강시킬 수 있어 생쥐의 Sarcoma 180에 대한 항암 능력이 높아진다고 판단된다.

총 복강 세포 수에 미치는 영향

노루궁뎅이에서 추출한 3종류의 조다당류에 대한 복강 세포의 수는 대조군에 비해 열수 추출 조다당류를 50 mg/kg 투여군의 복강세포 수는 4배로 증가하였고, 증성염 용액 추출 조다당류 투여군은 3.6배, 그리고 메탄올 추출 조다당류 투여군은 3배 증가하였다(Fig. 6). 흰목이의 증성염 추출물을 50

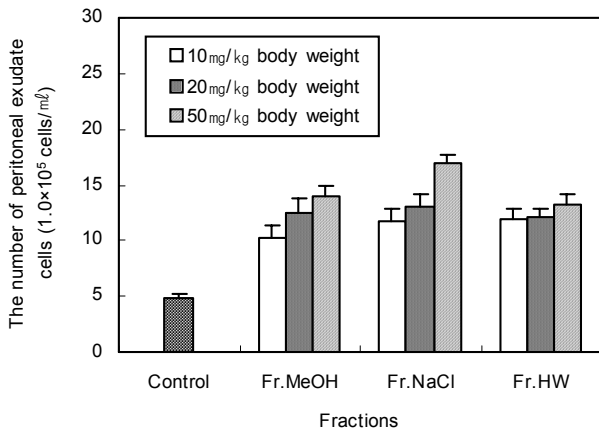


Fig. 6. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus* on the numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW was extracted with hot water.

mg/kg의 농도로 투여한 생쥐의 복강세포 수가 대조군에 비해 7.4배 증가하였고[22] 심 등은 삼색도장버섯의 중성염 용액 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포수가 대조군에 비해 약 10배 증가하였으며[27], 장미무당버섯의 자실체에서 추출한 조다당류가 투여된 생쥐의 복강세포 수는 10~50 mg/kg의 농도에서 1.4~5.6배 증가하였다[6]. 이와 같은 결과는 메탄올과 열수에서 추출한 조다당류가 복강 세포의 수를 증가시키는 효과가 있는 것을 나타낸 것으로 사료된다.

혈액 중 백혈구의 수에 미치는 영향

각각의 조다당류가 면역반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 노루궁뎅이의 자실체에서 추출된 조다당류를 10, 20, 50 mg/kg body weight 농도로 조절하여 생쥐에 투여한 후 혈액 내의 백혈구 수를 조사하였다. 조사결과 혈액 내의 백혈구 수는 대조군 2.35±0.34에 비하여 열수 추출 조다당류 50 mg/kg body weight에서 5.61±0.45로 약 2.4배 증가하였으며, 중성염 용액 추출 조다당류는 대조군에 비해 2.3배의 증가를 나타냈고, 메탄올 추출 조다당류는 1.4배 증가하였다(Table 2). 뽕나무버섯의 자실체에서 중성염 용액으로 추출한 조다당류를 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐 실험군의 백혈구 수는 대조군에 비해 약 2.4배 증가하였고 메탄올과 열수로 추출한 조다당류를 같은 농도로 투여한 생쥐의 백혈구 수는 각각 2배와 1.4배 증가하였다[14]. 또한 뽕나무버섯부치의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류를 50 mg/kg으로 투여한 실험군의 백혈구 수는 대조군에 비해 1.9배 증가하였고 열수로 추출한 조다당류를 동일한 농도로 투여한 실험군의 백혈구 수는 1.4배 증가하였다[16]. 따라서 위의 실험을 통해 노루궁뎅이의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류를 투여한 생쥐의 백혈구

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

| Group ^a | Dose (mg/kg body weight) | No. of mice | No. of leukocytes (×10 ⁶ /ml) |
|--------------------|--------------------------|-------------|--|
| Control | - | 10 | 2.35±0.34 ^b |
| Fr. MeOH | 10 | 10 | 2.35±0.29 |
| Fr. MeOH | 20 | 10 | 2.60±0.38 |
| Fr. MeOH | 50 | 10 | 3.18±0.18 |
| Fr. NaCl | 10 | 10 | 2.55±0.20 |
| Fr. NaCl | 20 | 10 | 3.84±0.03 |
| Fr. NaCl | 50 | 10 | 5.44±0.47 |
| Fr. HW | 10 | 10 | 2.60±0.14 |
| Fr. HW | 20 | 10 | 4.30±0.87 |
| Fr. HW | 50 | 10 | 5.61±0.45 |

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water.

^bMean±S.E.

수가 대조군에 비해 2.4배 증가한 것은 이 버섯의 조다당류가 생쥐의 백혈구 수를 증가시켜 면역을 증가시킬 수 있다는 나타낸 것으로 보여 진다.

면역 장기의 증량에 미치는 영향

노루궁뎅이의 자실체를 메탄올, 중성염, 열수를 이용하여 추출한 조다당류를 투여한 생쥐의 면역 관련 장기인 간, 비장, 흉선의 무게 변화를 조사하였다. 각각의 용매로 추출한 조다당류가 투여된 생쥐의 장기 무게는 생쥐의 체중에 따라 차이가 있어서 상대적인 비교는 어려웠다. 메탄올 추출 조다당류를 투여한 군은 대조군에 비해 체중 대 간의 무게비율이 낮은 것으로 나타났으며 중성염과 열수로 추출한 조다당류를 투여한 군은 대조군에 비해서 무게비율은 다소 높았다. 메탄올 추출 조다당류를 투여한 생쥐의 체중 대 비장의 무게비율이 대조군과 유사하였고, 중성염추출 조다당류는 조금 낮았고, 열수 추출 조다당류는 조금 높았으나 통계적인 유의성은 없었다. 흉선의 경우에는 중성염추출 조다당류의 무게 비율이 대조군에 비해 조금 낮았고, 메탄올과 열수 추출 조다당류는 대조군과 유사하였다(Table 3). 송이의 자실체를 열수로 추출한 조다당류를 10~50 mg/kg 투여한 생쥐 실험에서는 간, 비장, 흉선의 무게는 대조군에 비해 소폭으로 증가하였으나 유의성을 나타내지는 않았다[10]. 또한 장미무당버섯의 자실체에서 추출한 조다당류를 생쥐에 투여한 실험에서도 조다당류가 투여된 생쥐의 간, 비장, 흉선의 무게는 대조군에 비해 소폭 증가한 것으로 보고되었다[6]. 따라서 일반적으로 노루궁뎅이의 자실체에서 각기 다른 용매로 추출한 조다당류를 생쥐에 투여할 경우 면역과 관련된 장기의 무게가 다소 증가되는 경향을 나타내었으나 대조군에 비해서 유의성은 없었다.

Table 3. Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Hericium erinaceus* on the body and immunoorgan weight of ICR mice

| | Group ^a | | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Control | | Fr. MeOH | | Fr. NaCl | | | Fr. HW | | |
| Dose (mg/kg body weight) | - | 10 | 20 | 50 | 10 | 20 | 50 | 10 | 20 | 50 |
| NO. of mice | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Body weight (g) | 32.18±3.73 ^b | 31.72±3.05 | 31.47±0.78 | 33.50±3.39 | 33.15±1.12 | 32.35±2.60 | 30.85±1.02 | 31.85±3.13 | 33.47±2.29 | 33.37±2.29 |
| Liver weight (g) | 1.76±0.26 | 1.75±0.26 | 1.67±0.26 | 1.82±0.20 | 1.95±0.20 | 1.89±0.05 | 1.95±0.10 | 1.82±0.29 | 1.85±0.17 | 1.82±0.45 |
| Liver/Body (%) | 5.51±0.79 | 5.50±0.51 | 5.31±0.80 | 5.45±0.31 | 5.89±0.70 | 5.84±0.34 | 5.50±0.61 | 5.76±1.09 | 5.56±0.79 | 5.44±1.19 |
| Spleen weight (g) | 0.18±0.075 | 0.18±0.05 | 0.18±0.12 | 0.19±0.01 | 0.18±0.06 | 0.18±0.05 | 0.20±0.08 | 0.19±0.05 | 0.20±0.08 | 0.20±0.08 |
| Spleen/Body (%) | 0.57±0.25 | 0.56±0.13 | 0.57±0.16 | 0.58±0.32 | 0.54±0.18 | 0.53±0.14 | 0.53±0.14 | 0.59±0.19 | 0.58±0.20 | 0.60±0.23 |
| Thymus weight(g) | 0.28±0.04 | 0.25±0.05 | 0.27±0.05 | 0.25±0.05 | 0.26±0.00 | 0.25±0.05 | 0.26±0.05 | 0.28±0.05 | 0.29±0.00 | 0.29±0.00 |
| Thymus/Body (%) | 0.88±0.14 | 0.80±0.24 | 0.87±0.15 | 0.74±0.13 | 0.78±0.02 | 0.77±0.17 | 0.80±0.15 | 0.87±0.20 | 0.87±0.03 | 0.86±0.06 |

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water.

^bMean±S.E.

감사의 글

본 연구는 인천대학교 2008년도 자체 연구비지원에 의하여 수행되었습니다.

References

- Allison, D. C. and P. Ridolpho. 1980. Use of a trypan blue assay to measure the deoxyribonucleic acid content and radioactive labeling of viable cells. *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 700-703.
- Arthur, C. and M. D. Guyton. 1986. *Textbook of medical physiology*. 7th eds. W. B. Saunder Company. pp. 51-59.
- Chihara, G., Y. Maeda, G. Hamuro, Y. Arai, and F. Fukuoka. 1969. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* **222**, 687-688.
- Cho, S. M., J. H. Lee, S. B. Han, H. M. Kim, S. H. Yoo, and I. D. Yoo. 1995. Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea* (1)-Characterization of polysaccharides extracted with neutral sodium chloride solution. *Kor. J. Mycol.* **23**, 332-339.
- Cho, S. M., J. H. Lee, S. B. Han, H. M. Kim, S. H. Yoo, and I. D. Yoo. 1995. Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea* (2)-Isolation and characterization of hot-water extracted with polysaccharides. *Kor. J. Mycol.* **23**, 340-347.
- Choi, Y. I., K. W. Lee, H. Hur, W. Y. Lee, and T. S. Lee. 2008. Immuno-potentiating and antitumor effects against mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Russula rosacea*. *Kor. J. Mycol.* **36**, 84-92.
- Deonizot, F. and R. Lang. 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., T. Uematsu, A. Hamada, and S. Akiya. 1975. The polysaccharide from *Lampteromyces Japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 1955-1961.
- Ji, I. H. and M. N. Kim. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 322-330.
- Hur, H., Y. I., Choi, and T. S. Lee. 2008. Antitumor and immuno-potentiating activity against mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake*. *J. Life Sci.* **18**, 1290-1298.
- Jin, M. L. 1996. A study on the activation of immune cell and transcription factor of pine nut mushroom. Ph. D thesis of Seoul National University Graduate School. pp. 1-121.
- Kawakishi, H., A. Shimada, S. Hosokawa, and H. Mori. 1996. Erinacenes, E, F, G, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceus*. *Tetrahedron Lett.* **37**, 7399-7402.
- Kim, B. K., E. K. Park, and M. J. Shim. 1979. Studies on constituents of higher fungi of Korea (XXIV), antineoplastic activities of *Coriolus versicolor* (Fr.). Quel, *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145-149.
- Kim, S. B., K. W. Lee, H. Y. Kim, M. J. Shim, H. S. Rho, H. S. Lee, M. W. Lee, W. Y. Lee, and T. S. Lee. 2006. Inhibitive effect of mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting Body of *Armillaria mellea*. *Kor. J. Mycol.* **34**, 98-104.
- Kim, S. B., K. W. Lee, W. Y. Lee, and T. S. Lee. 2007. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from fruiting Body of *Oudemansiella radicata*. *Kor. J. Mycol.* **35**, 109-114.
- Lee, G. W., H. Y. Kim, W. H. Lee, and T. S. Lee. 2007. Antitumor and immuno-modulatory effect against mouse sarcoma 180 of crude polysaccharides extracted from fruiting Body of *Armillaria tabescens*. *Kor. J. Myco.* **35**, 101-108.
- Lee, G. W., H. Y. Kim, H. Hur, M. W. Lee, M. J. Shim, M. Y. Lee, and T. S. Lee. 2008. Antitumor and immuno-modulatory effect of crude polysaccharides from

- fruiting body of *Tremella aurantialba* against mouse Sarcoma 180. *Kor. J. Mycol.* **36**, 66-74.
18. Lee, K. Y., M. J. Han, S. Y. Park, and D. H. Kim. 2000. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 477-480.
 19. Mizno, T. 1992. Antitumor active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceus*, an edible and medicinal mushroom called yamabushitake or houtou. *Biosci. Biochem.* **56**, 347-348
 20. Mossman, B. T. 1983. *In vitro* approaches for determining mechanism of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts. *Environ. Health Perspect.* **53**, 155-161.
 21. Oh, Y. H., W. Y. Lee, M. W. Lee, M. J. Shim, and T. S. Lee. 2004. Immuno-modulatory and antitumor effect of crude polysaccharides extracted from sclerotium of *Grifola umbellata*. *Kor. J. Mycol.* **32**, 23-30.
 22. Oh, Y. H., S. B. Kim, K. W. Lee, H. Y. Kim, M. J. Shim, H. S. Rho, H. S. Lee, M. W. Lee, W. Y. Lee, and T. S. Lee. 2006. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis*. *Kor. J. Mycol.* **34**, 105-111.
 23. Ohno, N., Y. Arai, I. Suzuki, and T. Yadomae. 1986. Induction of alkaline phosphatase activity in murine spleen cells treated with various mitogens. *J. Pharmacobio-Dyn.* **9**, 593-599.
 24. Park, W. H. and H. D. Lee. 2002. Mushrooms in Korea. Kyohak publishing Co., Ltd., Seoul.
 25. Shim, M. J. 1980. Stimulating effects of *Coriolus versicolor* constituents on immune response. *Kor. J. Mycol.* **8**, 115-116
 26. Shim, S. M., K. H. Im, W. Y. Lee, J. W. Kim, M. J. Shim, M. W. Lee, and T. S. Lee. 2003. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. *Kor. J. Mycol.* **31**, 155-160.
 27. Shim, S. M., K. W. Im, J. W. Kim, W. Y. Lee, H. W. Kim, M. W. Lee, and T. S. Lee. 2003. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Daedaleopsis tricolor*. *Kor. J. Mycol.* **31**, 161-167.
 28. Ying, J. Z., X. L. Mao, Q. M. Ma, Y. C. Zong, and H. A. Wen. 1987. Icons of medical fungi from China. Science Press, Beijing, China.

초록 : 노루궁뎅이(*Hericium erinaceus*) 자실체 추출 조다당류의 생쥐 Sarcoma 180에 대한 면역증강 및 항암 효과

최연일 · 이재성 · 이우윤 · 이태수*
(인천대학교 생물학과)

노루궁뎅이는 담자균문, 민주름버섯목, 산호침버섯과에 속하는 식의약용버섯으로 예로부터 위궤양이나 위암의 치료에 효과가 있으며 생쥐의 Sarcoma 180과 Ehrlich Sarcoma에도 효과가 있다고 알려져 왔다. 노루궁뎅이의 자실체로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올 등을 이용하여 조다당류를 추출하고 ICR mice에 주사하여 항암 및 면역증강 효과를 조사하였다. Sarcoma 180, HepG2, HT-29, NIH3T3 등의 세포에 대한 세포독성을 조사한 결과 10~2,000 µg/ml의 조다당류 농도에서 각각의 암세포는 세포독성을 거의 나타내지 않았다. Sarcoma 180으로 접종된 ICR mouse에 자실체에서 추출한 각각의 조다당류를 투여한 실험군은 대조군에 비해 수명이 각각 29.1~54.1% 연장되었다. 노루궁뎅이 자실체를 중성염 용액으로 추출한 조다당류는 50 µg/ml의 농도에서 비장세포의 수를 2.9배 증가시켰으며 또한 중성염 추출 조다당류를 200 µg/ml의 농도로 투여한 실험군 생쥐의 B 임파구 alkaline phosphatase의 활성은 대조군에 비해 5.5배의 증가하였다. 중성염 용액 추출 조다당류를 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 실험군 생쥐의 총 복강 세포 수와 백혈구의 수는 대조군에 비하여 각각 4배와 2.3배로 증가하였다. 또한 면역 관련 장기인 간, 비장 및 흉선의 체중에 대한 무게 비율은 대조군에 비하여 유의성을 보이지 않았다. 따라서 노루궁뎅이의 자실체에서 추출한 조다당류는 생쥐의 면역을 증강시키고 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암효과를 나타내었다.