

In vivo Antitumor Activity and Acute, Subacute Toxicity of Keumrsa (*Phellinus linteus*) Extracts

Jong-Myeung Kim¹, Jun-Duck Park², Dong-Chan Park² and Byung-Oh Kim^{1*}

¹Department of Applied Biology, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

²Keumrsa Mush & Farm, Yeosu 469-832, Korea

Received September 16, 2013 / Revised October 24, 2013 / Accepted October 31, 2013

This study used an S-180 cell-injected mouse model to evaluate the antitumor effects of the acute and subacute toxicity of Keumrsa (*Phellinus linteus*) extract intravenously administrated in ICR mice. When administered intravenously (31.3-250 mg/kg body weight), Keumrsa (*Phellinus linteus*) extract significantly inhibited the growth of the solid tumor cell. The antitumor activity of Keumrsa (*Phellinus linteus*) extract increased in a dose-dependent manner. The highest dose (250 mg/kg body weight) was highly effective, reducing tumor formation by 42.7% compared with the control group. In the acute toxicity test, LD₅₀ of the Keumrsa (*Phellinus linteus*) extract showed 632.84 mg/kg (♂) and 814.48 mg/kg (♀) after intravenous administration. In addition, liver and spleen weight were increased in a dose-dependent manner. In the subacute toxicity test, the mice were intravenously administered over the course of 28 days. The LD₅₀ of the Keumrsa (*Phellinus linteus*) extract showed 355.41 mg/kg (♂) and 383.53 mg/kg (♀) after intravenous administration. The liver and spleen weight also increased in a dose-dependent manner. In the case of the group that received more than 125 mg/kg of intravenous administration, exercise capacity, such as jumping ability and agility, were significantly increased. These results suggest that Keumrsa (*Phellinus linteus*) extract can be regarded as a potent enhancer of the innate immune response, and it can be considered as a new natural product with low toxicity that may be used as a candidate for antitumor action.

Key words : Antitumor, S-180, Keumrsa, *Phellinus linteus*, acute toxicity, subacute toxicity, intravenously

서 론

전 세계적으로 과도한 육류 섭취, 운동부족, 환경오염과 과도한 스트레스에 의한 암의 유행과 암으로 인한 사망률은 증가하고 있으나[10], 다행히 현대 의학의 발달로 인해 이러한 암은 조기 발견과 치료는 획기적인 발전을 가져왔다. 그러나 현대 의학의 암 치료 방법은 수술, 항암제, 방사선 치료에 국한되며, 현재 사용되는 대부분의 항암제는 정상세포와 암세포를 구분할 수 있는 능력이 없다는 것이 문제점이다. 암 치료 방법이 진보되고 있으나 특이적으로 암세포만을 공격하는 기술은 아직 부족한 상태이다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 전 세계적으로 30~75% 정도의 암환자들이 식이요법과 한방 등에 기초한 대체의학을 선택하고 있다[8].

버섯 유래의 천연물질의 항암 활성의 주된 작용은 숙주의 면역 반응을 활성화 시키는 작용을 한다. 1968년 표고버섯으

로부터 S-180 암세포에 저해 물질이 발견된 이후 다양한 버섯으로부터 많은 수의 항암 물질이 분리 되었다[28]. 이중 상황버섯 *Phellinus linteus* (PL)은 일본, 중국 한국 등에서 전통적으로 사용되어 온 한약재이며[15], 오래 전부터 건강증진을 위한 식이요법과 바이러스와 세균 감염을 치료하기 위하여 복용되어 왔다. 상황버섯의 종류는 세계적으로 280종이며, 국내에는 약 53종이 분포하는 것으로 알려져 있으며[21], 13.2%의 펙타이드와 82.5%의 탄수화물로 이루어져 있으며, 이중 6.8%의 탄수화물은 uronic acid이다. 분자량은 약 153 kDa이며, 당 성분은 Ara (7.5%), Xyl (3.7%), Glc (21.1%), Gal (24.1%) 그리고 Man (44.2%)이고, 10개의 주요 아미노산으로 구성되며, 주요 아미노산은 Asp와 Glu로 구성되어 있다[25]. 상황 버섯 균사체의 열수 추출물은 *in vitro*상에서 항체의 생산을 촉진시키며, INF- γ 사이토카인을 유도하여 Th-1을 활성화 시켜 면역을 증진시키며, 항염증, 항알러지, 항산화 등의 효과가 알려져 있다[21]. 특히 상황버섯 추출물은 직접적으로 암세포를 공격하지 않고 숙주의 면역세포를 활성화시키거나 암세포의 apoptosis를 유도하여 암세포를 제거한다고 알려져 있으므로[3, 5, 7, 11] 상황버섯 추출물은 독성이 없는 천연의 면역요법으로 알려져 있다[12]. 그러나 상황버섯 균사체 추출물의 경구 투여에 대한 연구는 많이 진행되었으나, 경구 투여 시 발생하는 단점인 위나 소화 기관에서 파괴되거나 흡수되지 못하는 점을 극복하기

*Corresponding author

Tel : +82-54-530-1216, Fax : +82-54-530-1218

E-mail : kimb@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

위한 정맥 주사를 통한 약효 평가에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이다.

따라서 본 연구는 인공 재배법으로 대량 생산이 가능한 금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 주사용 항암제로의 개발을 위하여 mouse sarcoma cells인 S-180세포에 대한 생체 내 항암 활성과 마우스에 대한 급성독성 및 아 급성 독성을 보고함으로써 천연물 신약의 후보물질로서의 가능성을 제안하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

시험약물

실험에 사용된 금사목질진흙버섯 자실체 추출물은 3~4년 생 건조 상황버섯을 분쇄하여 110°C에서 96~100 시간 열수로 추출하여 조제 하였다. Positive control로 사용된 doxorubicin (adriamycin, ADR)은 Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용직전 멸균된 saline에 용해시켜 사용하였으며, Negative control로는 saline을 사용하였다.

Mouse sarcoma cells

Mouse sarcoma cells는 S-180 세포 주를 한국 세포 주 은행 으로부터 분양 받아 RPMI 1640 (Sigma, USA) 배지에 10% fetal bovineserum (Gibco, USA)과 penicillin-streptomycin (100 unit/ml, 100 µg/µl)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 계대 배양하며 사용하였다.

사용 동물 및 사육환경

실험에 사용된 동물은 썬타코(주)(Seoul, Korea)에서 공급 받은 4~5주령의 수컷 ICR 마우스(30±1 g)를 사용하였다. 공급 받은 마우스는 마우스용 케이지(220×200×145 mm)에서 1주일 간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 실험실의 사육 환경 은 온도 22±2°C, 상대습도 55±5%, 조명주기 12 시간, 조도 200 lux로 조절하여 사육하였다. 급이 사료는 pellet형 고품사료인 Purina Rat Chow를 Nestle Purina Pet Care Korea Ltd. (Seoul, Korea)로부터 공급받아 자유롭게 섭취할 수 있도록 급이 하였으며, 음수도 멸균 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 S-180 암종에 대한 *in vivo* 항암효과

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 S-180 암종에 대한 *in vivo* 항암효과는 썬타코(Seoul, Korea)로부터 분양 받아 순화 시킨 웅성의 ICR 마우스를 각 투여군 당 10 마리씩 분리하여 mouse sarcoma cells인 S-180 세포를 사용하여 마우스 당 1×10⁷ cell씩 피하로 서혜부에 이식 후 약물을 투여하여 약효를

측정 하였다. 암 세포 이식 후 24시간부터 음성 대조군은 0.9% 생리식염수를, 양성 대조군에는 2 mg/kg doxorubicin (adriamycin, ADR)을 투여 하였으며, 실험 군에는 금사목질진 흙버섯 자실체 추출물을 각각 31.3 mg/kg, 62.5 mg/kg, 125 mg/kg, 250 mg/kg의 농도로 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 일에 체중 kg당 10 ml의 용량으로 정맥 주사하고, 14 일째 체중 측정 후 부검하여 종양의 무게를 측정하여 항암 효과를 측정하였다.

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 급성독성 시험

Mouse 시험 군을 암 수 각 6군으로 나누어 각 군당 5마리씩 분리하였다. 각 시험물질은 Saline에 녹인 후 꼬리 정맥을 통하여 125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg, 750 mg/kg, 1,000 mg/kg의 농도로 단회 투여 하였으며, 음성 대조군은 saline을 투여 하였다. 이때 최대 투여 량은 체중 kg당 10 ml를 넘지 않게 서서히 투여 하였으며, 일주일간 사육하면서 임상적 증상, 체중 변화, 사망률 그리고 최종 실험 완료 후 부검하여 내부 장기를 관찰하였다.

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 아 급성독성 시험

Mouse 시험 군을 암 수 각 5 군으로 나누어 각 군당 5 마리 씩 분리하였다. 각 시험물질은 Saline에 녹인 후 꼬리 정맥을 통하여 31.3 mg/kg, 62.5 mg/kg, 125 mg/kg, 250 mg/kg의 농도로 2 일 간격으로 1 회씩 4 주간 투여 하였으며, 음성 대조 군은 saline을 투여 하였다. 각 군은 투여 직 후 임상적 증상, 사망률 그리고 최종 실험 완료 후 부검하여 내부 장기를 관찰 하였으며, 체중은 2 일 간격으로 투여 전 측정하여 최대 투여 량이 체중 kg당 10 ml를 넘지 않게 서서히 투여하였다.

통계학적 처리

체중, 장기, 암세포의 무게는 SPSS프로그램의 ANOVA에서 LSD (significance difference) 사후검증 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의 차가 $p < 0.1$ 일 때 통계 적 유의성을 인정하였다. LD₅₀ 값은 SPSS 프로그램의 probit 분석방법을 이용하였다.

결과 및 고찰

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 S-180 암종에 대한 *in vivo* 항암효과

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 정맥 투여 항암 활성을 측정하기 위하여 mouse sarcoma cells (S-180) 이식 후 금사목 질진흙버섯 자실체 추출물을 2 일 간격으로 13 일간 투여하면 서 체중의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. Saline을 투여 한 음성 대조군의 체중은 30.5±1.61 g에서 32.5±1.9 g으로 지속적으로 증가하였으며, 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 투여 군에서도 31.3 mg/kg은 31.0±2.7 g에서 32.8±1.8 g으로, 62.5

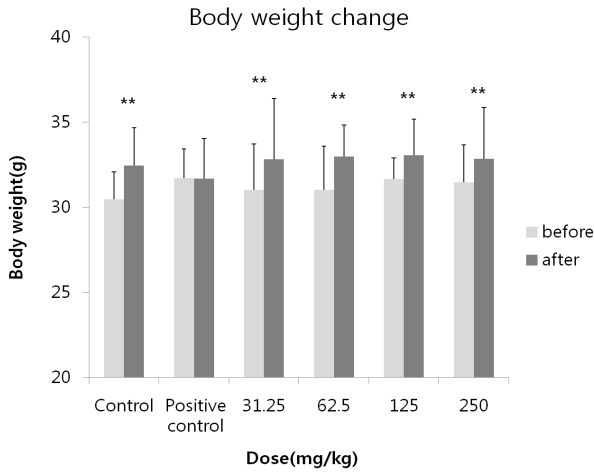


Fig. 1. Body weight changes in the S-180 cell implanted ICR mice intravenous treated with Keumsa *Phellinus linteus*. Data were analyzed by ANOVA with LSD. As compared with before (**: $p < 0.05$).

mg/kg에서는 31.0±2.6 g에서 33.0±2.0 g으로, 125 mg/kg은 31.7±1.3 g에서 33.1±1.4 g으로, 250 mg/kg에서는 31.5±2.2 g에서 32.8±1.4 g으로 증가하여, 대조군과 비교하여 유의성 있게 증가하는 경향을 나타내었다(n=10, $p < 0.05$). 그러나, 양성 대조군인 2 mg/kg doxorubicin (adriamycin, ADR) 투여군에서는 31.7±1.7 g에서 31.7±2.3 g으로 실험 기간 동안 체중의 변화가 거의 생기지 않거나 조금 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 양성 대조약물로 사용된 doxorubicin (adriamycin)은 anthracycline glycosidic 계열의 항암제로서 약 30년 이상 유방암, 림프 종, 골육종, 상피암종, 흑색 종과 다른 육종에 사용되어져 온 항암제이나[24], topoisomerase II에 의해 매개되는 단일가닥 DNA와 이중가닥 DNA의 파괴를[27] 비특이적으로 유도하여 식용부진, 위통, 탈모, 메쓰거움, 구토, 간 독성, 급성부정맥, 심장 독성 등의 심각한 독성의 원인이 되어 사용에 제한이 된다는 결과와 일치하였다[1, 16]. 그러나 금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 정맥 투여군은 체중 변화에 있어 음성 대조군과 비교하여 특이한 차이점을 나타내지 않는 것으로 사료되어 투여 농도에서 특이한 독성의 징후를 찾을 수 없었다. Mouse sarcoma cells에 대한 각 시험 물질의 항암효과는 실험이 종료된 후 도살하여 암세포를 적출하여 전자저울에서 암세포의 무게를 측정하여 음성 대조군인 saline 투여군의 암세포 무게를 100%로 기준하여 확인 하였다. Saline을 투여한 음성 대조군의 암세포의 무게는 0.21±0.07 g이었으나, 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 31.25 mg/kg 투여군은 0.17±0.04 g, 62.5 mg/kg 투여군은 0.12±0.04 g, 125 mg/kg 투여군은 0.11±0.04 g, 특히 250 mg/kg의 투여군에서는 0.09±0.03 g으로 나타나 음성 대조군 대비 77.8%, 56.8%, 54.5%와 42.7%로 유의성 있는 약효를 나타내었다(n=10, $p < 0.05$). 양성 대조군인 doxorubicin 2 mg/kg은 0.17±0.04 g의

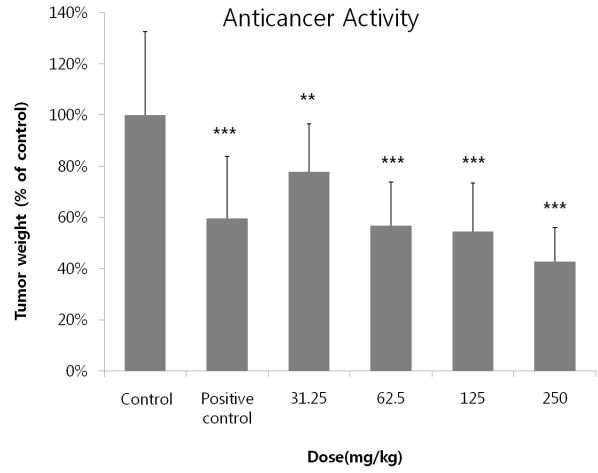


Fig. 2. The change of cancer weight in the S-180 cell implanted ICR mice intravenously treated with Keumsa *Phellinus linteus*. Data were analyzed by ANOVA with LSD. As compared with negative control (**: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$)

무게로 음성 대조군 대비 59.6%의 약효를 나타내었다(n=10, $p < 0.01$)(Fig. 2). 이전의 연구에서 Yang 등은 대장암 세포 주 CT-26에 금사목질진흙버섯 자실체 추출물을 경구 투여 하였을 때 macrophage lysosomal enzyme 활성화에 의해 1,000 mg/kg에서 대조군 대비 74%의 약효를 나타내었다고 보고 하였으며[28], Eom 등은 금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 경구 복용이 NK세포의 수적인 증가를 유도하지는 않지만 INF- γ 및 TNF- α 등의 다양한 cytokine이 분비되면서 이들의 상호작용에 의해 NK 세포를 활성화 시켜 면역 활성을 증가시켜 암세포를 공격한다고 보고하였다[9]. 그러나 Yang과 Eom의 보고는 항암제로서의 활성은 미흡하였다. 본 실험의 결과는 금사목질진흙버섯 자실체 추출물이 mouse sarcoma cells인 S-180 이식 후 암세포의 무게가 음성 대조군 대비 31.25 mg/kg 투여군에서 77.8%, 250 mg/kg의 투여군에서는 42.7%로 훨씬 낮은 농도에서 보다 높은 약효를 나타내었으며, 특히 62.5 mg/kg 투여군에서는 양성 대조군인 Doxorubicin 2 mg/kg 투여군의 59.6%와 유사한 56.8%의 암세포 무게를 나타내었다. 이상의 결과는 Yang과 Eom 등의 보고와 같이 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 투여 시 INF- γ 및 TNF- α 등의 다양한 cytokine이 분비되어 NK 세포를 활성화 시켜 발생하는 항암효과는 경구 투여 시 위나 소화 기관에서 파괴되거나 흡수되지 못하여 정맥 투여 보다 면역 세포 활성화를 저해하는 요인으로 작용하여 항암 효과가 떨어지는 것으로 추측되었다.

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 급성독성 시험

투여 후 경과 일자 별 사망률 및 LD₅₀

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 급성 독성을 측정하기 위하여 금사목질진흙버섯 자실체 추출물을 투여 후 7 일간

없었으나, 250, 500, 750 mg/kg 투여군에서는 암 수 모두 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 50% 정도의 체중 증가 량 감소 현상이 관찰되었다(Table 2).

임상증상

음성 대조군(saline)은 투여 직 후부터 시험 종료 시까지 아무런 임상증상도 나타내지 않았으며, 정상적인 체중 증가 경향을 보였다. 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 1,000 mg/kg 투여군은 투여 직 후 암, 수 모든 동물이 신경학적 증상을 동반하면서 사망하였으며, 750 mg/kg 투여군은 수컷 동물에서는 투여 후 즉각적인 신경학적 증상이 관찰 되었으며 이 중 2 마리는 즉각 사망하였으며, 3 마리는 20여분 후 회복되어 실험 종료 시까지 생존하였다. 암컷 동물도 마찬가지로 신경학적 증상이 관찰 되어, 1 마리는 즉각 사망하였으나, 4 마리는 회복되어 실험 종료 시까지 생존 하였다. 500 mg/kg 투여군에서도 수컷 동물은 투여 후 행동 둔화 현상과 뒷 다리 마비 증상 후 투여 5 시간부터 48 시간 내에 3 마리가 사망하였으며, 나머지 2 마리는 회복하였다. 암컷 동물군에서는 투여 후 뒷 다리 마비와 행동둔화 증상이 나타났으나 모두 회복 되었다. 250 mg/kg 투여군에서는 투여 직후 약한 신경 학적 증상이 나타났으나, 수 분 내에 회복 되었으며, 125 mg/kg 투여군에서는 특이한 증상이 나타나지 않았다.

육안적 부검 소견

대조군(saline)은 투여 후 8 일째에 부검하였는 바 아무런 육안적 이상 소견을 관찰 할 수 없었다. 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 투여군은 전체 용량 투여군에서는 육안적으로 별다른 이상 소견이 관찰되지 않았으나, 특정 장기 특히, 이자와 간에서 체중 대비 장기 무게 %가 증가현상이 나타났다. 이자의 경우 대조군과 비교하여 수컷에서는 750 mg/kg 투여군에서 유의성 있는 증가 현상이 나타났으며($p < 0.05$), 암컷에서는 250 mg/kg 이상의 투여군에서 유의성 있는($p < 0.1$) 증가 현상이 나타났다. 간의 체중 대비 장기 무게%는 수컷의 경우 125 mg/kg 이상의 투여군에서 유의성 있는 증가 현상이 나타났으며, 암컷의 경우는 250 mg/kg 이상의 투여군에서 유의성 있는 증가 현상이 나타났다($p < 0.1$)(Fig. 3). 그러나 심장, 신장 및 허파 등의 장기에서는 특별한 이상 증상이 나타나지 않았다(data not shown). 이러한 현상은 Eom 등의 보고에서처럼 금사목질진흙버섯 자실체 추출물이 면역 세포에 영향을 끼쳐 이자의 크기가 증가한 것으로 보여지며, 간 세포에도 영향을 미치는 것으로 추측되었다.

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 아 급성독성 시험

투여 후 경과 일자 별 사망례 및 LD₅₀

대조군인 saline 투여군과 금사목질진흙버섯 자실체 추출 물을 2 일 간격으로 28 일간 투여하면서 관찰한 결과 62.5,

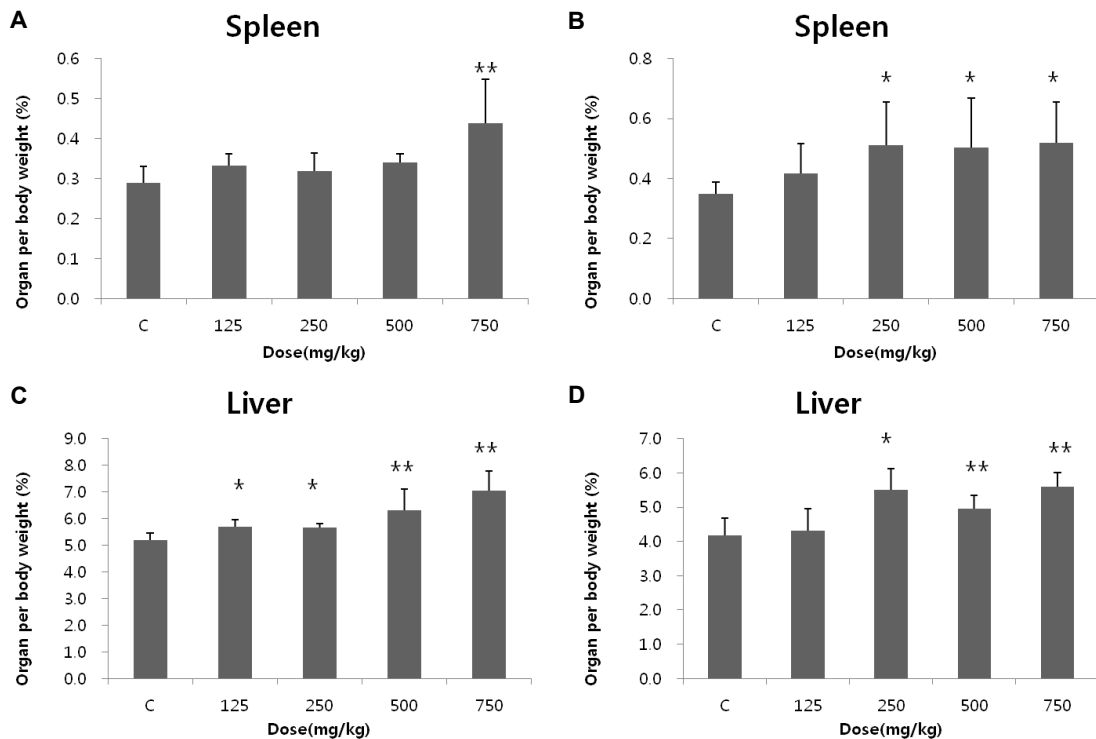


Fig. 3. Organ weight per body weight (%) in ICR mice after single intravenously treated with Keumsa *Phellinus linteus*. Data were analyzed by ANOVA with LSD. As compared with control (*: $p < 0.1$, **: $p < 0.05$). (A) Male spleen, (B) Female spleen, (C) Male liver, (D) Female liver.

Table 3. Survivals in mouse intravenously treated with Keumsa *Phellinus linteus*

Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment						Final survivals	LD ₅₀ (mg/kg)
		0	1	7	14	21	28		
Male	250	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	355 (250~544)
	125	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	
	62.5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
	31.3	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
	Control*	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
Female	250	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	384 (270~557)
	125	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
	62.5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
	31.3	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
	Control*	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	

31.25 mg/kg 투여군에서는 사망 동물이 나타나지 않았으며, 금사린테우산 추출물 250 mg/kg 투여군에서는 13 일차에서 수컷 1 마리, 암컷 1 마리 사망하였으며, 125 mg/kg 투여군에서는 9 일차에서 수컷 1 마리가 사망하여 250 mg/kg 투여군 사망률이 암컷 20%, 수컷 20% 이었으며, 500 mg/kg, 투여군은 수컷에서만 20%의 사망률을 나타내어 LD₅₀치가 수컷 마우스는 355.41 mg/kg, 암컷 마우스는 383.53 mg/kg으로 급성 독성의 결과와 마찬가지로 암컷 보다 수컷의 LD₅₀치가 낮게

나타났다(Table 3).

투여 후 체중 변화

음성 대조 Saline 투여군과 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 31.25, 62.5 mg/kg 투여군은 암, 수 모두에서 대조군에 비해 유의성 있는 체중 변화가 관찰되지 않았으며, 4 주간 꾸준히 증가하는 경향을 나타내었으며, 체중 증가 량도 유사하거나 오히려 증가 량이 높은 결과를 보였다. 그러나 125와 250

Table 4. Body weight in ICR mice intravenous treated with Keumsa *Phellinus linteus*

Sex	Dosage (mg/kg)		Days after treatment					
			0	1	7	14	21	28
Male	250	Mean	28.1	28.7	29.8	31.2	31.8	31.2
		SD	0.85	1.4	1.17	1.15	1.46	0.52
		N	5	5	4	4	4	4
	125	Mean	29	29.5	31.1	33.4	34	32.1
		SD	1.49	2.31	2.14	2.34	2.59	1.61
		N	5	5	4	4	4	4
	62.5	Mean	27.3	28.2	29.8	31.6	32.4	33.2
		SD	1.36	1.52	1.57	1.66	1.56	1.81
		N	5	5	5	5	5	5
	31.3	Mean	28.8	29.9	31.9	32.7	33.4	33.7
		SD	2.14	2.31	3.58	3.04	2.84	3.3
		N	5	5	5	5	5	5
	C	Mean	28.4	29.2	30.1	31.8	32.4	33.8
		SD	2.24	2.44	2.76	2.68	3.16	3.02
		N	5	5	5	5	5	5
Female	250	Mean	24.4	24.8	25	25.7	26.4	25.9
		SD	1.83	1.47	2.35	2.2	2.54	2.4
		N	5	5	4	4	4	4
	125	Mean	25.4	26	25.1	26	26.6	26.7
		SD	1.64	1.9	1.34	1.96	2.32	2.26
		N	5	5	5	5	5	5
	62.5	Mean	23.7	25	24.8	25.4	26.5	26.7
		SD	1.41	1.4	1.19	1.18	1.44	1.98
		N	5	5	5	5	5	5
	31.3	Mean	24.6	25.5	25.7	26.6	26.8	26.8
		SD	1.49	0.93	0.86	1.74	0.99	0.92
		N	5	5	5	5	5	5
	C	Mean	24.1	24.9	24.3	24.7	25.7	26.1
		SD	1.75	1.69	1.92	1.78	1.8	1.84
		N	5	5	5	5	5	5

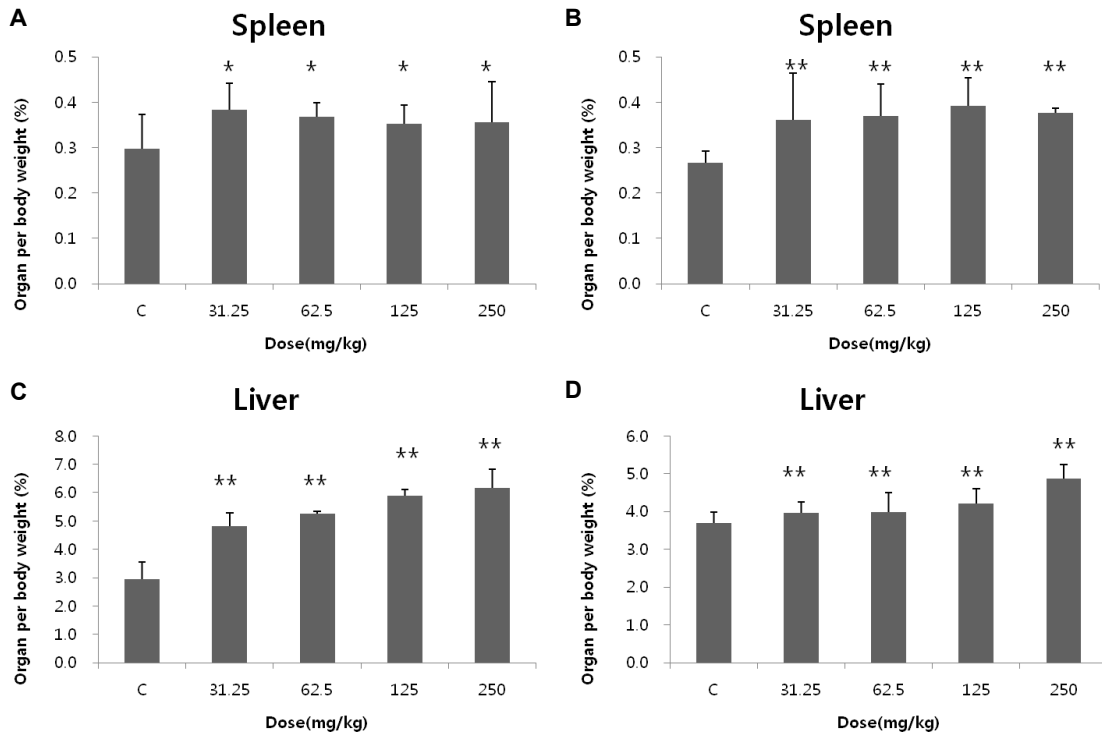


Fig. 4. Organ weight per body weight (%) in ICR mice intravenous treated with Keumsa *Phellinus linteus* during for 28 days. Data were analyzed by ANOVA with LSD. As compared with control (*: $p < 0.1$, **: $p < 0.05$). (A) Male spleen, (B) Female spleen, (C) Male liver, (D) Female liver.

mg/kg 투여군에서는 수컷의 경우 3주 이후 체중 감소 현상이 나타났으며, 체중 증가 량도 60% 정도 수준에 머물렀으며, 암컷의 경우에는 250 mg/kg의 농도에서만 감소 현상이 일어났으며, 체중 증가 량은 약 70% 정도 수준이었다(Table 4).

임상증상

음성 대조군(Saline)은 투여 직 후부터 시험 종료 시까지 아무런 임상 증상도 나타내지 않았으며, 정상적인 체중 증가 경향을 보였다. 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 250 mg/kg 투여군에서는 암, 수 동물에서 색소 침착으로 인한 고리의 색 변화가 있었으며, 운동 능력의 향상이 관찰되었다. 125 mg/kg 투여군에서는 암, 수 동물 모두 꼬리의 약한 색소 침착 현상이 나타났으며, 점프, 민첩한 행동 등의 운동 능력이 향상되었다. 62.5와 31.25 mg/kg 투여군에서는 특이한 임상 증상이 나타나지 않았다.

육안적 부검 소견

음성 대조군(Saline)은 4 주간 투여 후 29 일째에 부검하였는바 아무런 육안적 이상 소견을 관찰 할 수 없었다. 금사목질진흙버섯 자실체 추출물이 투여된 모든 군은 대조군과 비교하여 이자의 체중 대비 장기 무게 %가 암 수 동물 모두에서 유의성 있게($p < 0.1$) 20~30% 정도의 증가 현상이 나타났으며, 간의 체중 대비 장기 무게%는 농도에 따라 유의성 있게($p < 0.05$) 증

가하였으며, 125 mg/kg 이하 투여군에서는 육안적으로 특별한 이상 증상은 관찰되지 않으나(Fig. 4), 250 mg/kg 투여군에서는 수컷의 경우 무게 비가 약 2 배 이상 증가하는 현상이 관찰되었으며, 간의 조직에 황색 반점이 관찰되었다. 심장, 신장, 허파 등의 장기에서는 특별한 변화를 관찰 할 수 없었다 (data not shown).

이상의 결과를 종합하면 Yang과 Eom 등의 보고와 같이 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 투여 시 INF- γ 및 TNF- α 등의 다양한 cytokine이 분비되어 NK 세포를 활성화 시켜 발생하는 항암효과는 경구 투여 시 위나 소화 기관에서 파괴되거나 흡수되지 못하여 정맥 투여 보다 면역 세포 활성화를 저해하는 요인으로 작용하여 항암 효과가 떨어지는 것으로 추측되었으며, 금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 정맥 단 회 투여 급성 독성 실험 시 250 mg/kg 이상의 농도에서 체중 감소현상이 나타났으며, 간과 이자의 체중대비 무게 %가 증가하는 현상이 관찰되어 간세포와 면역세포에 영향을 미치는 것으로 추정 되었으며, ICR 마우스에 대한 급성독성 LD₅₀치는 수컷 마우스는 632.84 mg/kg, 암컷 마우스는 814.48 mg/kg으로 나타났다.

금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 ICR 마우스에 대한 4주간 투여 아 급성 독성의 LD₅₀치는 수컷 355.41 mg/kg, 암컷 383.53 mg/kg으로 암컷 보다 수컷에 더 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 체중 변화는 125와 250 mg/kg에서 약간의 체중

증가 감소 현상이 관찰되어 독성이 나타나는 것으로 추정되었다. 체중 대비 장기 무게 %에서는 금사목질진흙버섯 자실체 추출물 투여군 전체에서 유의성 있게 간의 크기가 증가하며, 특히 250 mg/kg 투여군에서는 간의 조직에 반점 등의 이상이 관찰되어 간 독성이 있을 것으로 추정되었다. 이자의 크기도 전체 투여군에서 유의성 있게 증대되는 현상으로 보아 Eom 등의 보고와 같이 다양한 cytokine 분비를 촉진하여 면역 증대 현상의 결과로 추정되었다. 특히 임상적으로 125 mg/kg 이상 투여군에서 점프 능력과 민첩성 등의 운동 능력이 현저히 증가되는 현상이 관찰되었으며, 이에 대한 정확한 메카니즘은 확인할 수 없었으나, 흥미로운 결과를 나타내었다. 이상의 결과를 바탕으로 금사목질진흙버섯 자실체 추출물에 대한 표준물질 정제 과정을 통한 작용기전과 운동능력 향상에 대한 실험 등이 추가된다면 유효농도에서 독성이 낮으면서도 암을 제어할 수 있는 새로운 천연물 신약의 후보 물질로 이용될 가능성이 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 경북대학교 학술연구비지원사업과 금사 머쉬엔 팜 연구비 지원에 의해 경북대학교 동물실험윤리위원회 승인번호 2013-0012호에 준하여 실험 하였습니다.

References

- Bergh, J., Jönsson, P. E., Glimelius, B., Nygren, P. and SBU-group. Swedish council of technology assessment in health care. 2001. A systematic overview of chemotherapy effects in breast cancer. *Acta Oncol* **40**, 253-281.
- Chen, Y., Yang, W., Chang, B., Hu, H., Fang, X. and Sha, X. 2013. *In vivo* distribution and antitumor activity of doxorubicin-loaded N-isopropyl acrylamide-co-methacrylic acid coated mesoporous silica nanoparticles and safety evaluation. *Eur J Pharm Biopharm Online In press* **29 June**.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. *Nature* **222**, 687-688.
- Cho, J. H., Kim, H. K., Baik, S. O., Choi, S. Y. and Lee, J. Y. 2011. Single- and repeated-dose toxicities of aloe fermentation products in rats. *Lab Anim Res* **27**, 235-244.
- Chung, E. J., Lee, B. J. and Chung, M. H. 1993. Effect of cynanchi wilfordii radix extract on the acute toxicity in mice and subacute toxicity in rats. *Korean J Pharmacogn* **24**, 166-176.
- Chung, K. S., Choi, E. C., Kim, B. K., Kim, Y. S. and Park, Y. K. 1982. The constituents and culture of Korean Basidiomycetes: antitumor polysaccharides from the cultured mycelia of some Basidiomycetes. *Arch Pharm Res* **5**, 17-20.
- Collins, L., Zhu, T., Guo, J., Xiao, Z. J. and Chen, C. Y. 2006. *Phellinus linteus* sensitizes apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *Br J Cancer* **95**, 282-288.
- Daniel, S. 2010. Medicinal mushroom *Phellinus linteus* as an alternative cancer therapy (Review). *Exp Ther Med* **1**, 407-411.
- Eom, S. Y., Zhang, Y. W., Kim, N. S., Kang, J. W., Hahn, Y. S., Shin, K. S., Song, H. G., Park, S. Y., Kim, J. S., Kim, H. and Kim, Y. D. 2006. Effects of Keumsa Sanghang (*Phellinus linteus*) Mushroom extracts on the natural killer cell activity in human. *Korean J Food Sci Technol* **38**, 717-719.
- Feron, E. R. 1997. Human cancer syndromes. Cues to the origin and nature of cancer. *Science* **278**, 1043-1050.
- Guo, J., Zhu, T., Collins, L., Xiao, Z. J., Kim, S. H. and Chen, C. Y. 2007. Modulation of lung cancer growth arrest and apoptosis by *Phellinus linteus*. *Mol Carcinog* **46**, 144-154.
- Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, I. D., Yang, K. H. and Kim, H. M. 1999. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* **41**, 157-164.
- Hong, E. K., Kim, H. M., Lee, K. Y., Chung, Y. S., Yoo, B. I., Kim, S. G., Ahn, E. T. and Han, Y. B. 1997. Anti-tumor effect of the complex of acriflavine and guanosine(AG60). *J Korean Cancer Assoc* **29**, 29-37.
- Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some *Basidiomycetes*, especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155-157.
- Lee, H. J., Lee, H. J., Lim, E. S., Ahn, K. S., Shim, B. S., Kim, H. M., Gong, S. J., Kim, D. K. and Kim, S. H. 2005. Cambodian *Phellinus linteus* inhibits experimental metastasis of melanoma cells in mice via regulation of urokinase type plasminogen activator. *Biol Pharm Bull* **28**, 27-31.
- Kerr, J. F., Winterford, C. M. and Harmon, B. V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013-2026.
- Kim, M. K., Park, S. C., Yun, H. I., Oh, T. K. and Choi, Y. W. 1998. Acute toxicity of enrofloxacin-colistin combinations after a single oral and intravenous administration in ICR mice. *J Toxicol Pub Health* **14**, 385-391.
- Lee, J. H., Cho, S. M., Ko, K. S. and Yoo, I. D. 1995. Effect of cultural conditions on polysaccharide production and monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202. *Korean J Mycol* **23**, 325-331.
- Lee, J. W., Beak, S. J., Bang, K. W., Kang, S. W., Kang, S. M., Kim, B. Y. and Ha, I. S. 2000. Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Korean J Food Sci*

- Technol* **32**, 726-735.
20. Lee, S. A., Ko, S. J., Eun, S. H., Lee, H. K., Ahn, M. S., Kwon, Y. M., Yoo, D. Y. and Moon, G. 2010. Effects of gunbibosinhangam-tang and gunbibosinhangam-tang on solid tumor and immune cells in mice. *Korean J Ori Physiol Pathol* **24**, 602-609.
 21. Oh, G. S., Lee, M. S., Pae, H. O., Kwon, J., Lee, S. S. and Jeong, J. G. 2006. Effects of oral administration of *Phellinus linteus* on the production of Th1- and Th2- type cytokines in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **28**, 281-293.
 22. Rhee, Y. K., Han, M. J., Park, S. Y. and Kim, D. H. 2000. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Korean J Food Sci Technol* **32** 477-480.
 23. Shin, C. C., Song, S. W., Suh, J. E., Kang, B. H., Kim, W. B. and Han, S. S. 2000. Single Dose Intravenous toxicity study of a new anthracycline anticancer agent (da-125) in rats and mice. *J Appl Pharmacol* **8**, 84-92.
 24. Smylie, M. G., Wong, R., Mihalcioiu, C., Lee, C. and Pouliot, J. F. 2007. A phase II, open label, monotherapy study of liposomal doxorubicin in patients with metastatic malignant melanoma. *Invest New Drugs* **25**, 155-159.
 25. Song, K. S., Cho, S. M., Lee, I. K., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S. and Yoo, I. D. 1995. B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull* **43**, 2105-2108.
 26. Sung, I. J., Park, M. Y. and Kim, J. D. 2010. Mouse single oral dose toxicity test and bone marrow micronucleus test of mahwangbujaseshin-tang extracts. *Korean J Ori Physiol Pathol* **24**, 124-133.
 27. Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D. and Liu, L. F. 1984. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* **226**, 466-468.
 28. Yang, B. K., Hwang, S. L., Yun, I. J., Do, E. J., Lee, W. H., Jung, Y. M., Hong, S. C. and Park, D. C. 2009. Antitumor effects and immunomodulating activities of *Phellinus linteus* extract in a CT-26 cell-injected colon cancer mouse model. *Mycobiology* **37**, 128-132.

초록 : 금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 *in vivo* 항암활성 및 급성, 아 급성 독성 시험

김종명¹ · 박준덕² · 박동찬² · 김병오^{1*}

(¹경북대학교 생태환경대학 생물응용학과, ²금사 머쉬 앤 팜)

본 연구는 인공재배 상황버섯 자실체 추출물인 금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 mouse sarcoma cells인 S-180 세포에 대한 정맥 투여 시 항암 효과와 급성독성 및 4주 아 급성 독성에 대한 보고이다. 금사목질진흙버섯 자실체 추출물의 항암효과는 250 mg/kg에서 대조군 대비 42.7%의 크기로 가장 높은 효과를 나타내었으며, 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 급성 독성에서는 LD₅₀치가 632.84 mg/kg (♂)과 814.48 mg/kg (♀)로 나타났으며, 이자와 장기의 무게비가 증가하는 현상이 나타나, 영향이 있는 것으로 추측되었다. 4주 아 급성 독성 시험에서 LD₅₀치는 355.41 mg/kg (♂)과 383.53 mg/kg (♀)로 나타났으며, 특히 250 mg/kg 투여군에서는 간의 무게 비가 2배 정도 증가하는 현상과 황색 반점이 나타났다. 특히 125 mg/kg 이상 투여군에서는 점프 능력과 민첩성 등의 운동 능력이 현저히 증가되는 현상이 관찰되었으며, 이에 대한 정확한 메카니즘은 확인할 수 없었다. 이상의 결과를 바탕으로 금사목질진흙버섯 자실체 추출물에 대한 표준물질 정제 과정을 통한 작용기전과 운동능력 향상에 대한 실험 등이 추가된다면 유효 농도에서 독성이 낮으면서도 암을 제어할 수 있는 새로운 천연물 신약의 후보 물질로 이용될 가능성이 있는 것으로 판단된다.