

생쥐의 Sarcoma 180에 대한 금목이(*Tremella aurantialba*) 자실체 추출 조다당류의 항암 및 면역조절 효과

이건우¹ · 김혜영¹ · 허현² · 이민웅² · 심미자³ · 이우윤¹ · 이태수^{1*}

¹인천대학교 생물학과, ²동국대학교 생물학과, ³서울시립대학교 생명과학과

Antitumor and Immuno-modulatory Effect of Crude Polysaccharides from Fruiting Body of *Tremella aurantialba* Against Mouse Sarcoma 180

Geon Woo Lee¹, Hye Young Kim¹, Hyun Hur², Min Woong Lee², Mi Ja Shim³,
U-Youn Lee¹ and Tae Soo Lee^{1*}

¹Department of Biology, University of Incheon, Incheon 402-749, Korea

²Department of Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

³Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

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

ABSTRACT: *Tremella aurantialba*, one of edible and medicinal mushrooms belonging to Tremellaceae of Basidiomycota, has been known to have outstanding curing effects on coughing, tracheitis and hypertension of humans and antitumor activity on the sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma of mice. 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 showed that all crude polysaccharides extracted from the fruiting body were not cytotoxic against cancer cell lines such as RAW 309 CR.1 and Sarcoma 180 at the concentration of 2000 $\mu\text{g/ml}$. Intraperitoneal injection with crude polysaccharides exhibited life prolongation effect of 11.1~66.7% in mice inoculated with Sarcoma 180. Fr. MeOH improved the immunopotential activity of B lymphocyte by increasing the alkaline phosphatase activity by 1.16 folds at the concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$. In case of Fr. HW, the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes were increased by 1.42 and 2.87 folds, respectively.

KEYWORDS : Antitumor effect, Crude polysaccharides, Immuno-modulatory, *Tremella aurantialba*

버섯은 담자균과 자낭균 중 눈으로 확인이 가능한 자실체를 형성하는 고등균류로서 독특한 향과 맛을 가지는 동시에 약용 및 식용으로 널리 이용되고 있다. 지구상의 추정된 버섯 종의 수는 14,000여 종으로 이중에서도 약 20%만이 알려져 있다. 이는 버섯의 종수는 많이 존재하지만 아직 밝혀지지 않은 새로운 버섯과 이들 버섯이 함유한 여러 종류의 이용 가능한 약리적 물질이 많다고 추정되고 있어서 버섯의 인공재배와 약리효과에 대한 연구는 계속되고 있다(Lee, et al., 2002). 현대 의학 특히 대체의학에서 가장 중요하게 여기는 것은 버섯들이 가지고 있는 항암 및 면역 활성 특성을 갖고 있는 다당류(polysaccharides)이다. 또한 버섯은 자실체뿐만 아니라 균사체와 배양액에도 생물학적 활성을 가진 다당류를 갖고 있다. 버섯의 다당류는 암세포를 직접적으로 공격하지는 않으나, 숙주(host)에서 면역반응에 의한 항암효과를 보이고, 암 형성 및 암 전

이를 억제시킨다. 이들의 활성은 흉선 의존형 면역체계를 통해서 조절된다고 보고되고 있다(Wasser, 2002).

버섯을 의학용으로 이용하기 위한 약리활성 연구는 항암 면역요법제로서 이용될 수 있는 버섯에 함유된 다당류에 대한 연구가 주를 이루고 있다. 이러한 연구는 Roland 등(1960)이 큰말장버섯(*Calvatia gigantea*)으로부터 calvacin을 분리함으로써 담자균의 항암 성분에 관한 연구가 시작되었으며, 이어서 Chihara 등(1969)은 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 자실체로부터 Sarcoma 180에 강력한 저지력을 지닌 고분자 β -1,3-glucan인 lentinan을 보고하였으며, Komatsu 등(1969)는 치마버섯(*Schizophyllum commune*)으로부터 β -1,6; β -1,3-glucan인 schizophyllan을 분리하였다. Schizophyllan 후에 연구자들에 의해 인체의 면역반응을 비특이적으로 증가시키는 역할을 하는 물질로 밝혀졌다(Chihara, 1970). 이 후 Tsugagoshi 등(1974)은 구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 배양균사체로부터 β -1,3; β -1,4; β -1,6-glucan인 단백 다당체인 PS-K를 분리하여 이

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

물질이 항암성을 갖고 있다는 것을 밝혔다. 표고버섯의 lentinan, 운지버섯의 PSK, 치마버섯의 schizophyllan 등과 같이 버섯에서 분리된 β -D-glucan은 모두 인체에 비특이적인 면역반응을 증가시켜 항종양 작용을 나타내는 것으로 밝혀졌다(Hamuro and Chihara, 1984). 또한 Fisher 등(2002)은 운지버섯에서 추출한 polysaccharide-K(PSK)의 항암효과와 면역기전을 이용하여 면역요법(chemoimmunotherapy)에 대해 보고하였다. Gregory(1966)는 50 종류의 버섯에서 추출한 물질이 Sarcoma 180에 항암 작용을 나타낸 것을 발표하였다. Lee 등(1992)은 구름버섯과 표고버섯, Kim 등(1979)은 팽나무버섯, Yoshioka 등(1975)은 느타리버섯에서 추출한 다당류가 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암효과를 나타낸다고 보고하였다. 이들은 특히 이러한 효과를 나타내는 버섯의 주성분인 단백 다당체는 종양세포에 대하여 직접적인 작용을 하기보다는 면역계의 숙주매개형(host mediated) 면역반응에 관여하여 면역기능을 회복시켜 항암효과를 나타내는 것이라고 보고하였다.

금목이(*Tremella aurantialba*)는 흰목이과(Tremellaceae), 흰목이속(*Tremella*)에 속하는 버섯으로 자실체는 길이는 8~15 cm, 폭은 7~11 cm로 비교적 크고 나무 위에 부착하여 발생한다. 형태는 뇌모양의 과일상 이며 신선할 때는 금황색 또는 선홍색이고 건조하면 단단해지며 열은 갈황색이 되고, 물을 흡수하게 되면 원래의 모양으로 되 돌아온다. 여름부터 가을에 걸쳐 참나무 등의 활엽수에서 발생하며, 때로는 침엽수인 삼나무에서 발생하는 목재의 갈색부후균이다. 금목이는 백색부후균인 꽃구름버섯(*Stereum hirsutum*)과 공생을 관계를 갖고 있으며 이 버섯과 밀접한 공생관계를 통해 자실체를 형성할 수 있다. 금목이는 중국의 운남성, 사천성, 감숙성 등지와 티베트에 분포하고 있다. 금목이의 자실체는 폐암 등의 암에 효과가 있다고 알려져 있으며 이외에도 기관지염, 해소, 천식 및 고혈압 등의 치료효과가 있다고 보고되어 있다. 현재 금목이는 중국의 운남성과 사천성 등의 지역에서만 재배 되고 있다고 보고되어 있다(卯曉嵐, 2000).

따라서 본 연구는 식·의약품 버섯인 금목이의 자실체로부터 중성염용액(0.9%), 메탄올(80%) 및 열수를 이용하여 조다당류를 추출한 후 이들 조다당류를 여러 세포주와 생쥐에 투여하여 나타난 세포독성, 면역증강 및 항암효과에 대한 실험 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서는 2005년 중국 윈난성 곤명시에서 구입한 금목이(*Tremella aurantialba*)의 자실체를 사용하였다. 구입한 자실체는 50°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시키고 분쇄한 후 -65°C의 저온냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다. 또한 신선한 자실체로부터 균사체를 순수 분리

하여 인천대학교의 버섯균주 및 DNA은행(Culture Collection and DNA Bank of Mushrooms)에 기탁하여 보존하였다(보존번호: IUM 1603).

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 대식세포 RAW 309 Cr.1 이었으며, 암세포로는 마우스 육종암세포 Sarcoma 180이었다. 세포독성 실험은 Denizot와 Lang(1986)의 방법에 따라 수행하였다. RAW 309 Cr.1 세포는 1×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 100 μ l씩 주입한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2000 μ g/ml이 되도록 조정 한 후 100 μ l씩 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) solution 10 μ l를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μ l로 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sarcoma 180은 2×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 50 μ l씩 주입하고 각 추출물의 최종 농도를 10~2000 μ g/ml이 되도록 암세포에 처리하여 최종 용적이 100 μ l가 되도록 하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT) solution 당 25 μ M phenazine methosulfate가 포함된 용액을 well 당 30 μ 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 5×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켜 0.2 ml씩(1×10^6 cells/mouse) ICR 마우스의 복강에 이식하여 복수암을 유발시키고 Sarcoma 180을 이식한 24시간 후부터 20 mg/kg body weight 농도의 추출물을 생리 식염수에 용해시켜 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 다음 식으로 increase of life span(ILS)을 계산하여 암세포의 성장 억제 효과를 평가하였다.

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

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 2×10^5 cells/ml이 되도록 조정하여 96 well plate에 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 50, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석한 각각 추출물과 양성 대조군으로 5, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 lipopolysaccharide(LPS)를 $100 \mu\text{l}$ 씩 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 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 1×10^6 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°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후, 세포 배양액을 원심분리하고 침전물에 1 mM MgCl₂를 포함한 50 mM sodium carbonate buffer(pH 9.0)에 1 mg/ml이 되도록 ρ -nitrophenyl phosphate를 첨가한 용액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 가한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시켰다. 차가운 0.3 N NaOH 용액 50 μl 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 1×10^5 cells/well로 분주하고 추출물의 최종 농도가 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 세포주에 첨가하였으며, 양성대조군으로 LPS를 1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 첨가하였다. 각 농도의

추출물을 첨가한 실험군과 양성 대조군은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 후, 10%가 되도록 FBS를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 상등액 $100 \mu\text{l}$ 에 $100 \mu\text{l}$ 의 Griess reagent(50 μl of 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, 50 μl 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 1×10^7 을 여러 가지 추출물, 각각의 농도와 함께 24 well plate에서 37°C, 5% CO₂ 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°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 나누어 3일간 연속으로 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 추출물을 복강 내에 투여하였고, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 24시간 후 마우스를 경추탈골시켜 10 ml의 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 중량에 미치는 영향 분석

6주령의 ICR 웅성 마우스를 실험군과 대조군으로 나누어 10일간 연속으로 복강 내에 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 추출물을 투여하였으며, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 추출물 투여 최종일로부터 2일 후 심장체혈하여 혈액을 채취하여 Turk's solution으로 염색하여 혈구계수기로 백혈구 수를 측정하였다. 또한 간, 비장 및 흉선을 적출하여 중량을 측정하였고 상대장기 중량은 장기의 중량을 부검 전 체중으로 나누어 백분율로 산출하였다.

결과 및 고찰

성분의 추출 및 분리

3종류의 용매를 이용한 추출방법에 따른 수득률은 80%

Table 1. Recovery ratio of crude polysaccharides from fruiting body of *Tremella aurantialba*

Fraction ^a	Weight of the used mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery ratio ^b (%)
Fr. MeOH	500	41.44	8.3
Fr. NaCl	500	2.96	0.6
Fr. HW	500	38.84	7.8

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

^bRecovery ratio (%) = [Weight of extract (g)/Weight of the used mushroom (g)] × 100.

의 메탄올에서 41.44 g이 추출되어 8.3%의 높은 수득률을 보였고, 중성염에서는 2.96 g이 추출되어 가장 적은 0.6%의 수득률을 나타내었으며, 열수에서는 38.84 g이 추출되어 7.8%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%, 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 수득률이 적었다.

평균 수명 연장효과

금목이의 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180 접종 생쥐에 주사하여 수명연장 효과를 분석한 결과, 3종류의 추출물이 각각 생쥐의 수명을 약 11~67% 연장시키는 효과가 있었다. 대조군의 평균 생존 일수는 15일이었

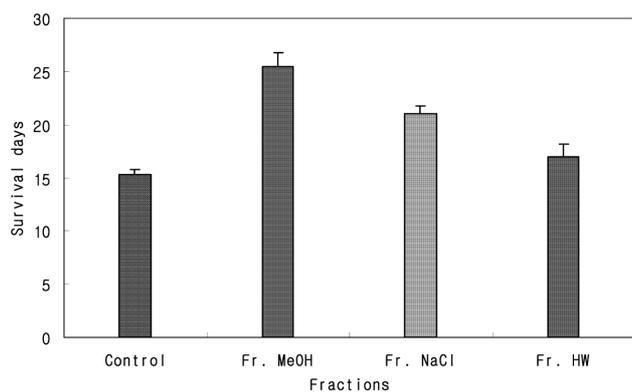


Fig. 1. Effect of crude polysaccharides^a from fruiting body of *Tremella aurantialba* on the life elongation of ICR mice^b inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection^c). ^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted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

으며, 메탄올에서 추출한 조다당류를 20 mg/kg body weight 투여한 실험군의 평균 생존일수는 25.5일로 나타나 수명 연장효과가 66.7%로 높게 나타났다(Fig 1). 이미 국내에서는 한국산 버섯의 자실체에서 분리한 다당류가 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 높은 항암력을 나타낸다는 연구 결과는 보고된 바 있다. Kim 등(1980)은 한국산 야생 영지(*Ganoderma lucidum*)의 항암 성분이 Sarcoma 180에 대해 87.6%의 높은 억제 효과를 나타냄을 보고하였고, 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 삼색도장버섯에서 중성염으로 추출한 조다당류를 투여한 실험에서는 수명이 77.4% 연장되어 금목이에 비해서는 수명 연장효과가 약 16% 높게 나타났다(심 등, 2003b). 이외에도 오 등(2006)은 흰목이의 중성염 추출 조다당류가 Sarcoma 180에 대하여 대조군에 비해 53%의 수명 연장 효과를 나타냈다고 보고하였으며, 김 등(2006)은 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 뽕나무버섯의 열수 추출물을 투여한 결과 금목이 결과와 유사한 약 67.5%의 수명 연장 효과를 나타냈다고 보고하였다. 따라서 여러 종류의 약용버섯에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180에 접종된 생쥐에 처리하면 처리한 생쥐군은 대조군에 비해 약 32.3~77.4%의 범위 내에서 수명이 연장되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 약용버섯의 자실체로부터 추출한 조다당류를 투여하는 경우 대부분의 경우 암의 증식이 억제되어 수명의 연장효과가 나타나는 것으로 판단된다.

세포에 대한 독성효과

금목이에서 추출한 조다당류를 정상세포와 암세포에 대해 세포독성을 조사한 결과 암세포주인 Sarcoma 180에 대해서 2000 µg/ml 농도의 중성염 및 열수 추출물이 약간의 독성을 보였으며, 정상세포인 RAW 309 Cr.1에 대해서는 전혀 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

그러나 심 등(2003a)의 매미눈꽃동충하초의 조다당류를 이용한 세포독성 실험에서는 10 µg/ml의 농도에서는 독성을 나타내지 않았으나 100 µg/ml에서는 독성을 나타내었다. 그러나 삼색도장버섯(심 등, 2003b)과 흰목이(오 등, 2006)의 열수추출물 독성실험에서는 1000 µg/ml 이하의 농도실험에서 실험세포주인 NIH3T3와 Sarcoma 180에 독성이 없었다. 따라서 본 세포독성 실험에 사용한 금목이 자실체에서 추출한 조다당류는 삼색도장버섯이나 흰목이 등에서 추출한 조다당류에 비해서 독성이 낮은 것으로 판단된다. 특히 앞의 수명연장 실험에서 세포독성이 없는 금목이의 조다당류를 투여한 생쥐군이 투여하지 않은 대조군에 비해 수명이 크게 연장된 것은 금목이 자실체에서 추출한 조다당류가 직접적인 세포독성으로 Sarcoma 180

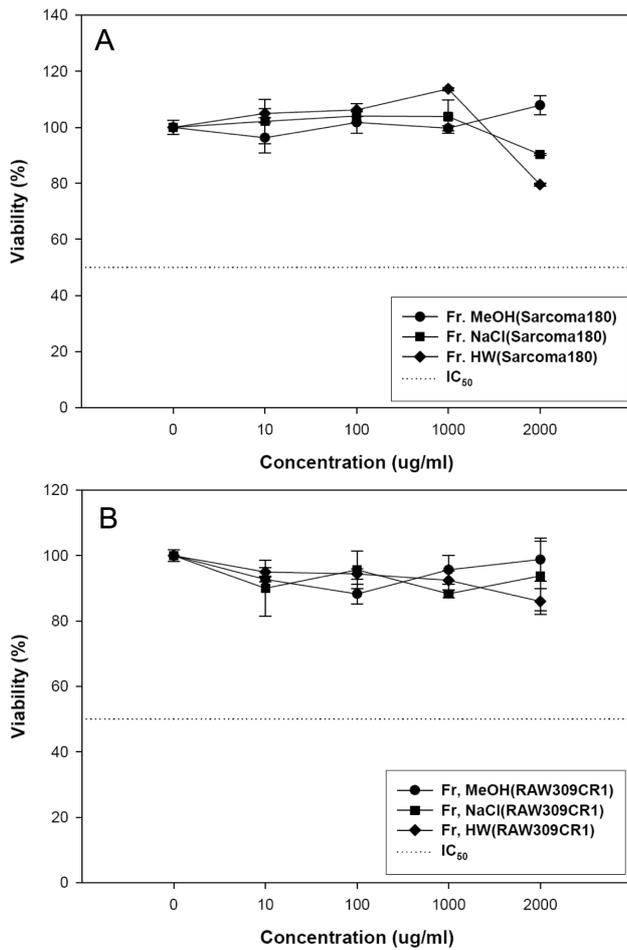


Fig. 2. *In vitro* cytotoxicity of fractions from fruiting body of *Tremella aurantialba* against (A) Sarcoma 180, (B) RAW 309 Cr.1. Concentration of each cell lines was 1×10^5 cells/well. Each cell lines was incubated in the fractions for 24 hr in 37°C of 5% CO_2 incubator. The Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. The Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW was extracted with hot water. IC_{50} means 50% inhibition concentration.

의 증식을 억제하지는 않았지만 조다당류에 함유된 생리 활성물질이 생쥐 복강 내의 Sarcoma 180의 증식을 지연시키거나 억제시켜 생쥐의 수명이 연장된 것으로 사료된다.

비장세포의 증식에 미치는 영향

금목이의 자실체에서 3 종류의 용매로 추출한 조다당류를 이용하여 생쥐의 비장세포에 대한 증식 정도를 MTT 법으로 관찰한 결과 메탄올, 중성염 및 열수 추출물이 50~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 약 1.63~1.99배의 증식능을 나타내었다. 반면 양성 대조군으로 널리 사용된 LPS는 5~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 2.17~2.57배의 증식능을 나타내었다. 이는 금목이에서 추출한

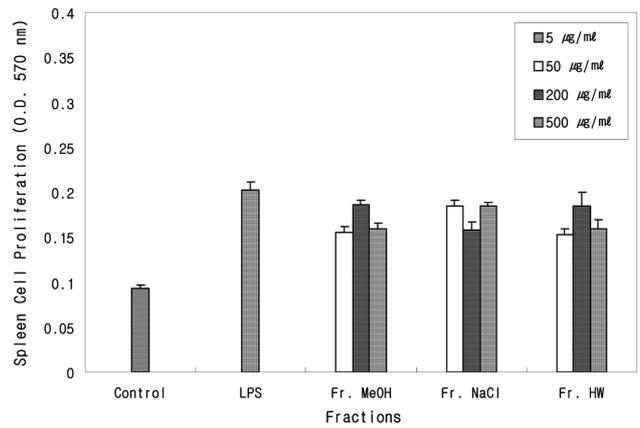


Fig. 3. Effect of fractions from fruiting body of *Tremella aurantialba* on proliferation of murine spleen cells. Concentration of spleen cells was adjusted to 2×10^5 cells/ml. Murine spleen cells were incubated in the fractions for 48 hr in 37°C of 5% CO_2 incubator. Proliferation of murine spleen cells 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.

3 종류의 조다당류가 생쥐의 비장세포를 증식시키는 능력이 양성대조군인 LPS에 비해서는 약간 낮은 경향을 나타냈으나 대조군보다는 높게 나타나서 금목이 추출 조다당류가 비장세포의 증식에 비교적 긍정적인 역할을 하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

진(1996)도 잣버섯의 균사체에서 추출한 조다당류의 일종인 lepidan이 대조군에 비해 비장세포를 10배 이상 증식시킨 것은 물론 비장세포내의 B 임파구의 증식도 촉진시켰다고 보고하였다. 따라서 약용버섯에서 추출한 조다당류는 일반적으로 항체를 생산하는 비장 세포의 증식을 촉진하여 면역을 증강시키는 역할에 기여하고 있는 것으로 사료된다.

생쥐의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

Alkaline phosphatase는 B 임파구에서 분비되고 면역의 활성화에 영향을 미치는 효소이다. 금목이 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수를 이용해 추출한 조다당류를 생쥐에 투여하여 alkaline phosphatase가 활성화된 양을 측정할 결과 메탄올 및 중성염 추출물이 200~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해서 약 1.1~1.16배의 활성을 나타냈다. 그러나 LPS를 처리한 양성대조군에 비해서는 활성이 낮게 나타났다(Fig. 4). 이 결과는 오 등(2003)이 저령의 균핵에서 중성염용액으로 추출한 조다당류가 대조군에 비교해 7배 이상, 양성대조군인 LPS에 비교해 6배 이상 높은 활성을 나타낸 것에 비해서는 활성이 낮았으나, 오

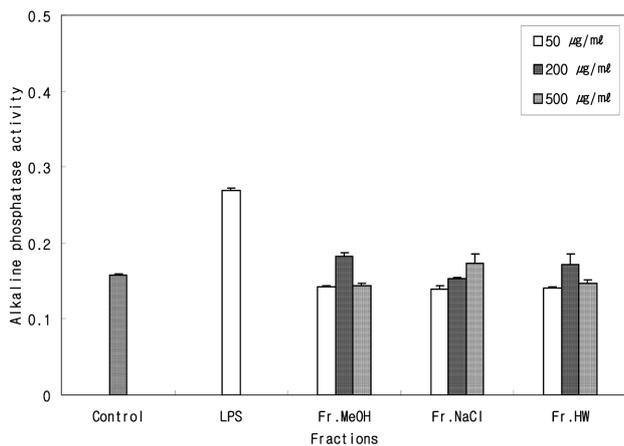


Fig. 4. Effect of fractions from fruiting body of *Tremella aurantialba* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Murine spleen cells were adjusted to 1×10^6 cells/ml and incubated in the fractions for 48 hr in 37°C of 5% CO₂ incubator. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows : Alkaline phosphatase activity (ρ -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.

등(2006)이 흰목이의 자실체에서 중성염으로 추출한 조다당류와 김 등(2006)이 뽕나무버섯의 자실체에서 중성염으로

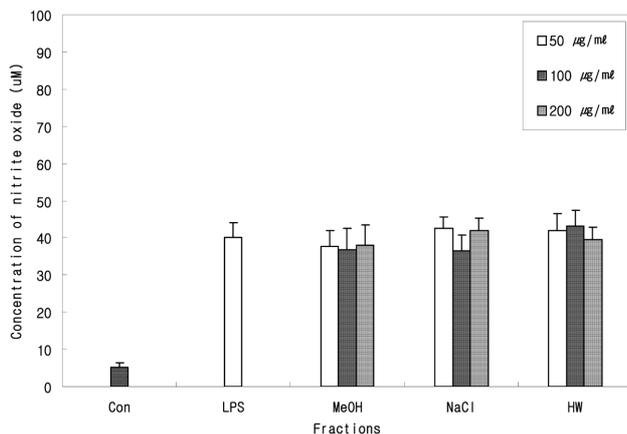


Fig. 5. Effect of fractions from fruiting body of *Tremella aurantialba* on nitrite oxide production in RAW 264.7. Concentration of RAW 264.7 was adjusted to 1×10^5 cells/ml. RAW 264.7 were incubated initially for 4 hr in the fractions and then incubated for another 48 hr in 37°C of 5% CO₂ incubator 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.

로 추출한 조다당류를 이용한 실험의 대조군의 결과와 비교해서 활성도가 약간 높게 나타났다. 따라서 금목이의 자실체에서 추출한 조다당류는 생쥐의 B 임파구에서 분비되는 alkaline phosphatase를 미약하게 활성화시키는 효과가 있는 것으로 보여 진다.

대식세포의 활성화에 미치는 영향

대조군의 RAW 264.7에 의해 발생된 nitric oxide(NO) 농도가 5.12 μM 인 것에 비해 중성염 추출물을 50~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 대식세포주는 36.6~42.54 μM 의 NO를 발생시켰다. 특히, 중성염 및 열수 추출물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 양성대조군인 LPS에 의해 생성된 40 μM 의 nitric oxide 농도에 비해 다소 높은 41.94~42.54 μM 농도의 NO를 생성하였다(Fig. 5). 따라서 금목이의 자실체에서 중성염 및 열수를 이용하여 추출한 조다당류는 대식세포의 활성을 증가시켜 숙주세포의 항암효과를 높이는 것으로 판단된다.

Cytokine 분비에 미치는 영향

금목이에서 추출한 조다당류가 세포수준의 면역조절에 끼치는 영향을 확인하기 위하여 생쥐의 비장 세포에서 분비하는 cytokine(IL-2)의 양을 ELISA assay kit로 측정하였다. 메탄올과 열수로 추출한 조다당류는 100~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위에서 대조군보다 높은 활성을 보였다. 그리고 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 메탄올 및 열수 추출 조다당류가 Con A와 LPS에 비해서 높은 활성을 보였다(Fig. 6). 따라서 본 실험

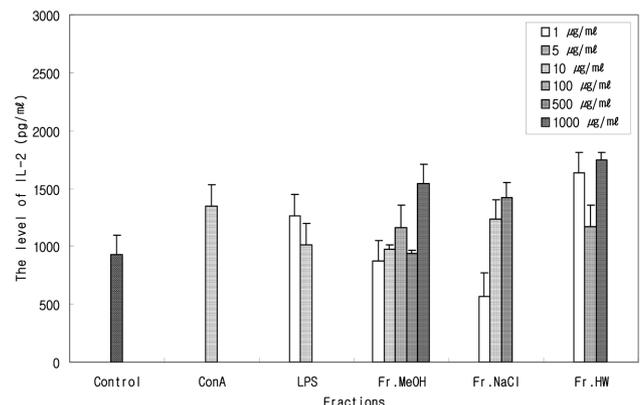


Fig. 6. Effects of fractions from fruiting body of *Tremella aurantialba* on cytokine (IL-2) production in splenocytes. Concentration of splenocytes was 1×10^7 cells/ml. Splenocytes were incubated in the fractions for 24 hr in 37°C of 5% CO₂ incubator. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl 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.

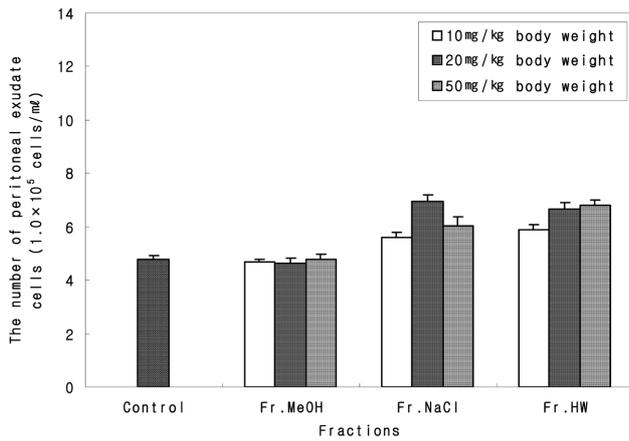


Fig. 7. Effect of fractions from fruiting body of *Tremella aurantialba* on the numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fractions were injected into ICR mice for 3 consecutive day and numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice were measured 24 hr after final injection. Fr. MeOH was extracted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

험의 결과 금목이에서 추출한 조다당류가 IL-2에 활성을 촉진한 것은 이들 물질이 생쥐의 항암효과와 면역증강효과와 밀접한 관계가 있을 것으로 판단된다.

총 복강 세포 수에 미치는 영향

금목이에서 추출한 3 종류의 조다당류를 투여한 생쥐의 복강 세포 수는 추출방법과 농도에 따라 차이가 있었다. 일반적으로 생쥐의 복강 세포 수는 메탄올추출 다당류를 제외하고 중성염과 열수 추출 조다당류에서 농도에 따라 대조군에 비해 각각 약 1.16~1.42배 증가하였다(Fig. 7). 이 결과는 김 등(2006)이 뽕나무버섯의 열수추출 조다당류를 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포 수가 대조군에 비해 3.3배 증가했다고 보고하였고, 오 등

Table 2. Effect of crude polysaccharides from fruiting body of *Tremella aurantialba* 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	2.31 ± 0.88 ^b
Fr. MeOH	10	10	3.85 ± 0.47
Fr. MeOH	20	10	5.45 ± 1.20
Fr. MeOH	50	10	3.65 ± 0.59
Fr. NaCl	10	10	3.61 ± 1.34
Fr. NaCl	20	10	3.03 ± 0.36
Fr. NaCl	50	10	3.44 ± 0.54
Fr. HW	10	10	4.69 ± 0.83
Fr. HW	20	10	3.75 ± 1.13
Fr. HW	50	10	6.64 ± 1.18

^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.

(2006)이 흰목이의 중성염 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포 수가 대조군에 비해 7.4배 증가했다고 보고한 것에 비해서는 복강세포수의 증가율이 낮은 것이었다. 따라서 본 실험 결과 금목이에서 중성염과 열수를 이용해 추출한 조다당류는 복강세포수의 활성화에 효과가 낮은 것으로 사료된다.

혈액 중 백혈구 수에 미치는 영향

금목이에서 추출한 조다당류가 백혈구의 수에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10, 20, 50 mg/kg body weight 농도의 조다당류를 생쥐에 투여하여 백혈구의 수를 조사하였다. 혈액 내의 백혈구 수는 대조군 2.31 ± 0.88에 비하여 메탄올 추출물 20 mg/kg body weight에서 5.45 ± 1.20으로 약 2.4배 증가하였으며, 열수 추출 조다당류는 50 mg/kg body weight의 농도에서 2.87배의 증가를 보였다(Table 2). 이 결과를 통해 금목이의 메탄올, 중성염 및

Table 3. Effect of crude polysaccharides from fruiting body of *Tremella aurantialba* on the body and immunoorgan weight of ICR mice^a

	Group ^b									
	Control	Fr. MeOH			Fr. NaCl			Fr. HW		
Dose (mg/kg body weight)	-	10	20	50	10	20	50	10	20	50
No. of mice	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Body weight (g)	37.58 ± 0.66 ^c	36.23 ± 0.46	35.60 ± 1.80	38.33 ± 0.74	36.54 ± 3.41	34.93 ± 1.65	32.38 ± 1.01	35.55 ± 3.76	36.86 ± 2.31	34.73 ± 1.70
Liver weight (g)	1.99 ± 0.20	1.86 ± 0.15	1.55 ± 0.14	1.80 ± 0.23	1.87 ± 0.82	1.88 ± 0.31	1.86 ± 0.11	1.95 ± 0.26	2.03 ± 0.51	2.11 ± 0.44
Liver/Body (%)	5.29 ± 0.46	5.13 ± 0.48	4.38 ± 0.59	4.71 ± 0.68	5.15 ± 0.98	5.41 ± 0.98	5.76 ± 0.39	5.47 ± 0.26	5.47 ± 0.71	6.03 ± 1.02
Spleen weight (g)	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.16 ± 0.04	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.06	0.23 ± 0.08
Spleen/Body (%)	0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.04	0.44 ± 0.06	0.30 ± 0.06	0.45 ± 0.13	0.42 ± 0.05	0.62 ± 0.08	0.53 ± 0.08	0.48 ± 0.08	0.66 ± 0.21
Thymus weight (g)	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01
Thymus/Body (%)	0.08 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.05	0.08 ± 0.06	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.05	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.03

^aSignificant difference was not found in body and immunoorgan weight of ICR mice among control and treated groups (P = 0.05).

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

^cMean ± S.E.

열수 추출 조다당류는 10~50 mg/kg body weight의 농도에서 생쥐의 백혈구 수를 2~3배 정도 증가 시키는 것으로 나타났다. 오 등(2006)은 흰목이의 증성염 추출 조다당류를 50 mg/kg body weight 농도로 생쥐에 투여했을 때 투여한 생쥐의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.6배 증가했다고 보고하였다. 따라서 위의 2가지 실험을 통해 약용버섯에서 추출한 조다당류를 투여한 생쥐에서 백혈구 수가 1.6~2.87배 증가되었다는 것은 버섯 추출 조다당류가 생쥐의 백혈구 수를 증가시키는데 효과가 있으며 또한 백혈구 수의 증가는 면역의 증강에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

면역 장기 중량에 미치는 영향

면역관련 장기의 중량변화는 전체적으로 증가하는 양상을 보였으나 유의성이 없었다. 간의 경우 열수 추출물의 농도가 20, 50 mg/kg body weight 일 때 대조군에 비해 무게가 증가하였다(Table 3). 그리고 비장의 경우 10~50 mg/kg body weight 농도의 증성염 및 열수 추출물에서 대조군에 비해 총 중량대비 장기의 상대적인 중량비가 증가하였다.

흰목이 증성염용액 추출 조다당류를 투여한 오 등(2006)의 실험에서도 실험군의 간, 비장, 흉선의 무게가 대조군에 비해 0.85~7.24% 증가되었으나 유의성은 없었다. 김 등(2006)은 뽕나무버섯의 증성염용액 추출 조다당류를 생쥐에 투여한 후 간, 비장, 흉선의 무게를 대조군과 비교한 결과 조다당류를 투여한 군이 대조군에 비해 이들 장기의 무게가 소폭으로 증가하였다고 보고하였다. 따라서 앞에서의 다른 연구자의 실험결과와 본 실험 결과를 종합하면 버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 투여한 생쥐의 간, 비장, 흉선의 무게는 일반적으로 소폭으로 증가되는 경향을 나타내나 통계적인 유의성은 낮은 것으로 나타났다.

적 요

금목이의 자실체로부터 증성염용액, 열수 및 메탄올을 이용하여 조다당류를 추출하였다. 세포독성 실험결과, 각각의 조다당류는 2000 µg/ml의 농도에서 마우스 대식세포 RAW 309 Cr.1와 육종암세포 Sarcoma 180에 대하여 세포독성은 나타나지 않았다. Sarcoma 180가 접종된 ICR mice에 각각의 조다당류를 주사하여 평균 수명 연장 효과를 조사한 결과 실험군은 수명이 대조군에 비해 각각 11.1~66.7% 연장되었다. 메탄올으로 추출한 조다당류를 200 µg/ml 투여한 생쥐의 B 임파구 alkaline phosphatase의 활성은 대조군에 비해 약 1.16배 증가하는 것으로 나타났다. 열수 추출 조다당류를 투여한 생쥐의 복강의 총 세포 수는 대조군에 비하여 최고 1.42배 증가하였으며, 혈액 중 백혈구의 수도 대조군에 비하여 약 2.87배 증가하

였다. 또한 면역과 관련된 장기인 간 비장 및 흉선의 무게는 대조군에 비하여 소폭 증가하였다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청(과제번호 2040393)과 교육과학기술부, 과학재단이 인천대학교 “버섯균주 및 DNA은행”에 지원한 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 구현옥, 김인천, 박신자, 정상희, 박종명, 이재진, 유한상, 이영순. 1999. 신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)에서 분리한 다당체의 *Staphylococcus aureus* 감염 및 마우스 Sarcoma 180 종양세포에 대한 방어효과. 한국실용동물학회지 15:155-158.
- 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.
- 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 항암효과. 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.
- 이병우, 이명섭, 박기문, 김창한, 안평옥, 최춘언. 1992. 운지버섯 균사체 추출물의 항암효과에 관한 연구. 한국산업미생물학회지 20:311-320.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승헌, 유익동. 1995a. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I)-증성염 용액 추출 다당류의 특성. 한국균학회지 23:332-339.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승헌, 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.
- 水野 卓, 川合正允. 1992.キノコの化学·生物学. 學會出版センタ.
- 卯曉嵐. 2000. 中國大型真菌. 河南科學技術出版社.
- Arthur, C. and Guyton, M. D. 1986. *Textbook of medical physiology. 7th Ed.* W. B. Saunder company. pp. 51-59.
- Chihara, G., Hamuro, G., Meada, Y., Arai, Y. and Fukoka, F. 1970. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachman). *Nature* 225:973-948.
- 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.
- 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.
- Fisher, M. and Yang, L. X. 2002. Anticancer effects and mechanism of polysaccharide-K(PSK): implications of cancer immunotherapy. *Anticancer Res.* 22:1737-1754.
- Gregory, F. J., Healy, E. M., Agerborg, H. P. and Warren, G. H. 1996. Studies on antitumor substances produced by basidiomycetes. *Mycologia* 58:80-88.
- Gross, R. L. and Newberne, P. M. 1980. Role of nutrition in immunologic function. *Physiol. Rev.* 60:188-302.
- Hamuro, J. and Chihara, G. 1984. Lentinan, T-cell oriented immunopotentiator; its experimental and clinical application and possible mechanism of immune modulation, In immune modulation agent and their mechanisms. *Marcel Dekker*. pp. 409-437.
- 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 fungi of Korea (XXIV), antineoplastic activities of *Coriolus vesicolor* (Fr.) Qué1, *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Arch. Pharm. Res.* 2:145-149.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K. and Saito, G. 1969. Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann.* 60:137-44.
- Lee, H. W., Lee, D. W., Ha, H. C. and Lee, J. S. 2002. Antioxidant activities of the mycelium and culture broth of *Phellinus igniarius* and *Agrocybe cylindracea*. *Kor. J. Mycol.* 30:37-43.
- 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. Pharmacobio-Dyn.* 9:593-599.
- Roland, J. F., Chmielewicz, Z. F., Weiner, B. A., Gross, A. M., Boenong, O. P., Luck, J. V., Bardos, T. J., Rerlly, H. C., Sugiyura, K., Stock, C. C., Lucas, E. H., Byerrum, R. U. and Stevens, J. A. 1960. Calvacine, a new antitumor agent. *Science* 132:1987.
- Stevens, J. A. 1960. Calvacine, a new antitumor agent. *Science* 132:1987.
- Sugihara, T., Yoshioka, Y. and Nishioka, K. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysacchrides. *Nature New Biology* 235:59-60.
- Suzuki, M., Arika, T., Amemiya, T. and Fujiwara, M. 1982. Cooperative role of T lymphocytes and macrophages in antitumor activity of mice pretreated with schizophyllan. *Jpn. J. Exp. Med.* 50:59-65.
- Tsugagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* 65:557.
- Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:258-274.
- 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., Emori, M., Ikekawa, T. and Fukuoka, F. 1975. Isolation, purification, and structure of components from acidic polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* Fr.. *Quel. Carbohydr. Res.* 43:305-320.