

장미무당버섯(*Russula rosacea*)의 자실체에서 추출한 조다당류의 생쥐 Sarcoma 180에 대한 면역증강 및 항암 효과

최연일¹ · 이건우¹ · 허현² · 이우윤¹ · 이태수^{1*}

¹ 인천대학교 생물학과, ² 동국대학교 생물학과

Immuno-potentiating and Antitumor Effects against Mouse Sarcoma 180 by Crude Polysaccharides Extracted from Fruiting Body of *Russula rosacea*

Yon Il Choi¹, Geon Woo Lee¹, Hyun Hur², 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

(Received June 1, 2008. Accepted June 20, 2008)

ABSTRACT: *Russula rosacea*, one of edible and medicinal mushroom belonging Agaricales of Basidiomycota, has been known to have good inhibitory effects on 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, crude polysaccharides were not cytotoxic against cancer cell lines such as Sarcoma 180, HepG2, HT-29 and NIH3T3 at the concentration of 10~2000 µg/ml. Intraperitoneal injection with crude polysaccharides exhibited life prolongation effect of 21.4~45% in mice previously inoculated with Sarcoma 180. Fr. HW improved the immuno-potentiating activity of B lymphocyte by increasing the alkaline phosphatase activity by 6.8 fold compared with control at the concentration of 500 µg/ml. In case of Fr. NaCl, the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes were increased by 6 and 2.6 folds at the concentration of 50 mg/kg, respectively. Therefore, the antitumor effect against mice Sarcoma 180 by *Russula rosacea* could be due to immunomodulating activity.

KEYWORDS : Antitumor effect, Crude polysaccharides, Immunomodulation, *Russula rosacea*

약용버섯에 함유된 다당류는 암의 치료에 사용되는 항암 화학요법제와는 달리 부작용이 거의 없고 면역의 활성을 크게 증가시킬 뿐만 아니라 기존의 항암요법제와 병용하는 경우 치료효과가 증가하는 것은 물론 부작용을 크게 완화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Fukuda *et al.*, 1975). 따라서 새로운 버섯에서 추출한 다당류를 항암제로 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 우리나라에서는 상황버섯(*Phellinus linteus*; 이 등, 2000)은 자실체로부터 분리한 단백 다당체가 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암 작용을 나타낸다고 보고하였다. 심 등(2003)은 삼색도장버섯 자실체에서 중성염으로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 암을 유발시킨 생쥐에 투여한 결과 대조군에 비해 생명이 77.4% 연장되는 높은 항암효과가 나타났다. 오 등(2004)도 저령의 균핵에서 중성염으로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180가 투여된 생쥐에 주사한 결과, 조다당류를 투여한 생쥐의 생명이 대조군에 비해 66.7% 연장되는 것이 관찰되었다. 이러한 항암 작용

을 하는 삼색도장버섯 조다당류의 화학적 성분을 분석한 결과, 다당체의 함량은 93.89%이었으며 단백질의 함량은 3.1%이었다. 중성염으로 저령의 균핵에서 추출한 조다당류의 다당체 함량은 98.25%이었고 단백질의 함량은 1.44%이었다. 이와 같은 결과를 분석해 보면 버섯에서 추출한 항암 물질은 주로 다당체와 소량의 단백질로 구성되어 있는 단백다당체인 것으로 사료되었다(오, 2004; 심, 2003b). 또한 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암효과를 보이는 삼색도장버섯, 저령 및 상황버섯을 대상으로 이들 버섯의 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180, HepG2, HT-29, MCF-7, HL-60 등의 암세포주에 배양하여 세포독성 실험을 수행한 결과 이들 버섯 자실체의 조다당류는 공통적으로 실험대상 암세포주에 대해 농도가 증가함에 비례하여 세포독성이 증가하는 경향을 나타내었으나 암세포주의 암세포의 증식을 크게 억제하거나 사멸시키는 기능은 미약하였다. 이는 버섯에서 추출한 조다당류가 암세포에 직접적으로 작용하여 암세포를 사멸시키거나 증식을 크게 억제하기 보다는 숙주의 면역 활성을 증가시키고 회복시킴으로서 항암효과를 나타내는 것으로 판

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

단된다. 김 등(2006)도 뿔나무버섯(*Armillaria mellea*)의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류의 암세포주 세포독성 실험에서 위와 유사한 결과를 얻었고, 고농도의 조다당류를 생쥐의 복강에 주사한 경우, B 임파구의 활성화, 총 복강 세포의 수, 혈중 백혈구의 수도 크게 증가시키는 효과가 있는 것을 밝혔다. 이처럼 한국산 버섯으로부터 추출한 조다당류가 항암 및 면역 증강 효과를 나타내는 것이 알려짐에 따라 이들 버섯에서 추출한 성분의 함암 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Ji *et al.*, 2000).

장미무당버섯(*Russula rosacea*)는 분류학적으로 주름버섯목(Agaricales), 무당버섯과(Russulaceae), 무당버섯속(*Russula*)에 속하는 버섯으로서 여름부터 가을에 걸쳐 활엽수림 내의 땅위에 단생 또는 군생하는 균근성 버섯이다. 이 버섯은 형태적으로 다른 무당버섯종과 매우 유사하나 대체로 갓의 지름은 5~10 cm로 초기에는 반구형이나 편평형을 거쳐 후에 오목편평형이 된다. 갓의 표면은 적홍색~담황백색으로 약간의 분말상을 나타내고 갓 내부의 조직은 백색이다. 대는 길이가 3~8 cm, 직경이 1~2.5 cm로 속은 비어있다. 대의 표면은 초기에는 백색이나 나중에는 갓과 같은 담홍색을 나타낸다. 포자는 달걀 모양의 유구형인 $8\sim9.5\times6\sim8\ \mu\text{m}$ 로 표면은 불완전한 망목상이며 돌기가 나있다. 포자문은 백색내지 담황색을 나타낸다(박과이, 2002).

장미무당버섯은 영양이 풍부하고 약간 매운 맛을 나타내는 식·의약품 버섯이다. 중국학자들의 연구에 의하면 이 버섯 자실체를 열수로 추출한 물질은 생쥐의 Sarcoma 180과 Ehrlich sarcoma에 대해 높은 억제효과를 나타내고 대식세포의 수를 증가시키는 효과를 있어서 사람의 암을 치료하는 보조제로 이용하려는 연구가 시도되고 있다(Ying *et al.*, 1987).

본 연구에서는 강원도 속초시에 소재한 설악산에서 식·의약품 버섯인 장미무당버섯의 자실체를 채집하였다. 채집한 자실체는 실험실에서 건조하고 중성염용액(0.9%), 메탄올(80%) 및 열수를 이용하여 조다당류를 추출한 후 *in vitro*와 *in vivo*에서 생쥐의 Sarcoma 180에 대한 항암 및 면역증강효과 연구를 수행하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서는 2006년 여름 설악산에서 채집한 장미무당버섯(*Russula rosacea*)의 자실체를 사용하였다. 채집한 자실체는 실험실로 운반한 뒤 50°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시킨 후 마쇄하여 -65°C의 저온냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

조 등(1995a, 1995b)과 심 등(2003a)의 방법에 따라 중

성염용액(0.9% NaCl), 80% 메탄올 및 열수로 추출하였으며, 추출한 물질은 각각 수율을 조사하였다.

세포독성 실험

실험에 사용한 정상세포는 마우스 섬유아세포 NIH3T3, 암세포는 마우스 육종암세포 Sarcoma 180, 인간 간암세포 HepG2, 인간 대장암세포 HT-29이었다. 세포독성 실험은 Denizot와 Lang(1986)의 방법에 따라 수행하였다. NIH3T3, HepG2 및 HT-29 세포는 $1\times10^5\ \text{cells/ml}$ 의 세포를 96 well microtiter plate에 100 μl 씩 주입한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2000 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 조정된 후 100 μl 씩 세포에 처리하여 37°C의 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 μl 를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μl 에 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sarcoma 180은 $2\times10^5\ \text{cells/ml}$ 의 세포를 96 well microtiter plate에 50 μl 씩 주입하고 각각의 조다당류 최종 농도를 10~2000 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 암세포에 처리하여 최종 용적이 100 μl 가 되도록 하고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis(2-methoxyl-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT) solution 당 25 μM phenazine methosulfate가 포함된 용액을 well 당 30 μl 씩 처리하여 암 조건에서 2시간 배양한 후 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 암세포의 생존율은 실험군의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 구하였다.

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

T : 실험군의 평균 흡광도

C : 대조군의 평균 흡광도

B : Blank

수명연장 실험

Sarcoma 180을 $5\times10^6\ \text{cells/ml}$ 이 되도록 부유시켜 0.2 ml/씩($1\times10^6\ \text{cells/mouse}$) ICR 마우스의 복강에 이식하여 복수암을 유발시키고 Sarcoma 180을 이식한 24시간 후부터 20 mg/kg body weight 농도로 추출한 조다당류를 생리식염수에 용해시켜 0.22 μm 의 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 아래의 식으로 increase of life span(ILS)을 계산하여 버섯 추출 조다당류가 암세포의 성장을 억제시킨 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 μ l씩 분주하였다. 50, 200, 500 μ g/ml 농도로 희석한 각각의 조다당류와 양성 대조군으로 사용한 5, 50 μ g/ml 농도의 lipopolysaccharide(LPS)를 100 μ l씩 처리하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하고 위의 MTT법과 동일한 방법으로 처리한 후 흡광도를 측정하였다(Mossman, 1983).

마우스의 B 림파구 활성화에 미치는 영향

Ohno 등(1986)의 방법에 따라 분화된 B 림파구의 표면에 발현되는 alkaline phosphatase를 측정하였다. 준비된 비장세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 well 당 100 μ l씩 분주하고 50, 200, 500 μ g/ml의 조다당류와 양성 대조군으로 5, 50 μ g/ml의 LPS(lipopolysaccharide)를 가함으로써 최종 부피가 200 μ l가 되도록 하였다. 37°C의 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 *p*-nitrophenyl phosphate를 첨가한 용액을 100 μ l씩 가한 다음 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시켰다. 차가운 0.3 N NaOH 용액 50 μ l를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 alkaline phosphatase activity를 다음 식에 따라 계산하였다.

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

Cytokine 분비에 미치는 영향

장미무당버섯 추출물이 생쥐의 비장세포를 자극하여 cytokine의 분비를 조절하는지를 알기 위하여 mouse interleukin-2(IL-2)와 mouse TNF- α ELISA kit(KOMA BIOTECH Co., Korea)를 이용하여 측정하였다. 무균적으로 비장을 적출하여 complete medium(10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 medium)에서 스테인레스 스틸 망을 통과시켜 단핵세포를 만들었다. 이로부터 얻은 세포는 Ficoll-Paque Plus 용액(Sigma, USA) 3 ml에 넣은 후 현탁액을 7 ml까지 세포가 섞이지 않도록 넣는다.

이 후 400 $\times$ g에서 30분 간 원심 분리하였다. 이 후 가운데 위치한 유핵세포를 얻어 혈구계산기를 이용하여 세포의 수를 계수하였고, trypan blue exclusion 방법(Allison, and Ridolpho, 1980)으로 생존율(85% 이상)을 확인하였다. 유핵세포를 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 Co. Korea)로 측정하였다. 비장 임파구 자극의 양성 대조군으로 T 세포(concanavalin A; ConA) 및 B 세포 mitogen(lipopolysaccharide; LPS)를 사용하였다. 실험에 사용된 장미무당버섯 추출 조다당류를 각각 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml로 첨가하여 비장면역세포의 자극능을 확인하였다.

총 복강세포 수에 미치는 영향 분석

6주령의 ICR 웅성 마우스를 실험군과 대조군으로 나누어 3일간 연속으로 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 버섯추출 조다당류를 복강 내에 투여하였고, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 조다당류 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.

혈 중 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 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 중량을 측정하였다. 실험군과 대조군의 상대장기 중량은 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 96.1 g이 추출되어 가장 높은 24.0%의 수득률을 보였고, 중성염에서는 7.7 g이 추출되어 1.9%의 수득률을 나타내었으며, 열수에서 가장 적은 2.8 g이 추출되어 0.7%의 수득률을 나타내었다(Table 1).

이 결과는 이 등(2007)이 뽕나무버섯부치의 자실체로부터 각각 메탄올과 중성염 용액으로 추출한 조다당류 23.6%와 1%에 비해 수득율이 높았고, 오 등(2004)이 저

Table 1. Recovery ratio of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Russula rosacea*

Fraction ^a	Weight of the used mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery rate ^b (%)
Fr. MeOH	400	96.1	24.0
Fr. NaCl	400	7.7	1.9
Fr. HW	400	2.8	0.7

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol without dialysis, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000), Fr. HW; Fraction extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000).

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

령의 균핵에서 각각 메탄올과 증성염 용액으로 추출한 조다당류 수득률 9.8%와 1.5%에 비해서도 높았다. 그러나 심 등(2003b)이 매미눈꽃동충하초의 자실체를 메탄올로 추출한 수득률 30.6%에 비해서는 낮게 나타났다. 이와 같이 버섯의 종류에 따라 추출된 조다당류의 양이 서로 다르게 나타난 것은 버섯에 따라 함유된 조다당류의 종류와

양도 다르고 또한 용매의 종류에 따라 추출되는 양도 다르기 때문에 사료된다.

세포에 대한 독성효과

암세포주와 정상세포주에 대한 장미무당버섯 추출 조다당류의 세포독성 실험 결과를 분석해 보면 암세포주인 Sarcoma 180과 HT-29에 대해서는 10~2000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약간의 세포독성을 나타내었으나 정상세포주인 NIH3T3에서는 메탄올 추출물 2000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 약 10%의 세포독성을 나타내고 대부분의 추출물 농도에서는 세포독성을 거의 나타내지 않았다(Fig. 1). 그러나 김 등(2006)이 뽕나무버섯의 자실체에서 증성염용액, 메탄올, 열수를 이용해 추출한 조다당류를 이용한 세포독성 실험에서는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았으나 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 30% 내외의 실험 세포주가 사멸해 세포독성이 약하게 나타났다. 그러나 삼색도장버섯(심 등, 2003b)과 흰목이(오 등, 2006)의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류의 세포독성실험에서는 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이하의

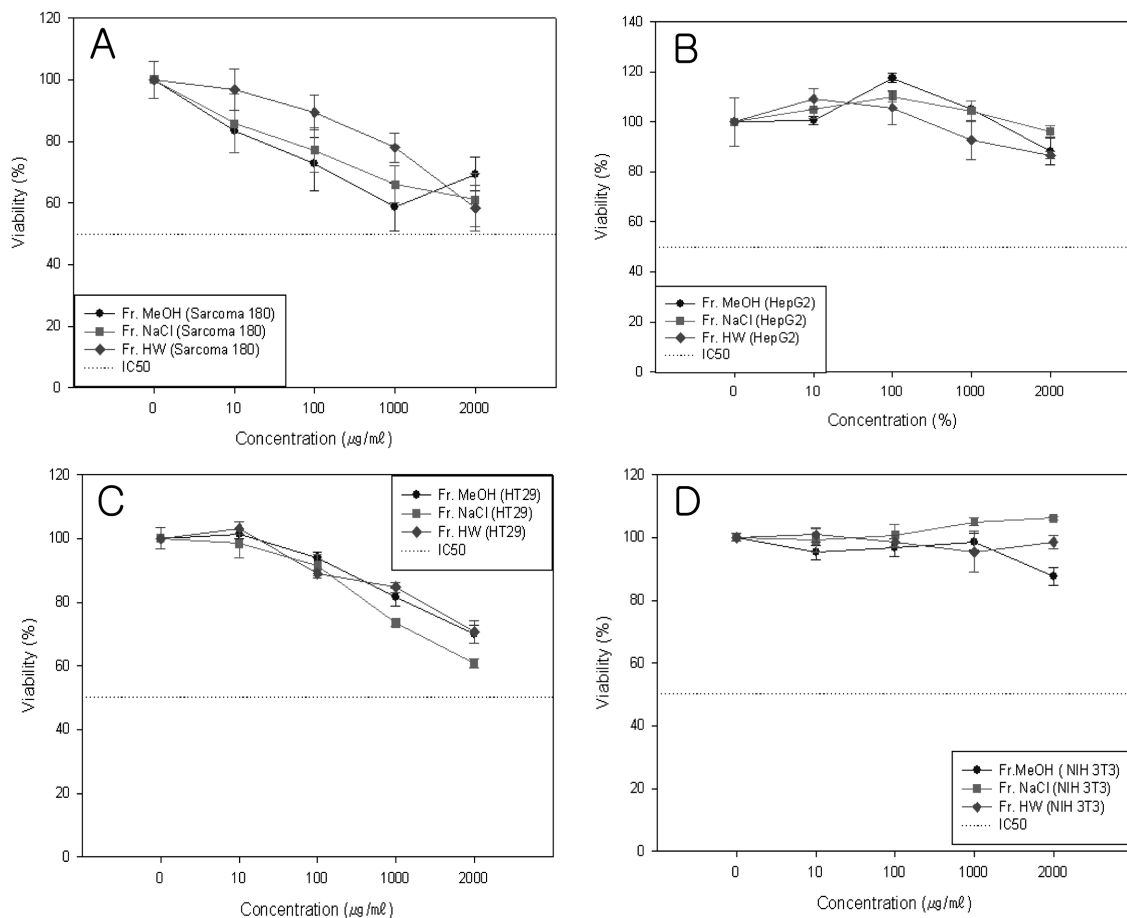


Fig. 1. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Russula rosacea* against (A) Sarcoma 180, (B) HepG2, (C) HT-29, (D) NIH3T3. Concentration of cells was 1×10^5 cells/well. The Fr. MeOH was extracted with 80% methanol without dialysis. The Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). The Fr. HW was extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). IC₅₀ means 50% inhibition concentration.

농도에서는 실험에 이용한 세포주인 NIH3T3와 Sarcoma 180에 대한 독성은 없었다. 따라서 버섯의 자실체 추출 조다당류의 생쥐 Sarcoma 180에 대한 항암효과는 세포독성에 의한 것이기 보다는 조다당류의 투여에 의한 생쥐의 면역증강 등에 의한 것으로 사료된다.

평균 수명 연장효과

장미무당버섯의 자실체에서 3 종류의 용매를 이용하여 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종된 생쥐에 주사하여 수명이 연장된 효과를 조사한 결과, 이들 생쥐의 수명은 3 종류의 조다당류 투여에 의해 약 21.4~45% 연장되었다. 대조군의 생쥐는 평균 생존 일수가 20일이었으나 열수로 추출한 조다당류를 20 mg/kg body weight로 투여한 실험군의 생쥐 평균 생존일수가 29일로 가장 길게 나타나 수명이 45% 연장되는 효과가 나타났다(Fig 2). 심 등(2003a)은 매미눈꽃동충하초의 자실체로부터 중성염용액으로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종된 생쥐에 투여하여 조사한 결과 수명연장효과가 32.3%로 본 실험에 비해서는 낮게 나타났다. 그러나 심 등(2003b)이 삼색도장버섯을 중성염 용액으로 추출한 조다당류를 생쥐에 투여한 실험에서는 생쥐의 수명이 77.4% 연장되어 본 실험의 결과에 비해 수명연장 효과가 크게 나타났다. 김 등(2006)은 Sarcoma 180을 접종한 생쥐에 뽕나무버섯의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180 접종생쥐에 투여하여 이들 생쥐의 수명이 대조군에 비해 67.5% 연장된다는 것을 보고하였고, 오 등(2006)도 흰목이의 자실체에서 중성염용액 추출 조다당류를 Sarcoma 180 접종생쥐에 투여하여 53%의 수명

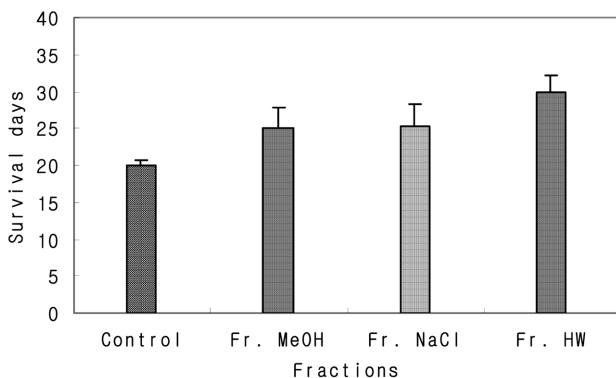


Fig. 2. Effect of crude extracts isolated from fruiting body of *Russula rosacea* on the life elongation of ICR mice^b inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection^c). ^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol without dialysis, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000), Fr. HW; Fraction extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). ^bEach experimental group consisted of 10 mice. ^ci.p. injection intraperitoneal injection.

연장 효과를 얻었다고 밝혔다. 따라서 약용버섯의 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180에 접종된 생쥐에 투여할 경우 수명이 최장 77.4% 정도 연장될 수 있을 것으로 사료된다.

비장세포의 증식에 미치는 영향

3종류의 조다당류 추출물에 대한 비장세포의 증식을 MTT법으로 관찰한 결과, 50~500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 중성염, 열수 및 메탄올 추출 조다당류는 대조군에 비해 1.42~2.15배의 증식능을 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 LPS는 5~50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 41.69~43.38배의 증식을 보여주었다(Fig. 3). 이 등(2007)은 뽕나무버섯부치의 자실체에서 메탄올, 중성염용액, 열수로 추출한 조다당류가 50~500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 약 1.8~2.1배 높게 증식하였으며, 양성대조군으로 사용된 LPS는 50~200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 약 2.4배 높게 증식되었다. 진(1996)은 액체 배양한 잣버섯의 균사체에서 추출한 다당류인 lepidan이 비장세포를 대조군에 비해 10배 이상 증식시켰으며, 또한 비장세포내의 B 임파구의 증식도 촉진시켰다고 보고하였다. 따라서 생체 내에서 면역에 관여하는 면역세포와 항체를 생산하는 비장 세포의 증식 촉진은 면역의 증강에 직접인 효과가 있어서 장미무당버섯을 비롯한 약용버섯의 자실체에서 추출한 조다당류의 비장세포 증식촉진은 Sarcoma 180에 대한 생쥐의 항암작용을 증진시키는 것으로 사료된다.

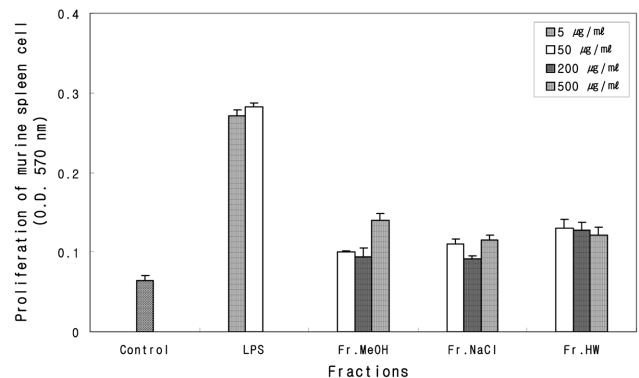


Fig. 3. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Russula rosacea* on proliferation of murine spleen cells. Concentration of spleen cells was 2×10^5 cells/ml. Proliferation of murine spleen cells was measured after 48 hours of incubation by MTT method. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol without dialysis. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). Fr. HW was extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

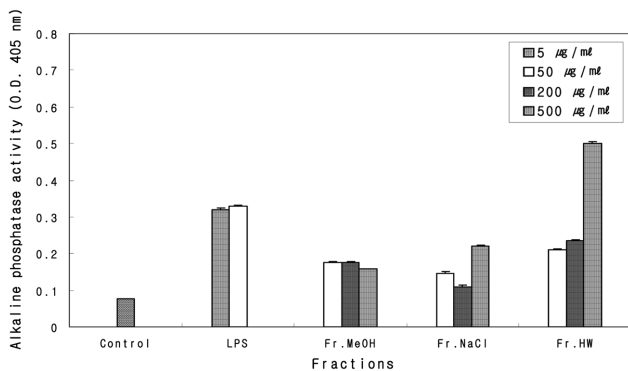


Fig. 4. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Russula rosacea* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows: Alkaline phosphatase activity (ρ -nitrophenol $\mu\text{mol}/1 \times 10^5$ lymphocytes/60 mins) = $1.15 \times$ optical density at 405 nm. MeOH was extracted with 80% methanol without dialysis. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). Fr. HW fraction was extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

생쥐의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

Alkaline phosphatase는 B 임파구에서 분비되며 면역의 활성화에 관여하는 효소이다. 장미무당버섯의 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수를 이용해 추출한 조다당류를 생쥐에 투여하여 alkaline phosphatase가 활성화된 양을 측정된 결과, 열수에서 추출한 조다당류가 50~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해서 약 2.7~6.8배의 높은 활성을 보였으나 같은 농도인 양성대조군 LPS에 비해서는 alkaline phosphatase 활성이 약간 낮게 나타났다(Fig. 4). 이 등 (2007)은 뽕나무버섯부치의 자실체에서 중성염용액과 열수를 이용하여 추출한 조다당류를 처리하여 alkaline phosphatase의 양을 측정된 결과 200~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해서는 2배의 높은 활성을 나타냈으나 LPS를 처리한 양성대조군에 비해서는 활성이 약간 증가되었다. 또한 김 등(2007)은 민긴뿌리버섯의 자실체에서 중성염으로 추출한 조다당류를 200~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 LPS를 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리한 양성 대조군에 비해 1.4배 높은 alkaline phosphatase의 활성이 나타났다고 보고하였다. 따라서 장미무당버섯을 포함한 대부분의 약용버섯 자실체에서 중성염용액, 메탄올 및 열수를 이용해 추출한 조다당류는 생쥐의 B 임파구를 활성화시키는 효과가 있는 것으로 보여 진다.

Cytokine 분비에 미치는 영향

장미무당버섯에서 추출한 조다당류가 세포수준에서 면역조절에 미치는 영향을 확인하기 위하여 생쥐의 비장 세

포에서 분비하는 cytokine(TNF- α , IL-2)의 양을 ELISA assay kit로 측정하였다. TNF- α 의 경우 메탄올로 추출한 조다당류는 1~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 범위에서 대조군에 비해 높은 활성을 보였다. 그리고 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 메탄올 및 중성염 추출 조다당류도 같은 농도의 양성대조군 Con A와 LPS에 비해서 높은 활성을 나타냈다. IL-2에서는 메탄올로 추출한 조다당류의 모든 농도에서 대조군과 양성 대조군인 ConA와 LPS에 비해 활성이 높았으며, 중성염 용액으로 추출한 조다당류는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서만 대조군과 양성 대조군인 ConA와 LPS 보다 활성이 높게 나타났다(Fig. 5). 이 등(2007)도 뽕나무버섯부치의 자실체에서 중성염용액, 메탄올 및 열수로 추출한 조다당류가 1~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 범위에서 대조군에 비해서 높은 TNF- α 의 활성을 보였으나 양성 대조군인 Con A나 LPS에 비해서는 이들 3 종류의 조다당류 활성이 각각의 농도에서 약간 높아지는 경향을 보였다. 따라서 본 실험의 결

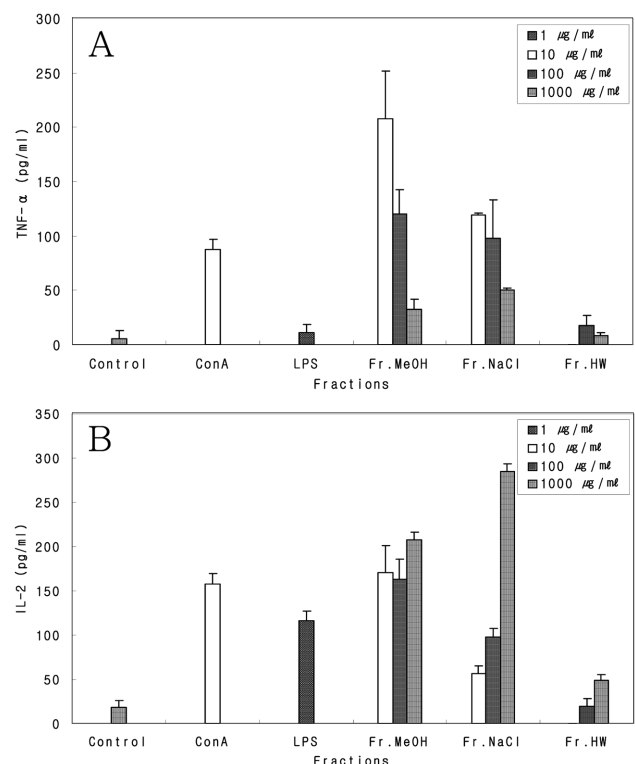


Fig. 5. Effects of fractions extracted from fruiting body of *Russula rosacea* on cytokine (A: TNF- α , B: IL-2) production in splenocytes. Concentration of splenocytes was 1×10^7 cells/ml. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol without dialysis. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). Fr. HW fraction was extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). 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.

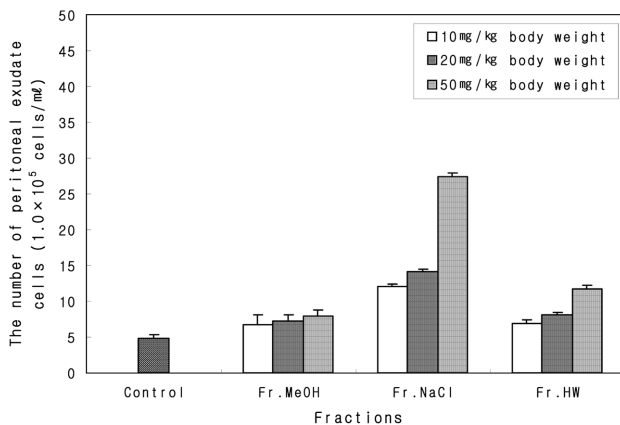


Fig. 6. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Russula rosacea* on the numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol without dialysis. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000). Fr. HW was extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000).

과 장미무당버섯에서 추출한 조다당류가 TNF- α 와 IL-2 사이토카인의 활성을 촉진시키므로써 이들 사이토카인이 생쥐에 면역을 증강시키고 항암효과를 높여 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐의 수명을 연장시키는 것으로 사료된다.

총 복강 세포 수에 미치는 영향

장미무당버섯에서 추출한 3종류의 조다당류에 대한 복강 세포의 수는 메탄올 및 열수 추출 조다당류에서 농도에 따라 약 1.4~5.6배 증가하였다(Fig. 6). 이와 같은 결과는 메탄올과 열수에서 추출한 조다당류가 복강 내 세포들을 활성화시켜 그 수를 증가시키는 데 큰 효과가 있는 것으로 판단된다. 이 등(2007)은 뽕나무버섯부치의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류를 10~50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포수가 대조군에 비해 1.5~3배 증가하였고, 중성염용액으로 추출한 다당류는 대조군에 비해 농도에 따라 1.5~3배 증가하였다. 또한 오 등(2006)은 흰목이의 중성염 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포 수가 대조군에 비해 7.4배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 장미무당버섯의 자실체 추출 조다당류가 투여된 생쥐의 복강세포 수 증가했다는 것은 이 버섯의 조다당류를 투여한 생쥐의 면역이 증강되어 Sarcoma 180에 대한 항암효과가 높아 질 수 있을 것으로 사료된다.

혈액 중 백혈구의 수에 미치는 영향

각각의 조다당류가 면역반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 장미무당버섯의 자실체에서 추출된 조다당류를 10, 20, 50 mg/kg body weight 농도로 조절하여 생쥐에 투여한 후 혈액 내의 백혈구 수를 조사하였다. 혈액 내의

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

Group ^a	Dose (mg/kg body weight)	No. of mice	No. of leukocytes ($\times 10^6/ml$)
Control	—	10	2.35 $\pm$ 0.34 ^b
Fr. MeOH	10	10	3.15 $\pm$ 0.01
Fr. MeOH	20	10	3.22 $\pm$ 0.02
Fr. MeOH	50	10	4.40 $\pm$ 0.28
Fr. NaCl	10	10	3.23 $\pm$ 0.08
Fr. NaCl	20	10	3.84 $\pm$ 0.30
Fr. NaCl	50	10	6.00 $\pm$ 0.03
Fr. HW	10	10	3.29 $\pm$ 0.25
Fr. HW	20	10	3.40 $\pm$ 0.14
Fr. HW	50	10	4.40 $\pm$ 0.57

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol without dialysis, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000), Fr. HW; Fraction extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000).

^bMean $\pm$ S.E.

백혈구 수는 대조군 2.35 $\pm$ 0.34에 비하여 메탄올 추출물 50 mg/kg body weight에서 4.40 $\pm$ 0.28으로 약 1.9배 증가하였으며, 중성염 추출 조다당류는 50 mg/kg body weight의 농도에서 2.6배의 증가를 나타냈다(Table 2). 이 등(2007)은 뽕나무버섯부치의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류를 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐 실험군의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.9배 증가하였고 가열수로 추출한 조다당류를 같은 농도로 투여한 생쥐의 백혈구 수는 1.4배 증가하였다. 따라서 위의 실험을 통해 장미무당버섯의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류가 투여된 생쥐의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.9배 증가한 것은 이 버섯의 조다당류가 생쥐의 백혈구 수를 증가시켜 면역을 증강시키는데 기여할 수 있다는 보여준 것으로 사료된다.

면역 장기의 중량에 미치는 영향

면역과 관련된 장기인 간, 비장, 흉선의 중량변화는 메탄올로 추출한 조다당류를 생쥐에 투여한 결과 각각의 농도에서 대조군과 유사한 양상을 보였다. 중성염으로 추출한 조다당류는 농도가 10~50 mg/kg body weight 일 때 대조군에 비해 간, 비장 및 흉선의 무게가 소폭으로 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, 이 등(2007)도 뽕나무버섯부치의 자실체를 중성염용액으로 추출한 조다당류 실험에서 생쥐의 간, 비장, 흉선의 무게가 대조군에 비해 다소 증가된 것을 확인되었다. 따라서 장미무당버섯을 비롯한 버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 생쥐에 투여하면 조다당류가 투여된 생쥐의 간, 비장, 흉선의 무게는 일반적으로 소폭 증가하는 경향을 나타내고 있는 것으로 사료된다.

Table 3. Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Russula rosacea* 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	37.70 ± 1.90	37.50 ± 2.90	37.40 ± 2.21	36.70 ± 1.50	36.60 ± 2.60	38.00 ± 2.50	37.1 ± 3.50	38.90 ± 3.50	38.20 ± 3.70
Liver weight (g)	1.76 ± 0.26	1.63 ± 0.13	1.57 ± 0.17	1.74 ± 0.20	1.53 ± 0.13	1.37 ± 0.17	2.09 ± 0.12	1.57 ± 0.15	1.65 ± 0.15	1.65 ± 0.15
Liver/Body (%)	5.51 ± 0.79	4.32 ± 0.02	4.32 ± 0.39	4.56 ± 0.90	4.39 ± 1.80	4.1 ± 1.10	4.36 ± 0.29	4.32 ± 0.67	4.28 ± 1.3	4.35 ± 0.87
Spleen weight (g)	0.18 ± 0.075	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.33 ± 0.05	0.33 ± 0.03	0.33 ± 0.67	0.36 ± 0.58	0.20 ± 0.14	0.25 ± 0.35	0.29 ± 0.58
Spleen/Body (%)	0.57 ± 0.25	0.59 ± 0.32	0.62 ± 0.12	0.79 ± 0.32	0.81 ± 0.18	0.91 ± 0.18	0.94 ± 0.82	0.53 ± 0.82	0.64 ± 0.83	0.76 ± 0.12
Thymus weight (g)	0.28 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.24 ± 0.13	0.22 ± 0.06	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.23 ± 0.00	0.22 ± 0.05
Thymus/Body (%)	0.88 ± 0.14	0.58 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.61 ± 0.08	0.59 ± 0.14	0.59 ± 0.12	0.60 ± 0.51	0.59 ± 0.18	0.59 ± 0.39	0.58 ± 0.69

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol without dialysis, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000), Fr. HW; Fraction extracted with hot water and dialyzed with dialysis tube (MW. 12,000).

^bMean ± S.E.

적 요

장미무당버섯은 담자균문, 주름버섯목, 무당버섯과에 속하며 맛이 좋은 식용 버섯으로 예로부터 암의 치료에 효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 장미무당버섯의 자실체로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올을 이용하여 조다당류를 추출하고 ICR mice에 주사하여 항암 및 면역증강 효과를 조사하였다. Sarcoma 180, HepG2, HT-29, NIH3T3 등의 암세포에 대한 독성을 조사한 각각의 암세포는 10~2000 $\mu\text{g/ml}$ 의 조다당류 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다. 각각의 조다당류가 투여된 실험군은 대조군에 비해 수명이 각각 21.4~45% 연장되었다. 열수로 추출한 조다당류는 B 임파구의 alkaline phosphatase 활성을 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 약 6.8배의 증가시켰다. 중성염추출 조다당류를 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 생쥐의 총 복강 세포 수와 백혈구의 수는 대조군에 비하여 각각 6배와 2.6배로 증가하였다. 또한 면역에 관련된 장기인 간, 비장 및 흉선의 체중이 대조군에 비하여 소폭 증가된 것으로 조사되었다. 따라서 장미무당버섯의 자실체에서 추출한 조다당류가 Sarcoma 180에 대한 항암작용을 나타내는 것은 이들 조다당류가 Sarcoma 180에 대한 세포독성효과가 아니고 면역을 증강시킨 효과에 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 자실체로부터추출한 조다당류의 항암 및 면역 활성 효과에 관한 연구. 한국균학회지 35:109-114.
- 박완희, 이호득. 2002. 한국의 버섯. 교학사.
- 심성미, 임경환, 이우윤, 김정완, 심미자, 이민웅, 이태수. 2003a, 매미눈꽃등충하초(*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.
- 이진우, 김혜영, 이우윤, 이태수. 2007. 뽕나무버섯부치(*Armillaria tabescens*)의 자실체에서 추출한 조다당류의 생쥐 Sarcoma 180에 대한 항암 및 면역증강 효과. 한국균학회지 35:101-108.
- 이영경, 한명주, 박순영, 김동현. 2000. 상항버섯 자실체의 *in vitro* 및 *in vivo* 항암활성. Kor. J. Food Sci. Technol. 32:477-480.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승헌, 유익동. 1995a. *Fomitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성 다당류(I)-중성염 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.
- Allison, D. C. and Ridolpho, P. 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.
- 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.
- Ji, J. H. and Kim, M. N. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 29:322-330.
- 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.
- 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.