

신령버섯(*Agaricus brasiliensis*) 자실체 추출 조다당류의 항암 및 면역증강 작용

차윤정 · 김정화 · 이태수 · 이우윤*

인천대학교 생명과학부

Antitumor and Immuno-potentiating Activities of Crude Polysaccharides from Fruiting Body of *Agaricus brasiliensis*

Youn Jeong Cha, Jeong Hwa Kim, Tae Soo Lee and U-Youn Lee*

Division of Life Sciences, University of Incheon, Incheon 406-772, Korea

(Received 15, March 2011., Accepted 21, March 2011)

ABSTRACT : *Agaricus brasiliensis*, one of edible mushroom belonging to Basidiomycota, has been used for curing gastric ulcer and stomach cancer of human beings and also 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 prepared from fruiting body of the mushroom. β -glucan and total protein contents were identify from fractions of edible mushrooms extract. The β -glucan and protein contents of all fractions of the mushrooms ranged from 21.54~32.31% and 0.16~9.34%, respectively. *In vitro* cytotoxicity tests, crude polysaccharides were not cytotoxic against cancer cell lines such as Sarcoma 180, HT-29, NIH3T3 and RAW 264.7 at the concentration of 10~2000 μ g/ml. Intraperitoneal injection with crude polysaccharides exhibited life prolongation effect of 18.8~50.6% in mice previously inoculated with Sarcoma 180. Fr. HW increased the numbers of spleen cell by 1.2 fold at the concentration of 200 μ g/ml compared with control. Fr. MeOH and Na improved the immuno-potentiating activity of B lymphocyte by increasing the alkaline phosphatase activity by 1.6 fold compared with control at the concentration of 50~500 μ g/ml. Fr. Na generated 15.9 μ M of nitric oxide (NO) when cultured with RAW 264.7 at the concentration of 200 μ g/ml, while lipopolysaccharide, a positive control, produced 3.7 μ M. The Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH increased the secretion of TNF- α , IL-1 β , IL-2 and IL-6 by 2.2 times compared with the control group. Fr. Na increased the numbers of peritoneal exudate cells by 4 folds at the concentration of 50 mg/kg compared with control. Circulating leukocytes increased by 2.7 folds when Fr. HW from *A. brasiliensis* was inoculated at the concentration of 50 mg/kg body weight. The hematological and blood chemical analysis of the 3 fractions did not show any difference in blood compositions and enzyme activities compared with the control group ($p < 0.05$). Therefore, the experimental results suggested that crude polysaccharides extracted from *A. brasiliensis* contain antitumor and immuno-potentiating activities against Sarcoma 180 in ICR mice.

KEYWORD : *Agaricus brasiliensis*, Antitumor, Crude polysaccharides, Immuno-potentiating

서 론

사람의 삶의 질이 풍족해지고 수명이 연장되면서 특정한 병의 발생이 증가하고 있다. 통계청의 사망원인 통계에 따르면, 우리나라의 사망률 1위의 질병은 암으로 2009년 총 사망자수 246,942명 중 암 사망자수는 69,780명으로 전체 사망자의 28.3%를 차지하고 있다. 암의 발병요인은 유전적 이거나 대부분 잘못된 식습관에 의한 것으로 알려져 있다. 암의 치료 방법으로는 외과적 수술요법, 방사선요법, 화학요법 등이 있으며 최근에는 숙주의 대식세포를 자극하여 interferon- γ 나 interleukin-2 등의 cytokine방출을 촉진시켜

암세포를 괴사시키는 면역 또는 생물학적 요법이 주목을 받고 있다(Kato *et al.*, 1981). 이러한 면역요법이나 생물학적 요법에 쓰이는 제제들을 생물학적 반응 조절물질(Biological Response Modifier; BRM)이라 한다. BRM이란 각종 면역항체증강이나 생체활성조절물질의 총칭이며 숙주의 종양세포에 대한 대응력을 변화시켜 종양세포에 대한 치료 효과를 향상시키는 물질로서 채소, 과일, 곡물 등의 천연산물에 들어있는 β -glucan이 중요한 BRM로 알려져서 현재 의약품이나 식품에 첨가되어 이용되고 있다(Wasser and Weiss, 1999).

균류의 하나인 버섯의 세포벽에 존재하는 β -glucan은 널리 알려져 있는 BRM중에 하나로 이미 세 종류의 제제가 개발되어 의약품으로서 실용화 되었다. Lentinan은 Chihara 등(1969)이 표고의 자실체로부터 분리한 것으로 Sarcoma 180

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

에 대해 강력한 종양 억제효과가 있다는 것을 보고 하였고 위암의 주사약으로서 1985년에 발매되었다. Tsukagoshi 등(1974)은 구름버섯의 배양균사체로부터 Krestin을 분리하였고 1977년에 폐암, 유방암, 소화기암의 치료약으로 시판되었다. Komatsu 등(1969)이 치마버섯으로부터 분리한 Sonifilan은 자궁 경부암등을 치료하는 주사약으로서 1986년에 시판되었다. 우리나라에서는 상황버섯의 액체배양 균사체에서 추출한 β -glucan이 강한 항암작용을 갖고 있다는 것이 밝혀져 이를 Mesima-X라는 상품명으로 판매가 되고 있다(Lee et al., 1996). 따라서 버섯의 자실체와 균사체로부터 유래한 추출물의 항암효과에 대한 연구는 현재까지도 계속해서 많은 연구가 진행되고 있다.

신령버섯(*Agaricus brasiliensis*)은 분류학적으로 주름버섯목, 주름버섯과, 주름버섯속에 속하는 버섯으로 주로 남미의 브라질 동남부 상파울루 지방의 부식질이 많은 산지에서 자생하나 최근 미국 플로리다주와 노스캐롤라이나주의 해안 초지와 평원에도 자생하는 것이 보고되었다. 건조한 신령버섯의 성분은 단백질 40~45%, 탄수화물 38~45%, 섬유질 6~8%, 지방 3~4%, 회분 5~7%로 영양이 풍부하며, 혈당강하, 혈압강하 및 콜레스테롤을 저하하는 효과가 있으며 이외에도 면역력을 증진하고 암을 예방하는 효과도 있는 것으로 알려져 있다(Park and Lee, 1991; Wasser, 2002).

본 연구는 국내에서 재배한 신령버섯의 자실체를 중성염 용액(0.9%), 메탄올(80%) 및 열수를 이용하여 조다당류를 추출한 후 *in vitro*와 *in vivo*에서 여러 암세포에 대한 독성과 생쥐의 Sarcoma 180에 대한 면역증강과 항암에 관한 연구를 수행한 것이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서는 구매한 신령버섯(*Agaricus brasiliensis*)의 자실체를 사용하여 수행하였다. 자실체를 80°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시키고 마쇄한 후 -70°C의 저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

Cho 등(1995a; 1995b)과 Shim 등(2003a; 2003b)의 방법에 따라 신령버섯의 자실체를 80% 메탄올, 중성염용액(0.9% NaCl) 및 열수로 추출하였으며, 추출된 각각의 물질의 수율을 조사하였다.

실험동물

5주령의 음성 ICR mouse (25~27 g)를 Orient Bio사(Seongnam, Korea)로부터 구입하여 polycarbonate cage 당 5마리씩 넣은 후 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%, 12시간 간격으로 명암이 자동 조절되는 사육실에서 1주일 동안 적응시켰다. 사료와 음수는 제한하지 않았고 사료는 Orient

Bio사의 실험동물용 고형사료를 구입하여 사용하였으며 실험은 인천대학교 동물실험윤리위원회의 지침을 준수하여 수행하였다.

항암 성분의 화학적 분석

β -glucan의 함량 측정

β -glucan의 측정은 mushroom and yeast β -glucan kit (Megazyme International Ireland Inc., K-YBGL, Ireland)를 이용하여 측정하였다. 버섯추출 다당류 5 mg에 hydrochloric acid(37% v/v)를 75 μ l 넣고 30°C의 항온수조에서 45분간 교반시킨 후 500 μ l의 3차 증류수를 넣고 100°C의 항온수조에서 2시간 동안 반응을 시켰다. 식힌 반응물에 2N KOH를 500 μ l 넣고 혼합한 다음 원심분리(1,500 $\times$ g, 10 min)하여 상등액을 얻었다. 상등액 50 μ l에 exo-1,3- β -glucanase(20 U/ml) + β -glucosidase(4 U/ml) 용액을 50 μ l 넣고 40°C에서 60분간 반응시킨 후 GOPOD 시약을 1.5 ml 넣고 40°C에서 20분간 반응 후 510 nm 파장에서 total glucan을 측정하였다. 또한 버섯추출 다당류 5 mg에 2N KOH를 100 μ l 넣고 20분간 혼합한 뒤 400 μ l의 1.2 M sodium acetate buffer(pH 3.8)와 amyloglucosidase(1630 U/ml) + invertase (500 U/ml)를 넣어 40°C 항온수조에서 30분 동안 반응시킨 후 원심분리(1,500 $\times$ g, 10 min)하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액 50 μ l에 sodium acetate buffer(200 mM, pH 5.0)를 50 μ l 넣은 뒤 GOPOD 시약을 1.5 ml 넣고 40°C에서 20분간 반응 후 510 nm 파장에서 α -glucan을 측정하였다. β -glucan은 total glucan과 α -glucan을 측정하여 얻어진 흡광도 값을 표준물질인 glucose를 이용하여 %(w/w)농도로 각각 계산 하고, total glucan에서 α -glucan을 빼주어 β -glucan함량을 구하였다.

총 단백질의 함량 측정

Bradford(1976)의 방법에 준하였고 bovine serum albumin (BSA, Sigma Co., USA)을 표준으로 하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 검량선으로부터 추출물 중 총 단백질의 함량을 측정하였다.

세포독성 실험

실험에 사용한 암세포는 인간 대장암세포 HT-29, 마우스 복수암세포 Sarcoma 180, 정상세포는 마우스 섬유아세포 NIH3T3, 마우스 대식세포주 RAW 264.7 이었다. 세포독성 실험은 Denizot과 Lang(1986)의 방법에 따라 수행하였다. HT-29, NIH3T3 및 RAW 264.7 세포는 1×10^5 cells/ml가 되도록하여 96 well microtiter plate에 100 μ l씩 주입한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2000 μ g/ml이 되도록 조정한 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 l에 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 각각의 조다당류 최종 농도를 10~2000 μ g/ml이 되도록 세포에 처리하여 최종 용적이 100 μ l가 되도록 하고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-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. 암세포의 생존율은 실험군의 흡광도와 대조군의 흡광도를 비교하여 구하였다.

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

T : 실험군의 평균 흡광도

C : 대조군의 평균 흡광도

B : Blank

수명연장 실험

신령버섯의 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180 복수암을 유발시킨 웅성 ICR mouse에 투여하여 수명연장에 미치는 효과를 조사하였다. 복수암은 4°C의 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4, Gibco BRL., USA) 5 ml에 5×10^6 cells/ml의 Sarcoma 180을 부유시킨 후 생쥐의 복강에 0.2 ml(1×10^6 cells/ml)씩 주사기로 이식하여 유발시켰다. Sarcoma 180을 이식한 24시간 전후에 추출한 조다당류를 20 mg/kg body weight의 농도로 생리식염수에 용해하고 0.22 μ m의 membrane filter로 여과한 후 각각의 추출물을 매일 1회 10일간 복강 내에 0.2 ml씩 주사기로 투여하였다. 대조군에는 같은 기간 동안 동량의 생리식염수를 투여하였다. 평균 수명 일수는 Sarcoma 180을 이식한 후 생쥐가 사망할 때까지의 일수를 관찰하여 계산하였다. 또한 아래의 식으로 Increase of life span(ILS)을 계산하여 Sarcoma 180을 이식한 생쥐에 신령버섯의 자실체 추출 조다당류를 투여하여 나타나는 수명연장의 효과를 측정하였다.

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

C : 대조군의 평균 수명 (일)

T : 실험군의 평균 수명 (일)

비장세포의 증식에 미치는 효과

비장세포의 증식능은 WST-1 assay로 측정하였다. 6주령의 ICR 수컷 생쥐를 경추 탈골하여 치사시키고 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망(Bellco Glass Inc., USA) 위에서 분쇄하였다. 이로부터 얻어진 세포 부유액을 2배 부피의 lymphocyte separation medium(PAA Laboratories GmbH, Austria)에 조심스럽게 첨가하여 400 $\times$ g에서 20분 동안 원심

분리 하였다. 단핵 세포층만 조심스럽게 취하여 300 $\times$ g에서 5분씩 3회 원심분리하여 비장세포를 준비하였다. 생쥐의 비장세포를 2×10^5 cells/ml가 되도록 10% heat-inactivated FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 96 well plate에 100 μ l씩 분주하였다. 50, 200, 500 μ g/ml 농도로 희석한 각각의 조다당류 100 μ l와 5, 50 μ g/ml 농도의 lipopolysaccharide (LPS, Sigma Co., USA)를 100 μ l씩 처리한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 암 조건에서 5 mg/ml 농도의 WST-1 solution을 각 well당 10 μ l씩 첨가한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 4시간동안 배양한 뒤 microplate plate reader를 이용하여 440 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 효과

분화된 B 임파구 표면에 발현되는 alkaline phosphatase의 활성을 측정하기 위해 Kurihara 등(2003)의 방법을 수정하여 실험에 사용하였다. 비장세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 각 well 당 100 μ l 씩 분주하고 50, 200, 500 μ g/ml의 추출물과 5, 50 μ g/ml의 LPS를 가하여 37°C의 5%의 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. -70°C에서 얼리고 37°C 항온수조에서 녹이는 작업을 3회 반복하여 세포를 터트리는 과정을 거쳤다. 세포부유액 25 μ l에 1 mM MgCl₂를 포함한 50 mM sodium carbonate buffer에 1 mg/ml가 되도록 p-nitrophenyl phosphate (Sigma Co., USA)를 첨가한 용액을 100 μ l를 넣고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시켰다. 빙냉의 0.3 N NaOH 용액 50 μ l를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, alkaline phosphatase 1 unit은 1×10^5 lymphocyte에서 발현되는 효소가 37°C에서 1시간동안 1 μ M의 p-nitrophenol을 절단할 수 있는 양으로 정의하였다. B 임파구의 alkaline phosphatase 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

Alkaline phosphatase activity

(p-nitrophenol μ mol/ 5×10^5 lymphocytes/60 min)

$$= 1.15 \times \text{OD}_{405}$$

대식세포 활성화에 미치는 효과

활성화된 대식세포가 nitric oxide(NO)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 생쥐의 단핵구 기원의 RAW 264.7 세포주를 이용하여 NO의 생성량을 NO detection kit(iNtRON Biotech. Inc. Korea)로 측정하였다. RAW 264.7의 세포를 96 well plate에 1×10^5 cells/ml로 100 μ l분주하고 조다당류의 최종농도가 50, 100, 200 μ g/ml가 되도록 하여 100 μ l 첨가하였으며, 양성 대조군으로 1, 10, 50 μ g/ml의 LPS를 첨가하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. Cell debris를 제거한 배양 상등액을 각 well당 100 μ l씩 분주하고 sulfanilamide가 함유된 N1 buffer(substrate solution)를 50 μ l 첨가한 후 상온에서 10분간 반응시킨 후 naphthylethylenediamine이 함유된 N2 buffer(coloring solution)

를 첨가하여 상온에서 10분간 발색시켜 ELISA plate reader를 사용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 RAW 264.7에 대한 NO 생성농도의 정량은 1 mM의 nitrite를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 계산하여 측정하였다.

Cytokine의 분비에 미치는 효과

신령버섯의 자실체에서 추출한 조다당류가 생쥐의 비장세포를 자극하여 cytokine의 분비에 관여하는지 알아보기 위해 생쥐의 TNF- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2(IL-2) 그리고 interleukin-6(IL-6)를 ELISA Kit(KOMA BIOTECH Co., Korea)를 이용하여 측정하였다. 6주령의 ICR 계열 수컷 생쥐에서 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 세포를 Ficoll-Paque Plus 용액(Sigma, USA) 3 ml에 넣고 현탁액을 7 ml까지 세포가 섞이지 않도록 넣은 후 400 $\times$ g로 30분 간 원심 분리하였다. 이 후 가운데 위치한 유핵세포의 수를 혈구계산기를 이용하여 계수하였고, trypan blue exclusion 방법(Allison and Ridolpho, 1980)으로 생존율(85% 이상)을 확인한 후 유핵세포를 5×10^6 cells/ml로 맞추고 버섯 추출 조다당류를 각각 10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 1000 μ g/ml의 농도로 24 well plate에서 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 상등액에 분비된 싸이토카인(TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6)의 양을 ELISA Kit(KOMA BIOTECH Co. Korea)를 이용하여 측정하였다. 양성대조군으로는 T 세포(concanavalin A; ConA) 및 B 세포 mitogen (lipopolysaccharide; LPS)을 사용하였다.

총 복강세포 수에 미치는 효과

6주령의 ICR 수컷 생쥐를 각각 실험군과 대조군으로 나누어 3일간 연속으로 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 잎새버섯 추출 조다당류를 복강 내에 투여하였으며, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 조다당류를 투여한 최종일로부터 24시간 후 마우스를 경추 탈골시키고 10 ml의 PBS buffer(pH 7.2)로 복강 내를 세척하여 복강세포를 채취하고 Turk's solution으로 염색한 후 혈구계수기를 이용하여 총 복강세포의 수를 측정하였다.

혈 중 백혈구 수에 미치는 효과

6주령의 ICR 수컷 생쥐를 실험군과 대조군으로 각각 5마리씩 나누어 추출한 조다당류를 10일간 연속으로 복강 내에 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 0.2 ml씩 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수를 투여하였다. 조다당류 투여 최종일로부터 2일 후 심장채혈하여 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)가 들어있는 용기(Becton Dickinson Ltd., USA)에 넣어 골고루 섞은 후 자동혈구분석기

(XE-2100, SYSMEX Co., Japan)로 백혈구(white blood cell, WBC)의 수를 측정하였다.

혈액 생화학적 검사

6주령의 ICR 수컷 생쥐를 각각의 군 당 5마리씩으로 나누고 복강 내에 버섯 추출물을 10, 20, 50 mg/kg body weight으로 10일간 연속 투여하였으며, 대조군은 생리식염수를 투여하였다. 추출물의 투여 최종일로부터 2일 후 혈액을 채취하여 혈액생화학적 검사에 사용하였다. 혈액을 원심 분리관에 넣고, 2,400 $\times$ g에서 10분 동안 원심 분리하여 얻은 혈청으로 총 단백(total protein), blood urea nitrogen(BUN), creatinine, bilirubin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase(AST), Alkaline phosphatase (ALP) 등을 혈액화학검사 자동분석장치(HITACHI Co., Clinical analyzer 7600, Japan)로 측정하였다.

결과 및 고찰

성분의 추출 및 분리

3종류의 용매를 이용하여 추출한 조다당류의 수득률은 80%의 메탄올에서 31.54 g이 추출되어 가장 높은 39.42%의 수득률을 보였고, 중성염에서는 4.97 g이 추출되어 6.21%의 수득률을 나타내었으며, 열수에서 가장 적은 1.80 g이 추출되어 2.25%의 수득률을 나타내었다(Table 1). 이 결과는 매미눈꽃동충하초의 자실체에서 메탄올을 이용하여 추출한 수득률 30.6%(Shim *et al.*, 2003a), 장미무당버섯의 자실체로부터 메탄올로 추출한 수득률 24%(Choi *et al.*, 2008)에 비해서는 낮았으나 흰목이의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류 수득률 8.8%에 비해서는 높았다(Oh *et al.*, 2006). 이와 같이 각각의 버섯 조다당류의 수득률이 다르게 나타난 것은 각각의 버섯이 함유한 세포내의 다당류의 성분이 차이가 있기 때문인 것으로 사료된다.

항암에 관여하는 성분의 화학적 분석

신령버섯의 버섯추출 조다당류에 함유된 β -glucan와 단백

Table 1. The recovery rate of crude polysaccharides extracted from *Agaricus brasiliensis*

Fractions ^a	Weight of the dry mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery rate (%) ^b
Fr. MeOH	80	31.54	39.42
Fr. NaCl	80	4.97	6.21
Fr. HW	80	1.80	2.25

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

^bRecovery rate (%)

= [Dry weight of extract (g) / Dry weight of the mushroom used in the experiment (g)] $\times$ 10

질의 함량을 알아본 결과, 조다당류의 함량은 21.54~32.31%, 단백질의 함량은 0.16~9.34%이었다(Table 2). 이 결과는 Um 등(2010)이 느타리 버섯속의 노랑느타리의 자실체에서 80%의 에탄올로 추출한 37.67%의 β -glucan에 비해서는 적었지만 노랑느타리의 19.03%에 비해서는 많았다.

세포독성 효과

신령버섯 추출 조다당류의 정상세포와 암세포에 대한 직접적인 세포독성 실험 결과 암세포인 HT-29와 정상세포인

Table 2. Polysaccharides and protein contents of fractions extracted from *Agaricus brasiliensis*

Fractions ^a	β -D-glucan ^b (mean $\pm$ S.E.)	Protein ^c (mean $\pm$ S.E.)
Fr. MeOH	21.54 $\pm$ 3.24	0.16 $\pm$ 0.98
Fr. NaCl	28.78 $\pm$ 1.28	4.78 $\pm$ 0.58
Fr. HW	32.31 $\pm$ 0.96	9.34 $\pm$ 1.01

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

^b β -D-glucan contents were quantitatively determined by mushroom and yeast β -glucan kit and expressed as the weight percentage. 1 mg/ml used for each experiment.

^cTotal protein contents were quantitatively determined by Bradford reaction and expressed as the weight percentage. 1 mg/ml used for each experiment.

NIH3T3와 RAW 264.7에 대해서는 10~2000 μ g/ml의 농도에서 세종류의 용매로 추출한 조다당류 모두 독성을 나타내지 않았으나 생쥐의 육종암 세포인 Sarcoma 180은 증성염 용액 추출 조다당류 2000 μ g/ml의 농도에서 독성을 보였다(Fig 1). 송이의 자실체에서 3종류의 용매로 추출한 조다당류를 이용한 세포독성 실험에서는 10~2000 μ g/ml 범위의 농도에서만 Sarcoma 180과 HT-29에 대해서만 약간의 독성을 나타내었고 정상세포주인 NIH3T3에는 독성을 나타내지 않았다(Hur *et al.*, 2008). 장미무당버섯의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류의 세포독성 실험에서는 1000~2000 μ g/ml 범위의 농도에서만 Sarcoma 180에 대해 약간의 독성을 나타내었고 다른 세포주인 HepG2, HT-29 및 NIH3T3는 10~2000 μ g/ml의 농도범위에서 독성을 나타내지 않았다(Choi *et al.*, 2008). 그러나 삼색도장버섯과 흰목이의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류 세포독성실험에서는 1000 μ g/ml 이하의 농도에서는 NIH3T3와 Sarcoma 180 세포주에 대한 독성은 없었으나 2000 μ g/ml의 농도에서는 독성이 약하게 나타났었다(Shim *et al.*, 2003b; Oh *et al.*, 2006). 따라서 버섯의 자실체에서 추출된 조다당류가 실험에 사용한 세포주에 대한 독성에 차이가 나타나는 것은 버섯의 자실체를 구성하는 다당류와 단백질의 성분이 다르기 때문인 것으로 판단된다.

생쥐의 수명연장 효과

신령버섯의 자실체에서 3종류의 용매를 이용하여 추출한

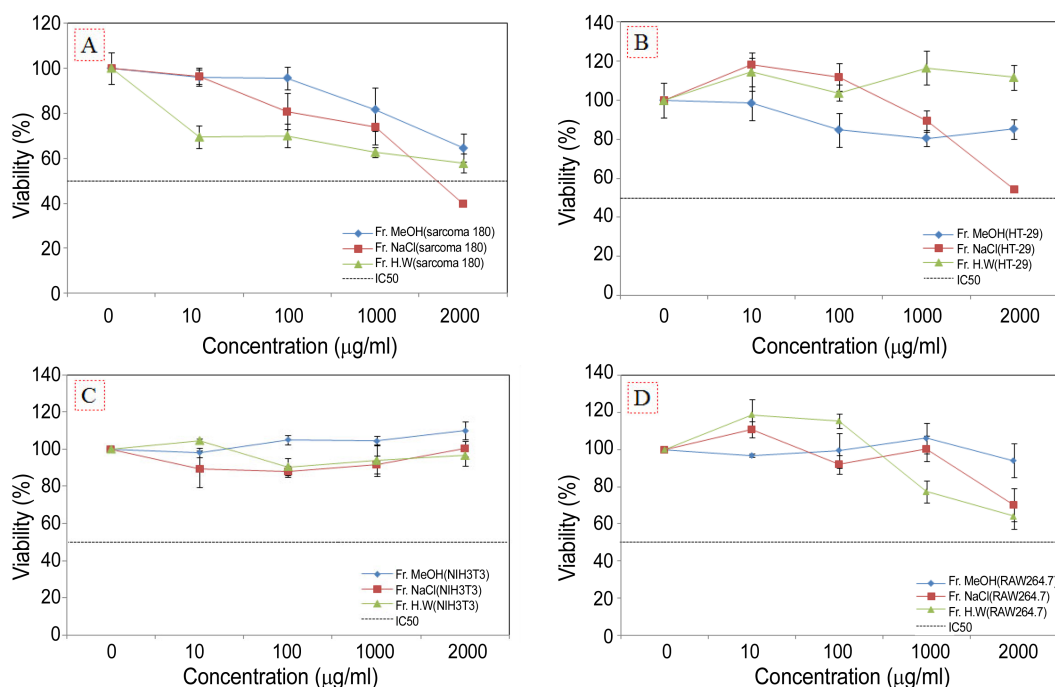


Fig. 1. *In vitro* cytotoxicity^a of fractions^b extracted from fruiting bodies of *Agaricus brasiliensis* against (A) Sarcoma 180, (B) HT-29, (C) NIH3T3, (D) RAW 264.7.

^aCytotoxicity was measured after 24 hours of incubation.

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

^cConcentration of cells was 1×10^5 cells/ml.

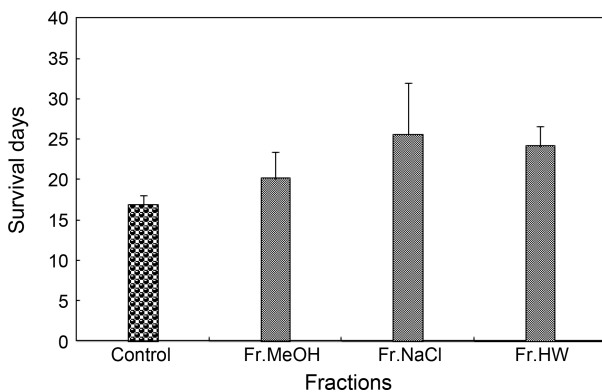


Fig. 2. Effect of crude extracts isolated from edible mushrooms on the life span of ICR mice inoculated with Sarcoma 180 (i. p.)

^aFr. MeOH, fractions extracted with 80% methanol; Fr. NaCl, fractions extracted with 0.9% NaCl solution; Fr HW, fractions extracted with hot water. Each experimental group consisted of 5 mice.

^bmg/mk body weight.

^cSurvival days of each animal in experimental group were counted individually and the mean survival days (M±S.E., mean±standard error) of each group were calculated.

^dILS, Increase of life span.

조다당류를 Sarcoma 180 접종생쥐에 주사하여 수명이 연장된 효과를 조사한 결과, 이들 생쥐는 3종류의 조다당류 투여에 의해 수명이 18.8~50.6% 연장되었다. 대조군의 생쥐는 평균 생존 일수는 17일이었으나 중성염 추출 조다당류를 20 mg/kg body weight로 투여한 실험군 생쥐의 평균 생존일수는 25.6일로 나타나 수명을 50.6% 연장시키는 것으로 나타났다(Fig. 2). 본 실험 결과를 대향고 자실체와 금목이의 자실체를 각각 열수와 메탄올로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 투여 후 나타난 수명연장효과와 비교한 결과 대향고의 67.5%와 금목이의 66.7%에 비해서는 낮았으나(Lee *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2008b), 송이의 자실체에서 열수로 추출한 조다당의 수명연장효과 37.2%에 비해서는 높았다(Hur, *et al.*, 2008). 따라서 이제까지 여러 종류의 약용버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 투여할 경우 생쥐의 수명은 대조군에 비해 최소 37.2%에서 66.7% 정도 연장이 가능한 것으로 보여 진다.

비장세포의 증식에 미치는 효과

3종류의 서로 다른 용매로 추출한 조다당류가 비장세포의 증식에 미치는 영향을 WST-1 assay를 이용하여 관찰하였다. 3종류의 용매를 이용하여 추출한 조다당류는 50~500 µg/ml 농도에서 비장세포의 수를 대조군에 비해 1.1~1.2배 증식시키는 것으로 나타났다. 양성 대조군으로 사용된 LPS는 5~50 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 비장세포의 수를 각각 1.2배와 1.4배 증식시켜 LPS가 신령버섯에서 추출한 조다당류보다는 비장 세포를 증식시키는 능력이 높게 나타났다

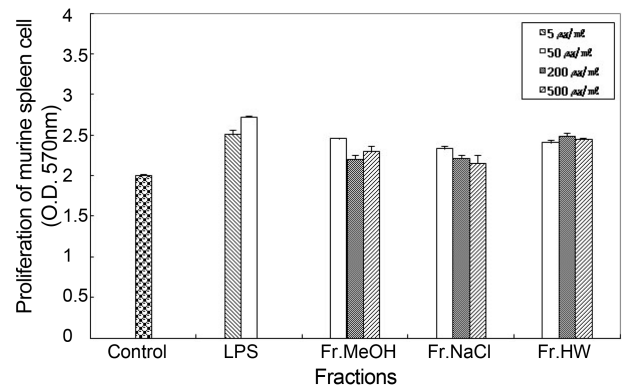


Fig. 3. Effect of three fractions^a extracted from fruiting bodies of *Agaricus brasiliensis* on proliferation of murine spleen cells^{b,c,d}.

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

^bProliferation of murine spleen cells was measured after 48 hours of incubation by WST method.

^cConcentration of splenic lymphocytes was 2×10^5 cells/ml.

^dLPS, Lipopolysaccharide was used for positive control.

(Fig. 3). Lee 등(2007)은 뽕나무버섯부치의 자실체에서 메탄올, 중성염용액, 열수로 추출한 조다당류가 50~500 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 약 1.8~2.1배 높게 증식하였으며, 양성대조군으로 사용된 LPS는 50~200 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 약 2.4배 높게 증식되었다. 또한 Lee 등(2008a)은 금목이의 자실체에서 메탄올, 중성염용액, 열수로 추출한 조다당류가 50~500 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 약 1.6~2.0배 높게 증식하였으며, 반면 양성대조군으로 사용된 LPS는 5~50 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 2.2~2.6배 높게 증식하여 LPS가 금목이에서 추출한 조다당류보다 비장의 세포수를 증식시키는 능력이 높게 나타났다고 보고하였다. 따라서 실험에 사용한 대부분 버섯의 자실체에서 추출한 조다당류가 생쥐의 비장세포 증식능을 향상시킨 것은 버섯의 조다당류가 면역에 관여하는 비장 세포의 증식을 촉진시켜 생쥐의 항암효과를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

생쥐의 B 임파구 활성화에 미치는 효과

Alkaline phosphatase는 B 임파구로부터 분비되어 면역의 활성화에 영향을 주는 효소로 알려져 있다. 신령버섯의 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수 등 3종류의 용매를 이용해 추출한 조다당류가 생쥐의 alkaline phosphatase를 활성화시킨 양을 측정하였다. 이들 3종류의 용매를 이용해 추출한 조다당류는 50~500 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 약 1.2~1.6배 높은 활성을 보였으며 양성 대조군인 LPS는 5~50 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 1.7~1.9배 높은 alkaline phosphatase의 활성이 나타나서 LPS가 신령버섯에서 추출한 조다당류에 비해 alkaline phosphatase의 활성능이 큰 것으로 나타났다(Fig. 4). 이 결과는 Kim 등(2006)이 뽕나무버섯의

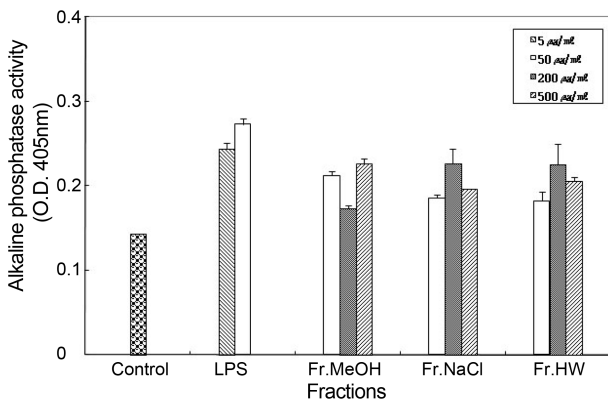


Fig. 4. Effect of three fractions^a extracted from fruiting bodies of *Agaricus brasiliensis* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells^b

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

^bLPS, Lipopolysaccharide was used for positive control.

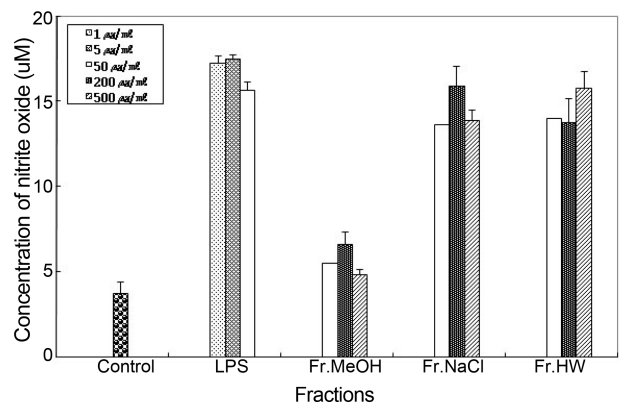


Fig. 5. Effect of three fractions^a extracted from fruiting bodies of *Agaricus brasiliensis* on nitric oxide production in the RAW 264.7^{b,c}.

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

^bConcentration of RAW 264.7 cell was 1×10^6 cells/ml.

^cLPS, Lipopolysaccharide was used for positive control.

자실체에서 중성염용액으로 추출한 조다당류를 50~500 µg/ml의 농도로 처리한 B 임파구의 alkaline phosphatase 활성이 대조군에 비해 약 3배의 높게 나타낸 것에 비해서는 낮은 결과였다. Lee 등(2007)은 뽕나무버섯부처의 자실체에서 중성염용액과 열수를 이용하여 추출한 조다당류를 처리하여 alkaline phosphatase의 양을 측정한 결과 200~500 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해서는 2배의 높은 활성을 나타냈으며 LPS를 처리한 양성대조군에 비해서도 활성이 약간 증가되었다. 따라서 신령버섯을 비롯한 식의약품 버섯에서 추출한 조다당류는 생쥐의 B 임파구 활성화에 큰 기여를 하는 것으로 보여 진다.

대식세포 활성화에 미치는 효과

대조군의 RAW 264.7에 의해 발생된 nitric oxide(NO)의 농도가 3.7 µM인 것에 비해 메탄올, 중성염 및 열수 추출물은 50~500 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 대식세포는 4.8~15.9 µM의 NO를 발생시켰으며 양성대조군인 LPS는 1~50 µg/ml 농도에서 15.7~17.5 µM의 NO를 생성하여 신령버섯 추출 조다당류가 생성한 NO의 양보다 조금 많았다(Fig. 5). Lee 등 (2008b)은 대향고 자실체의 중성염용액과 열수 추출물은 50 µg/ml 농도에서 양성대조군인 LPS에 의해 생성된 40 µM의 NO보다 다소 많은 49.5~46.6 µM의 NO를 생성하였다. Kim 등(2006)은 뽕나무버섯의 열수 추출 조다당류를 50 µg/ml 농도로 처리하였을 때 생성된 NO의 양이 대조군에 비해 8.5배, 양성 대조군인 LPS에 비해 1.1배 증가했다고 보고하였다. 따라서 신령버섯의 자실체에서 3종류의 용매를 이용하여 추출한 조다당류를 대식세포에 처리하면 대식세포를 활성화하여 대조군에 비해 많은 양의 NO를 발생시켜 숙주의 면역력을 높이는 것으로 나타났다.

Cytokine 분비에 미치는 효과

신령버섯의 조다당류를 투여한 생쥐에서 비장세포가 면역조절 물질인 TNF-α, IL-1β, IL-2 그리고 IL-6 등의 사이토카인을 어느 정도 분비하는지 알아보기 위해 ELISA assay kit를 이용해 비장세포에서 각각의 사이토카인을 측정하였다. 중성염용액 추출 조다당류를 10~1000 µg/ml 농도로 처리한 비장세포에서의 TNF-α 활성은 대조군의 13.1 pg/ml에 비해 88.8~141.53 pg/ml로 나타나 6.8~10.8배 많이 분비되었고, 10 µg/ml의 메탄올 추출 조다당류의 72.9 pg/ml로 같은 농도의 양성대조군인 LPS의 73.5 pg/ml에 비해서는 적게 분비되었으며, Con A의 36.8 pg/ml에 비해서 5.6배 높았다(Fig. 6A). IL-1β 분비량은 대조군에서 10.9 pg/ml이었고, 양성대조군인 LPS는 10 µg/ml의 농도에서 143.1 pg/ml로 가장 높게 나타났으며, 또 다른 양성대조군인 Con A는 1 µg/ml의 농도에서 159.5 pg/ml로 분비량이 가장 높았다(Fig. 6B). IL-2의 분비량은 대조군에서 26.7 pg/ml이었으며 양성대조군인 LPS와 Con A는 10 µg/ml 농도에서 271.8 pg/ml과 166.6 pg/ml을 분비하여 대조군에 비해 각각 10.2배와 6.2배 많이 생성하였으며 추출한 조다당류 중 가장 많은 IL-2가 분비된 것은 1000 µg/ml의 메탄올 추출 조다당류에서의 118로 대조군의 4.4배 많이 분비되었다(Fig. 6C). IL-6의 분비량은 양성대조군인 LPS는 5 µg/ml 농도에서 511.7 pg/ml, Con A는 1 µg/ml 농도에서 119.4 pg/ml가 대조군의 65에 비해 각각 7.9배와 1.84배 많이 생성하였다(Fig. 6D). Lee 등(2007)도 뽕나무버섯부처의 자실체에서 중성염용액, 메탄올과 열수로 추출한 조다당류가 10~1000 µg/ml 농도의 범위에서 대조군에 비해서 높은 TNF-α의 활성을 보였으나 양성 대조군인 Con A나 LPS에 비해서 활성이 낮아지는 경향을 보였다. Hur 등(2008)도 송이의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류는 1~1000 µg/ml

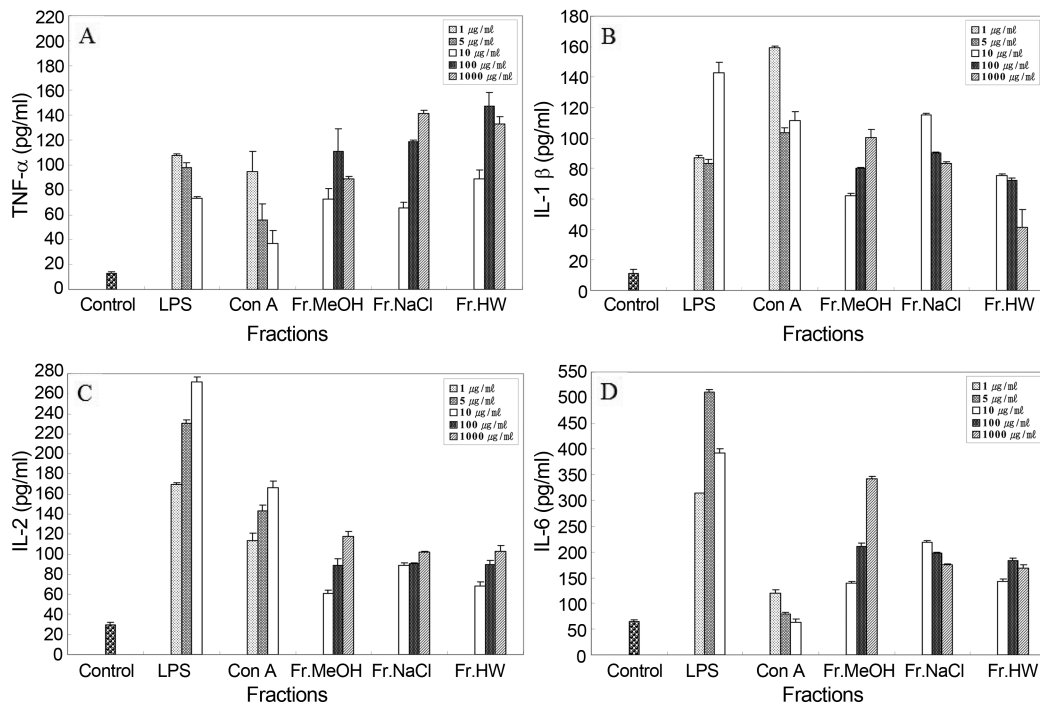


Fig. 6. Effects of fractions extracted from fruiting body of *Agaricus brasiliensis* on cytokine(A:TNF- α , B:IL-1 β , C:IL-2, D:IL-6) production in splenocytes. Concentration of splenocytes was 5×10^6 cells/ml. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. 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.

농도의 범위에서 대조군에 비해서는 높은 TNF- α 활성을 보였으나 양성 대조군인 Con A나 LPS에 비해서는 낮았다. 따라서 본 실험의 결과 신령버섯의 자실체에서 추출한 조다당류는 TNF- α , IL-1 β , IL-2 및 IL-6 등의 사이토카인 분비를 촉진하여 Sarcoma 180을 접종한 생쥐에 면역증강과 항암 효과를 나타낼 수 있었던 것으로 사료되었다.

총 복강 세포 수에 미치는 효과

신령버섯에서 추출한 3종류의 조다당류를 50 mg/kg 투여한 복강 세포의 수는 대조군에 비해 배타를 추출투여군은 2배 증가하였고 중성염 추출 투여군은 4배, 열수추출 조다당류를 투여한 생쥐의 복강세포 수는 대조군에 비해 3배 증가하였다 (Fig. 7). 이 결과는 Choi 등(2008)이 장미무당버섯의 자실체 추출 조다당류가 투여된 생쥐의 복강세포 수가 10~50 mg/kg의 농도에서 1.4~5.6배 증가된 것에 비해서 높았지만 Oh 등(2006)이 흰목이의 중성염 추출물을 50 mg/kg의 농도로 투여한 생쥐의 복강세포 수가 대조군에 비해 7.4배 증가하였고, Shim 등(2006b)은 삼색도장버섯의 중성염 용액 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포수가 대조군에 비해 약 10배 증가한 것에 비해서는 낮았다. 따라서 위와 같은 결과는 버섯에서 추출한 조다당류는 복강의 세포의 수를 증가시키는데 효과가 있다는 것을 나타낸 실험 결과로 사료된다.

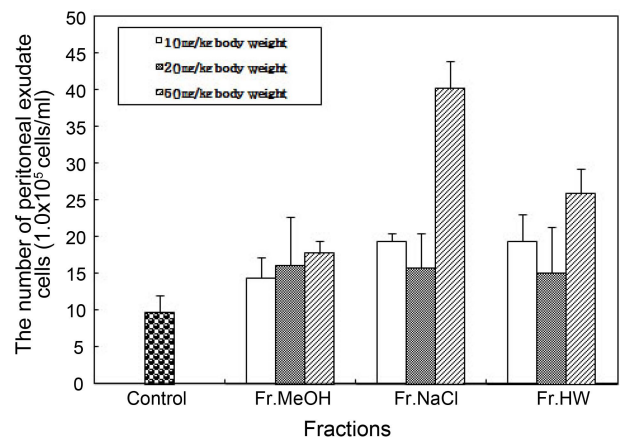


Fig. 7. Effect of three fractions^a extracted from fruiting bodies of *Agaricus brasiliensis* on the number of peritoneal exudate cells in ICR mice.

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

혈액 중 백혈구의 수에 미치는 효과

백혈구는 생체가 외부의 침입에 1차적인 방어에 관여하는 세포이다(Arthur and Guyton, 1986). 신령버섯에서 추출한 각각의 조다당류가 혈액 중 백혈구의 수에 효과를 알아보기

위하여 신령버섯의 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 대조군의 2.33×10^3 cells/ml에 비하여 열수 추출 조다당류 50 mg/kg body weight에서 6.37×10^3 cells/ml로 약 2.7배 증가하였으며, 중성염용액 추출 조다당류는 5.65×10^3 cells/ml로 약 2.4배 증가하였다. 메탄올추출 조다당류는 20 mg/kg body weight에서 5.86×10^3 cells/ml로 약 2.5배의 증가를 보였다(Table 3). Lee 등(2008)은 대향고의 자실체에서 메

탄올 추출 조다당류는 50 mg/kg body weight에서 대조군에 비해 약 1.6배 증가하였으며 중성염용액 추출 조다당류는 같은 농도에서 1.58배 증가 하였다. 또한 Choi 등 (2008)은 장미무당버섯의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류가 50 mg/kg body weight로 투여된 생쥐의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.9배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 버섯의 조다당류를 투여된 생쥐는 대부분의 경우 백혈구 수의 증가되어 면역이 증강되는 효과가 있는 것으로 보여 진다.

혈액의 생화학적 검사

신령버섯의 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수로 추출한 조다당류를 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 실험군과 생리식염수만을 투여한 대조군의 혈중 단백질 농도를 비교한 결과 모두 정상범위에 포함되어 있음을 확인하였고, 신장 기능의 지표가 되는 BUN, creatinine 및 bilirubin의 양은 대조군과 모든 실험 군 간에 유의성 ($p < 0.05$)이 없었다. 또한 간 세포내에 존재하는 ALP, ALT 및 AST 등의 효소는 간이 손상되면 혈액으로 유리되기 때문에 간 기능의 간접적인 지표로 이용되고 있다. 실험 결과 각 실험군의 수치는 대조군에 비해 비교적 높게 나타났지만 모두 정상범위 내의 수치에 포함되었으며 통계분석 결과 대조군과 실험군 간에는 유의성은 없는 것으로 나타났다(Table 4). 따라서 신령버섯의 자실체에서 추출한 조다당류를 생쥐에 투여한 결과 생쥐의 정상적인 대사활동에는 큰 문제는 없는 것으로 나타났다.

적요

신령버섯은 담자균문, 주름버섯목, 주름버섯과에 속하는

Table 3. Effect of fractions extracted from fruiting bodies of *Agaricus brasiliensis* on the number of circulating leucocytes in ICR mice

Group ^a	Dose ^b	No. of mice	No. of leukocytes ^c ($\times 10^3$ cells/ml)
Control	-	-	2.33 $\pm$ 1.03
Fr. MeOH	10	5	5.62 $\pm$ 1.41
	20	5	5.86 $\pm$ 0.93
	50	5	6.92 $\pm$ 1.96
Fr. NaCl	10	5	4.32 $\pm$ 1.94
	20	5	4.81 $\pm$ 1.08
	50	5	5.65 $\pm$ 0.33
Fr. HW	10	5	3.69 $\pm$ 5.61
	20	5	5.61 $\pm$ 1.27
	50	5	6.37 $\pm$ 1.27

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

^bmg/kg body weight.

^cMean $\pm$ S.E.

Table 4. Analysis of blood of ICR mice administered with various fractions extracted from *Agaricus brasiliensis* in ICR mice

Extracts ^a	Concent ration	Protein (g/dl)	BUN ^b (mg/dl)	Creatinie (mg/dl)	T. bilirubin (mg/dl)	AST ^c (U/L)	ALT ^d (U/L)	ALP ^e (U/L)
Control	-	6.00 $\pm$ 0.21 ^f	16.67 $\pm$ 2.31	0.47 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.06	50.33 $\pm$ 12.86	33.00 $\pm$ 3.61	63.5 $\pm$ 1.70
MeOH	10 mg/kg	7.00 $\pm$ 0.15	18.33 $\pm$ 0.44	0.53 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.04	71.00 $\pm$ 12.67	43.67 $\pm$ 4.89	65.70 $\pm$ 2.20
	20 mg/kg	6.80 $\pm$ 0.31	20.00 $\pm$ 2.00	0.60 $\pm$ 0.00	0.53 $\pm$ 0.04	86.00 $\pm$ 2.00	40.33 $\pm$ 0.89	69.30 $\pm$ 1.10
	50 mg/kg	7.20 $\pm$ 0.26	18.00 $\pm$ 0.00	0.60 $\pm$ 0.00	0.57 $\pm$ 0.04	82.67 $\pm$ 3.11	57.00 $\pm$ 8.67	74.30 $\pm$ 5.10
NaCl	10 mg/kg	7.00 $\pm$ 2.44	17.00 $\pm$ 0.00	0.60 $\pm$ 0.00	0.53 $\pm$ 0.04	66.67 $\pm$ 1.78	46.33 $\pm$ 6.89	69.30 $\pm$ 3.10
	20 mg/kg	7.10 $\pm$ 0.20	20.33 $\pm$ 1.56	0.57 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.04	64.67 $\pm$ 1.78	39.67 $\pm$ 1.78	69.30 $\pm$ 3.10
	50 mg/kg	7.40 $\pm$ 0.33	20.33 $\pm$ 1.56	0.57 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.04	70.67 $\pm$ 3.11	40.33 $\pm$ 0.89	69.7 $\pm$ 0.90
HW	10 mg/kg	7.10 $\pm$ 0.11	21.67 $\pm$ 0.44	0.60 $\pm$ 0.00	0.57 $\pm$ 0.04	62.67 $\pm$ 3.78	37.00 $\pm$ 3.33	77.30 $\pm$ 5.10
	20 mg/kg	6.90 $\pm$ 0.11	21.00 $\pm$ 0.67	0.60 $\pm$ 0.00	0.43 $\pm$ 0.04	76.00 $\pm$ 4.67	56.33 $\pm$ 3.78	81.70 $\pm$ 8.40
	50 mg/kg	6.40 $\pm$ 0.51	21.67 $\pm$ 0.44	0.60 $\pm$ 0.00	0.57 $\pm$ 0.04	71.33 $\pm$ 1.78	48.67 $\pm$ 3.78	75.00 $\pm$ 6.70

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

^bBUN : blood urea nitrogen.

^cAST : aspartate aminotrasferase.

^dALT : alanine aminotransferase.

^eALP : alkaline phosphatase.

^fMean $\pm$ S.E.

식용버섯으로 혈당, 혈압강하효과와 콜레스테롤 저하, 항종양, 암예방 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 신령버섯의 자실체로부터 메탄올, 중성염용액 및 열수 등을 이용하여 조다당류를 추출하고 성분을 분석한 결과 β -glucan은 21.54~32.31%, 단백질은 0.16~9.34%로 구성되어 있는 것이 밝혀졌고 신령버섯 추출 조다당류를 Sarcoma 180, HT-29, NIH3T3 및 RAW 264.7 등의 암세포 및 정상세포에 대한 독성을 조사한 결과 10~2000 μ g/ml의 조다당류 농도에서 각각의 세포는 세포독성을 나타내지 않았다. Sarcoma 180으로 접종된 ICR 생쥐에 신령버섯의 자실체에서 추출한 각각의 조다당류를 투여한 실험군은 대조군에 비해 수명이 각각 18.8~50.6% 연장되었다. 비장세포의 증식능과 B 임파구의 활성화에 미치는 alkaline phosphatase의 활성을 조사한 결과 비장세포 증식능은 대조군에 대해 1.1~1.2배의 증식능을 보였고 B 임파구의 활성화는 대조군에 대해 1.2~1.6배 증가하였다. 또한 버섯추출 조다당류를 투여한 실험군이 대조군에 비하여 대식세포에서 1.3~4.3배의 많은 nitric oxide를 발생시켰다. 비장세포에 여러 농도의 조다당류를 처리한 후 TNF- α , IL-1 β , IL-2 및 IL-6 등의 사이토카인 분비량을 측정 한 결과 생성된 사이토카인의 양은 대조군에 비해 2.2배 높게 나타났다. 중성염용액추출 조다당류를 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 실험군 생쥐의 총 복강 세포 수는 대조군에 비하여 4배 증가하였고, 열수추출 조다당류를 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 실험군 생쥐의 백혈구 수는 대조군에 비하여 각각 2.7배 증가하였다. 혈액생화학적 검사를 시행한 결과, 대조군과 유사한 경향을 나타냈다. 따라서 신령버섯의 자실체에서 추출한 조다당류는 생쥐의 면역력을 증강시키는 것은 물론 Sarcoma 180에 대한 항암효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

감사의 말씀

본 연구는 2010년도 인천대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

- 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.
- Arthur, C. and Guyton, M. D. 1986. *Textbook of medical physiology*. 7th Eds. W.B. Saunder Company. pp. 51-59.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- 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, S. M., Lee, J. H., Han, S. B., Kim, H. M., Yoo, S. H. and Yoo, I. D. 1995a. 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., Lee, J. H., Han, S. B., Kim, H. M., Yoo S. H. and Yoo, I. D. 1995b. 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., Lee, K. W., Hur, H., Lee U. Y. and Lee, T. S. 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 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.
- Hur, H., Choi, Y. I. and Lee, T. S. 2008. Antitumor and immuno-potentiating activity against mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Life Science.* 18:1290-1298.
- Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. and Mutai, M. 1981. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann.* 72:517-523.
- Kim, S. B., Lee, K. W., Kim, H. Y., Shim, M. J., Rho, H. S., Lee, H. S., Lee, M. W. Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2006. Inhibitive effect of mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting Body of *Armillaria mellea*. *Kor. J. Mycol.* 34:98-104.
- 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.
- Kurihara, K., Shingo, Y., Miura, N. N., Horie, S., Usui, Y., Adachi, Y., Yadomae, T. and Ohno, N. 2003. Effect of CAWS, a mannoprotein- β -glucan complex of *Candida albicans*, on leukocyte, endothelial cell, and platelet functions *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* 26:233-240.
- Lee, G. W., Kim, H. Y., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2007. Antitumor and immuno-modulatory effect against mouse Sarcoma 180 of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens*. *Kor. J. Mycol.* 35:101-108.
- Lee, G. W., Kim, H. Y., Hur, H., Lee, M. W., Shim, M. J., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2008a. Antitumor and immuno-modulatory effect of crude polysaccharides from fruiting body of *Tremella aurantialba* against mouse Sarcoma 180. *Kor. J. Mycol.* 36:66-74.
- Lee, G. W., Kim, H. Y., Hur, H., Lee, T. S. and Lee, U. Y. 2008b. Antitumor and immuno-potentiating activity against mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides from fruiting body of *Lentinus giganteus*. *Kor. J. Mycol.* 36:75-83.
- Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6:213-218.
- Oh, Y. H., Kim, S. B., Lee, K. W., Kim, H. Y., Shim, M. J., Rho, H. S., Lee, H. S., Lee, M. W., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2006. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis*. *Kor. J. Mycol.* 34: 105-111.
- Park, W. H. and Lee, H. D. 1991. Mushrooms in Korea. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea.
- Shim, S. M., Im, K. H., Lee, U. Y., Kim, J. W., Shim, M. J., Lee, M. W. and Lee, T. S. 2003a. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. *Kor. J. Mycol.* 31:155-160.

- Shim, S. M., Im, K. H., Kim, J. W., Lee, U. Y., Kim, H. W., Lee, M. W. and Lee, T. S. 2003b. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Daedaleopsis tricolor*. *Kor. J. Mycol.* 31:161-167.
- Tsukagoshi, 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.* 65:557-558.
- Um, S. N., Jin, G. E., Park, K. W., Yu, Y. B. and Park, K. M. 2010. Physiological activity and nutritional composition of *Pleurotus* species. *Kor. J. Food Sci. Technol.*
- Wasser, S. P. and Weiss, A. L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International J. Medicinal Mushrooms.* 1:31-62.
- Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 60:258-274.