

상황버섯 자실체의 *in vitro* 및 *in vivo* 항암활성

이영경 · 한명주 · 박순영* · 김동현**
경희대학교 식품영양학과, *의과대학, **약학대학

In vitro and *in vivo* Antitumor Activity of the Fruit Body of *Phellinus linteus*

Young-Kyung Rhee, Myung Joo Han, Soon-Young Park* and Dong-Hyun Kim**
Department of Food and Nutrition, *College of Medicine
**College of Pharmacy, Kyung-Hee University

Abstract

This study was undertaken to investigate immunochemotherapeutic activity against tumor growth and cytotoxic activity against tumor cell lines. *Phellinus linteus* (PL), which was artificially cultured in *Morus alba*, prolonged significantly the survival rate of mice intraperitoneally implanted with sarcoma 180 and inhibited solid tumor growth on mice subcutaneously implanted with sarcoma 180. The acetone precipitate of water extract of PL was better than its water extract. However, PL showed little cytotoxic activity against tumor cell lines.

Key words : *Phellinus linteus*, antitumor activity, cytotoxicity

서 론

항암활성이 있는 다당체는 고등식물, 곰팡이, yeast, bacteria 등 천연자원에서 계속 분리되어 오고 있다^(1,2). 이 다당체들 중에서 담자균류의 항암활성이 가장 광범위하게 연구되고 있으며⁽³⁾, Chihara 등은 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 sarcoma 180에 강력한 저지력을 지닌 고분자 β -1,3-glucan인 lentinan을 분리하였다⁽⁴⁾. 이 들 담자균류의 항암성분들이 면역능에 미치는 연구를 통해 lentinan이 세포성 면역의 immunoaccelator로 작용함과 동시에 T-cell adjuvant로 작용함을 입증하였다⁽⁵⁾. 한편, 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 Kim 등이 구름버섯, 표고버섯, 느타리버섯 등의 자실체의 열수 추출물이 sarcoma 180에 강한 저지력이 있음이 밝혔고⁽⁶⁾ 김 등과 한 등은 상황버섯이 항암활성이 있음을 밝히고^(7,8) 또한 상황버섯은 최근 인공재배법으로 대량 생산이 가능하게 되었고, 특히 재배된 상황버섯은 장내세균의 유해효소를 저해하

고 장점막 알파글루코시다제 저해하는 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다⁽⁹⁾. 하지만 인공재배된 상황버섯 자실체를 대상으로 항암활성을 검토한 연구는 아직 보고된 바 없어, 본 연구에서는 재배 상황버섯의 항암효과를 조사하였다.

실험방법

실험재료

Phellinus linteus(PL)를 뽕나무에 이식하여 재배한 상황버섯의 자실체는 금사버섯농원에서 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), trypsin, RPMI1640 배지는 Sigma사(미국)에서 구입하였으며, antibiotics-antimycotics, FBS는 Difco사(미국)에서 구입하여 사용하였다. SNU-C4, A-549, P-388, L-1210, MA104 세포주는 서울대학교 세포주은행에서 분양받아 사용하였다.

실험동물

SPF ICR 생쥐를 대한동물(주)에서 분양받아 경희대학교 청정실험동물시설(environmental safety cabinet, Myungjin model)에서 실시하였으며 청정구역내의 온도 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 배기 10-20 회/h, 형광등 명

Corresponding author : College of Pharmacy, Kyung Hee University 1, Hoegi, Dongdaemun-ku, Seoul 130-701 Korea
Tel : 82-2-961-0374
Fax : 82-2-957-5030
E-mail dhkim@nms.kyunghee.ac.kr

암 12 h cycle, 조도 300-500 lux의 환경에서 1주일간 순화시킨 후 사용하였다.

시료의 추출

시료 약 500 g에 5배의 물을 가하여 80°C에서 6시간 동안 추출하여 여과하고 잔사를 반복하여 추출하였다. 이 추출액을 합치고 투석하고 동결건조하여 얻은 분말을 재배상황버섯의 물추출분획물로 사용하였다. 또한, 이 물추출분획에 cold acetone를 50%가 되도록 가하여 얻은 침전을 원심분리하고 동결건조하여 얻은 분말을 재배상황버섯의 유기용매침전분획물로 사용하였다.

세포주의 배양

SNU-C4, A-549, P-388, L-1210 cell line은 10% FBS, 1% antibiotics-antimycotics와 2.2 g/L sodium bicarbonate을 보강한 RPMI 1640 medium으로 배양하였다.

세포독성의 측정

SNU-C4, A-549는 0.25% trypsin으로 처리하여 cell을 flask에서 수집하여 cell 수를 3×10^4 cell/well로 맞추어 96 well에 180 μ l씩 분주하여 24시간 동안 37°C의 5% CO₂가 포화된 CO₂ incubator에서 부착시켰다. 한편, P-388과 L-1210은 4×10^4 /well이 되게 cell 수를 맞추어 180 μ l를 깔아 2시간 동안 5% CO₂가 포화된 CO₂ incubator에서 안정화시켰다. 그리고 여기에 10 mg/ml이 되게 재배상황버섯 추출물의 농도를 맞추어 고압증기 멸균한 검체를 well당 20 μ l를 가하여 시료의 최종농도가 1 mg/ml이 되게 한 후 48시간 동안 37°C의 5% CO₂가 포화된 CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 대조약물로는 adriamycin을 사용하였다. 배양 후 20 mg/mL의 MTT시약을 well당 50 μ l씩 가하여 4 시간 동안 CO₂ incubator에서 반응시키고 상등액을 제거하고 남은 침전에 DMSO 100 μ l를 가하여 580 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

복수암에 대한 항암활성 측정

Sarcoma 180을 이식(2×10^7 cell/ml)한 생쥐에서 복수 암을 취하여 생리식염수에 현탁하고 2000 rpm에서 원심분리하여 cell을 회수하고 이를 2회 반복하여 세척하고 0.4% trypan blue로 염색하여 2×10^7 cell/ml이 되도록 제조하였다(이상의 조작은 4°C에서 실시하였다). 이렇게 제조한 sarcoma 180를 ICR계 생쥐(웅성 25 g) 50마리에 0.1 ml씩 복강투여하고 한군을 10마리씩 5군으로 나누었다. 1군에는 생리식염수(sarcoma 180 대조

군), 2군에는 재배상황버섯 물추출분획물을 kg당 100 mg, 3군에는 재배상황버섯 물추출분획물을 kg당 10 mg, 4군에는 재배상황버섯 물추출물의 유기용매 침전분획을 kg당 100 mg, 5군에는 재배상황버섯 물추출물의 유기용매 침전분획 10 mg를 sarcoma 180을 이식한 날부터 7일 동안 복강내에 투여하였다. 정상대조군의 10마리 생쥐에는 sarcoma 180을 투여하지 않고 생리식염수만을 투여하였다. 그리고 40일간 사육하면서 생존율을 비교하였다.

고형암에 대한 항암활성 측정

Sarcoma 180을 이식(2×10^7 cell/ml)한 생쥐에서 복수 암을 취하여 생리식염수에 현탁하고 2000 rpm에서 원심분리한 침전액을 2회 반복하여 세척한 후 0.4% trypan blue로 염색하여 2×10^7 cell/ml이 되도록 제조하였다(이상의 조작은 4°C에서 실시하였다). 이렇게 제조한 sarcoma 180를 ICR계 생쥐(웅성 25 g) 50마리에 0.1 ml씩 안와에 주사하여 이식하고 한군을 10씩 5군으로 나누었다. 1군에는 생리식염수(sarcoma 180 대조군), 2군에는 재배상황버섯 물추출분획물을 kg당 25 mg, 3군에는 재배상황버섯 물추출물의 유기용매침전분획을 kg당 25 mg를 sarcoma 180을 이식한 날부터 7일 동안 복강내에 투여하였다. 정상대조군의 10마리 생쥐에는 sarcoma 180을 투여하지 않고 생리식염수만을 투여하였다. 그리고 20일 후 도살하여 안와에 생긴 고형 암세포를 취하여 무게를 측정하였다.

결과 및 고찰

재배 상황버섯의 물추출물과 유기용매 침전 분획을 이용하여 *in vitro*에서 정상세포(MA-104)와 암세포에 대한 세포독성을 측정하였다(Table 1). 정상세포에서와

Table 1. Cytotoxic activity of artificially cultured *P. linteus* against tumor cell lines

Sample	IC ₅₀ (mg/ml)				
	A549	SNU C4	L1210	P388	MA-104
WE	0.5	>0.5	0.38	>0.5	>0.5
OSP	0.5	>0.5	0.5	>0.5	>0.5
Adriamycin	0.05	0.02	0.01	0.001	0.5

WE, water extract of artificially cultured *P. linteus*; OSP, the acetone precipitate of water extract of artificially cultured *P. linteus* by cold acetone.

A549, human lung cancer cell line; SNU C4, human colon cancer cell line; L1210, mouse lymphocytic leukemia cell line; P388, mouse lymphoid neoplasma cell line; MA-104, Macacus rhesus monkey kidney cell line.

Table 2. Effect of artificially cultured *P. linteus* on the life span of ICR mice inoculated with sarcoma 180 (i.p.)

Group	Dose(mg/kg body weight)	Survival rate(%)	Survival time(day)
Normal control	0	100	-
Group 1	0	0	16 ± 4.7 ^{a)}
Group 2	100	20	25 ± 4.7 ^{b)}
Group 3	10	20	22 ± 3.0
Group 4	100	40	20 ± 4.0
Group 5	10	40	23 ± 1.2 ^{b)}

Group 1, treated with sarcoma 180 only; group 2 and 3, treated with water extract of artificially cultured *P. linteus*; group 4 and 5, treated with the precipitate of water extract of artificially cultured *P. linteus* by cold acetone.

Sarcoma 180 cells (2.0×10⁶ cell/mouse) were inoculated intraperitoneally into ICR mice and then followed by mushrooms administration for seven consecutive days.

^{a)}Mean ± standard deviation.

^{b)}Statistically significant compared to control data (p<0.05).

Table 3. Effect of artificially cultured *P. linteus* on the growth of sarcoma 180 (s.c.) in ICR mice

Group	Dose (mg/kg body weight)	Tumor weight (g)
Normal control	0	0
Group 1	0	3.6 ± 1.80 ^{a)}
Group 2	25	3.5 ± 2.10
Group 3	25	1.1 ± 1.20 ^{b)}

Group 1, treated with sarcoma 180 only; group 2, treated with the water extract of artificially cultured *P. linteus*; group 3, treated with the precipitate of water extract of artificially cultured *P. linteus* by cold acetone.

Sarcoma 180 cells (2×10⁶ cell/mouse) were inoculated into the left groin of ICR mice and then followed by mushrooms administration (25 mg/kg) for seven consecutive days.

^{a)}Mean ± standard deviation.

^{b)}Statistically significant compared to control data (p<0.05).

같이 재배 상황버섯의 물추출물과 유기용매 침전분획 모두 암세포에 대한 독성이 아주 낮거나 거의 효과가 없었다.

*In vivo*에서 항암활성을 조사하기 위해 먼저 sarcoma 180을 복강내에 이식하여 만든 동물모델에서의 항암활성을 조사하였다(Table 2). 대조군에서는 모두 30일 이내 모두 사망했으며 생존율은 16.4일이었다. 그러나, 재배 상황버섯의 물추출물을 투여한 경우 대조군에 비해 10 mg/kg에서 30% 이상의 생명연장효과와 생존율이 20%였으며, 100 mg/kg을 투여한 경우는 50% 이상의 생명연장효과와 20%의 생존율을 나타냈다. 이 물추출물의 유기용매 침전분획을 10 mg/kg 투여한 경우 생명연장효과는 40%이상의 생명연장 효과와 생존율이 40%였다. 그러나 이 침전분획을 kg당 100 mg을 투여한 경우는 생존율은 변화가 없으나, 생명연장 효과는 감소하는 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 고용량에서는 오

히려 독성을 나타낼 가능성을 보여주는 것이라 생각된다.

또한 sarcoma 180을 마우스의 안와에 이식하여 고형암을 유발시켜 재배 상황버섯의 항암활성을 측정하였다. 그 결과 대조군에서는 암세포 투여 21일 후에 암세포의 무게가 3.6g이었으나 상황버섯의 물추출물을 투여한 경우 5%정도의 감소를 나타냈으나 유의성은 없었다. 그러나, 유기용매 침전분획을 투여한 경우 70% 이상의 유의성 있는 억제효과를 나타냈다(Table 3).

재배 상황버섯은 직접적으로 암세포에 대해 항암효과를 나타내지 않았으나 *in vivo*에서 암세포를 이식한 경우 항암효과를 나타냈다. 이러한 결과는 재배상황버섯의 항암활성물질은 세포독성을 나타내는 물질이라기 보다는 면역부활능을 갖는 기존의 버섯추출물들과 같은 β-glucan 물질로 생각된다.

요 약

재배상황버섯의 *in vivo*에서의 항암효과와 *in vitro*에서 암세포에 대해 세포독성을 조사하였다. 재배상황버섯의 물추출물과 이 물추출물의 50% cold acetone 침전분획에 대해 암세포에 대한 세포독성은 거의 없거나 아주 약하였다. 그러나, sarcoma 180을 복수에 이식하여 만든 복수암 생쥐에 대한 항암효과를 관찰한 결과는 물추출물과 acetone 침전분획 모두에서 생명연장효과와 생존율을 높였다. 또한 sarcoma 180을 생쥐의 안와에 이식하여 만든 고형암 모델 동물에서 재배 상황버섯의 물추출물분획은 고형암의 성장억제율이 약 하였으나 acetone 침전분획물에서는 아주 높은 고형암 성장억제효과를 나타냈다. 이러한 결과로 보아 재배상황버섯의 항암효과는 암세포에 직접 작용하여 항암효과를 나타내기보다는 기존의 버섯들과 마찬가지로 생체의 면역능을 활성화 시킴으로써 항암효과를 발휘하

는 것으로 생각된다.

문 헌

1. Takeda, T., Shibata, S. and Fukuoka, F. Further investigation of the structure and the antitumor activity of the polysaccharides from *Gyrophora esculenta* and *Lasallia papulosa*. Chem. Pharm. Bull. 17:1910-1916 (1969)
2. Kao, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. and Mutai, M. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. Gann 72: 517-523 (1981)
3. Chihara, G., Hanuram, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. Antitumor polysaccharide derive chemically from natural glucan (pachyman). Nature 225: 943-944 (1970)
4. Chihara, G., Hanuram, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*. Nature 222: 687-678 (1969)
5. Sasaki, T. and Takasuka, N. Further studies of the structure of lentinan, an antitumor polysaccharides from *Lentinus edodes*. Carbohyd. Res. 47: 99-104 (1976)
6. Kim, B.K., Park, E.K. and Shim, M.J. Studies on constituents of higher fungi of Korea (XXIV), antineoplastic activities of *Coriolus versicolor* (Fr.) Qel, *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Arch. Pharm. Res. 2: 145-149 (1979)
7. Kim, H.M., Han, S.B., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, D.H. and Yoo, L.D. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Int. J. Immunopharmacol. 18: 295-303 (1996)
8. Han S.B., Lee C.W., Jeon Y.J., Hong N.D., Yoo I.D., Yang K.H. and Kim H.M., The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. Immunopharmacology 41: 157-164 (1999)
9. Kim, D.-H., Choi, H.-J., Bae, E.-A., Han, M.J. and Park, S.-Y. Effect of artificially culture *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacteria enzymes and at intestinal β -glucosidases. J. Fd Hygi. Safe. 13: 20-23 (1998)

(1999년 9월 3일 접수)