송이(*Tricholoma matsutake*)의 자실체에서 추출한 조다당류가 생쥐의 Sarcoma 180에 미치는 항암 및 면역증강 작용

허현¹ · 최연일 · 이태수*

인천대학교 생물학과, ¹동국대학교 생명과학과

Received August 31, 2008 / Accepted September 18, 2008

Antitumor and Immuno-potentiating Activity against Mouse Sarcoma 180 by Crude Polysaccharides Extracted from Fruiting Body of *Tricholoma matsutake*. Hyun Hur¹, Yon Il Choi and Tae Soo Lee*. Department of Biology, University of Incheon, Incheon 402-749, Korea, ¹Department of Life Science, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea - *Tricholoma matsutake*, one of edible and medicinal mushroom belonging to Tricholomaceae of Agaricales, has been known to contain some curing effect on gastric cancer and ulcer, and inhibitory effect on sarcoma 180 and Ehrlich sarcoma. Neutral salt 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, HT29 and NIH3T3 at the concentration of 2.0 mg/ml. Intraperitoneal injection with crude polysaccharides showed life prolongation effect of 23.4~37.2% in mice previously inoculated with Sarcoma 180. Fr. MeOH and Fr. HW exhibited the immuno-potentiating activity of B lymphocyte by increasing the alkaline phosphatase activity by 2.2~11.9 folds compared with control at the concentration of 0.2~0.5 mg/ml. In case of Fr. NaCl, the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes were increased by 6.0 and 1.5 folds at the concentration of 50 mg/kg, respectively. Therefore, it is concluded that crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* showed anti-tumor and immuno-potentiating activity against Sarcoma 180 of mouse.

Key words : Antitumor effect, crude polysaccharides, immuno-potential, *Tricholoma matsutake*

서 론

버섯의 자실체에서 추출한 다당류를 비롯한 단백 다당류는 암의 치료에 사용되는 항암화학요법제와는 달리 부작용이 적고 면역 활성을 증가시켜 항암요법제와 병용하는 경우 항암제에 의한 부작용을 크게 완화시키고 치료효과를 증가시킬 수 있다는 장점이 알려져 있다[7]. 또한 버섯 유래의 항암성을 고분자 다당류인 β -1,3; β -1, 6-glucan은 기존의 항암화학요법제와는 달리 일반적으로 암세포에 직접 작용하기보다는 숙주매개성 면역기능을 증가시켜 면역체계의 대식세포를 활성화하여 치료효과를 나타내기 때문에 부작용을 거의 나타내지 않는다[21]. 최근 우리나라에서는 상황버섯의 자실체로부터 분리한 단백 다당체가 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암 작용을 나타낸다는 보고가 있다[14]. 민긴뿌리버섯의 자실체로부터 열수와 증성염용액을 이용하여 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 ICR mouse에 투여했을 때 대조군에 비해 42.9~66.7%의 수명연장효과를 나타냈으며 면역 활성을 나타내는 임파구의 alkaline phosphatase의 활성도 1.4~3배 증가시키는 것으로 나타난 보고

가 있다[11]. 장미무당버섯의 자실체를 열수, 메탄올 및 증성염용액을 이용하여 추출한 조다당류를 HepG2, NIH3T3, HT29 및 Sarcoma 180 등의 암세포에 대상으로 세포독성을 조사한 결과 이들 추출물은 0.01~2.0 mg/ml의 농도에서 실험 세포주에 대해 독성을 나타내지 않았다[5]. ICR mouse에 Sarcoma 180을 접종한 후 이 버섯의 추출물을 투여한 실험군은 투여하지 않은 대조군에 비해 수명이 21.4~45% 연장되는 효과를 나타냈으며 alkaline phosphatase의 활성도 0.5 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 6.8배 증가되는 것으로 나타났다. 금목이(*Tremella aurantialba*)의 자실체를 열수로 추출한 조다당류를 이용하여 수행한 세포독성 실험에서도 실험 암세포에 대해 독성을 나타내지 않았으며, Sarcoma 180을 접종한 ICR mouse에 메탄올로 추출한 조다당류를 투여한 ICR mouse의 수명도 66.7% 연장되는 것으로 나타났다[13]. 항암효과와 면역증강작용을 나타낸 삼색도장버섯의 자실체에서 증성염용액으로 추출한 물질의 성분을 분석한 결과 이들의 성분의 화학적 구성은 다당류 함량이 93.89%, 단백질의 함량은 3.1%인 단백다당류인 것이 밝혀졌으며[20], 저령의 균핵에서 증성염용액으로 추출한 항암물질의 성분은 다당류의 함량이 98.25%이었고, 단백질의 함량은 1.44%인 단백 다당체라[16]는 보고가 있다. 또한 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암효과를 나타내는 삼색도장버섯, 저령, 상황

*Corresponding author

Tel : +82-32-770-8242, Fax : +82-32-770-4424

E-mail : tslee@incheon.ac.kr

버섯 및 뽕나무버섯부처의 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180, HepG2, HT-29, MCF-7, HL-60, 및 RAW 309 Cr.1 등 암세포주를 대상으로 세포독성 실험을 수행한 결과 이들 버섯에서 추출한 조다당류는 일반적으로 실험대상 암세포주에 대해 농도를 높임에 따라 세포독성이 증가하는 경향을 나타내었으나 조다당류의 농도를 높이더라도 암세포의 증식이 크게 억제되거나 사멸되지는 않았다[12,14,16,20]. 또한 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류의 암세포주 세포독성 실험에서 위와 유사한 결과를 얻었고, 고농도의 조다당류를 생쥐의 복강에 주사한 경우, B 림프구의 활성화, 총 백혈구의 수, 혈중 백혈구의 수도 크게 증가시켜 면역력을 증강시키는 효과가 있다는 보고가 있다[10].

송이(*Tricholoma matsutake*)는 분류학적으로 주름버섯목(Agaricales), 송이과(*Tricholomataceae*), 송이속(*Tricholoma*)에 속하는 버섯으로 초가을부터 늦가을에 걸쳐 적송림 내의 땅위에 산생 또는 군생하며, 살아있는 소나무의 잔뿌리에 외생균근을 형성하고, 땅위에 균류를 형성하는 균근성 버섯이다. 이 버섯의 갓은 지름이 8~25 cm로 초기에는 구형이나 후에 볼록편평형으로 된다. 갓의 표면은 담황갈색~황갈색으로 섬유상의 인편으로 덮여있고 갓 내부의 조직은 백색이다. 대의 길이는 10~20 cm이고, 직경은 1.5~3 cm로 속이 차있다. 대의 아래위 굵기는 같으며, 턱받이가 있고, 턱받이의 위쪽은 백색이고, 아래쪽은 갈색의 인편으로 덮여있다. 포자의 크기는 6.5~7.5×4.5~6.5 μm 의 광타원형 내지 구형이고, 표면은 평활하며, 포자문은 백색을 나타낸다[18].

송이버섯 자실체에서 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[22].

본 실험에 사용한 송이는 2006년 가을 강원도 양양군의 송림에서 채취하여 판매하는 것을 구입하여 실험실로 운반한 후 건조하여 사용하였다. 건조한 자실체는 증성염용액(0.9%), 메탄올(80%) 및 열수를 이용하여 조다당류를 추출한 후 이를 *in vitro*와 *in vivo*에서 생쥐의 Sarcoma 180에 대한 항암 및 면역증강효과 연구를 수행하였기에 그 결과를 보고하고자한다.

재료 및 방법

본 실험의 재료인 송이(*Tricholoma matsutake*)는 2006년 가을 강원도 양양군에서 판매되고 있던 자실체를 구입하여 사용하였다. 구입한 자실체는 실험실로 운반한 뒤 50°C의 건조기에서 24시간 동안 건조시킨 후 마쇄하여 -65°C의 저온냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

조 등[3,4]과 심 등[19,20]의 방법에 따라 증성염용액(0.9% NaCl), 80% 메탄올 및 열수로 추출하였으며, 추출한 물질은 각각 수율을 조사하였다.

수명 연장 실험

Sarcoma 180을 5×10^6 cells/ml이 되도록 부유시켜 0.2 ml 씩(1×10^6 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 수명연장[increase of life span (ILS)]을 계산하여 버섯에서 추출한 조다당류가 암세포의 성장을 억제시킨 효과를 평가하였다.

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

C: 대조군의 평균 수명(일)

T: 실험군의 평균 수명(일)

세포 독성 실험

실험에 사용한 정상세포는 마우스 섬유아세포 NIH3T3, 암세포는 마우스 육종암세포 Sarcoma 180, 인간 간암세포 HepG2, 인간 대장암세포 HT-29이었다. 세포독성 실험은 Denizot와 Lang [6]의 방법에 따라 수행하였다. NIH3T3, HepG2 및 HT-29 세포는 1×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 100 μl 씩 주입한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 0.01~2.0 mg/ml이 되도록 조정 후 100 μl 씩 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 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 2×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 50 μl 씩 주입하고 각각의 조다당류 최종 농도를 0.01~2.0 mg/ml이 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

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. 0.05, 0.2, 0.5 mg/ml 농도로 희석한 각각의 조다당류와 양성 대조군으로 사용한 0.005, 0.05 mg/ml 농도의 lipopolysaccharide (LPS)를 100 μ l씩 처리하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하고 위의 MTT 법과 동일한 방법으로 처리한 후 흡광도를 측정하였다[15].

마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

Ohno 등(1986)의 방법에 따라 분화된 B 임파구의 표면에 발현되는 alkaline phosphatase를 측정하였다. 준비된 비장 세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 well 당 100 μ l씩 분주하고 0.005, 0.2, 0.5 mg/ml의 조다당류와 양성 대조군으로 0.005, 0.05 mg/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.

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

Cytokine 분비에 미치는 영향

송이 자실체의 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 30분간 원심 분리하였다. 이 후 가운데 위치한 유핵세포를 얻어 혈구계산기를 이용하여 세포의 수를 계수하였고, trypan blue exclusion 방법[1]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-alpha, 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. 실험에는 송이에서 추출한 조다당류를 각각 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.0 mg/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 송이의 자실체에서 추출한 조다당류의 수득률은 80%의 메탄올에서 54.1 g이 추출되어 가장 높은 13.5%의 수득률을 보였고, 증성염에서는 4.7 g이 추출되어 1.2%의 수득률을 나타내었으며, 열수에서 가장 적은 1.4 g이 추출되어 0.4%의 수득률을 나타내었다(Table 1). 이와 같은 결과는 금목이의 자실체로부터 각각 메탄올과 증성염 용액으로 추출한 조다당류의 수득률인 8.3%와 0.6%에 비

Table 1. Recovery rate of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake*

Fraction ^a	Weight of the used mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery rate ^b (%)
Fr. MeOH	400	54.1	13.5
Fr. NaCl	400	4.7	1.2
Fr. HW	400	1.4	0.4

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

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

해서는 높았고[13], 저령의 군핵에서 메탄올로 추출한 조다당류 수득률이 9.8%에 비해서도 높았다[16]. 그러나 민긴뿌리버섯 자실체에서 각각 메탄올과 증성염으로 추출한 18.5%와 5.3%의 수득률에 비해서는 낮게 나타났다[11]. 이와 같은 결과는 서로 다른 버섯의 종류에 따라 자실체함유 조다당류 함량의 차이에 의한 것으로 사료된다.

세포주에 대한 독성 효과

세포주에 대한 송이 추출 조다당류의 세포독성 실험 결과를 분석해 보면 암세포주인 Sarcoma 180과 HT-29에 대해서는 0.01~2.0 mg/ml의 농도에서 약간의 세포독성을 나타내었으나 정상세포주인 NIH3T3에서는 전혀 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2). 삼색도장버섯과 흰목이의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류를 이용한 세포독성실험에서도 1.0 mg/ml 이하의 농도에서는 NIH3T3와 Sarcoma 180 세포주에 대한 독성은 나타나지 않았으며[20,17], 장미무당버섯 자실체 추출 조다당류의 독성실험에서도 0.01~2.0 mg/ml의

Fig. 1. Effect of crude polysaccharides^a extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* on the life elongation of ICR mice^b inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection)^c

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

^b Each experimental group consisted of 10 mice.

^c i.p. injection intraperitoneal injection.

농도에서 Sarcoma 180과 HT-29 세포주에 대해서 약간의 독성을 나타내서[5] 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 뽕나무버섯의 자실체에서 증성염용액, 메탄올, 열수를 이용해 추출한 조다당류를 이용한 세포독성 실험에서는 0.01 mg/ml의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았으나 0.1 mg/ml에서는 30% 내외의 암세포주가 사멸하는 세포독성이 나타났다[10]. 따라서 대부분의 버섯 자실체에서 추출한 조다당류가 암세포주에 대해 독성을 거의 나타내지는 않으면서 생쥐의 Sarcoma 180 등에 대해 항암 효과를 보이는 것은 조다당류가 생쥐의 면역을 증강시킨 효과에 의한 것으로 사료된다.

수명 연장 효과

송이의 자실체에서 3 종류의 용매를 이용하여 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종된 생쥐에 주사하여 수명이 연장된 효과를 조사한 결과, 이들 생쥐의 평균수명은 3 종류의 조다당류 투여에 의해 24.0~37.2% 연장되었다. 대조군의 생쥐는 평균 생존 일수가 20일이었으나 열수추출 조다당류를 20 mg/kg body weight로 투여한 실험군 생쥐의 평균 생존일수가 30일로 대조군에 비해 10일 정도 길게 나타나 수명이 37.2% 연장되는 효과가 나타났다(Fig. 1). 흰목이[17], 민긴뿌리버섯[11] 및 삼색도장버섯[20]의 자실체에서 증성염용액을 이용하여 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 투여한 결과 수명이 각각 53%, 66.7%, 77.4% 연장된 것으로 나타나서 본 실험의 결과에 비해 수명연장효과가 높게 나타났다. 반면에 매미눈꽃동충하초의 자실체에서 증성염용액으로 추출한 조다당류를 투여한 생쥐의 수명은 32.3% 연장되어 수명연장 효과가 본 실험의 결과보다 짧게 나타났다. 따라서 위와 같은 여러 종류 버섯의 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 투여하여 수명이 연장된 효과는 약 32.3~77.4%로 나타나 버섯 추출 조다당류가 생쥐의 생명을 연장시키는 항암 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

비장세포의 증식에 미치는 영향

송이에서 추출한 3 종류의 조다당류 추출물에 대한 비장세포의 증식을 MTT법으로 관찰한 결과, 모든 농도의 조다당류는 대조군에 비해 높은 증식능을 나타내었는데, 열수 추출물은 0.5 mg/ml의 농도에서 가장 높은 3.6배의 증식능을 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 LPS는 0.005~0.05 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 4.2~4.4배의 증식을 보여주었다(Fig. 3). 액체 배양한 잣버섯의 균사체에서 추출한 다당류의 일종인 lepidan을 처리한 비장세포가 대조군에 비해 10배 이상 증식하였으며, 비장세포내의 B 임파구 증식도 촉진되었는 보고가 있다[9]. 또한 금목이의 자실체에서 메탄올, 증성염용액, 열수로 추출한 조다당류를 0.05~0.5 mg/ml의 농도

Fig. 2. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* 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. The Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW was extracted with hot water. IC₅₀ means 50% inhibition concentration.

Fig. 3. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* 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. 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.

로 처리했을 때 대조군에 비해 약 1.6~2.0배 높게 증식하였으며, 양성대조군으로 사용된 LPS는 0.05~0.5 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 약 2.2~2.6배 증식되었다[13]. 따라서

면역세포와 항체의 생산에 관여하는 비장 세포의 증식 촉진 은 면역 증강에 직접적인 영향을 미쳐 생쥐의 Sarcoma 180 에 대한 항암효과를 증진시키는 것으로 사료된다.

생쥐의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

B 임파구에서 분비되는 Alkaline phosphatase는 면역의 활성화에 관여하는 효소이다. 송이의 자실체를 메탄올, 중성염 용액 및 열수를 이용해 추출한 조다당류를 이용하여 B 임파구에서 alkaline phosphatase가 활성화된 양을 측정 한 결과, 열수에서 추출한 조다당류를 0.5 mg/ml 농도로 처리하여 대조군과 비교한 결과 11.9배의 높은 활성을 보였으나 0.05 mg/ml의 농도에서는 양성대조군으로 사용한 LPS에 비해서는 활성이 약간 낮게 나타났다(Fig. 4). 금목이 자실체에서 메탄올과 중성염용액을 이용하여 추출한 조다당류를 이용하여 alkaline phosphatase가 활성화된 양을 측정 한 결과 0.2~0.5 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해서 각각 1.1~1.2배의 활성을 나타냈으나 LPS를 처리한 양성대조군에 비해서는 활성이 약간 낮게 나타났다[13]. 장미무당버섯의 자실체를 열수로 추출한 조다당류를 0.05~0.5 mg/ml 농도로 처리한 실험군의 활성이 대조군에 비해 2.7~6.8배 높게 나타났으나 LPS를 0.05 mg/ml 농도로 처리한 양성 대조군에 비해서는 활성이

Fig. 4. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* 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/60mins) = $1.15 \times$ 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.

낮게 나타난 보고가 있다[5]. 따라서 송이를 포함한 대부분 약용버섯의 자실체에서 중성염용액, 메탄올 및 열수를 이용해 추출한 조다당류는 생쥐의 B 림파구의 alkaline phosphatase의 활성을 높이는 효과가 있는 것으로 보여 진다.

Cytokine 분비에 미치는 영향

송이에서 추출한 조다당류가 세포수준에서 면역조절에 미치는 효과를 확인하기 위하여 생쥐의 비장 세포에서 분비하는 cytokine (TNF- α , IL-2)의 양을 ELISA assay kit로 측정하였다. TNF- α 의 경우 열수로 추출한 조다당류는 0.1~1.0 mg/ml 농도의 범위에서 대조군인 ConA에 비해 높은 활성을 보였으며 열수 및 중성염으로 추출한 조다당류 0.1~1.0 mg/ml 농도의 범위에서는 LPS 보다 활성이 높게 나타났다. IL-2의 경우에는 열수로 추출한 조다당류의 농도 0.1~1.0 mg/ml 에서 대조군에서 비해서는 활성이 크게 높았으나 양성대조군인 ConA와 LPS에 비해 활성이 약간 높게 나타났고, 메탄올과 중성염용액으로 추출한 조다당류는 모든 농도에서 양성 대조군인 ConA와 LPS 보다 활성이 낮게 나타났다(Fig. 5). 뽕나무버섯부처의 자실체에서 중성염용액, 메탄올 및 열수로 추출한 조다당류가 0.001~1.0 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해서 TNF- α 의 활성이 높게 나타났고, 양성대조군인 Con A나 LPS에 비해서 이들 조다당류 활성은 각각의 농도에서 약간 높은 경향을 보였다[12]. 따라서 송이의 자실체에서 추출한 조다당류가 TNF- α 와 IL-2 사이토카인의 활성을 촉진시킴으로서 이들 사이토카인이 생쥐에 면역력을 증강시키고 항암효과를 높여 Sarcoma 180 점종생쥐의 수명을 연장시키는 것이 가능한 것으로 사료된다.

Fig. 5. Effects of fractions extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* 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. 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.

총 복강 세포 수에 미치는 영향

송이의 자실체에서 3종류 용매로 추출한 조다당류를 투여한 실험군 생쥐의 복강 세포 수는 조다당류의 추출방법과 조다당류 처리농도에 따라 차이가 있었지만, 일반적으로 조다당류를 처리한 모든 실험군의 생쥐 복강세포수가 대조군에 비해 2.5~6배 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 특히 조다당류를 높은 농도로 처리한 실험군의 생쥐 복강세포 수가 조다당류의 농도를 낮게 투여한 실험군에 비해 높게 나타는 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 버섯 추출 조다당류가 복강 내 세포의 증식을 활성화시켜 그 수를 증가시키는 데 효과가 있는 것으로 판단된다. 장미무당버섯에서 3 종류의 매로 추출한 조다당류를 10~50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포수가 대조군에 비해 1.4~5.6배 증가하였다는 보고가 있으며[5] 흰목이의 중성염 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐의 복강세포 수가 대조군에 비해 7.4배 증가하였다는 보고가 있다[17]. 따라서 버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 투여한 대부분 생쥐의 복강세포 수의

Fig. 6. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* on the numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW was extracted with hot water.

증가하고 또한 생쥐의 Sarcoma 180에 대한 면역과 항암 효과가 증강되는 데에는 정의 상관관계가 존재하는 것으로 판단된다.

혈액 중 백혈구의 수에 미치는 영향

백혈구는 체내 혈액을 구성하는 주요 성분으로 외부의 감염으로부터 생체를 1차적으로 방어하는 면역반응에 관여하는 세포이다[2]. 송이의 자실체에서 3 종류의 용매로 추출된 조다당류가 생쥐의 면역에 미치는 반응을 알아보기 위해 추출된 조다당류를 10, 20, 50 mg/kg body weight 농도로 조절하여 생쥐에 투여한 뒤 혈액 내의 백혈구 수를 조사하였다. 혈액 내의 백혈구 수는 대조군 2.35 ± 0.34 에 비해 중성염 추출 조다당류는 50 mg/kg body weight의 농도에서 3.50 ± 0.47 로 1.5배 증가하였으며, 열수 추출 조다당류는 50 mg/kg body weight의 농도에서 4.40 ± 0.28 로 약 1.9배의 증가를 나타냈다(Table 2). 민긴뿌리버섯의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류를 50 mg/kg body weight로 투여한 생쥐 실험군의 백혈구 수가 대조군에 비해 2.1배 증가하였고 중성염용액으로 추출한 조다당류를 같은 농도로 투여한 생쥐의 백혈구 수는 2.0배 증가하였다는 보고가 있다[11]. 따라서 송이의 자실체에서 열수로 추출한 조다당류가 투여된 생쥐의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.9배 증가한 것은 송이의 자실체에서 추출한 조다당류가 생쥐의 면역에 큰 기여를 할 수 있다는 것을 보여 준 사례라 판단된다.

면역 장기의 중량에 미치는 영향

송이의 자실체를 메탄올, 중성염용액 및 열수로 추출한 조다당류를 생쥐에 투여하고 면역과 관련된 장기인 간, 비장, 흉선의 중량변화를 조사한 결과, 장기의 중량은 각각의 서로 다른 추출방법과 농도에서 대조군과 유사한 양상을 보였다. 농도가 10~50 mg/kg인 열수 추출 조다당류를 투여한 실험

Table 2. Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* 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 ± 0.34^b
Fr. MeOH	10	10	2.00 ± 0.85
Fr. MeOH	20	10	2.20 ± 0.38
Fr. MeOH	50	10	2.86 ± 0.60
Fr. NaCl	10	10	2.80 ± 0.81
Fr. NaCl	20	10	2.90 ± 0.46
Fr. NaCl	50	10	3.50 ± 0.47
Fr. HW	10	10	2.10 ± 0.57
Fr. HW	20	10	4.40 ± 0.38
Fr. HW	50	10	4.00 ± 0.43

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

^bMean $\pm$ S.E.

군의 간, 비장 및 흉선의 무게는 대조군에 비해 소폭 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 3). 흰목이[17], 뽕나무버섯부치[12] 및 장미무당버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 투여한 실험[5]에서도 본 실험과 유사하게 실험군의 간, 비장, 흉선의 무게가 소폭으로 증가한다는 것을 보고하였다. 따라서 일반적으로 송이를 비롯한 대부분의 버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 투여한 생쥐는 간, 비장 및 흉선의 무게는 약간 증가하는 경향을 나타내는 것으로 사료된다.

요 약

송이는 담자균문, 주름버섯목, 송이과에 속하며 맛이 좋은 식용 버섯으로 예로부터 사람의 위궤양이나 위암의 치료효과는 물론 생쥐의 Sarcoma 180과 Ehrlich Sarcoma에도 효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 송이의 자실체로부터 중성염용액, 열수 및 메탄올을 이용하여 조다당류를 추출하고 ICR mice에 주사하여 항암 및 면역증강 효과를 조사하였다. NIH3T3, Sarcoma 180, HepG2, HT-29 등의 암세포에 대한 독성을 조사한 결과 각각의 암세포는 2 mg/ml의 조다당류 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다. Sarcoma 180이 접종된 ICR mouse에 자실체에서 추출한 각각의 조다당류를 투여한 실험군은 대조군에 비해 평균수명이 각각 23.4~37.2% 연장되었다. 메탄올과 열수로 추출한 조다당류를 0.2~0.5 mg/ml의 농도로 투여한 실험군 생쥐의 B 임파구 alkaline phosphatase 활성은 대조군에 비해 각각 2.17~11.9배의 증가하였다. 중성염추출 조다당류를 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 생쥐의 총 복강 세포 수와 백혈구의 수는 대조군에 비하여 각각 6배와 1.5배 증가하였다. 따라서

Table 3. Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake* 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	32.72±2.16	38.62±2.61	34.52±1.57	30.85±1.02	32.35±2.60	33.15±1.12	34.25±0.51	34.22±1.42	34.00±0.98
Liver weight (g)	1.76±0.26	1.75±0.19	2.27±0.33	2.25±0.33	1.95±0.20	2.05±0.05	1.95±0.10	1.95±0.10	2.05±0.23	2.17±0.26
Liver/Body (%)	5.51±0.79	5.67±0.75	5.89±0.85	6.55±1.23	6.80±0.98	7.10±1.75	7.78±2.52	5.69±0.31	6.00±0.79	6.39±0.78
Spleen weight (g)	0.18±0.075	0.13±0.05	0.18±0.05	0.20±0.00	0.26±0.05	0.17±0.05	0.26±0.00	0.20±0.00	0.20±0.06	0.20±0.08
Spleen/Body (%)	0.57±0.25	0.38±0.18	0.45±0.12	0.58±0.26	0.92±0.21	0.99±0.09	1.26±0.18	0.58±0.08	0.58±0.24	0.59±0.24
Thymus weight (g)	0.28±0.04	0.20±0.00	0.32±0.05	0.25±0.09	0.20±0.00	0.25±0.05	0.27±0.05	0.27±0.05	0.25±0.05	0.27±0.05
Thymus/Body (%)	0.88±0.14	0.61±0.04	0.84±0.12	0.66±0.30	0.69±0.13	0.80±0.09	0.85±0.11	0.80±0.14	0.73±0.18	0.81±0.15

^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.

송이의 자실체에서 추출한 조다당류는 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암작용 및 면역증강 작용을 나타내는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부, 과학재단이 “버섯균주 및 DNA은행”에 지원한 연구비 및 농촌진흥청의 농과계 대학기지원 사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Allison, D. C. and P. Ridolpho. 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 M. D. Guyton. 1986. *Textbook of medical physiology*. 7th Eds. W. B. Saunder Company. pp. 51-59.
- Cho, S. M., J. H. Lee, S. B. Han, H. M. Kim, S. H. Yoo and I. D. Yoo. 1995a. Immuno- stimulating Polysaccharides from the Fruiting Bodies of *Fomitella fraxinea* (1)- Characterization of polysaccharides extracted with neutral sodium chloride solution. *The Korean Journal of Mycology* **23**, 332-339.
- Cho, S. M., J. H. Lee, S. B. Han, H. M. Kim, S. H. Yoo and I. D. Yoo. 1995b. Immuno- stimulating Polysaccharides from the Fruiting Bodies of *Fomitella fraxinea* (2)- Isolation and characterization of hot- water extracted polysaccharides. *The Korean Journal of Mycology* **23**, 340-347.
- Choi, Y. I., K. W. Lee, H. Hur, W. Y. Lee and T. S. Lee. 2008. Immuno-potentiating and Antitumor Effects against Mouse Sarcoma 180 by Crude Polysaccharides Extracted from Fruiting Body of *Russula rosacea*. *The Korean Journal of Mycology* **36**, 84-92.
- Denizot, F. and R. Lang. 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., T. Uematsu, A. Hamada and S. Akiya. 1975. The polysaccharide from *Lampteromyces japonicus*. *Chem. pharm. Bull.* **23**, 1955-1961.
- Ji, J. H. and M. N. Kim. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 322-330.
- Jin, M. L. 1996. A Study on the Activation of Immune Cell and Transcription Factor of Pine Nut Mushroom. Collected Papers of Seoul National University Graduate School. pp. 1-121.
- Kim, S. B., K. W. Lee, H. Y. Kim, M. J. Shim, H. S. Rho, H. S. Lee, M. W. Lee, W. Y. Lee and T. S. Lee. 2006. Articles: Inhibitive effect of mouse sarcoma 180 by crude polysaccharide extracted from fruiting Body of *Aramillaria mellea*. *The Korean Journal of Mycology* **34**, 98-104.
- Kim S. B., K. W. Lee, W. Y. Lee and T. S. Lee. 2007. Articles: Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from fruiting Body of *Oudemansiella radicata*. *The Korean Journal of Mycology* **35**, 109-114.
- Lee, K. W., H. Y. Kim, W. H. Lee and T. S. Lee, 2007. Antitumor and immuno-modulatory effect against mouse sarcoma 180 of crude polysaccharides extracted from fruiting Body of *Armillaria tabescens*. *The Korean Journal of Mycology* **35**, 101-108.
- Lee, K. W., H. Y. Kim, H. Hur, M. W. Lee, M. J. Shim, W. Y. Lee and T. S. Lee. 2008. Antitumor and immuno-modulatory effect of crude polysaccharides from fruiting body of *Tremella aurantialba* against mouse sarcoma 180. *The Korean Journal of Mycology* **36**, 66-74.

14. Lee, K. Y., M. J. Han, S. Y. Park and D. H. Kim. 2000. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 477-480.
15. 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.
16. Oh, Y. H., W. Y. Lee, M. W. Lee, M. J. Shim and T. S. Lee. 2004. Immuno-modulatory and antitumor effect of crude polysaccharides extracted from sclerotium of *Grifola umbellata*. *The Korean Journal of Mycology* **32**, 23-30.
17. Oh, Y. H., S. B. Kim, K. W. Lee, H. Y. Kim, M. J. Shim, H. S. Rho, H. S. Lee, M. W. Lee, W. Y. Lee and T. S. Lee. 2006. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis*. *The Korean Journal of Mycology* **34**, 105-111.
18. Park, W. H. and H. D. Lee. 2002. Mushrooms in Korea. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., Seoul.
19. Shim, S. M., K. H. Im, W. Y. Lee, J. W. Kim, M. J. Shim, M. W. Lee and T. S. Lee. 2003a. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. *The Korean Journal of Mycology* **31**, 155-160.
20. Shim, S. M., K. W. Im, J. W. Kim, W. Y. Lee, H. W. Kim, M. W. Lee and T. S. Lee. 2003b. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Daedaleopsis tricolor*. *The Korean Journal of Mycology* **31**, 161-167.
21. Suzuki, M., T. Arika, T. Ameriya and M. Fujiwara. 1982. Cooperative role of T lymphocytes and macrophages in antitumor activity of mice pretreated with schizophyllan. *Jpn. J. Exp. Med.* **50**, 59-65.
22. Ying, J. Z., X. L. Mao, Q. M. Ma, Y. C. Zong and H. A. Wen. 1987. Icons of medicinal fungi from China. Science Press, Beijing, China.