

목질진흙버섯 단백질의 항암 면역조절 기능

정 경 수

충남대학교 약학대학

서론

암의 수술요법, 화학요법, 방사요법 등은 치료효과에 못지 않은 부작용이 뒤따르며 그중에서도 화학요법제의 면역독성, 신장독성, 간독성 등은 잘 알려진 바와 같다. 그러나 담자균류의 항암성 단백질은 세포독성 항암제들과는 숙주의 면역기능을 증강 또는 회복시킴으로써 항암력을 발휘할뿐만 아니라 화학요법제의 부작용을 완화시키거나 예방하여 주는 등 매우 유익하고 흥미로운 작용을 하고있다. 국내에서 담자균류의 항암성분이 항암면역요법제로 사용되고 있는 예는 구름버섯 (운지, *Coriolus versicolor*)의 PS-K(코포랑) 및 Krestin과 목질진흙버섯(상황: *Phellinus*)의 메시마-엑스를 들 수 있다. 이중 목질진흙버섯은 고목에 붙어 자라는 다년생의 버섯으로 Ikekawa에 의해 항암효과가 최초로 보고된 바 있으나 최근 연자 등에 의하여 군사체 배양이 성공적으로 이루어졌으며 그로부터 새로운 항암성 단백질체 메시마-엑스산이 개발되었다. 이에 연자는 이와 유사한 연구를 수행코자하는 국내 연자들을 격려하고 약학의 발전을 도모코자 지난 수년간 연자를 위시한 몇몇 연구자들에 의해 진행되어 온 연구 내용 및 경험등을 소개하고자 한다.

실험방법

1. *in vivo* 항암실험 : sarcoma 180-ICR 마우스를 실험 모델로 하되 복수암 유발시에는 복강에, 고형암 유발시에는 왼쪽 사타구니 피하에 이식하였다. 이식 용량은 1×10^6 cells/mouse로 하되 복수암에 대한 전투여 효과 실험에서는 2×10^5 cells/mouse로 하였다. 시료는 생리식염수에 용해시켜 멸균 후 복강 주사하였다.
2. *in vitro* 세포독성실험 : SNU1(인간의암세포주)에 대하여는 MTT assay를 시행하였고 L1210(마우스백혈병세포주)에 대하여는 trypan blue exclusion으로 세포독성을 확인하였다.
3. 유세포분석학적 연구
 - 1) 비장 백혈구 현탁액 조제 : Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이 들어 있지 않은 PBS (fatal calf serum 2.5% 첨가)를 사용하여 비장 세포 현탁액을 제조하고 적혈구는 0.83%

- NH₄Cl 용액으로 hemolysis시켰다.
- 2) 비장세포 배양 : complete RPMI배지에 세포를 현탁시키고 시료(0-200 g/ml)를 가하여 5% CO₂ incubator 에서 48-72시간 배양하며 ³H-thymidine uptake 실험 또는 면역형광염색을 시행하였다.
 - 3) 면역형광 염색 (immunofluorescence staining) : 백혈구 세포표면항원 (surface antigen)을 인식하는 단클론항체를 이용하여 간접적으로 면역형광염색을 시행하였다.
 - 4) 유세포 분석(flow cytometric analysis) : Becton Dikins사의 FACStar를 이용하여 분석하였다. 시료당 10,000개이 세포에 대하여 list mode 자료를 취합한 후 Consort 30 프로그램을 이용하여 forward scatter와 dot plot상에서 전 비장세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast 영역을 분석하였다.
 4. 항체생성 세포 (plaque-forming cells) 수에 미치는 효과 : sarcoma 180을 피하에 이식하고 5일간 시료를 투여한 후 제 15일에 면양적혈구 (4×10^8 또는 1×10^7 cells/mouse)를 ip 접종하였다. 5일 후 비장을 적출하여 그 중의 용혈반형성 세포를 LHG(localized hemolysis in gel)법으로 측정하였다.
 5. Cyclophosphamide 간독성 억제 효과 실험 : 제1일부터 6일 및 8일에 시료를 투여하고 7일 및 9일에는 cyclophosphamide(100mg/kg)를 투여하였다. 제11일에 실험동물의 하지 동맥으로부터 혈액을 채취하여 serum을 분리한 후 Ciba-Corning사의 Express 550혈액분석기로 GOT, GPT 농도를 분석하였다.
 6. 부분 분절에 의한 항암효과의 증대 : 장내미생물의 효소작용을 PL-Kp를 부분분절시킨 후 *in vivo* 항암실험을 시행하였다.

결과

in vivo 항암실험 및 *in vitro* 세포독성 실험결과 PL-Kp는 ICR 마우스내에 sarcoma 180 고형암 및 복수암 모델에서 항암효과가 있었으며 암세포 이식 -10일 부터 -1일 까지의 투여에 의해서도 항암력이 발휘되었다. (Table 1).

그러나 *in vitro* 실험에서 위암세포 SNU 1 및 마우스 백혈병 세포주 L1210에 대하여 200µg/ml까지도 직접세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 PL-Kp는 숙주의 면역기능에 의존하여 항암력을 나타냄을 알 수 있다. 한편 면역형광염색/유세포분석학적 연구결과, PL-Kp는 단암(tumor-bearing)동물에서는 감소된 T세포를 회복시켰으나 정상 마우스에서는 B 세포를 증가시키는 등 상이한 면역 조절 작용을 나타내었다. (Table 2)

한편 비장 백혈구에 대하여 lymphoblast 형성을 촉진 하였으며 (Table 3), 특히 면역계의 증추적 역할을 감당하는 CD4⁺ T 세포에 현저한 blastogenic effect를 발휘하였다 (Table 4). 또한 항체생성에 미치는 영향을 실험한 결과 PL-Kp는 면역기능이 현저히 억제된 담암 ICR 마우스의 항체생성 능력을 129배 증가시킴으로써 억제된 면역기능 회복(immunorestoring)효과를 발휘하였다 (Table 5). 한편 PL-Kp는 cyclophosphamide 투여로 인한 간손상을 효과적으로 예방하여 혈중 GOT 증가를 현저히 억제하였으며 체중 및 비장, 간장, 중량의 감소도 유의성 있게 억제함으로써 cyclophosphamide 독성완화 작용이 입증 되었다. (Table 6) 한편 장내미생물의 효소 작용을 이용하여 다당체를 부분 분절(fragmentation)시킨 결과 PL-Kp의 항암력이 현저히 증대되었다. (Table 7)

결론

목질진흙버섯의 항암성 단백다당체 PL-Kp는 다양한 면역 조절 작용을 나타내는 항암 면역조절 물질로서 화학요법제의 부작용 완화 작용이 있어서 암의 치료 등에 매우 유용하게 활용될 수 있으리라 믿어진다. 또한 면역형광염색 및 유세포분석기법이 면역증강제, 항암 면역제 등 면역조절제의 검색 및 작용기전 등을 규명함에 있어서 매우 효과적으로 활용될 수 있음이 확인되었다.

Table 1. Antitumor effect of PL-Kp-Pretreatment against scarma 180 ascites tumor in female ICR mice.

dose (mg/kg)	No of mice	Body weight (g)	Spleen weight	No of sarcoma 180 recovered (x 10)	% inhibition
0	14	33.0 ± 2.6 ^a	142.9 ± 27.6	395.4 ± 281.5	-
20	16	33.7 ± 2.0	158.8 ± 35.2	184.7 ± 150.3 [*]	53.3
50	14	32.3 ± 1.6	168.5 ± 24.4 [*]	233.7 ± 192.4	40.9
100	14	34.1 ± 2.3	190.8 ± 35.2 ^{**}	77.9 ± 92.6 ^{**}	80.3

^amean ± S. D., ^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01

Table 2. Effect of PL-Kp on the splenic leukocyte composition of the BALB/c mice.

PL-Kp	T cells	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Macrophages	B cells
100mg/kg	32.1 ± 0.7 ^a	20.4 ± 0.5	11.7 ± 0.5	17.0 ± 2.4	59.4 ± 1.8 [*]
-	32.0 ± 1.2	20.7 ± 1.5	11.9 ± 0.7	14.3 ± 1.9	52.8 ± 3.9

^amean ± S.D., *p < 0.05, **p < 0.01.

Table 3. Lymphoblast-formation stimulatory activity of PL-Kp on the splenic lymphocytes of BALB/c mice.

stimulant		40 hr		70 hr	
		cpm (mean ± SD)	SI [*]	cpm (mean ± SD)	SI [*]
none	-	1757.3 ± 133.5	1.00	1629.8 ± 305.4	1.00
PL-Kp	1 µg/ml	1963.0 ± 214.3	1.12	2116.8 ± 224.9	1.30
PL-Kp	10 µg/ml	1953.8 ± 156.9	1.11	3210.7 ± 307.3	1.97
PL-Kp	100 µg/ml	3272.3 ± 105.2	1.86	5305.8 ± 355.2	3.32
LPS	50 µg/ml	25651.5 ± 1054.8	14.5	31868.0 ± 908.0	19.5

*SI=Stimulation index

Table 4. Blastogenic effect of Kp on the splenic leukocytes.

Kp ($\mu\text{g/ml}$)	% blasts	% Jij ⁺ (T cells)	% J11d (B cells)	%Gk 1.53 ⁺ (CD4 ⁺) cells in total small lymphocytes balsts		
0	35	46.4	64.2	28.3	6.3(198/3168)*	74.4(1061/1427)
25	41	48.9	56.8	30.8	5.4(162/2992)	75.4(1206/1599)
50	44	48.9	58.3	33.2	5.9(165/2777)	76.3(1292/1693)
100	48	51.0	52.9	34.5	6.1(165/2751)	75.9(1380/1819)
200	54	52.9	48.6	39.4	5.7(140/2469)	76.7(1639/2138)

*counts of the positively labeled cells/total cells in the gated area.

Table 5. Hemolytic Plaque-forming Cells (PFC) in the Spleen of ICR Mice.

Sarcoma -180	SRBC	No. of mice	Spleen weight (mg) (M \pm SD)	No. of splenic leukocyte (x10 ⁷)	PFC/ spleen (x10) (M \pm SD)	PFC/ 10 cells	Stimulation Index
control	1x10 ⁶ 4x10 ⁸	4	315 \pm 44	30.6 \pm 6.89	447 \pm 81	1450	-
PL-Kp	1x10 ⁶ 4x10 ⁸	4	283 \pm 58*	28.1 \pm 5.96*	414 \pm 157*	1473	0.93
control	1x10 ⁶ 1x10 ⁷	10	240 \pm 54	21.4 \pm 3.67	2.0 \pm 0.5	9.5	-
PL-Kp	1x10 ⁶ 1x10 ⁷	10	317 \pm 69*	29.1 \pm 3.94*	259 \pm 53.5**	889	129.0
normal	- -	2	190 \pm 28	18.9 \pm 6.30	1.6 \pm 0.5	8.6	-

*not significant at p = 0.05 *p < 0.05, **p < 0.01

Table 6. Protective effect of PL-Kp against the hepatotoxicity of cyclophosphamide in ICR mice.

	CP	PL-Kp	Body wt	Spleen wt.	liver wt.	GOT	GPT
		(mg/kg)	(g)	(mg)	(g)	(U/L)	(U/L)
normal	-	-	30.9 ± 1.6	146.7 ± 18.7	2.16 ± 0.21	73.0 ± 22.3	29.4 ± 9.98
control	yes	-	28.1 ± 1.4 ^{**}	60.3 ± 9.4 ^{**}	1.92 ± 0.16 [†]	134.6 ± 43.7 ^{**}	38.2 ± 6.9
treated	yes	100	32.6 ± 1.4	90.0 ± 14.7 ^{**}	2.22 ± 0.15	89.1 ± 15.2	28.7 ± 4.7
treated	yes	50	28.2 ± 2.6 [†]	96.5 ± 16.3 ^{**}	2.07 ± 0.26	76.5 ± 11.9	30.1 ± 5.6

[†]CP = cyclophosphamide, 100mg/kg x 2, ip, [†]p < 0.05, ^{**}p < 0.01.

Table 7. Antitumor effect of PL-Kp and its partially fragmented products against sarcoma 180 solid tumor in ICR mice.

	dose	splen weight	tumor weight	% tumor
	(mg/kg, ip)	(mg)	(g)	Inhibition
control	-	205 ± 57 ^a	2.00 ± 1.03	-
PL-Pk	100	224 ± 71	1.01 ± 0.78 [†]	49.5
PL-Pk	20	229 ± 59	1.16 ± 0.82	42.0
PL-Pka	100	250 ± 54	0.48 ± 0.35 ^{**}	76.0
PL-Pka	20	200 ± 24	1.20 ± 0.98	40.0
PL-Pkb	100	267 ± 30	0.37 ± 0.45 ^{**}	81.5
PL-Pkb	20	169 ± 36	0.26 ± 0.30 ^{**}	87.0
PL-Pkc	100	240 ± 31	1.92 ± 0.85	4.0
PL-Pkc	20	194 ± 25	1.51 ± 11.28	24.5

^amean ± SD, [†]p < 0.05, ^{**}p < 0.01.