

*Lyophyllum decastes*의 抗癌成分의 免疫學的 研究(I)

李 廷 玉·崔 應 七·金 炳 珪

서울대학교 藥學大學

(Received March, 1987)

Immunological Studies on Antitumor Component of *Lyophyllum decastes*(I)

Chong Ock Lee, Eung Chil Choi and Byong Kak Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—To elucidate action mechanism of lyophyllan A, an antitumor polysaccharide of *Lyophyllum decastes*, its immunological activities were examined. Lyophyllan A increased significantly the weights of spleen and liver of mice. Lyophyllan A also restored the decreased thymic weight in tumor-bearing mice. It did not show any direct cytotoxicity against tumor cells, but showed immunopotentiating activities by increasing the number of the plaques in hemolytic plaque assays. Lyophyllan A increased the number of peritoneal exudate cells (PEC) and inhibited the growth of sarcoma 180 mixed with PEC. Moreover the macrophages from lyophyllan A-treated mice exhibited a strong cytotoxic activity towards L5178Y target cells.

담자균류에서 발견된 lentinan¹⁾, schizophyllan²⁾, 효모의 세포벽 zymosan³⁾과 효모의 glucan⁴⁾, 세균제제인 BCG⁵⁾ 및 *Corynebacterium parvum*⁶⁾, 방선균류의 하나인 *Nocardia rubra*의 세포벽성분⁷⁾ 등의 강력한 항암작용이 보고되었다. 그렇지만 이들 중에도 세균제제인 BCG나 Freund's complete adjuvant와 같은 면역보조제가 생체내에서 종종 복잡한 부작용을 나타내기 때문에 종양 면역을 증가시키기 위한 보조제로서 사용시에는 지장이 있는 것으로 밝혀지고 있다.⁸⁾ 반면에 담자균류에서 분리한 다당체 성분은 숙주에 대해 독작용을 수반하지 않으면서 종양 억제 작용을 나타내는 것으로 발표되었다.⁹⁾

담자균류의 항암성분에 대한 연구는 *Calvatia gigantea*로부터 calvacin¹⁰⁾이 분리된 후 활발히 진행되어, *Lentinus edodes*로부터 다당체인 lentinan, 단백다당체인 KS-2¹¹⁾, *Coriolus versicolor*로부터 단백다당체인 PS-K¹²⁾ 등이 보고되었다. 최근에는 보다 더 우수한 종양 억제 효과를 가진 성분을 분리하려는 연구는 물론이고 그 종양 억제 작용의 기전을 究明하려는 연구가 진행되고 있다. 이러한 면역 증강제의 작용기전을 밝히기 위해 체액성 면역 및 세포성 면역에 대한

영향, macrophage에 대한 영향, 보체계에 대한 영향 등에 대한 연구가 수행되고 있다. lentinan, zymosan 등이 neonatal thymectomized mice에서는 sarcoma 180에 대한 종양 억제 작용을 전혀 나타내지 않았으므로, 이 물질들의 종양 억제 효과에는 흉선이 뚜렷한 역할을 하는 것이 입증되었다.¹³⁾ 또한 lentinan은 생체내에서 macrophage를 활성화시켜 암세포에 대하여 독성작용을 나타낸다는 것이 보고 되었으며¹⁴⁾ lentinan 투여시 혈청 단백질 성분의 독특한 증가도 보고되었다.¹⁵⁾

한국산 담자균류의 항암성분에 대한 연구는 구름버섯, 포고버섯, 느타리버섯 등의 자실체의 고분자 추출물이 sarcoma 180에 대해 강력한 종양 억제 작용이 있음을 보고함으로써 시작되어¹⁶⁾, 노랑다발 자실체¹⁷⁾, 덕다리버섯¹⁸⁾, 뽕나무버섯¹⁹⁾, 애기줄자미버섯²⁰⁾ 및 *Lyophyllum decastes*의 배양 균사의 항종양 성분²¹⁾ 등이 보고된 바 있다. 그러나 이러한 항암 성분의 작용기전에 대해서는 자세히 밝혀진 바 없으며, 단지 마우스의 용혈반 형성 세포수의 증가 및 복강 세포수의 증가만이 보고되었다.

본 연구에서는 *Lyophyllum decastes*의 배양균

사로 부터 분리된 강력한 항종양작용이 있는 단백다당체 lyophyllan A²³⁾의 면역학적 작용기전을 구명 하였기에 보고하는 바이다.

實驗 方法

시료—*Lyophyllum decastes*(Fr.) Singer의 배양균사로 부터 분리된 항 종양 성분인 lyophyllan A를 사용하였다.

면역관련 臟器 중량의 변화—ICR 웅성 마우스를 대조군(N), 시료 투여군(L), sarcoma 180 세포를 오른쪽 옆구리에 피하 이식한군(T), 그리고 sarcoma 180 세포를 옆구리에 피하 이식후 3일부터 시료를 투여한군(TL) 등으로 분류하여 실험하였다. L군과 TL군의 시료는 lyophyllan A 40mg/kg을 5일간 연속으로 복강내에 투여하였고, N군과 T군은 시료 대신 생리 식염수를 투여하였다. 시료 투여후 7일 후에 실험 동물의 중량을 측정할 후 치사시켜 간, 비장, 흉선을 적출하여 중량을 측정하였다.

암세포에 대한 직접적 작용—1) Sarcoma 180 세포에 대한 lyophyllan A의 직접적 효과 : 복수형 sarcoma 180세포(2×10^5 cells/ml)를 lyophyllan A 0.08 mg/ml, 0.16 mg/ml, 0.40 mg/ml를 각각 포함한 Roswell Park Memorial Institute medium number 1640(RPMI 1640, Gibco Lab.) 배지에서 배양하였다. 이 배지는 20% fetal bovine serum(FBS, Irvine Scientific)을 첨가하여 사용하였다. 배양후 0.2% trypan blue액으로 염색하여 배양된 세포중의 생존 세포수를 hemacytometer로 측정하였다.

2) L5178Y 세포에 대한 lyophyllan A의 직접적 효과 : L5178Y 세포는 日本 東京大學 응용 미생물연구소의 田中信男 교수로 부터 분양 받았다.

L5178Y 세포(1×10^5 cells/ml)를 lyophyllan A (0.08, 0.16, 0.40 mg/ml)가 포함된 RPMI 1640 배지(10% FBS 포함)에서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂가 유지된 배양기에서 배양하여 24, 48, 72시간에 각각 0.2% trypan blue 염색하여 살아 있는 세포의 수를 hemacytometer로 측정하였다.

마우스의 용혈반 형성 세포수에 미치는 영향—1) 실험동물 : 웅성 ICR마우스로 체중이 20~25g인 것을 사용하였다.

2) 시약 및 재료 : ① Balanced salt solution (BSS) ② 0.83% NH₄Cl solution ③ 면양 적혈구(sheep red blood cell, SRBC)는 건강한 면양으로부터 채취한 신선한 혈액을 국립 보건 연구원에서 분양받아 처리하였다. ④ Alsever's solution은 glucose 20.5 g, NaCl 4.2 g, sodium citrate 8.0 g을 1 l의 증류수에 용해시킨 후 millipore filtration(0.45 μm)하였다. ⑤ Complement로서는 국립보건원 미생물부에서 역가를 조정된 guinea pig complement를 사용하였다. ⑥ Microchamber는 Cunningham's chamber(Takahashi Giken Glass 76×26 mm)를 사용하였다.

3) 방법²³⁾ : ① 각 실험군마다 5마리의 마우스를 사용하고, 대조군에는 생리 식염수를, 처치군에는 lyophyllan A 40 mg/kg씩을 연속적으로 5일 복강내에 주사하였다. 최종 시료 투여일로부터 7일 후에 SRBC 1×10^7 cells를 복강내 주사하여 면역시켰다. ② 5일 후에 마우스를 치사시켜 비장을 적출하였다. 적출한 비장을 빙냉의 BSS와 함께 분쇄하여 비장세포를 유리시키고 400×g에서 5분간 원심 분리 하였다. 상정액을 제거후 37°C의 0.83% NH₄Cl 용액에 부유시켜 3분간 방치하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 원심분리하여 빙냉의 BSS에 부유시켜 적혈구 제거 비장 세포수를 hemacytometer로 측정하였다. ③ Alsever's 용액에 현탁된 SRBC를 생리 식염수로 4회 세척하고(400×g, 5분), 마지막 세척후 20%(v/v)가 되도록 생리 식염수에 부유시켰다. ④ 20%(v/v) SRBC 250 μl, complement 500 μl를 혼합하여 ice bath상에서 30분간 방치후 사용하였다. ⑤ Complement-SRBC 150 μl, 비장 세포 부유액 650 μl를 잘 혼합하여 microchamber에 100 μl씩을 주입하였다. ⑥ 위의 microchamber를 wax-vaseline(1:1)으로 밀봉하여 37°C에서 1시간 배양후 형성된 용혈반(plaque-forming cells, PFC) 갯수를 측정하였다. ⑦ 100만개의 비장세포중 용혈반 형성 세포수(PFC/10⁶ spleen cells) 및 비장 세포 전체중의 용혈반 형성 세포

수(PFC/spleen)을 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{PFC}/10^6 \text{ spleen cells} = \frac{N}{C \cdot V_m \cdot a} \times 10^6$$

$$\begin{aligned} \text{PFC}/\text{total spleen cells} \\ = \left(\frac{\text{PFC}}{10^6 \text{ spleen cells}} \right) \cdot C \cdot V_s \end{aligned}$$

단, $a = \frac{650}{800}$ (배양 혼합액 중의 비장세포 부유액의 비율)

N: the number of plaque observed in a microchamber

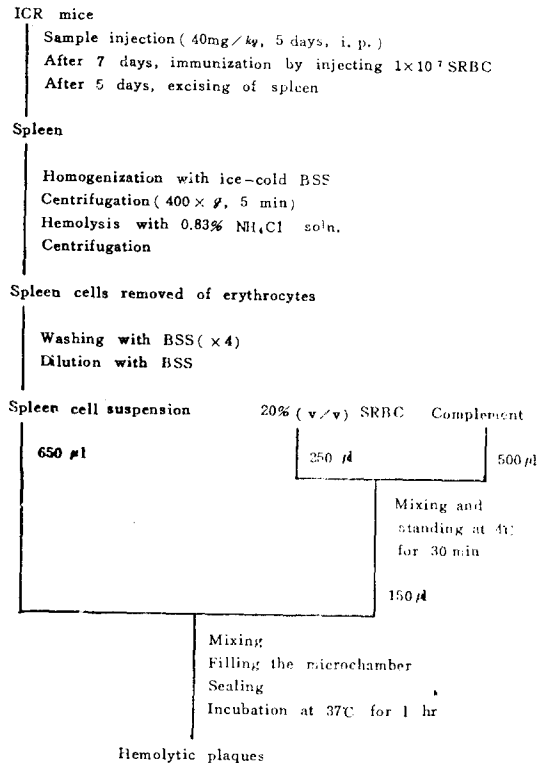
C: the count of spleen cells in 1ml of spleen cell suspension

V_m : volume of incubation mixture filled into a microchamber(ml)

V_s : total volume of spleen cell suspension (ml)

이상의 과정을 Scheme I에 요약하였다.

마우스의 복강 세포군에 미치는 영향—1) 실험 동물 및 약물투여: 18~20 g의 ICR웅성 마우



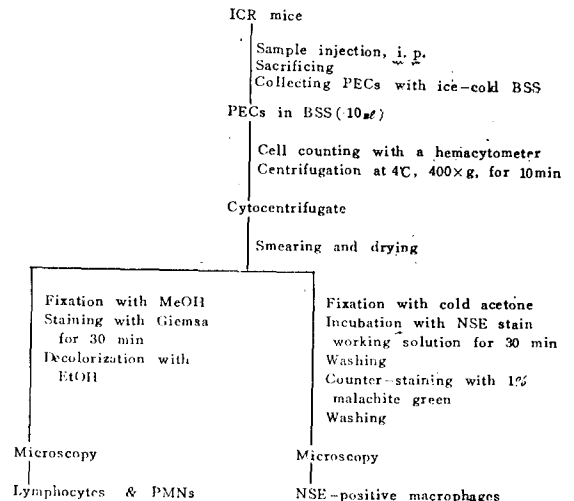
Scheme I—Procedure of hemolytic plaque assay.

스에 lyophyllan A 50mg/kg을 복강내에 1회 주사하였다.

2) 복강 세포 측정: 약물 투여 후 1일, 3일, 5일, 7일에 실험 동물을 치사시키고 복강을 빙냉의 BSS로 세척, 복강 세포(peritoneal exudate cell, PEC)를 모아 hemacytometer로 총 복강 세포수를 측정하였다.

3) Lymphocyte 및 Polymorphonuclear leucocyte (PMN)의 측정: 상기의 복강 세포액을 4°C, $400 \times g$ 에서 10분간 원심 분리하여 세포침전물을 얻고 이를 0.2 ml 정도의 BSS에 현탁시켜 slide glass상에 도말하여 건조시켰다. 건조된 도말표본을 100% 메탄올로 5분간 고정 한 후 Giemsa staining solution을 가하여 실온에서 30분간 염색하였다. 염색 후 과잉의 염색액을 따라내고 95% ethanol로 세척액이 맑아질때까지 탈색하였다. 건조 후 cedar oil을 mounting 용액으로 하여 $\times 1,000$ 으로 관찰하였다. 세포의 모양이 둥글고 크기가 고르며 전체가 진한 청색으로 염색된 것을 lymphocyte로, 진하게 염색된 여러개로 보이는 핵 또는 도너츠 모양으로 생긴 핵을 지닌 세포를 PMN으로 보았다.

4) Macrophage의 측정: 상기한 방법으로 자연 건조된 복강세포 도말표본을 ice bath 상에서 빙냉의 acetone으로 5분간 고정시킨 후 mac-



Scheme II—Method for examining effects of lyophyllan A on peritoneal cell population.

rophage의 특징적인 효소인 nonspecific esterase (NSE)를 확인하는 방법으로 NSE staining을 시행하였다.²⁴⁾ 고정 후 상수로 세척하고 NSE staining solution에 세포 도말편을 하향하여 넣고 37°C에서 30분간 염색을 시행하였다. 상수로 세척한 후 1% malachite green으로 counter staining을 하고 다시 세척후 glycerol을 mounting solution으로 하여 관찰하였다. malachite green에 의해 염색된 반달 모양의 핵을 가지며 cytoplasm내에 NSE stain에 의해 염색된 적색의 입자를 지닌 세포를 macrophage로 하였다 (Scheme II).

Sarcoma 180의 *in vivo* 성장에 미치는 腹腔細胞의 영향—lyophyllan A의 투여후 복강내 세포를 분리하여 sarcoma 180과 혼합하여 sarcoma 180 세포의 성장에 대한 복강 세포의 영향을 측정하였다.

1) 복강 세포의 제조 : 20~23 g ICR-여성 마우스를 각 실험군마다 10마리씩 사용하여, 대조군(N), 시료 투여군(L), sarcoma 180을 옆구리에 피하 이식한 군(T), 그리고 sarcoma 180을 피하 이식후 시료를 투여한 군(TL) 등으로 분류하여 실험하였다.

Fig. 1에 도시한 바와 같이 L군은 lyophyllan A 40 mg/kg을 연속적으로 5회 복강내 주사하고, 시료 투여후 1일 및 7일에 복강 세포를 취하고 각각 L-1 및 L-7군으로 하였다.

TL군은 sarcoma 180(1×10^6 cells/mouse)를 마우스의 옆구리에 피하이식후 3일후 부터 lyophyllan A 40 mg/kg을 연속 5회 腹腔내 투여한 후 1일 및 7일에 복강 세포를 취하여 각각 TL-1 및 TL-7군으로 하였다. T군은 TL군의 sarcoma 180 이식 시기와 동일한 날에 종양을 이식한 후 복강세포를 같은 시기에 취했다. 각 마우스는 경동맥을 절제하여 bleeding 시켜서 복강세포에 RBC가 혼입되는 것을 막았으며 氷冷의 생리 식염수로 복강 세포액을 취해서 세척한 후 사용하였다.

2) 복강 세포액과 sarcoma 180의 혼합실험 : 7일된 복수형 sarcoma 180 세포 1×10^6 cells와 상기 각 군의 복강 세포 8×10^5 cells를 상온에서

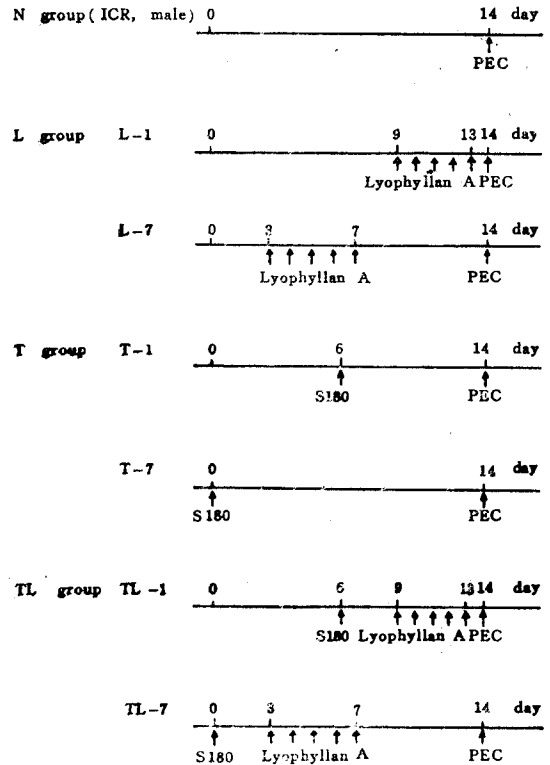


Fig. 1-Protocol for collection of peritoneal exudate cells from mice given various treatments at different periods.

혼합하여 20~25 g ICR 여성 마우스 옆구리에 피하 이식하였다. 각 군은 5마리의 동물을 사용하였으며 이식후 30일 후에 치사시켜 유발된 고형암을 적출해 내어 그 중량을 측정하였다. 이 동물 실험의 대조군으로서 sarcoma 180 (1×10^6 cells)만을 이식하여 실험하였다.

활성화된 세포 독성 macrophage의 유도—1)

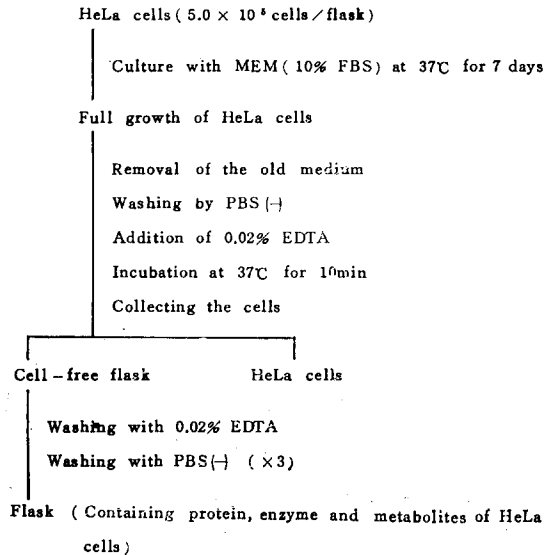
시약 : ① Hank's balanced salt solution(HBSS) : HBSS 시약용 분말 9.8 g을 2차 증류수에 녹여 1 l가 되도록 한 후 NaHCO_3 0.2~0.35 g을 가하여 pH를 7.4로 조정하고 kanamycin 50 mg(50 $\mu\text{g/ml}$)을 가하고 용해시킨 후 millipore filtration (0.45 μm) 하였다. 사용시 필요하면 heparin 2 unit/ml를 첨가하였다. ② Phosphate buffered saline(—) [PBS(—)] : NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.15 g, KH_2PO_4 0.2 g을 2차 증류수 1 l에 용해시켰다. PBS(—)는 Ca^{++} 와 Mg^{++} 을 포

함하지 않은 것이다. ③ 10 mM EDTA solution: EDTA disodium 0.372 g을 PBS(-) 100 ml에 녹여 그 free acid를 0.5 N NaOH로 중화시켜 pH를 7.0으로 조정하여 millipore filtration(0.45 μ m) 하였다. ④ 0.02% EDTA solution: 10 mM 용액을 PBS(-)로 희석하여 사용하였다. ⑤ FBS: 56°C에서 30분동안 불활성화시켜 사용하였다. ⑥ Eagle's minimum essential medium(MEM): MEM분말 9.4 g을 2차 증류수 1 l에 녹인후 NaHCO_3 를 첨가하여 pH를 7.1~7.4로 조정한다. 다음 kanamycin 50 mg, glutamin 0.292 g을 가하여 잘 용해시킨 후 millipore filtration(0.45 μ m) 하였다. 사용시 필요하면 FBS를 첨가하였다. ⑦ RPMI 1640 세포 배양용 배지: 이 배지 10.4 g을 2차 증류수 1 l에 녹인후 2.0 g의 NaHCO_3 를 가하고 1 N HCl로 pH를 6.9~7.2로 조정하였다. kanamycin 50 mg을 가하고 millipore filtration하였다. 사용시 필요하면 FBS를 첨가하였다. ⑧ Counting cocktail: 2,5-diphenyloxazole(PPO) 7 g, 1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl) benzene(POPOP) 0.5 g을 1 l의 toluene에 녹여 사용하였다. ⑨ [methyl- ^3H] thymidine(specific activity, 20.0 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) ⑩ Filter paper disc: Whatman 3 MM, 2.4 CMS filter paper를 사용하였다.

2) Macrophage 분리용 flask의 제조: HeLa cell은 일본 국립 암센터 연구소 新田和男 박사님으로부터 분양받았다. 배양용 flask는 25 $\text{cm}^2/50$ ml angled neck(Nunc) flask를 사용하였다.

5×10^5 HeLa cells은 10% FBS를 첨가한 MEM 배지에서 37°C, 7일동안 배양하였다. 7일후 세포가 충분히 성장하면 상정액은 버리고 PBS(-)로 세척한 다음 0.02% EDTA를 가해 37°C에서 10분간 배양하였다. 배양 flask의 기벽에 부착되어 있던 cell이 기벽으로부터 분리된다. 프라스크안에 있는 세포는 모두 제거하고 0.02% EDTA 용액으로 세척하고 난 다음 PBS(-)로 3회 세척하였다. 이 flask는 기벽에 일부 단백질, 효소, HeLa cell의 대사산물 등이 부착되어 있다. 따라서 macrophage의 부착시 기벽과의 분리를 용이하게 해 준다(Scheme III).

3) 복강 세포의 제조: 20~25 g의 ICR 웅성 마



Scheme III - Preparation of culture flask for macrophage attachment from HeLa cell culture.

우스를 사용하여 전술한 Fig. 1과 동일한 방식으로 N, L-1, L-7, T-1, T-7, TL-1, TL-7 등으로 실험군을 나누어 복강내 세포를 마우스의 경동맥을 절제하여 bleeding시킨 후 분리하였다. 빙냉의 HBSS(heparin 2 unit/ml 포함)을 5~6 ml 복강내에 주사하였다. 복부의 피부를 잘 제거하고 syringe로서 복강 세포를 취하였다.

4) Macrophage의 제조: 상기의 복강 세포를 4°C, 400×g로서 10분간 원심분리하여 HBSS(heparin 불포함)로 세척하고 원심분리 후 RPMI 1640(10% FBS 포함)에 부유시켰다. 상기에서 HeLa cell배양 flask로부터 제조한 flask에 복강 세포를 가하였다.

37°C에서 1시간 동안 배양한 후 상정액을 제거하고 HBSS로서 3회 세척하였다. RPMI 1640 2.4 ml와 10 mM EDTA 0.5 ml를 가하고 37°C, 45분간 배양하였다. flask내의 macrophage를 모두 취해 원심분리하고 HBSS로서 2회 세척하고 RPMI 1640에 부유시켰다(Scheme IV).

5) Target cell: 연속적으로 RPMI 1640(10% FBS)에서 배양하고 있는 L5178Y cell을 사용하였다.

6) Macrophage의 세포 독성 실험: Target L

ICR mice

- Sacrifice
- Ice-cold HBSS (containing heparin 2unit/ml)
- 5-6ml i. p. injection
- Massage
- Removal of the skin
- Collecting PECs by syringe

PECs

- Centrifugation at 4°C, 400×g, for 10 min
- Washing with HBSS (without heparin)
- Centrifugation
- Suspension in RPMI 1640 (10% FBS)

PECs in RPMI 1640

- Addition to flasks (made by cultured HeLa cells)
- Incubation at 37°C for 1 hr
- Removal of the non-adherent cells
- Washing with HBSS (×3)
- Addition of RPMI 1640 2.4ml and 10mM EDTA 0.8ml
- Incubation at 37°C for 45 min
- Collecting macrophages
- Centrifugation at 4°C, 400 ×g, for 10 min

Macrophages

- Washing by HBSS (×2)
- Addition of RPMI 1640

Macrophages in RPMI 1640

Scheme IV-Preparation of adherent peritoneal exudate cells (macrophage) from ICR mice.

Adherent PECs (macrophages) / Target tumor cells

(L 5178Y 5×10⁴ cells)

(×10, ×20)

- Incubation for 48 hr at 37°C in 5% CO₂ gas incubator
- Centrifugation

Cyto-centrifugate

- Addition of RPMI 1640 (10% FBS)
- Labeling with [³H] TdR (1μCi/ml) of viable cells

Cell suspensor

- Addition of 0.1ml to filter paper disc.
- Soakage in 5% cold TCA (×3)
- Ethanol
- Ethanol : ether (1 : 1) (×2)

Air drying

Counting of [³H] TdR incorporation into viable cells

Scheme V-Procedure for cytotoxicity test of macrophage induced by lyophyllan A.

5178Y 5×10⁴ cell와 ×10, ×20 (effector/target) 의 macrophage를 혼합하여 (Falcon* 2054 tube 사용) 37°C, 5% CO₂ gas 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

배양후 400×g, 10분 동안 원심분리하여 상정액을 제거하고 RPMI 1640 (10% FBS)를 가하였다. 잘 혼합하여 [methyl-³H] thymidine을 1 μCi/ml씩 가하여 37°C에서 1시간~1시간반 배양하여 살아있는 세포의 DNA에 labeling시켰다.

0.1 ml를 filter paper disc에 흡수시킨 후, 살아있는 세포에 incorporated된 ³H-TdR을 氷冷 5% TCA로 흡수시켰다(1회에 15분씩 3회). ethanol로 지방을 제거하고 ethanol:ether(1:1)용액으로 TCA를 제거하였다. 말린 후 counting vial에 넣고 5 ml의 counting cocktail을 가한 후 liquid scintillation spectrometer (Packard, model 3385)로 방사능(cpm)을 측정 하였다(Scheme V).

7) 결과계산 : 측정된 cpm의 평균치를 구하여 cytolytic activity(%)를 다음과 같이 구하였다.

$$\text{Cytolytic activity}(\%) = \left(1 - \frac{\text{cpm in target cells cultured with activated macrophages}}{\text{cpm in target cells cultured with normal macrophages}} \right) \times 100$$

실 험 결 과

면역 관련 장기 중량의 변화—1) 체중의 변화 : 각 실험군에서 체중의 차이는 관찰되지 않았다(Table I).

2) 간 중량의 변화 : 간 중량은 lyophyllan A 투여군이 대조군에 비하여 32.2% 증가하였으며, 담암동물군(TL군)의 경우에도 시료의 투여로 36.8%가 증가되었다(Table I).

3) 비장 중량의 변화 : 비장의 중량은 대조군에 비하여 L, T, TL군 모두 증가하였다. 특히 담암 동물군에 lyophyllan A를 투여한 TL군이 대조군에 비해 130%로 제일 증가되었다(Table II).

4) 흉선 중량의 변화 : 흉선의 중량은 T군의 경우 대조군에 비해 39.1%의 상당한 감소가 나타났으나, TL군의 경우에는 20.0%의 증가가

Table I—Effects of lyophyllan A on the immunoorgan weights of ICR mice (I).

Group	Body weight(g)		Liver weight (mg)	Wt. increase (%)	Significance (p)
	On 1st day	On 15th day			
N	28.3±1.7 ^{a)}	33.6±2.5	1862±285	—	—
L		32.9±1.4	2462±163	32.2	p<0.01
T		32.9±0.3	1903±297	2.2	N.S.
TL		34.0±0.9	2548±169	36.8	p<0.001

N : Normal mice. L : Lyophyllan A treated mice. T : S 180 tumor-bearing mice. TL : S 180 tumor-bearing mice treated with lyophyllan A. N.S. : Not significant. a) Mean±S.D.

Table II—Effects of Lyophyllan A on the immunoorgan weights of ICR mice (II).

Group	Spleen weight (mg)	Wt. increase (%)	Significance (p)	Thymus weight (mg)	Wt. increase (%)	Significance (p)
N	136±14 ^{a)}	—	—	45.5±11.0	—	—
L	272±27	100.0	p<0.001	43.1±8.3	-5.3	N.S.
T	246±27	80.9	p<0.001	27.7±8.0	-39.1	p<0.01
TL	313±23	130.1	p<0.001	54.6±7.2	20.0	p<0.05

N : Normal mice. L : Lyophyllan A treated mice. T : S 180 tumor-bearing mice. TL : S 180 tumor-bearing mice treated with lyophyllan A. N.S. : Not significant. a) Mean±S.D.

Table III—Viability of sarcoma-180 cells in a culture medium containing lyophyllan A.

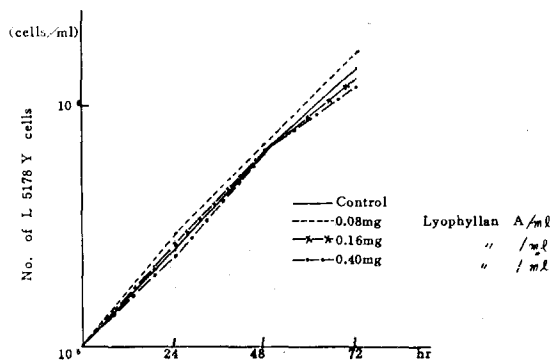
	Dose(mg/ml)	Average viability of tumor cells (%)
Control	—	98.5
Lyophyllan A	0.08	97.8
	0.16	98.1
	0.40	96.4

관찰되었다. L군의 경우 5.3%의 감소가 있었으나 유의성이 없었다(Table II).

암 세포에 대한 직접적 작용—1) Sarcoma 180 세포에 대한 효과 : lyophyllan A를 포함한 배지에서 24시간 배양후에 관찰한 세포의 viability는 대조군과 유사하였다(Table III).

2) L5178Y에 대한 효과 : lyophyllan A를 포함한 배지에서 24, 48 및 72시간 배양후 관찰시, 대조군의 L5178Y 세포의 증가와 유사한 증가가 관찰되었다(Fig. 2).

1), 2)의 결과로서 lyophyllan A는 종양세포에 직접적인 cytotoxic 또는 cytostatic 효과는 관찰되지 않았다.

**Fig. 2**—Direct effects of lyophyllan A on L5178Y.

마우스의 용혈반 형성 세포수(hemolytic plaque-forming cell count, PFC count)—lyophyllan A 투여군의 PFC는 대조군에 비해 14배 증가되었다(Table IV).

마우스의 복강 세포군에 대한 영향—lyophyllan A 투여군은 투여후 1일후에 복강 세포수의 현저한 증가를 보여서, 대조군이 3.8×10^6 cells/mouse인 것에 비하여 12.4×10^6 cells/mouse였다. 그러나 투여후 3일, 5일, 7일이 되면서 점점 감소하였다.

Table IV-Effects of lyophyllan A on hemolytic plaque-forming cells in the spleen of ICR mice immunized with SRBC.

	Control group	Treated group	Significance (p)
Body weight (g)	32.9 ± 3.1 ^{a)}	33.2 ± 1.2	—
Spleen weight (mg)	150.4 ± 27.1	203.1 ± 19.9	p < 0.01
Spleen cell count (1 × 10 ⁷)	21.5 ± 2.9	27.2 ± 1.5	p < 0.01
PFC/10 ⁶ spleen cells	3.4 ± 0.7	47.8 ± 15.9	p < 0.001
PFC/spleen (× 10 ²)	7.3 ± 1.1	130.0 ± 7.5	p < 0.001

a) Mean ± S.D. Each group consisted of five mice.

Table V-Effects of lyophyllan A on the number of peritoneal exudate cell.

	Body weight (g)	1st day	3rd day (PECs/mouse)	5th day	7th day
Control mice	19.6 ± 2.0 ^{a)}	3.8 × 10 ⁶	4.5 × 10 ⁶	4.3 × 10 ⁶	4.8 × 10 ⁶
Mice given lyophyllan A	20.3 ± 2.2	12.4 × 10 ⁶	7.8 × 10 ⁶	6.0 × 10 ⁶	5.3 × 10 ⁶

a) Mean ± S.D.

macrophage의 경우도 투여군에서 대조군 보다 투여후 1일에 그 수가 증가하였으나 그 후 점점 감소하였다. Lymphocyte수는 대조군에 비해 큰 변화가 없었다.

PMN의 경우는 대조군에서 관찰되지 않았으며, 투여군의 경우 투여후 1일에 1.9 × 10⁶ cell/mouse인 것이 관찰되었으나 그 후에는 관찰되지 않았다(Table V; Fig. 3).

Sarcoma 180의 *in vivo* 성장에 미치는 복강내 세포의 영향—담압 동물에 lyophyllan A를 투여

하여 7일후에 분리해낸 복강 세포와 sarcoma 180 cell과 혼합하여 실험한 TL-7군의 종양 무게가 대조군의 3%밖에 되지 않는 높은 종양 저지 효과를 나타냈다. TL-1군도 대조군의 41%로서 유의성 있는 종양 저지 효과가 있었다. L-7군은 대조군의 58%로서 유의성 있는 종양 억제 효과가 있었으나 L-1군 및 T-1군은 각각 대조군의 70%, 86%였으나 유의성은 없었다. T-7군은 전혀 종양 저지 효과가 없었으며 N군은 오히려 대

Table VI-Inhibition of growth of sarcoma 180 mixed with peritoneal exudate cells from N,L,T, and TL group mice.

Peritoneal exudate cells	Average tumor weight (g)	Relative change ^{a)} (%)
Control	3.41 ± 1.71 ^{b)}	100
N	4.60 ± 1.52	134
L-1	2.38 ± 1.14	70
L-7	1.97 ± 0.81 (p < 0.05)	58
T-1	2.93 ± 1.25	86
T-7	3.52 ± 2.20	103
TL-1	1.39 ± 0.77 (p < 0.01)	41
TL-7	0.10 ± 0.07 (p < 0.001)	3

a) $\frac{\text{Tumor weight of treated mice}}{\text{Tumor weight of control mice}} \times 100$

b) The mean values of five mice ± standard deviation

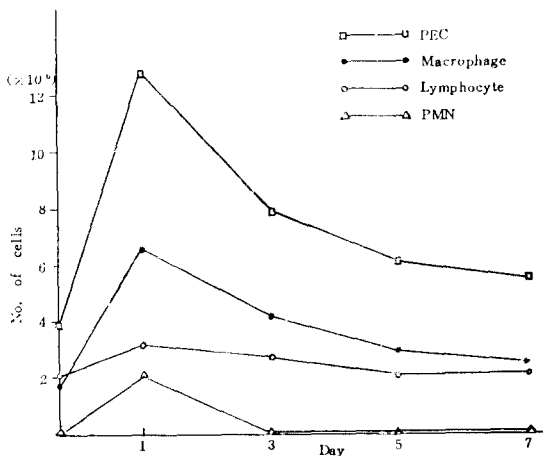


Fig. 3-Effects of lyophyllan A on the peritoneal cell population of ICR mice.

조군의 130%에 달하였다(Table VI).

활성화된 세포 독성 **Macrophage**의 유도—L 5178Y target cell에 대한 각 실험군의 macrophage의 cytolytic activity(cytotoxicity)는 TL-7군에서 E/T(effector/target)가 ×10일때 97.2%, ×20일 경우 97.8%로 강력하였고, TL-1의 경우는 ×20(E/T)에서는 91.6%로 강력하였으나 ×10에서는 36.1%에 그쳤다.

L-7군, L-1군의 ×20(E/T)에서 각각 70.5%, 64.5%의 cytotoxicity가 있었고, ×10에서 각각 45.3%, 33.5%였다. TL군과 L군을 비교해 보면 TL군에서 현저하게 높은 cytotoxicity가 관찰되었으며, TL-7, L-7군과 TL-1, L-1군을 비교해 보면 TL-7, L-7군에서 cytotoxicity가 높았다. 반면에 T-1, T-7군에서는 전혀 cytotoxicity가 관찰되지 않았다(Table VII).

고 찰

*Lyophyllum decastes*의 배양 균사로 부터 분리하여 정제된 단백 다당류인 lyophyllan A의 종양 억제 효과의 작용기전을 究明하기 위해 면역 관련 장기의 변화에 대해 살펴보았다. 실험 동

물의 체중의 변화는 대조군을 포함한 4가지 실험군에서 큰 차이가 없었다. 그러나 간 중량은 lyophyllan A 투여군과 담압동물에 lyophyllan A 투여군에서 모두 증가하였다. 비장의 증가는 대조군과 비교할 때 3가지 실험군에서 증가했고 특히 담압 동물에 lyophyllan A를 투여한 군에서 가장 현저하게 증가하였다. 이러한 간과 비장의 중량의 증가는 macrophage의 증가 그리고 macrophage function의 증가에 기인된 것으로 판단된다.²⁵⁾

흉선의 중량은 담압 동물군에서 대조군에 비해 39.1%의 현저한 감소를 나타냈다. 담압 동물에 있어서 B-lymphocyte의 作用은 손상을 입지 않으나, T-lymphocyte의 작용은 선택적인 저해를 받는다는 것이 보고된 바²⁶⁾ 있으므로 이와 일치하는 현상으로 사료된다. 그러나 lyophyllan A가 투여된 담압 동물군에서는 감소되었던 흉선의 중량이 회복되어 대조군보다도 20.0% 증가되었음을 관찰하였다.

또한 lyophyllan A의 암세포에 대한 직접적인 효과를 살펴보았다. lyophyllan A가 *in vitro*에서 sarcoma 180 세포의 viability에 전혀 영향을 주지 않았으며, 또한 L5178Y 세포의 cell growth에도 어떤 효과도 나타내지 않았으므로 lyophyllan A는 세포에 대해 직접적인 cytotoxic 또는 cytotoxic한 효과는 없었다.

SRBC에 대한 마우스의 면역 반응에 있어서 lyophyllan A의 효과를 실험하였을 때, 용혈반형성 세포수(PFC)가 현저히 증가하였다. 이것은 lyophyllan A가 항체 생성을 촉진시켰음을 보여주는 것이다. 그러나 비장의 PFC생성 과정은 T-cell과 B-cell 양자의 협조 작용을 거치는 것이므로 이 실험만으로는 두가지 세포중 어느 것이 더 주요하게 작용하였는지 명확하지 않다. 표코버섯으로부터 분리한 lentinan의 SRBC에 대한 마우스의 免疫 반응을 실험하였을 때 정상 마우스에서는 상당한 효과가 있었으나 흉선이 제거되어 T-cells이 결핍된 마우스에서는 효과가 없음이 보고되었고²⁷⁾, 또한 구름버섯의 단백 다당류인 PS-K를 투여한 마우스에 있어서 T-cell 분포 영역인 lymph nodes의 paracortical

Table VII—Tumor cytotoxic activity of macrophage induced by lyophyllan A.

E/T ^{b)}	³ H-Thymidine incorporation (CPM)		Cytolytic activity ^{a)} (%)	
	10	20	10	20
Control	5235±603 ^{c)}		—	—
N	4515±231	3144±172	—	—
L-1	3004±82	1117±122	33.5	64.5
L-7	2471±115	927±52	45.3	70.5
T-1	4393±427	3157±320	2.7	-0.4
T-7	4634±565	2901±96	-2.6	7.7
TL-1	2886±153	263±150	36.1	91.6
TL-7	126±25	69±8	97.2	97.8

a) Cytolytic activity(%)

$$= \left(1 - \frac{\text{CPM in target cells cultured with activated macrophage}}{\text{CPM in target cells cultured with normal macrophage}} \right) \times 100$$

b) Effector/Target. c) Mean ± S.D.

areas와 spleen의 periarteriolar lymphoid sheaths에서 lymphoid cells의 증식이 보고되었다.²⁸⁾ 따라서 lyophyllan A의 이러한 항체성 免疫의 자극 효과는 helper T-cell의 활성화에 기인된 것으로 추측된다. 이 실험에 저자 등이 사용한 SRBC의 투여량이 정상적인 마우스의 면역 유발 최소 용량인 4×10^8 cells/mouse 보다 적은 1×10^7 cells/mouse이었는데도 lyophyllan A가 면역능을 증가시킴을 관찰하였다.

lyophyllan A의 복강 세포군에 미치는 영향을 실험하였을 때 투여후 1일에 복강 세포를 현저히 증가시켰으며 macrophage의 수도 증가시켰다. 그러나 그후 3일, 5일, 7일이 되었을 때 점차 감소하였다. PMN은 1일에 일시적으로 증가하였으나 그후 곧 소실되었다. *in vivo*에서 복강내 세포와 혼합된 sarcoma 180 세포의 성장 저지 효과는 TL-7군의 중앙 무게가 대조군의 3%로 감소시켰으므로 가장 강력한 것으로 볼 수 있다. 또한 L-1, TL-1 보다 L-7, TL-7군에서 탁월한 중앙 저지율이 관찰되었으며 T-1, T-7, N군에서는 효과가 없었다.

lyophyllan A의 *in vivo*에서 cytotoxic macrophage의 유도에 관한 실험에서 TL-7군에서 97.2%, 97.8%의 매우 높은 cytotoxicity를 나타냈고, TL-1, L-1군과 L-7군에서도 유의성있는 cytotoxicity가 관찰되었는데 L군보다는 TL군에서, L-1, TL-1군 보다는 L-7, TL-7군의 cytotoxicity가 훨씬 높았다. lyophyllan A가 *in vivo*에서 activated cytotoxic macrophage를 유도하는 것이 확인되었다. 뿐만 아니라 복강 세포의 총수 및 macrophage수는 1일에 증가했으나 macrophage의 작용은 7일에 최고에 도달했다. 이 결과를 볼때 macrophage의 cytotoxicity는 lyophyllan A를 투여한 군에서 촉진된 복강 세포의 증가된 수 및 macrophage의 증가된 수와 면역 촉진 작용과는 직접 관계가 없다는 것을 증명할 것이다. 이러한 macrophage의 activation의 기전은 몇가지가 존재할 수 있는데, 그 중 한가지 가능성은 보체의 alternative pathway를 활성화하는데 작용하는 것으로 볼 수 있다. 즉 *in vivo*에서 C_3b 같은 active complement의 생성을 촉진

시키고 이 C_3b 가 macrophage를 activation시켜 cytotoxic하게 만들어준다고 추정되지만^{29,30)} 앞으로 더 연구되어야 할 것이다.

결 론

Lyophyllan A는 ICR 마우스에서 간 및 비장의 중량을 증가시켰다. 흉선의 중량은 담압 동물에서 현저히 감소되었으나, lyophyllan A를 투여한 담압 동물에서는 회복되어 증가되었다.

Lyophyllan A는 *in vitro*에서 L5178Y와 sarcoma 180 세포에 직접적인 세포 독성을 나타내지 않았다.

Lyophyllan A는 SRBC에 대한 용혈반 형성 세포수를 현저히 증가시켰다.

Lyophyllan A는 복강 세포수를 증가시켰으며, 복강 세포는 sarcoma 180 세포와 혼합하여 *in vivo* 실험시 강력한 중앙 억제 효과를 나타냈다. 또한 *in vivo*에서 activated cytotoxic macrophage를 유도하였다

감사의 말씀

이 연구에 소요되는 경비의 일부는 한국과학재단의 연구비로 충당되었기에 감사하는 바이다.

문 헌

- 1) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Ayai, Y. and Fukuoka, F.: Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Cancer Res.* 30, 2776 (1970).
- 2) Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakai, S.: Host mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* 60, 137 (1969).
- 3) Bradner, W.T., Clarke, D.A. and Stock, C.C.: Stimulation of host defense against experimental cancer. I. zymosan and sarcoma 180 in mice. *Cancer Res.* 18, 347 (1958).

- 4) Diller, I.C., Mankowski, Z.T. and Fisher, M.E.: The effect of yeast polysaccharides on mouse tumours. *Cancer Res.* **23**, 201 (1963).
- 5) Zbar, B., Bernstein, I. and Tanaka, T.: Tumor immunity produced by the intradermal inoculation of living tumor cells and living *Mycobacterium bovis* (strain BCG). *Science* **170**, 1217 (1970).
- 6) Likhite, V.V. and Halpern, B.N.: The delayed rejection of tumors formed from the administration of tumor cells mixed with killed *Corynebacterium parvum*. *Int. J. Cancer* **12**, 699 (1973).
- 7) Inoué, T., Yoshimoto, T., Ogura, T., Hirano, F., Azuma, I. and Yamamura, Y.: Effect of *Nocardia rubra* cell-wall skeleton treatment on tumor formation in two-stage chemical carcinogenesis of mouse skin. *Cancer Immunol. Immunother.* **11**, 207 (1981).
- 8) Schwarzenberg, L., Simmler, M.C. and Pico, J.L.: Human toxicology of BCG applied in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunotherapy* **1**, 69 (1976).
- 9) Sugiura, M. and Ito, H.: Toxicological studies of *Ganoderma lucidum* Karst. *Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo* **27**, 722 (1977).
- 10) Roland, J.F., Chmielewicz, Z.F., Weiner, B.A., Gross, A.M., Boening, O.P., Luck, J.V., Bardos, T.J., Reilly, H.C., Sugiura, K., Stock, C.C., Lucas, E.H., Byerrum, R.U. and Stevens, J.A.: Calvacin, a new antitumor agent. *Science* **23**, 1897 (1960).
- 11) Suzuki, F., Suzuki, C., Shimomura, E., Maeda, H., Fujii, T. and Ishida, N.: Antiviral and interferon-inducing activities of a new peptidomannan, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics* **32**, 1336 (1979).
- 12) Tsugagoshi, S. and Ohashi, F.: Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* **65**, 557 (1974).
- 13) Maeda, Y.Y. and Chihara, G.: The effects of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxymethylpachymaran and zymosan, and their effects on various immune responses. *Int. J. Cancer* **11**, 153 (1973).
- 14) Hamuro, J., Röllinghoff, M. and Wagner, H.: Induction of cytotoxic peritoneal exudate cells by T-cell immune adjuvants of the $\beta(1\rightarrow3)$ glucan-type lentinan and its analogues. *Immunology* **39**, 551 (1980).
- 15) Maeda, Y.Y., Chihara, G. and Ishimura, K.: Unique increase of serum proteins and action of antitumor polysaccharides. *Nature* **252**, 250 (1974).
- 16) 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.) Quel., *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.. *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145 (1979).
- 17) Lee, C.O., Choi, E.C. and Kim, B.K.: Studies on the antitumor components of Korean basidiomycetes (IV), antitumor components of *Naematoloma fasciculare* (Fr.) Karst.. *Arch. Pharm. Res.* **4**, 117 (1981).
- 18) Kang, C.Y., Lee, C.O., Chung, K.S., Choi, E.C. and Kim, B.K.: An antitumor component of *Laetiporus sulphureus* and its immunostimulating activity. *Arch. Pharm. Res.* **5**, 39 (1982).
- 19) Kim, J.S., Choi, E.C., Kim, H.R., Lee, C.K., Lee, C.O., Chung, K.S., Shim, M.J. and Kim, B.K.: Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XXXVII), antitumor components of *Armillariella mella*. *Kor. J. Mycol.* **11**, 151 (1983).
- 20) Kim, Y.J., Lee, C.O., Shim, M.J., Kim, S.W., Choi, E.C. and Kim, B.K.: Studies on antitumor components of cultured basidiomycetes, purification and chemical analysis of antineoplastic constituents of cultured mycelia of *Laccaria laccata*. *Kor. J. Mycol.* **12**, 35 (1984).
- 21) Kim, H.R., Shim, M.J., Kim, J.W., Kim, H.W., Lee, C.O., Choi, E.C. and Kim, B.K.: Studies on constituents of the higher fungi of Korea(XLVI), antitumor components extracted from the cultured mycelia of *Lyophyllum decastes*. *Kor. J. Pharmacogn.* **15**, 2 (1984).
- 22) Lee, C.O., Kim, H.S., Choi, E.C. and Kim, B.K.: Studies on constituents of the higher fungi of

- Korea (LV), the antitumor components and culture of *Lyophyllum decastes*. *Kor. J. Pharmacogn.* 17, 23 (1986).
- 23) Cunningham, A.: Plaque assay for antibody producing cells. *Allergy* 17, 5 (1973).
- 24) Koski, I.R., Poplack, D.G. and Blaese, R.M.: A nonspecific esterase stain for the identification of monocytes and macrophages. *Immunological Methods*. p.359 (1979).
- 25) Castro, J.E.: Antitumor effects of *Corynebacterium parvum* in mice. *Europ. J. Cancer* 10, 121 (1974).
- 26) Haba, S., Hamaoka, T., Takatsu, K. and Kitagawa, M.: Selective suppression of T-cell activity in tumor bearing mice and its improvement by lentinan. *Int. J. Cancer* 18, 93 (1976).
- 27) Dresser, D.W. and Phillips, J.M.: The orientation of the adjuvant activities of *Salmonella typhosa* lipopolysaccharide and lentinan. *Immunology* 27, 895 (1974).
- 28) Ohno, R., Yokomatu, S., Wakayama, K., Sugiura, S., Imai, K. and Yamada, K.: Effect of protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, on the immune response of mice to sheep red blood cells. *Gann* 67, 97 (1976).
- 29) Schorlemmer, H.U., Bitter-Suermann, D. and Allison, A.C.: Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. *Immunology* 32, 929 (1977).
- 30) Hamuro, J., Hadding, U. and Bitter-Suermann: Solid phase activation of alternative pathway of complement by $\beta(1,3)$ -glucans and its possible role for tumor regression. *Immunology* 14, 695 (1978).