

영지버섯의 항암효과 : 세포독성과 종양의 성장억제에 미치는 영향(1)

전북대학교 병원 치료방사선과, 진단방사선과*, 전주 우석대학교
생물공학과**, 미네소타대학교 병원 치료방사선과***

권형철 · 김정수 · 최기철* · 최동성** · 송창원***

= Abstract =

Antitumor effect of *Ganoderma lucidum* : Cytotoxicity and Tumor Growth Delay(1)

Hyung Cheol Kwon, M.D., Jung Soo Kim, M.D., Ki Chul Choi, M.D.*
Dong Seong Choi, Ph.D.** and Chang Won Song, Ph.D.***

Department of Therapeutic Radiology and Diagnostic Radiology, Chonbuk National University
Hospital, Chonju, Korea 560-182, Department of Biotechnology, Chonju Woo Suck University,
Samrye 565-800**, Department of Therapeutic Radiology-Radiation Oncology, University
of Minnesota Medical School, Harvard Street at East River Road,
Box 494 UMHC, Minneapolis, MN 55455***

Purpose : To investigate the effect of aqueous extract of *Ganoderma lucidum*(*G.I.*) on the survival of tumor cells in vitro and on the growth of tumors in vivo.

Materials and Methods : Dried *G.I.* was made into powder, extracted with distilled water, filtered and diluted from a maximum concentration of 100 mg/ml in sequence. The cytotoxicity of *G.I.* in vitro was evaluated from its ability to reduce the clonogenicity of SCK tumor cells. For the tumor growth delay study, about 2×10^5 of SCK tumor cells were subcutaneously inoculated in the legs of A/J mice. The first experimental group of mice were injected i.p. with 0.2ml of 250 mg/kg of *G.I.* from the first day after tumor inoculation for 10 days. The second experimental group of mice were injected i.p. with 0.2ml of 250 mg/kg of *G.I.* either once a day for 10 days or twice a day for 5 days beginning from the 7th day after tumor inoculation

Results : 1. Cytotoxicity in vitro; survival fraction, as judged from the curve, at *G.I.* concentration of 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 and 100 mg/ml were 1.0, 0.74 ± 0.03 , 0.18 ± 0.03 , 0.15 ± 0.02 , 0.006 ± 0.002 , 0.015 and 0.0015, respectively. 2. Tumor growth delay in vivo; a) the time required for the mean tumor volume to grow to $1,000\text{mm}^3$ was 11 days in the control group and 14 days in the experimental group. b) the time required for tumor volume to increase 4 times was 11 days in the control group while it was 10.5 and 12 days in the groups injected with *G.I.* once a day and twice a day from the 7th day after tumor inoculation respectively.

Conclusion : Aqueous extracts of *G.I.* showed a marked cytotoxicity on the SCK mammary cells in vitro. Tumor growth delay was statistically significant when *G.I.* injection was started soon after tumor inoculation, but it was not significant when in-

jection was started after the tumors were firmly established.

Key Words : *Ganoderma lucidum*, Cytotoxicity, Tumor growth delay

서 론

최근 20년에 걸친 꾸준한 암치료 방법의 꾸준한 발전에 힘입어 미국에서 새로이 진단된 암환자의 50% 이상이 근치목적으로 치료되고 있다고 보고¹⁾되고 있으나, 여전히 암의 정복이 현대의학의 커다란 과제로 남아 있다. 임상에서 이용되는 방사선치료나 항암화학 치료 모두 우수한 치료성적을 거둘 수가 있지만, 합병증의 초래는 투병중인 암환자에 커다란 부담을 가져다 줄 수가 있어 이 또한 극복해야 할 문제중의 하나이다^{1,2)}. 따라서 독성이 매우 적고 안전성이 높은 항암제의 개발이 필요하다. 그러나 이러한 신물질의 함성은 높은 수준의 기초과학과 튼튼한 재정의 뒷받침 없이는 쉽지 않은 것으로 되어있어 우리나라와 같은 실정에서 단기기간으로선 개발의 한계점에 있다고 본다. 또한 합성된 항암화학제는 많은 부작용의 초래로 사용상의 문제가 항상 제기되고 있다. 그리고 지금까지 개발된 항암제가 오로지 주사용으로만 되어있어 암환자의 입장에서 볼때 병원 입원을 해야하는 번거로움이 있다. 이러한 배경으로 볼때 영지처럼 비교적 독성이 적고 항암성을 갖고 있는 것으로 알려진 천연물질의 발굴과 임상분야에서 과학화의 노력이 필요하다고 본다. 또한 근래들어 국제학회에서 화학적 또는 생물학적 조절 약 물질들이 새로이 개발되어 그 효과가 소개되는 시점에서 우리나라에서도 신물질 개발의 노력과 병행하여 기존의 천연물질을 발굴하여 방사선 감수성 또는 방어 약 물로서 개발에 노력이 필요하다고 본다.

본 연구의 목적은 우선 영지의 생물학적 조절약물과 방사선 방어약물로서의 가능성을 규명하기 전단계인 예비실험의 성격으로서 그동안 민간요법과 한의학 분야에서 사용해온 영지의 항암효과를 규명하고 그리고 항암효과가 있다면 항암을 나타내는 적절한 농도와 어떠한 종양크기에서 복용시 항암효과를 발휘할 수 있는지를 밝히기 위해 이러한 환경과 비슷한 조건, 즉 농축과정 없이 간단한 중탕과 여과를 시킨 농도 범위에서 영지를 조성하여 SCK 종양세포의 시험관내 세포 독성 실험과 A/J 쥐의 생체내 종양성장의 억제력을

실험연구 하였다.

대상 및 방법

1. 영지추출액의 준비

시험용 제품의 영지버섯을 분말로 조성해 100g을 1리터의 증류수에 16-18시간동안 섭씨 4도에서 방치하여 수용액 상태에서 추출한 다음 여과지(185 mm, circle)와 여과기(Millipore, pore size 0.22 μ m, filter type GS)를 이용하여 최대 100 mg/ml의 농도를 준비해 이를 순서대로 희석하여 50, 25, 10, 5, 1 및 0.5 mg/ml 영지 추출액을 만들었다.

2. 실험동물 및 실험세포

실험동물은 8-10주 태생의 A/J원쥐(The Jackson Laboratory, U.S.A)를 사용했으며 실험세포는 이 쥐에서 자연적으로 성장하여 길러진 SCK 종양세포를 사용하였다.

3. 세포독성 및 종양성장의 지연 실험

1) 시험관내 세포독성

시험관내 세포독성은 clonogenic assay^{3,4)}을 이용하였는데 그 방법으로서 10% fetal calf serum이 포함된 RPMI 1640배지(GIBCO, U.S.A)가 들어있는 50ml 용량의 조직 배양 플라스크(Lux, U.S.A)에 지수적 성장에 도달한 종양세포를 영지 농도의 세포독성을 고려하여 각각 2×10^2 , 2×10^3 및 2×10^4 개씩 심은후 15-16시간 정도 배양한 다음, 희석된 영지추출액을 1시간 접촉시킨뒤 RPMI 1640 배지로 씻은 후 일주일 동안 배양기(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 배양을 하였다. 배양에서 생긴 colony를 95% 알코올로 고정하고 1% crystal violet로 염색을 한뒤 50개 이상의 세포들을 포함한 콜로니를 세어 plating efficiency(PE)를 계산하였다.

2) 생체내 종양성장의 지연

종양성장 억제력 실험^{5,6)}을 위해 A/J 실험쥐들의 우측허벅지에 약 2×10^5 의 종양세포를 접종하여 대조군(총 19마리, n=7, n=7, n=5)으로 설정하고 실

험군은 종양크기에 따른 영지의 종양성장의 지연정도를 알아보기 위하여 2가지 군으로 나누어 제1실험군 (n=11마리)은 종양접종후 제1일째부터 영지 250 mg/kg 농도의 0.2ml를 매일 1회씩 10일간 복강내 주사하였고 제2실험군은 약리역동적인 차이가 있는 가능성을 고려하기 위해 다시 2그룹으로 나누어 종양 접종 후 7일째부터 영지 250 mg/kg의 0.2ml를 매일 1회 10일간 복강내 주사하는 그룹(n=7마리)과 동일한 농도를 매일 2회씩 5일간 복강내 주사하는 그룹(n=8마리)으로 나누었다.

4. 분석방법

1) 시험관내 세포독성

영지버섯의 세포독성을 알아보기 위하여 clonogenic assay법을 이용하였고, 영지농도 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 및 100 mg/ml에서 각각의 생존분율을 구하였다.

2) 생체내 종양성장의 지연

종양성장의 억제 정도를 알아보기 위해 제1실험군에서 평균 종양용적을 제2실험군에선 상대적 종양용적을 비교 척도로 사용하였으며 종양크기의 측정은 종양 접종후 2일마다 실시하였으며 크기 계산은 용적을 나타내는 종양의 단경×단경×장경/2(mm³)의 공식을 적용하였다. 그리고 성장지연 곡선은 메킨토시 컴퓨터에서 사용되는 그래프용 프로그램 (Cricket graph)을 이용하여 작성하였다.

결 과

1. 시험관내 세포독성

세포생존 곡선상에서 구해진 생존분율은 영지 추출액의 농도 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 및 100 mg/ml에서 각각 1.0, 0.74±0.03, 0.18±0.03, 0.15±0.02, 0.006±0.002, 0.015, 0.0015를 나타냈다 (Fig. 1)

2. 생체내 종양성장의 지연

1) 영지를 종양접종후 곧바로 수사한 경우 : 평균 종양용적이 1,000 mm³에 도달하는 기간은 대조군에선 11일이었으며 종양접종후 제1일째부터 영지를 주사한 실험군에서는 14일이 소요되었다(Fig. 2).

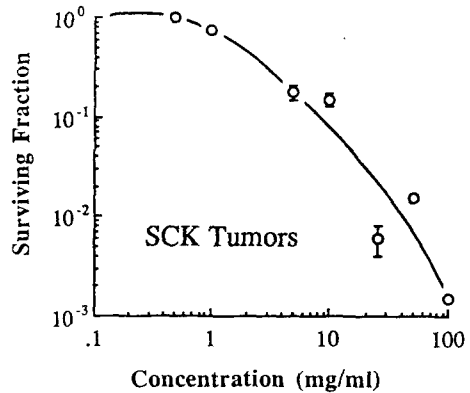


Fig. 1. Survival curves of SCK mammary cells in vitro as determined from the survival fraction at *Ganoderma lucidum* concentration of 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 and 100 mg/ml. Each concentration of aqueous extract of *G.l.* was contacted for 1 hour.

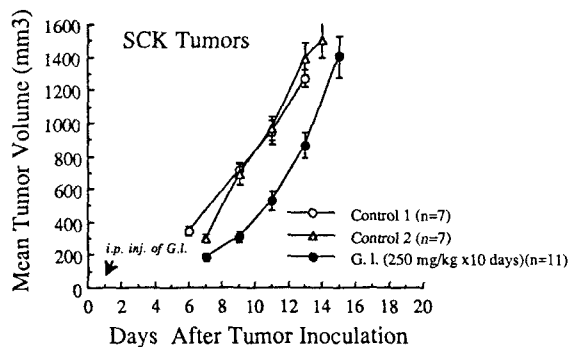


Fig. 2. Growth curves of SCK tumors which show mean tumor volume(mm³)as a function of days after tumor inoculation. The experimental group of mice were injected i.p. with 0.2 ml of 250 mg/kg of *Ganoderma lucidum* from the first day after tumor inoculation for 10 days.

2) 영지를 종양이 육안적 크기에 도달된 후 주사한 경우 : 종양용적이 4배에 도달되는데 소요되는 기간은 대조군에서 11일 이었으며, 종양접종후 제7일째부터 영지를 매일 1회씩 10일간 또는 매일 2회씩 5일간 주사한 실험군에서는 각각 10.5일과 12일이었다 (Fig. 3).

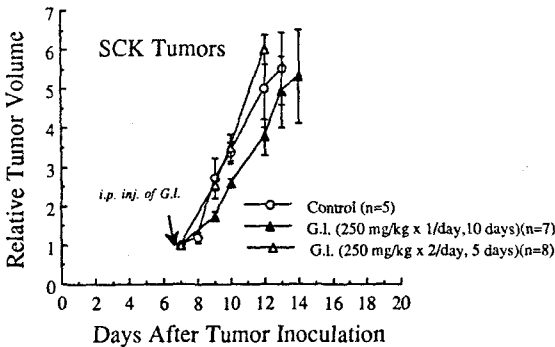


Fig. 3. Growth curves of SCK tumors which show relative tumor volume as a function of days after tumor inoculation. The experimental group of mice were injected i.p. with 0.2ml of 250 mg/kg of *Ganoderma lucidum* either once a day for 10 days or twice a day for 5 days beginning from the 7th day after tumor inoculation

고 안

영지(*Ganoderma lucidum*)는 Polyporaceae과에 속하는 고등균류의 일종으로서 오래전부터 불로초 또는 신비의 영약으로 불리어 왔으며 우리나라를 비롯하여 중국, 일본등지에서 고혈압, 뇌졸중, 심장병 및 간염 같은 질병을 치료하기 위한 전통약으로서 중요시 되어왔다⁷⁾. 지금까지 알려진 영지의 약리효능⁸⁾으로서선 혈압조절 및 항혈전작용, 혈당감소 및 인슈린 분비 촉진작용, 천식 및 알레르기 억제작용, 면역증강 작용과 항암작용 등을 들 수 있으며, 이중 영지의 항암작용을 나타내는 성분으로서의 쓴맛을 나타내는 세포독성인 terpenoid류와 고분자 단백질다당체 성분인 β -D-glucan이 현재까지 주된 항암성 물질로 밝혀진 상태이다^{9, 10, 11)}. β -D-glucan은 림파구 표표과 특정 혈청단백과 결합해서, macrophage, T-cell, NK cell등의 effector세포의 활성화나 항체생산의 촉진, 더 나아가 effector 세포의 활성화에 관여하는 IL-1, IL-2, IFN- γ 등의 생산을 증가시킨다 하고 항종양성 다당류의 항암효과는 이와같은 숙주의 면역 부활능에 기본을 두고 있다고 본다¹²⁾. 따라서 영지의 항암작용은 암세포를 직접 공격하여 일어나는 것이 아니라 암세포에 대한 숙주의 면역능력을 증가시켜줌으로써 간접적으로 암세포의 증식을 억제하므로써 일어난다고 볼 수 있다^{7, 13)}.

Maruyama¹⁴⁾등은 일본산 영지가 실험쥐에 접종한 sarcoma 180의 종양성장을 현저히 억제시킨다고 보고하였다. 이들의 실험에서 영지의 수용성 추출액은 종양성장의 억제력에 대한 효과를 나타냈으나 에탄올 추출액은 종양억제 효과가 없었다고 보고하고 있다. 다행히도 국내 의료 풍토상 전통적으로 내려오는 민간 요법에서 수용액과 혼합하여 열증탕 방식을 사용하고 있고 수용액 추출액이 항암성이 있다고 보고되고 있기 때문에 저자들의 실험에서도 영지의 수용액 추출액을 사용하였다. 한편 Maruyama등¹⁴⁾은 분자량이 10,000이상의 분획에서만 종양억제력의 효과가 있었다고 보고하였는데 저자들은 예비실험의 경우 이어서 영지 추출물의 분자량 측정은 실시하지 않았다. 그리고 매 실험에서 일관성 있는 영지의 농도액의 사용을 위해서 추출액의 동결건조가 필요한데 민간요법의 사용환경과 유사한 조건을 만들고 한편 예비실험 성격을 갖고 있어서 실험실에서 여과지로 여과기구 만을 통하여 얻을 수 있는 최고 영지 농도액을 만들어 이를 차례로 희석하여 실험에 사용하였다.

영지의 시험관내 세포독성 정도를 보전데, clonogenic assay법을 사용한 세포독성 실험에서 구한 생존곡선에서 영지농도 2 mg/ml의 생존분율은 약 0.5로서 이는 43°C의 온열을 1시간 적용한 세포독성과 유사하였으며 25배 높은 농도인 50 mg/ml의 생존분율은 0.015으로서 10 Gy의 X-선 조사량에 해당하는 세포독성을 나타내었다. 한편 단일 화학치료제의 세포독성이 보통 0.1-0.01 정도의 생존분율을 나타내는 것으로 보아 한국산 시판 영지의 수용성 추출액은 기존의 치료제의 효과에 비길정도의 상당한 세포독성을 나타내었다. 이와같이 시험관내 세포독성 실험에서 상당한 세포독성을 나타내었음을 기초로 쥐의 생체내에서도 종양성장을 지연시킬 수 있는지 또한 억제력이 있을 경우 종양의 크기에도 따른 영지의 억제력에 차이가 있는가를 알아보기 위하여 성장곡선을 구한 결과 영지를 종양접종후 초기 즉 육안적인 크기에 달하지 못한 정도에서 대조군에 비해 종양성장의 억제력을 나타냈으나, 종양접종후 7일째 영지를 접종한 경우는 이미 종양이 육안적 크기에 달해서 대조군에 비해선 억제력을 나타내지 못하였다. 따라서 종양의 크기가 미세한 경우에서만 영지의 종양에 대한 억제력이 있지 않나 생각된다.

영지의 안전성에 있어선 한국 균학회 소식지¹⁵⁾에 인용된 일본 이토 교수팀의 연구결과 쥐에서 1kg당 16.7g을 경구로 30일간 투여하여도 사망의 경우는 물론 병리학적 증상 및 혈액학적 이상이 없다고 하고 백서에 복강내 주사시 LD₅₀는 19.2 g/kg으로 밝혀졌다. 따라서 저자들의 본 실험에서 사용한 쥐의 복강내 주사량(250 mg/kg)은 상기결과 치사량의 1.3%밖에 해당한다. 또한 한의학 임상분야에서 일반적으로 빈혈, 만성감염, 자반병, 동맥경화증 및 보약 등에 하루 3-10g 정도를 사용하는 것으로 되어 있고 실제 독성은 아주 낮은 것으로 알려져 있다. 그러나 영지와 형태, 색깔 및 크기 등이 흡사하여 영지로 오인되기 쉬운 유독 야생버섯이 많아 이를 복용시 식중독등의 증상이 초래될 수 있어 야생보다 재배된 영지가 그 안전성을 확보할 수 있다고 본다.

결 론

영지의 생물학적 조절약물과 방사선 방어약물로서의 가능성을 규명하기 위한 예비실험에서 그동안 민간요법과 한의학 분야에서 사용하는 영지의 항암성 효과를 알아보았다. 농축과정 없이 증류수를 이용하여 간단한 증탕과 여과를 시켜 얻은 영지의 수용성 추출액은 SCK 종양세포주를 이용한 시험관내 세포독성 실험에서 상당한 정도의 세포독성을 나타냈으며, 종양성장의 지연정도를 관찰하는 실험에선 종양접종 초기에 영지를 주사한 실험군에서 통계학적으로 의미있게 종양성장의 억제력을 보였으나, 종양이 이미 육안적 크기로 성장한 후에 영지를 주사한 군에선 통계학적인 의미가 미약하였다.

참 고 문 헌

1. **Perez CA**: Overview. In: Perez CA, Brady LW, eds. Principle and Practice of Radiation Oncology, 2nd ed. Philadelphia, JB Lippincott Co. 51-55, 1992
2. **Chabner BA**: Anticancer drugs. In: Cancer: Principles and Practice of Oncology. Devita VT, Hellman S, Steven A. Rosenverg SA, 4th ed. Philadelphia, JB Lippincott Co. 325-417, 1993
3. **Hall EJ**: Radiobiology for the Radiologist. 3rd ed. Philadelphia, JB Lippincott Co. 18-38, 1988
4. **Rhee JG, Schuman VL, Song CW**: Difference in the Thermotolerance of mouse mammary carcinoma cells in vivo and vitro. Cancer Research 47: 2571-2575, 1987
5. **Hall EJ**: Radiobiology for the Radiologist. 3rd ed. Philadelphia, JB Lippincott Co. 70-71, 1988
6. **Kwon HC, Lyons JC, Song CW**: Radiosensitization of hypoxic cells in vitro and in vivo by AK-2123. The Journal of JASTRO Sept. 3(3):125-131, 1991
7. **이준우, 정훈, 정천희**: 영지 균사체의 알칼리 추출물이 보체계와 망내계에 미치는 영향. Kor. J. Mycol. 18(3): 137-144, 1990
8. **김병각**: 영지의 양효성분. 균학회 소식 2(2):16-20, 1990
9. **Mizuno T**: Bioactive substance and medicinal effects of Reishi, Ganoderma lucidum. 균학회 소식 2(2):21-29, 1990
10. **Miyazaki T and Nishijima M**: Studies on fungal polysaccharide. XXVII. Structural examination of a water soluble, Antitumor polysaccharide of Ganoderma lucidum. Chem. Pharm. Bull 29:3611-3616, 1981
11. **Mizuno T**: Immunostimulative and cytotoxic antitumor substance from mushroom fungi. Nippon Nogeikagaku Kaish. 63(4):862-865, 1989
12. **Nozoe S and Takahashi A**: Medicinally active substances from basidiomycetes, Nippon, Nogeikagaku Kaishi 63(4):868-873, 1989
13. **최정화**: 한국산 영지 진탕액이 Mouse의 면역세포 기능에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 박사학위 논문, 1990
14. **Maruyama H, Yamazaki K, Murofushi S**: Antitumor activity of Sarcodon(BERK.)S. Ito and Ganoderma lucidum(FR.)Karst. J. Pharmacobio-Dyn. 12:118-123, 1989
15. **한국 균학회**: 영지버섯의 신비. 균학회 소식 2(2):51-53, 1990