

## *Ganoderma lucidum* IY 009로 부터 분리된 항암성 다당류의 약리 및 독성

이권행\* · 이정옥<sup>1</sup> · 이준우<sup>2</sup> · 정훈<sup>2</sup> · 한만덕<sup>2</sup> · 정준호<sup>2</sup> · 오두환

\*연세대학교 식품생물공학과 생물산업소재연구센터, <sup>1</sup>한국화학연구소 의약활성연구실,

<sup>2</sup>일양약품(주) 중앙연구소 생물공학연구실

## Pharmacological, Toxicological Studies of Antitumor Polysaccharides Obtained from *Ganoderma lucidum* IY 009

Lee, Kweon-Haeng, Chong-Ock Lee<sup>1</sup>, June-Woo Lee<sup>2</sup>, Hoon Jeong<sup>2</sup>,  
Man-Deuk Han<sup>2</sup>, June-Ho Jeong<sup>2</sup> and Doo-Hwan Oh\*

Department of Food Engineering, College of Engineering, Yonsei university,  
Bioproducts Research Center, Seoul 120-749, Korea

<sup>1</sup>Pharmacological Screening Lab., Korea Research Institute of Chemical Technology,  
Taejeon 305-606, Korea

<sup>2</sup>Biotechnology Lab., Central Institute of Research, Il Yang Pharmaceutical Co. Ltd.,  
Yongin, 449-900, Korea

**Abstract** — The highest antitumor activity was observed in water soluble AS fraction of the *Ganoderma lucidum* IY 009. AS fraction did not show any cytotoxicity on sarcoma 180 cell but stimulated antibody production, opsonization of macrophage in ICR mouse and superoxide ion production from isolated macrophage. AS fraction activated complement C3 in human serum, and their antitumor activity was inhibited by EDTA, a chelator of cation related complementary activation. AS fraction exerted on prolong of life span and inhibition of tumor growth in the leukemia P388 or L1210 transplanted inbred mouse, BDF1 but Krestin did not. AS fraction did not show any serious and lethal effects through oral administration on ICR mouse, and LD<sub>50</sub> of those was above 2,230 mg/kg.

*G. lucidum*의 저분자 성분 중 대표적인 것은 lanostanoid triterpene류로, Kubota등(1)이 chloroform가용 분획에서 고미성분인 ganoderic acid A와 B를 분리한 이후, 1983년 Toth등(2)은 균사체에서 ganoderic acid U, V, W, X, Y 및 Z를 분리하였는데, 이 물질들은 모두 간암세포에 독성을 나타낸다고 보고하였으며, 1986년 Morigiwa등은 ganoderic acid B, D, H, R, S, Y, ganoderal A 및 ganoderol A와 B가 angiotensin I converting enzyme를 억제하는 작용이 있다고 보고하였다(3). 이후 1989년 Komoda등(4)은 ganoderic acid와 그의 유도체가 cholesterol합성을 저해한다고 보고하였다.

1979년 有地와 久保(5)는 자실체의 열수추출물을

본태성 고혈압쥐(SHR)에 투여하여 혈압강하 효과를 관찰하였으며, 작용성분은 당과 아미노산을 함유한 분자량이 100,000 이상인 고분자 물질이라 하였다. 고분자 분획은 또한 혈당을 조절하는 작용을 갖는데 (6, 7), Hikino등(8)은 자실체에서 insulin 분비를 촉진하는 효과가 있는 물질은 당과 단백질로 구성되어 있는, 분자량이 23,000과 7,400인 glycan이라고 보고 하였다.

최근 *G. lucidum* 다당의 약리효과 중 관심을 모으고 있는 것은 항암효과로 이 다당체들은 화학요법제에서 나타나는 독성이나 부작용이 없을 뿐만 아니라 항원성이 없기 때문이다. *G. lucidum*의 항암효과에 관해서는 1980년 Kim등(9)이 자실체의 0.1 N NaOH 추출물을 sarcoma 180이 이식된 mouse에 투여하여 암의 증식이 저지되는 것을 확인하였고, 1982년 Miyazaki와 Nishijima(10)는 자실체의 열수추출물을 분획하여 항암활성이 높은 수용성의 다당을 분리하였다.

**Key words:** Antitumor activity, Sarcoma 180, *Ganoderma lucidum*, Anticomplementary activity, Macrophage, Superoxide ion, Trypan blue, Complement C3, Leukemia P388 or L1210.

\*Corresponding author

이후 Mizuno등(11)도 자실체에서 항암활성이 높은 다당을 분리하였고, Sone등(12)도 자실체와 균사체에서 항암활성 다당을 분리하였다.

*G. lucidum* 다당체의 항암 작용 기전에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않았다. 다당체가 면역계와 관련된 비장세포의 항체생성 능력을 증가시키며(9), 보체계와 망내계를 활성화시킨다는 보고(13)가 있으나, 이러한 작용이 항암작용과 직접 연관이 있는지는 아직 확실하지 않다.

본 연구는 국내에서 자생하는 *Ganoderma lucidum* 자실체를 수집하여, 이중 항암활성이 우수한 IY 009의 균사체를 액체 배양하여, 항암성분을 분획한 후 항암 작용기전, mouse에 대한 독성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 사용균주와 시약, 그리고 균사체의 배양, 실험동물 및 종양세포, 조다당류의 분획조제, Sarcoma 180에 대한 항암효과의 측정, 보체활성의 측정방법 등은 전보(14)에서 사용한 것과 동일하게 실시하였다.

### Sarcoma 180에 대한 direct cytotoxicity의 측정

10%의 fetal bovine serum이 함유된 MEM 배지에 sarcoma 180 세포( $1.5 \times 10^5$  cells/ml)를 35 mm culture dish에 2 ml씩 분주하고 시료를 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml 및 500  $\mu$ g/ml 농도로 가해 5%의 CO<sub>2</sub> 하에서 37°C의 CO<sub>2</sub>(5%) incubator에서 24시간 동안 배양한 후 PBS buffer로 1회 수세하였다. 수세된 세포에 0.2 ml의 trypsin을 가해 10분 방치 후 2 ml의 MEM 배지에 현탁시켜 원심분리하였다. 침전된 세포를 0.1 ml의 PBS buffer에 현탁시켜, 이중 6  $\mu$ l 동량의 trypan blue로 염색하여, 염색이 되지 않은 살아 있는 세포와 염색이 된 사멸된 세포를 hemocytometer로 측정하였다(15).

### 용혈반 형성 세포수의 측정

용혈반 세포수의 측정은 Jerne와 Nordin(16)의 방법에 따라 행하였다. Mouse 5마리를 1군으로 하여 20 mg/kg 농도의 시료를 연속 5일간 복강 내에 투여한 후, 5일이 지난 다음  $1 \times 10^7$ 개 또는  $5 \times 10^7$ 개의 SRBC를 복강주사하여 면역시켰다. 5일 후 mouse에서 비장을 분리하여, 빙냉의 HBSS에 넣은 후, 분쇄하여 비장세포를 유리시킨 것을 400xg에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 tris buffered

ammonium chloride(pH 7.3)에 부유시켜 적혈구를 용해시켰다. 다시 빙냉의 HBSS용액으로 3회 세척한 후, hemacytometer로 세포수를 측정하였다. 용혈반 형성세포수를 측정하기 위해, 비장세포 0.1 ml( $1 \times 10^8$  cells/ml)와 10% SRBC 0.1 ml을 0.7% agar 용액 2 ml에 혼합하여 1.5% agar 기저평판에 균일하게 분주한 후, 37°C에서 60분간 감작화시켰다. 여기에 보체로서 10%의 guinea pig serum을 2.5 ml씩 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 용혈반 세포수를 측정하였다.

### 탐식기능의 측정

탐식기능은 carbon clearance rate로서 측정하였으며, Kanari등(17)의 방법 따라 행하였다. 20 mg/kg 농도의 시료를 복강내에 연속 5일간 투여하고, 24시간 후 mouse의 미정맥에 carbon 부유액(perikan drawing ink 17 black 3 ml, 생리식염수 4 ml, 3% gelatin 4 ml의 혼합액)을 0.1 ml/10 g씩 주사하고, 3, 6 및 9분 후에 안와 정맥에서 30  $\mu$ l를 채혈한 즉시 0.1%의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 ml를 가하여 용혈시킨 후, 675 nm에서 흡광도를 측정하여 carbon clearance rate( $t_{1/2}$ )를 구하였다.

### Peritoneal macrophage로부터 superoxide ion production의 측정

Mouse의 복강에서 분리된 macrophage를 HBSS buffer로 exudate시켜서 3회 수세하고 MEM배지에  $5 \times 10^6$  cell/ml로 현탁시켜 24 well culture dish에 1 ml씩 분주한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 동안 incubation시켰다. Buffer로 3회 수세하고 cytochrome-C (80  $\mu$ M)와 시료를 1 mg/ml씩 가해 total volume을 1 ml로 조정하여 30분간 incubation한 후 원심분리하여 상등액의 흡광도를 550 nm에서 측정하였다(18).

### 면역전기영동(2-dimensional crossed immunoelectrophoresis)

전기영동은 Shimura등(19)의 방법을 변형하여 행하였다. 6.25 mM EGTA, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>가 함유된 GVB<sup>2</sup> buffer에 용해시킨 시료(2.5 mg/ml) 25  $\mu$ l에 normal human serum 75  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 1차 전기영동은 tricine veronal buffer를 사용하여 1% agarose에서 2.1 mA/cm로 행하였으며, 2차 전기영동은 2.5%(v/v)의 antihuman whole serum을 함유한 1% agarose에서 4.2 mA/cm로 4시간 동안 행하였다. 전개된 gel은 coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하였다.

**Leukemia L1210 및 P388에 대한 항암효과의 측정**

Mouse leukemia L1210 및 P388에 대한 항암효과는 다음과 같이 측정하였다. L1210의 계대는 DBA/2 mouse를 사용하였으며, 약물의 복강내 투여에 의한 항암효과를 측정하기 위해 6주령 BDF<sub>1</sub> mouse를 group당 8마리를 단일군으로 하여 leukemia L1210을 1×10<sup>6</sup> cells/0.1 ml씩 복강내로 이식하였다. 시료를 saline에 녹여 암이식 후 1일 후부터 9일까지 1일 1회씩 연속하여 100 mg/kg 및 10 mg/kg의 농도로 각각 복강 또는 경구 투여하였다. 대조군은 saline을 주사하였다. 각 실험군의 mean survival time으로부터 대조군에 대한 투여군의 평균 생존일의 증가된 비율(T/C, %)을 계산하여 항암효과를 판정하였다.

Solid L1210에 대한 항암효과를 측정하기 위해, BDF<sub>1</sub> mouse 8마리를 단일군으로 하여 L1210 세포 7.0×10<sup>5</sup> cells/0.1 ml를 피하로 이식하였다. 암이식 후 1일 후부터 9일까지 연속하여 약물을 복강으로 주사하였다. 16일째에 mouse를 치사시킨 후 고형 종양을 적출하여 중량을 평량하였다. 암의 증식 저지율은 saline을 투여한 대조군과 비교하여 암저지 백분율(percent inhibition ratio : I.R. (%))을 계산하였다.

6주령 BDF<sub>1</sub> mouse 8마리를 한 실험군으로 하여 1×10<sup>6</sup> cells(0.1 ml)의 P388을 각각의 mouse에 복강내로 이식한 후, 1일 이후부터 9일까지 1일 1회씩 약물을 연속하여 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 용량으로 복강내로 주사하였다. 각 실험군의 mean survival time을 측정하여 대조군과의 비율(T/C %)을 계산하였다.

**급성경구독성**

5-6주령의 ICR mouse 암수를 무작위법으로 군분리하여 시험에 사용하였다. 사육관리는 폴리카보네이트 케이지(20 cm W×35 cm L×12 cm H)에 5마리씩 넣어 사육하였으며, 사료는 mouse용 고형사료와 음수는 이온교환수지 정제수를 순화 및 시험기간 동안 자유섭식시켰다. 동결건조된 시험물질이 물에 난용성이므로, 생리식염수에 최고 용해량을 고용량으로 잡고 투여군 간의 농도 공비는 1.5로 정했다. 투여 당일에 체중별로 고르게 분포시킨 후 꼬리식별법으로 개체 식별을 했다. 약물의 투여는 mouse경구 투여용 zonde를 장착한 주사관으로 1회 경구투여하였다. 임상 관찰은 투여당일은 1, 2, 3, 4시간에 걸쳐서 4회 실시하였으며, 익일부터는 1일 1회 실시하였다. 약물투여 후 체중변화를 관찰하기 위해, 투여 직전 및 투여 후 7일, 14일에 체중을 측정하여 비교하였다. 시험기간

종료시 모든 동물을 에테르로 치사시켜 부검한 후 내부장기 이상 유무를 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**G. lucidum IY 009 유래 조다당 분획, AS의 sarcoma 180에 대한 direct cytotoxicity**

조다당 분획, AS의 sarcoma 180에 대한 세포상해 활성을 측정하기 위해 10%의 FBS가 함유된 MEM 배지에 현탁된 sarcoma 180세포(1.5×10<sup>5</sup> cell/ml)를 35 mm culture dish에 2 ml씩 분주하고 AS분획을 10 µg/ml, 100 µg/ml 및 500 µg/ml 농도로 처리한 후, 세포의 생존율을 측정한 결과, Table 1에서와 같이 AS분획을 가한 것이나, 가하지 않은 것이나 생존율이 97% 이상으로 별 다른 변동이 없었다. 따라서 AS분획의 sarcoma 180에 대한 항암활성은 직접적인 세포상해 작용에 의한 것이 아니라, 면역계를 활성화시켜 숙주의 저항능력을 증강시켜 줄 것으로 생각되어 AS분획이 ICR mouse의 면역계에 미치는 영향을 검토하였다.

**G. lucidum IY 009의 조다당 분획, AS가 mouse의 항체생성에 미치는 영향**

G. lucidum IY009의 조다당 분획 AS 20 mg/kg을 복강투여한 후, mouse의 항체생성을 검토한 결과, Table 2에서와 같이 생리식염수를 투여한 군은 antigen으로 SRBC를 0.1×10<sup>7</sup> cells/ml 및 5×10<sup>7</sup> cells/ml의 농도로 각각 투여한 경우의 용혈반 형성 세포수는 각각 1.5×10<sup>6</sup>개, 4.0×10<sup>6</sup>개 및 61.6×10<sup>6</sup>개였고, G. lucidum IY 009의 조다당 분획, AS를 투여한 군은 각각 2.7×10<sup>6</sup>개, 6.7×10<sup>6</sup>개 및 150.7×10<sup>6</sup>개로, 생리식염수를 투여한 대조군보다 각각 1.5배, 1.9배 및 2.4배 증가하였다.

**G. lucidum IY 009의 조다당 분획, AS가 macrophage에 미치는 영향**

**Table 1. Direct cytotoxic effect against sarcoma 180 of alkali extracted crude polysaccharide fraction, AS of G. lucidum IY 009**

Concentration(µg/ml)	Average viability(%)
0	97.5
10	97.9
100	97.9
500	97.7

**Table 2. Effect of alkali extracted crude polysaccharide fraction, AS of *G. lucidum* IY 009 on hemolytic plaque forming cells in spleen of mice immunized with SRBC. 20 mg/kg of samples administrated through i.p. for 5 days**

Samples	SRBC × 10 <sup>7</sup>	PFC × 10 <sup>6</sup>	Total spleen cell × 10 <sup>8</sup>	Weight of spleen(g)	Change of weight (initial→final)
Saline	0	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.21 ± 0.03	20.4 ± 0.9 → 27.5 ± 0.0
	1	4.0 ± 2.8	1.4 ± 0.5	0.16 ± 0.06	20.3 ± 0.9 → 25.0 ± 3.6
	5	61.6 ± 13.7	1.2 ± 0.4	0.20 ± 0.07	20.3 ± 0.9 → 27.1 ± 3.9
Krestin	0	2.4 ± 0.9	1.3 ± 0.6	0.22 ± 0.06	20.5 ± 0.8 → 23.8 ± 4.9
	1	14.4 ± 5.2	1.3 ± 0.2	0.22 ± 0.06	20.5 ± 0.8 → 25.4 ± 4.1
	5	106.1 ± 60.6	1.5 ± 0.9	0.22 ± 0.07	20.5 ± 0.8 → 27.7 ± 2.6
Fraction AS	0	2.7 ± 0.7	1.2 ± 0.3	0.24 ± 0.05	20.4 ± 0.9 → 20.0 ± 2.7
	1	7.6 ± 3.3	1.5 ± 0.5	0.23 ± 0.06	20.4 ± 0.9 → 23.5 ± 2.2
	5	150.7 ± 71.8	1.7 ± 0.5	0.25 ± 0.08	20.4 ± 0.9 → 25.4 ± 5.5

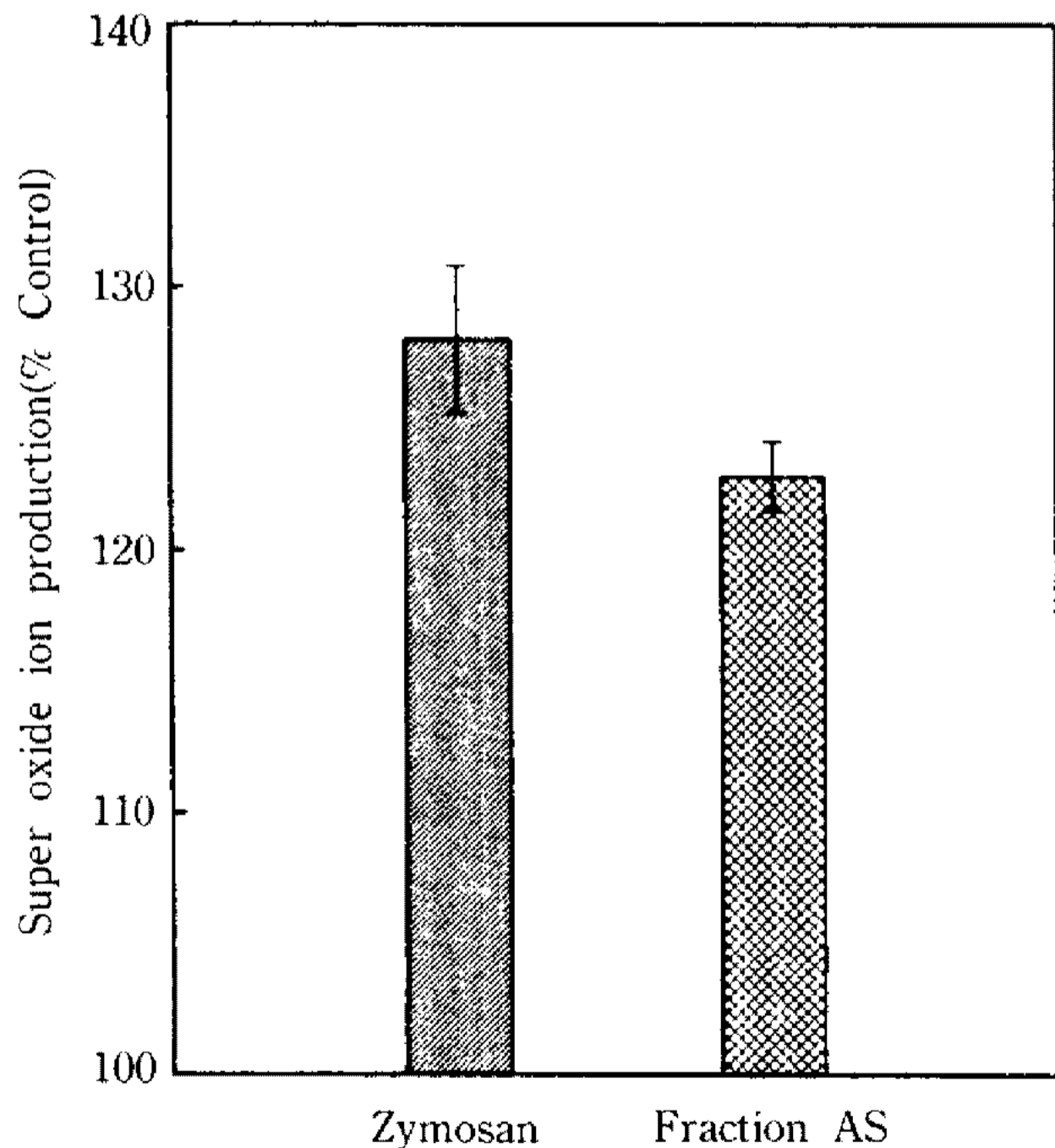
Each value represents the mean ± S.E.

**Table 3. Effect of alkali extracted crude polysaccharide fraction, AS of *G. lucidum* IY 009 on phagocytic activity of reticuloendothelial system in ICR mice**

Treatment	Dose (mg/kg)	No. of mouse	Clearance rate of carbon(t <sub>1/2</sub> , min)	Phagocytic index(K)
Saline		5	11.24 ± 0.16	0.017 ± 0.002
Krestin	20	5	10.40 ± 0.70	0.023 ± 0.002
Fraction AS	20	5	10.38 ± 0.67	0.023 ± 0.002

Each value represents the mean ± S.E.

*G. lucidum* IY 009의 조다당 분획, AS가 macrophage의 탐식기능에 미치는 영향을 살펴보기 위해 20 mg/kg 농도의 시료를 복강내에 연속 5일간 투여하고, 24시간 후 carbon clearance rate(T<sub>1/2</sub>)를 측정하고, Table 3에서와 같이 생리식염수를 투여한 대조군은 11.24분으로 나타났으며, 조다당 분획 AS를 투여하였을 때는 10.38분으로 나타나 AS분획이 macrophage의 탐식능을 촉진시킴을 알 수 있었으며, 촉진 효과는 Krestin의 경우와 유사하였다. 조다당 분획, AS가 macrophage의 superoxide ion production에 미치는 영향을 살펴보기 위해, ICR mouse의 복강으로부터 분리된 macrophage에 시료 1 mg/ml를 가하여 superoxide ion의 생성을 관찰하였다. Fig. 1에서와 같이 조다당 분획, AS는 생리식염수를 가한 대조군보다 macrophage로부터 superoxide ion을 22.8% 많이 생성하였다. 또한 sarcoma 180이 이식된 mouse에 macrophage기능의 특이한 저해제인 trypan blue(21)를 조다당 분획, AS와 병용 또는 단독으로 투여한 후 암의 증식을 살펴 본 결과, Table 4에서와 같이 단독으로 투여한 경우는 암의 증식이 87.0% 억제되었고, 병용투여에서는 70.8%가 억제된 것으로 나타나, 조다당 분획 AS에 의해 나타나는 항암활성은 macrophage의 활성화와 관련이 있음을 시사하고 있다.



**Fig. 1. Increased superoxide production of macrophage treated with alkali extracted crude polysaccharide fraction AS obtained from *G. lucidum* IY 009.**

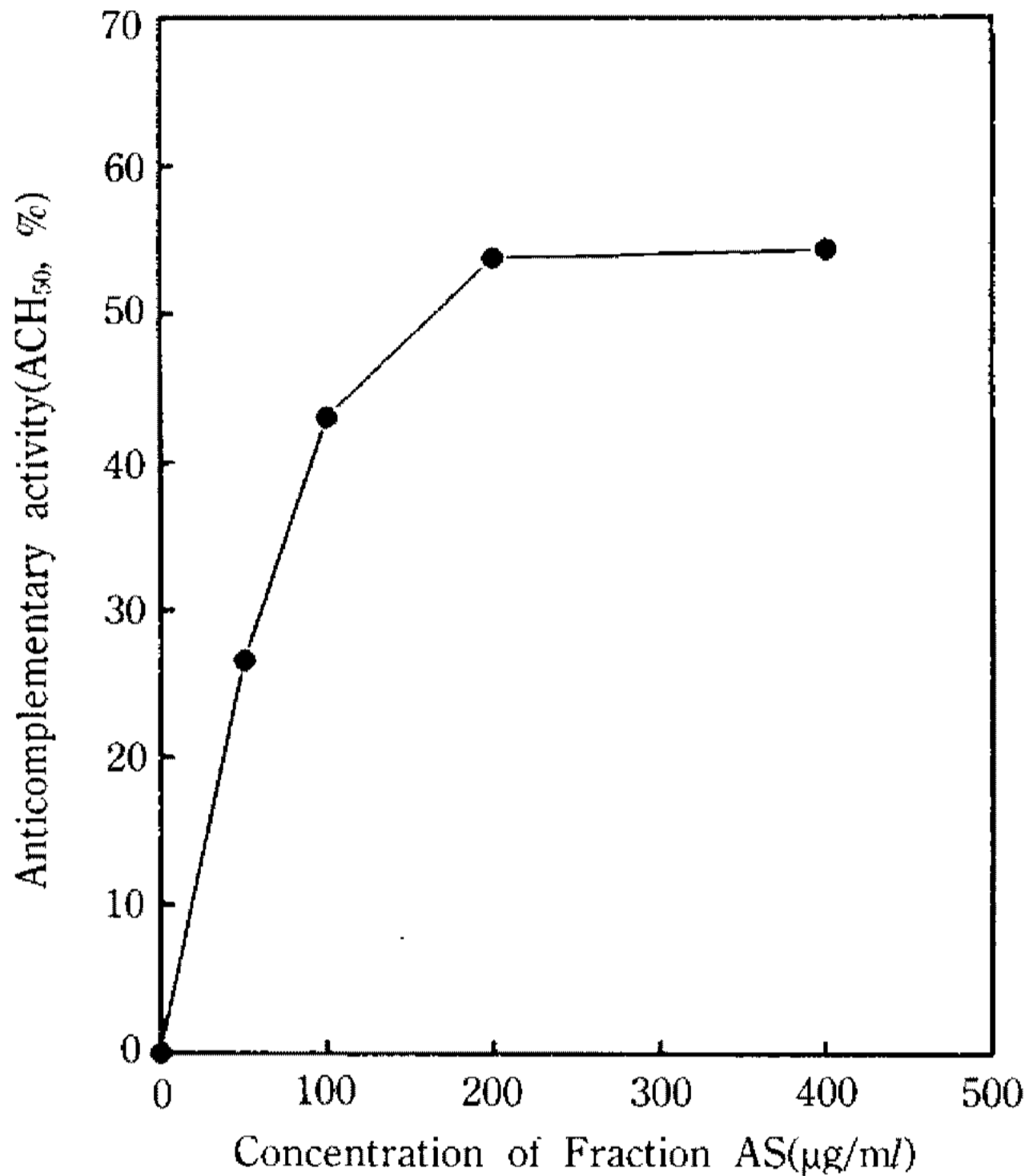
*G. lucidum* IY 009의 조다당 분획, AS가 보체계에 미치는 영향

조다당 분획 AS의 항암활성은 trypan blue에 극히



**Table 4. Effects of trypan blue with or without alkali extracted crude polysaccharide fraction, AS of *G. lucidum* IY 009 on tumor growth of the sarcoma 180 bearing mice**

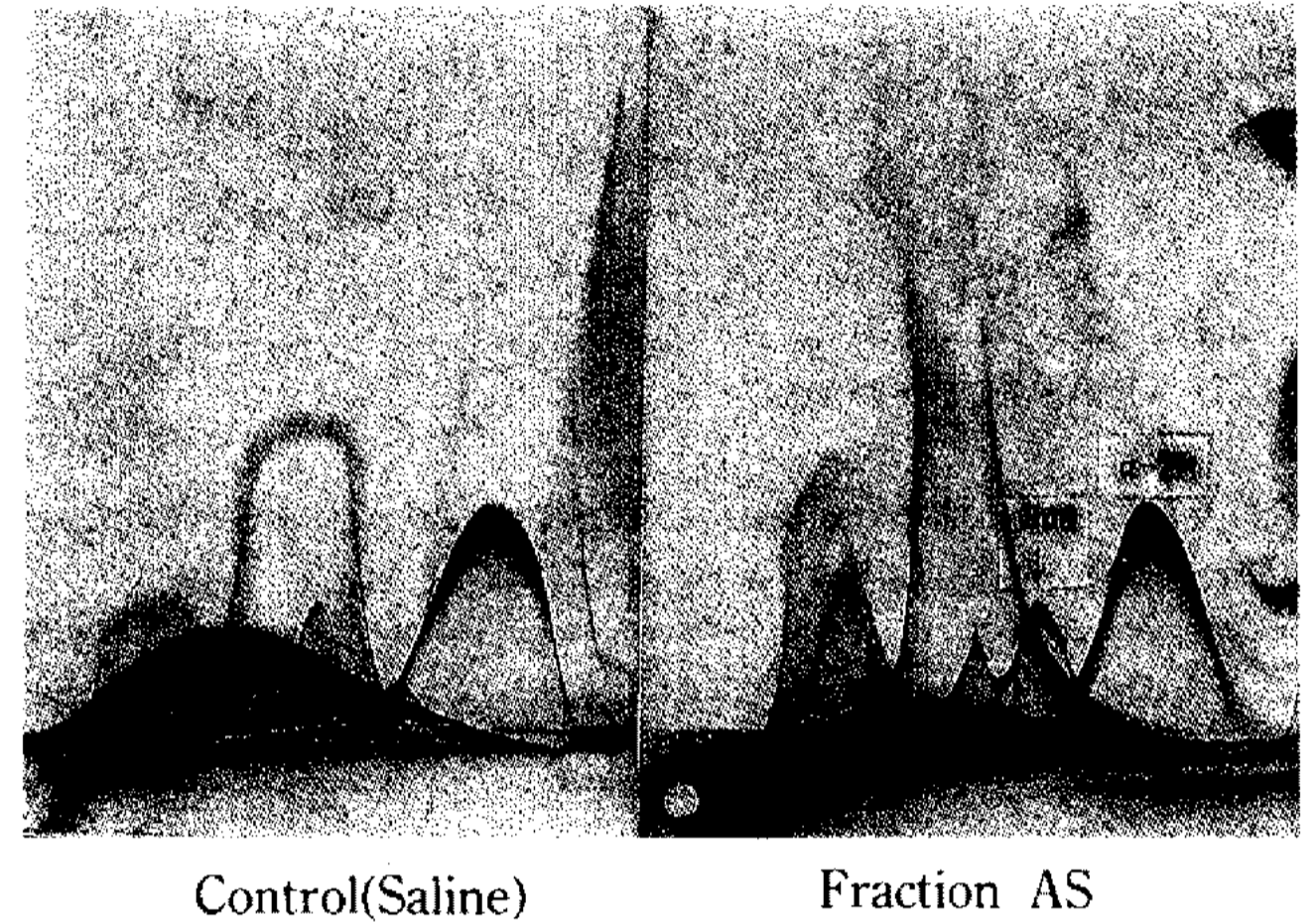
Samples	Dose(mg/kg)	Tumor weight(g)(Mean± SD)	Inhibition ratio(%)	Group
Saline		4.73± 1.85	0.0	10
Trypan blue	25	4.42± 1.72	6.2	9
Fraction AS	20	0.62± 0.99	87.0	10
Fraction AS/Trypan blue	20/25	3.35± 1.60	70.8	9



**Fig. 2. Anticomplementary activity dependent on concentration of alkali extracted crude polysaccharide fractions, AS obtained from *G. lucidum* IY 009.**

일부만이 저해를 받아, macrophage 외의 또 다른 면역계가 관여하고 있음을 시사하기 때문에, 보체계에 미치는 영향을 살펴 보았다. *in vitro*에서 조다당 분획, AS는 보체계를 활성화시키는 효과가 있었다.

Fig. 2에서와 같이 시료의 농도가 증가함에 따라 보체의 소모량(ACH<sub>50</sub>, %)이 증가하여 AS분획 200 µg/ml에서 최대인 54%를 나타낸다. 또한 AS분획 100 µg/ml을 human serum과 반응시켰을 때, alternative complement pathway 반응의 시발 물질인 complement C3가 감소함과 동시에 전환된 C3(3rd peak)는 증가하였다(Fig. 3). C3의 활성화 정도는 α-2 macroglobulin(α-2 M)과 activated C3(3rd peak)의 비율(3rd peak/α-2 M)로 나타내는데, AS분획의 complement C3의 활성화도는 0.69로 saline을 가한 control의 0.21보다 C3를 더 많이 활성화시켰음을 알 수 있었다. 이상의



**Fig. 3. Crossed immunoelectrophoresis patterns of normal human serum treated with alkali extracted crude polysaccharide fraction AS obtained from *G. lucidum* IY 009.**

100 µg/ml of fraction AS reacted with fresh human serum was run on 1% agarose, second run was done on 1% agarose containing antihuman whole serum. Gel was stained in coomassie brilliant blue R-250 solution. Converted complement C3(3rd peak) designated by arrow. α-2M designated α-2M macroglobulin.

결과들로부터 AS분획은 C1에서부터 시작되는 보체 활성화 반응인 classical complement pathway는 물론 C3부터 시작되는 반응인 alternative complement pathway를 활성화시키는 것으로 나타났다.

*In vitro*에서 다당류에 의해 나타나는 보체계의 활성화 효과가 *In vivo*에서 항암활성과 어떠한 관계를 가지고 있는 지에 대한 직접적인 실험적 증거는 아직 보고되지 않고 있다. 이는 *in vivo*에서 보체계만을 특이하게 저해할 수 있는 물질이 발견되지 않았기 때문이다. 본 실험에서는 보체계 활성화에 관여하는 2가 양이온인 Ca<sup>2+</sup>과 Mg<sup>2+</sup>의 chelator인 EDTA를 sarcoma 180을 이식한 mouse에 단독 또는 AS분획과 병용으로 투여하였을 때, EDTA가 암의 증식에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Table 5에서와 같이 10 mg/kg의 EDTA를 단독으로 투여하였을 경우는 EDTA가 암의 증식에 별 다른 영향을 미치지 않았다.

**Table 5. Effects of EDTA with or without alkali extracted crude polysaccharide fraction, AS from *G. lucidum* IY 009 on tumor growth of the sarcoma 180 bearing mice**

Samples	Dose(mg/kg)	Tumor weight(g)(Mean±SD)	Inhibition ratio(%)	Group
Saline		4.73±1.85	0.0	10
DETA	10	4.32±2.06	8.6	10
Fraction AS	20	0.62±0.99	87.0	10
Fraction AS/EDTA	20/10	1.64±0.83	65.4	9

**Table 6. Antitumor activities of alkali extracted crude polysaccharide fraction AS of *G. lucidum* IY 009 against mouse leukemia P388 and L1210 on BDF<sub>1</sub> mice**

Samples	Dose(mg/kg)	Antitumor activities					
		S180 in ICR		P388 in BDF <sub>1</sub>		L1210 in BDF <sub>1</sub>	
		sc/ip <sup>1)</sup> I.R.(%) <sup>2)</sup>	ip/ip* T/C(%)	ip/po T/C(%) <sup>3)</sup>	ip/ip* T/C(%)	sc/ip I.R.(%)	ip/po T/C(%)
Krestin	200	—	ND <sup>4)</sup>	—	—	—	—
	100	—	ND	ND	ND	—	—
	50	—	ND	ND	—	ND	ND
	20	52.0	—	ND	—	—	—
	10	—	ND	—	ND	—	ND
Fraction AS	200	—	T <sup>5)</sup>	—	—	—	—
	100	—	MT <sup>6)</sup>	ND	129	—	—
	50	—	108	ND	—	—	124
	20	87.0	—	ND	—	27.9	—
	10	—	110	—	117	—	105

\*Criteria of efficiency for antitumor chemotherapy in National Cancer Institute U.S.A.: Over 120%(T/C) prolongation of life time through i.p. administration in P388 bearing mouse, over 125%(T/C) in L1210

<sup>1)</sup>Inoculum site/Treatment site, <sup>2)</sup>Inhibition ratio of tumor growth, <sup>3)</sup>Life time of treated group/Life time of control group, <sup>4)</sup>Not detected, <sup>5)</sup>Assumed toxicity(T), <sup>6)</sup>Mild toxicity(MT)

그러나 조다당 분획 AS를 EDTA와 병용으로 투여하였을 때는 단독으로 투여하였을 때의 암증식 저지율인 87.0%보다 낮은 65.4%로 나타났다. 이와같은 결과는 조다당 분획, AS에 의해 나타나는 *in vivo*에서 항암활성은 이들에 의한 보체계의 활성화와 밀접한 관계가 있음을 보여 주는 것이다.

#### *G. lucidum* IY 009 유래 조다당 분획, AS의 syngenic mouse tumor, P388 및 L1210에 대한 항암효과

항암성 다당류와 같이 숙주의 면역계에 작용하여 항암활성을 나타내는 약물의 경우는 chemotherapy에 비해 부작용이 거의 없는 반면 활성이 약하여 syngenic tumor에서는 활성을 나타내지 않는 경우가 많다. 항암성 다당류의 활성 검색이나 효과 측정 방법이 확립되어 있지 않은 현 시점에서 allogenic tumor인 sarcoma 180을 이용하고 있으나, 보다 신빙성 있는

항암효과를 확인하기 위해서는 syngenic tumor를 이용한 항암실험이 필요하다고 생각된다. 따라서 *G. lucidum* IY 009의 조다당 분획, AS와 일본에서 시판되고 있는 면역항암제인 Krestin의 항암효과를 syngenic tumor를 이용하여 측정하였다. Syngenic mouse leukemia P388을 BDF<sub>1</sub>의 복강에 이식하고 10 mg/kg에서 200 mg/kg의 Krestin과 AS분획을 복강 및 경구로 각각 투여한 후 이들의 수명연장 효과를 관찰하였다. Table 6에서와 같이 Krestin은 수명을 연장시키지 못한 반면 AS분획은 10 mg/kg 및 50 mg/kg의 농도에서 약 10%의 수명을 연장시켰으나, 경구 투여에서는 Krestin과 마찬가지로 수명연장 효과가 없었다. 한편 syngenic mouse leukemia L1210을 BDF<sub>1</sub>의 복강에 이식하고 10 mg/kg에서 100 mg/kg의 Krestin과 AS분획을 복강 및 경구로 각각 투여한 후 이들의 수명연장 효과를 관찰한 결과, Krestin에서는 P388에서의 경우와 마찬가지로 수명연장

**Table 7. Acute toxicity of alkali extracted crude polysaccharide fraction AS of *G. lucidum* IY 009 on ICR mice**

Group	Sample administration		Special behaviour	Dead/Treated*	Minimum Lethal Dose(mg/kg)
	Route	Dose(mg/kg)			
control	p.o.	Saline	N.D.	0/10	
T1	p.o.	660	N.D.	0/10	
T2	p.o.	991	N.D.	0/10	
T3	p.o.	1,486	N.D.	0/10	
T4	p.o.	2,230**	N.D.	0/10	<2,230

\*Each group was consist of 5 male and 5 female mice. \*\*2230 mg of crude polysaccharide fraction AS was obtained from 2.5 L of cultured *G. lucidum* IY 009 by alkali extraction.

효과가 없었다. AS분획은 복강투여한 경우 10 mg/kg의 농도와 100 mg/kg의 농도에서 control에 비하여 평균수명을 각각 17%와 29% 연장시켰으며, 경구투여에 의해서는 10 mg/kg 및 50 mg/kg의 농도에서 각각 5%와 24%의 평균수명이 연장되었다. L1210을 BDF<sub>1</sub>의 피하에 이식하고 20 mg/kg의 Krestin과 AS 분획을 복강으로 투여한 후 고형암의 증식을 관찰한 결과 Krestin은 암의 증식억제 효과가 없었으나, AS 분획은 고형암의 증식을 27.9% 억제시켰다.

#### *G. lucidum* IY 009유래 조다당 분획, AS의 급성 경구 독성

고등균류로부터 얻어지는 항암성 다당이 임상적으로 이용될 경우, 경구투여되기 때문에, 경구투여에서 효과가 나타난다는 것은 중요한 의미를 갖는다. *G. lucidum* IY 009의 조다당 분획 AS를 P388이 이식된 mouse에 경구투여한 경우, 100 mg/kg 이상의 농도에서 활동성이 떨어지고 체중의 감소가 관찰되어(Table 6), ICR mouse를 이용하여 급성 경구 독성 시험을 행했다. Table 7에서와 같이 시험기간 동안 사망한 동물은 없었으며, 투여 직후에 자발운동의 정지나 활동성 감소가 전군에서 고르게 나타났으나, 이것은 약물투여로 인한 스트레스에 기인된 것으로 사료된다. AS분획 투여군과 대조군 사이의 체중증가율의 차이는 나타나지 않았으며, 내부장기의 육안적 소견에서 이상 장기는 발견되지 않았다. 조다당 분획, AS의 LD<sub>50</sub>은 2,230 mg/kg 이상으로, 최대 투여 농도가 최대 가용 용량임을 고려할 때 LD<sub>50</sub>의 농도는 훨씬 높아질 것으로 생각된다.

## 요 약

*G. lucidum* IY 009의 균사체의 조다당 분획, AS는 sarcoma 180 cell에 직접적인 toxicity를 나타내지

않았으나, ICR mouse의 항체 생성과 macrophage의 탐식능 및 분리된 macrophage로부터 superoxide ion 생성을 촉진시켰으며, AS분획의 항암활성은 macrophage 기능의 특이한 저해제인 trypan blue에 의해 저해 받았다. 또한 AS분획은 human serum중의 complement C3를 활성화시켰으며, AS분획의 항암활성은 보체계 활성화에 관여하는 2가 양이온의 chelator인 EDTA에 의해 저해 받았다.

Mouse leukemia P388 및 L1210이 이식된 inbreed mouse, BDF<sub>1</sub>에서 Krestin은 항암활성을 전혀 나타내지 못하였으나, AS분획은 수명연장 및 고형암 증식억제 효과를 나타내었다.

AS분획을 ICR mouse에 경구투여한 경우, 별 다른 독성을 보이지 않았으며, LD<sub>50</sub>은 2,230 mg/kg 이상으로 나타났다.

## 참고문헌

1. Kubota, T.Y., Asaka, I., Miura and H. Mori. 1982. Structures of Ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum*(Fr. Karst.). *Helv. Chem. Acta.* **65**: 611-619.
2. Toth, J.O., B. Luu and G. Ourisson. 1983. Les acides ganoderiques T a Z, triterpens cytoxiques de *Ganoderma lucidum*(Polyporaceae). *Tetrahedron Lett.* **24**: 1081-1083.
3. Morigiwa, A., K. Kitabatake, Y. Fujimoto and N. Ikekawa. 1986. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 3025-3028.
4. Komoda, Y., M. Shimizu, Y. Sonda and Y. Sato. 1989. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 531-533.
5. 有地 滋, 久保 道德. 1979. 靈芝(*Ganoderma lucidum*) 子實體の研究. 基礎と臨床. **13**: 4239-4244.
6. 이권행, 정훈, 김영일, 김병각. 1991. 산업폐자원을

- 이용한 발효에 의한 영지의 항고혈압 성분의 생산. 한국균학회지 **19**: 79-84.
7. 木村 善行, 有地 滋, 高橋 猛. 1983. 靈芝의 糖代謝에 미치는 영향. 基礎と 臨床 **17**: 17-20.
8. Hikino, H., C. Kono, Y. Mirin and T Hayashi. 1985. Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderans A and B, glucans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica*. **51**: 339-340.
9. Kim, B.K., H.S. Chung, K.S. Chung and M.S. Yang. 1980. Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes, mycelial culture and antineoplastic component of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **8**: 107-113.
10. Miyazaki, T. and M. Nishijima. 1982. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**: 3611-3616.
11. Mizuno, T., N. Kato, A. Totsuka, K. Takenaka, K. Shinkai and M. Shimizu. 1984. Fractionation, structural features and antitumor activity of water soluble polysaccharide from 'Reishi', fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nogeigaku Kaishi*. **58**: 871-882.
12. Sone, Y., R. Okuda, N. Wada, E. Kishida and A. Misaki. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2641-2653.
13. 이준우, 정훈, 정천희, 이권행. 1990. 영지균사체의 알카리 추출물이 보체계와 망내계에 미치는 영향. 한국균학회지 **18**: 137-144.
14. Lee, Kweon-Haeng, June-Woo Lee, Man-Deuk Han, Hoon Jeong, Young-Il Kim and Doo-Hwan Oh. 1994. Correlation between anticomplementary and antitumor activity of the crude polysaccharide from *Ganoderma lucidum* IY009. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **22**: 45-51.
15. Johnstone, A. and R. Thorpe. 1982. *Immunochemistry in Practice*. Pp 79-84 Blackwell Scientific Publications, Oxford, London.
16. Jerner, N. K. and A. A. Nordin. 1963. Plaque formation in agar by single antibody producing cell. *Science*. **140**: 405-406.
17. Kanari, M., M. Tomoda, R. Gonda, N. Shimizu, M. Kimura, M. Kawaguchi and C. Kawabe. 1989. A reticuloendothelial system activating arabinoxylan from the bark of *Cinnamomum cassia*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 3191-3194.
18. Richard, B. and Jhonston Jr. 1985. Measurement of  $O_2^-$  Secreted by monocytes and macrophages. pp 365-369. In L. Packer(ed.). *Methods in enzymology*. **105**, Academic Press, New York.
19. Shimura, K., H. Ito and H. Hibasami. 1983. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immuno-electrophoresis using fresh human serum. *Japan J. Pharmacol.* **33**: 403-408.
20. Kraus, J., W. Blaschek and G. Franz. 1988. *Arch. Pharm.*, **321**: 630.

(Received July 12, 1993)