

상황버섯으로부터 분리한 고분자 다당류의 약리활성

이은숙*, 서부일**

(*경산대학교 한의예과, **경산대학교 본초학교실)

ABSTRACT

Pharmacological Activities of the Polysaccharide

extracted from *Phellinus linteus*

Eun-Sook, Lee*, Bu-il, Seo**.

Department of preparatory oriental medicine, Kyungsan university.

Department of herbology, College of oriental medicine, Kyungsan university.

To examine the pharmacological activity of the polysaccharide extracted from *phellinus linteus*, we obtained the polysaccharide treated by the alkali and hot water, molecular weights of hot water was 10kD and 225 kD. Anticomplementary activity were highly/observed in hot water fraction than alkali fraction. The tumor inhibition ratio of the polysaccharide extracted by hot water and alkali of *Phellinus linteus* against sarcoma 180 were 72.5% and 67.6%, respectively. These results suggest that protein bound polysaccharides extracted by a hot water and alkali of *Phellinus linteus* were similar to the pharmacological activities and chemical properties.

*Key Word: *Phellinus linteus*, Pharmacological Activities, Polysaccharide, 상황버섯

I. 서론

상황버섯은 다공균과 (polyporaceae)에 속하는 버섯으로 뽕나무 줄기에 자생하며 학명은 *Phellinus linteus* (Berk, et Curt)Aoshima라고 한다. 담자균류에 대한 연구는 1969년 Chihara이후 *Coriolus versicolor*의 krestin¹⁾, *Shizophyllum commune*의 shizophyllan²⁾, *Lentinus edodis*의 lentinan³⁾, *Ganoderma lucidum*으로부터 분리된 다당류 G009등이⁴⁾ 연구·개발중에 있으며, 일부는 임상에 이용되고 있는 실정이다. 상황 버섯 자실체 열수 추출물은 소화기 계통의 암인 위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암을 비롯한 간암의 절제 수술후 화학요법을 병행할 때 면역기능을 항진시키는 것으로 알려졌다⁵⁾. 현재 자연산의 상황은 희귀하여 배양 균사체에 대한 연구도 활발히 진행 중에 있으며, 이들에서도 일반적인 담자균류로부터 분리한 다당류처럼 면역기능 조절을 통하여 일어나는 것으로 알려졌다고, 항체 생성촉진 효과, 임파구 생성촉진효과, 대식세포의 활성화, T 임파구의 지연형 과민반응 증가, S-180 및 Ehelich 복수암에 대한 항암 효과 등이 연구되었다^{6) 7)}.

이처럼 상황버섯이 다양한 약리활성을 나타내고 있으므로 약용 및 식용 제품의 개발 가능성에 대한 타당성을 조사하고자, 상황버섯 자실체를 열수와 알칼리 추출하여 약리효과에 대한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용버섯

본 실험에 사용된 버섯은 시중에 유통되어 있는 상황버섯 자실체를 구입하여 사용하였으며, 이를 세절하여 열수 및 알칼리 추출에 이용하였다.

2. 시약

지질과산화 실험을 위한 ascorbic acid, butylated hydroxytoluene(BHT), ferrous sulfate, adenosine 5-diphosphate(ADP), ferric chloride, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(β -NADPH), pyridine, 2-thiobarbituric acid(TBA),1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)는 Sigma사(St. Louis, USA)의 것을 사용하였다. 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급품 이상의 것을 사용하였다.

3. 실험동물 및 종양세포

본 실험에서 항암실험에 사용한 mouse는 20~25g의 ICR계 웅성, microsome 분리용 위한 rats는 230~250g의 S-D계 웅성으로 삼육축산에서 구입하여 사용하였고, *in vivo* 항암실험을 위한 암세포는 sarcoma 180을 사용하였다.

4. 분자량 측정

분자량은 Sepharose CL-4B resins를 이용하여 chromatography를 행하였으며, 당의 확인에는 phenol-sulfuric acid법⁸⁾을 이용하여 발색시켜 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 분자량 측정을 위한 표준물질로는 Sigma사의 dextran(2,000kD, 500kD, 124kD, 9.3kD)을 사용하였다.

5. 항암효과의 측정

Sarcoma 180 고형암 세포주에 대한 항암 효과의 측정은 0.1ml(5×10^7 cells/ml)의 sarcoma 180을 ICR계 mouse의 우측 서혜부에 피하 이식한 후, 72시간 후부터 20mg/kg 농도의 시료를 1일 1회씩 10일간 투여하였다. 암세포 이식 30일째 되는 날에 mouse로부터 고형암을 적출하여 중량을 평량하였다. 고형암의 증식저지율은 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 증식 저지백분율(Inhibition ratio:

I.R., %)로 계산하였다.

$$I.R.(%) = \frac{C_w - T_w}{C_w} \times 100$$

C_w = 대조군의 평균 중앙무게

T_w = 처치군의 평균 중앙무게

6. 보체활성의 측정

보체활성은 Lee 등의 방법⁹⁾으로 측정하였으며, 실험의 정확을 기하기 위하여, complement와 hemolysin에 대한 활성 역가를 측정하여 실험에 이용하였다. 시험관에 150 μ l의 GVB²⁺ buffer(0.15 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 1.8 mM sodium barbital, 3.1 mM barbituric acid, 141 mM NaCl 및 0.1% gelatin, pH 7.4)와 시료 50 μ l(50 μ g/ml)를 가한 다음, 100 U/ml로 조정된 guinea pig complement 50 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후, GVB²⁺ buffer를 가해 보체의 최종 농도가 1 unit/ml 되게 조정하였다. 조정된 보체 혼합물을 1.0 unit/ml, 1.2 units/ml 및 1.6 units/ml되게 각 시험관에 분주한 후 여기에 antisheep hemolysin(2 MHU/ml)과 동량의 sheep red blood cell(5 \times 10⁸ cells)를 혼합하여 실온에서 30분간 감각시킨 sensitized-SRBC 2 ml씩을 가하고, GVB²⁺ buffer로 최종 용량을 5 ml로 조정하여 37 $^{\circ}$ C의 water bath에서 60분간 반응시켰

7. 간 homogenate의 분리

Microsome는 다음과 같은 방법으로 얻었다. Pentobarbital로 마취된 흰쥐를 개복하여 50ml용 주사기로 50mM Tris-Cl buffer(pH 7.4) 30ml를 portal vein에서 하대정맥으로 혈액이 흘러나오도록 관류를 행하였다. 이후 간을 적출하여 50 mM Tris-Cl과 150 mM KCl이 함유된 buffer(pH 7.4)로 세척하고 잘게 썰어, Homogenizer(Polytrone[®], PT 10/35, Switzerland)를 이용하여 빙냉하에서 균질화를 실시하였다. 균질화물은 8,000 \times g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 얻었다. 상등액은 105,000 \times g에서 60분 동안 초원심분리를 실시한 후, 침전부분을 완충액으로 현탁시켜 단백질의 농도가 20 mg/ml되게 조정하였다. 분리된 microsome은 -70 $^{\circ}$ C에 보존하면서 실험목적에 따라 사용하였다.

8. In vitro에서의 지질 과산화 유발 및 측정

Microsome를 이용한 *in vitro* 지질 과산화 반응의 유도는 Ohkawa 등의 방법¹⁰⁾을 이용하였다. Ascorbate, FeSO₄, 시료 및 microsome(2 mg/ml) 등을 83.5mM의 KCl과 37.2 mM의 Tris-Cl(pH 8.0)이 함유되게 한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 지질 과산화 정도는 Ohkawa 등의 방법을 이용하여 생성된 MDA양을 측

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{\text{MDA of control} - \text{MDA of sample}}{\text{MDA of control}} \times 100(\%)$$

다. 70 μ l의 0.5 M EDTA를 가하여 반응을 중단시킨 다음 400 \times g에서 5분간 원심 분리하여 상정액을 얻은 다음 541 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항보체 활성은 대조군 대비 총보체 용혈율(50% of total complement hemolysis, TCH₅₀, %)의 저지율(inhibition of TCH₅₀, ITCH₅₀, %)로 나타내었다.

정하였다. 표준물질로서 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)를 이용하여 시료내의 MDA 양을 정량하였으며, 저해율은 다음 식에 의하여 계산하였다.

III. 결 과

1. 분자량 분포

열수추출 및 알칼리 추출 고분자 다당류의 분자량 pattern은 Fig. 1에 나타내었다. 열수 추출 분획은 10kD와 225kD의 분자량 peak 양상을 나타내었으며, 알칼리 추출분획은 10kD의 분자량을 가지는 분자량 pattern 양상을 나타내었다.

2. 항암 및 항보체 활성

상황버섯 자실체의 열수 추출 및 알칼리 추출분획의 항암 및 항보체활성을 측정된 활성을 Fig. 2 및 3과 같다. 열수 추출 다당류는 67.6%, 알칼리 추출분획은 72.5%의 항암 활성을 나타내었다. 항보체 활성의 경우 열수 추출 분획에서는 14.5%, 알칼리 추출 분획에서는 10.7%의 보체계 활성능을 나타내었다. 일반적으로 β -glucan을 함유하고 있는 담자균류 유래 다당류는 보체계를 활성화시키는 것으로 알려졌다¹¹⁾. 상황버섯에서도 225kD의 고분자 부분을 함유하고 있는 열수추출 다당류에서 약간 높은 보체 활성화 효과를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

3. AsA-Fe로 유도된 지질 과산화에 대한 영향 (in vitro)

상황버섯으로부터 추출한 고분자 다당류들의 지질과산화 억제활성을 조사하기 위하여 in vitro에서 간 microsome에 시료를 가한 후, 생성된 MDA의 양을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군은 ml당 30.1nM의 MDA를 생성시켰으며, 열수 추출 및 알칼리 추출물은 각각 13.3nM/ml과 8.6nM/ml의 MDA 생성능을 보였으며, 이들 각각의 저해율은 55.8% 및 71.3%의 지질과산화 저해율을 나타내 열수보다는 알칼리 추출분획에서 약간 높은 것으로 조사되었다. 강력한 항산화제로 알려진 BHT는 92.0%의 지질 과산화 저해능을 나타내었다.

IV. 고찰

열수 및 알칼리 추출 고분자 다당류의 기본 구조적 특성을 알아보기 위하여 IR을 측정된 결과는 당류의 일반적인 peak인 3400 cm^{-1} 부근에서의 O-H 신축진동, 2930 cm^{-1} 부근에서의 C-H 신축진동, 1600 cm^{-1} 부근에서의 C=N 신축진동, 1400 cm^{-1} 부근에서의 C-H 변각진동 및 1100 cm^{-1} 부근에서의 C-O 변각진동 등의 흡수띠를 나타내어 다당류에서 나타나는 일반적인 peak 들이 관찰되었다 (자료는 제시하지 않았음). β -glucosidic 다당류의 특징적 peak 흡수대인 890 cm^{-1} 부근에서의 미약한 흡수대가 관찰됨으로서 α 와 β -glucan이 혼재된 다당류임을 알 수 있었다¹²⁾. 고분자 다당류의 면적 약리활성은 그들의 polymer size, 중합도, 분지도 등의 구조적 특징과 관련되고 있는 것으로 알려졌다. 이들의 분자량 형태 주 peak는 10 kD였으며, 열수 추출에서는 225 kD의 분자량을 갖는 peak를 보였는데 이것은 추출시 열에 의해 다당류의 구조가 repacking되었거나, 완화된 추출에 의한 native한 다당류 형태로 존재하고 있는 것으로 추정된다. 담자균류 유래 다당류의 약리활성의 본태가 β -glucan으로 밝혀진 이래 *Coriolus versicolor*의 krestin¹⁾, *Shizophyllum commune*의 shizophyllan²⁾, *Lentinus edodus*의 lentinan³⁾, 등이 현재 임상에 이용되고 있으며, 이들은 대식세포의 활성화, 보체계활성화, B 세포 및 T 세포를 통하여 항암활성을 나타낸다고 보고되었다. 상황버섯의 열수 및 알칼리 추출물의 항암효과와 보체 활성은 고분자량을 나타내었던 열수 추출 다당류에서 약간 높게 나타났다 (Fig. 2 및 3). 지질 과산화 억제능을 측정하기 위하여 정상 흰쥐의 간으로부터 분리한 microsome에서의 지질 과산화 억제능을 측정된 결과, ascorbate와 Fe^{2+} 로 지질 과산화를 유발시킨 경우 1.0mg/ml의 첨가 농도에서 각각 열수와 알칼리 추출 다당류는 55.8%와 71.3%의 저해율을 나타내어 지질 과산화 억제능과 다당

류의 분자량 크기 차이는 상관성이 없는 것으로 추정된다. 이와 같이 상황 유래 다당류는 비효소적 지질 과산화를 억제하는 것으로 나타났으므로 지질 과산화 유발 및 억제능과 관련 있는 효소들의 활성변화, SOD와 catalase 및 glutathione의 농도변화 등에 관한 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다. 이와 같은 결과들로부터 다당류의 약리활성 발현을 위해서는 고분자 중합도가 높은 구조적 특징이 중요한 것으로 추정되며, 구조적 특징과 관련한 약리활성의 변화에 대해서는 향후 수행되어야 할 것이다.

V. 요약

상황버섯 자실체의 열수 및 알칼리 추출 다당류에 대한 약리 효과는 다음과 같다.

1. 분자량은 10kD 부근에서 주를 이루고 있었으며, IR은 다당류의 전형적인 peak 흡수대를 나타냈다.
2. 항암 활성과 보체 활성화에 있어서는 열수 추출 다당류에서 높게 나타났으며, 지질 과산화 저해능은 알칼리 추출 및 열수 추출 분획에서 각각 71.3%와 55.8%의 저해율을 나타내었다.

상기와 같은 결과를 종합하여 볼때 상황버섯 자실체의 열수 및 알칼리 추출물은 당과 단백질로 구성된 단백 다당류였으며, 열수 추출과 알칼리 추출에 의한 약리활성 정도는 유사한 것으로 조사되었다.

< 참고 문헌 >

1. Miyazaki, T., T. Yadomae, M. Sugiura, H. Ito, K. Fujii, S. Naruse and M.

- Kunihisa: Chemical Structure of antitumor polysaccharide, Coriolan, produced by *Coriolus versicolor*, *Chem. Pharm. Bull.*, 22, 1739(1974)
2. Komatsu, N., S. Okubo, S. Likumoto, K. Kimura, G. Saito and S. Sakai: host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*, *Gann*, 60, 137(1969).
3. Chihara, G., J. Hamuro, Y. Y. Maeda, Y. Arai and F. Fukuoka: Fraction of the polysaccharide with antitumor activity, especially lentinan, from the *Lentinus edodes* (berk) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.*, 30, 2776~2781(1970).
4. Lee, J.W., Jeong, H., Kim, K.N., Lee, S.M., Han, M.D., Lee, S.Y. Kim, S.U. and Kang, S.M. : Effect of G009 on Lipid Peroxidation Induced by peroxidizer in Rats. *The J. Applied Pharmacol.* 4(3), 244~250(1996).
5. IKeka, J., Nakamishi, M., Uehara, n., Chihara, G. and Fukuoka, F.: Antitumor action of some Basidiomycetes especially *Phellinus linteus*, *Gann*, 59, 155~157(1968).
6. Lee, J.W., Jeong, H., Kim, K.N., Lee, S. b., Kim, H.M., Hong, N.D. and Yoo, I. D. : immunostimulation activity and characterization of polysaccharide from mycelium of *Phellinus linteus*. *J Microbiol. and Biotech.* 6(3), 213~218(1996).
7. Chung, K.S., Kim, S.S., Kim, H.S., Han, M.W. and Kim, B.K. : Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelium culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji*, 38(2),

- 158~165(1994).
8. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers and F. Smith: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.*, 28, 350~356(1956).
 9. Lee, J.W., Jeong, H., Chung, C.H., and Lee, K.H.: effects of alkali extract of *Ganoderma lucidum* IY007 on complement and reticuloendothelial system, *Kor. J. Mycol.*, 18(3) 137~144(1990)
 10. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351~358.(1979)
 11. 水野 卓, 川合正允: キノコの化学・生化学, 學會出版 センア -, 東京, 3~9(1992)
 12. Baker, S.A., Bourne, E.J. and Whiffen, D.H.: Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. *Methods Biochem. Anal.*, 3. 213~245(1956)
 13. Jeong, H., Lee, J.W. and Lee, K.H.: Studies on the anticomplementary activity of Korean higher fungi, *Kor. J. Mycol*, 18(3), 145~148(1990)

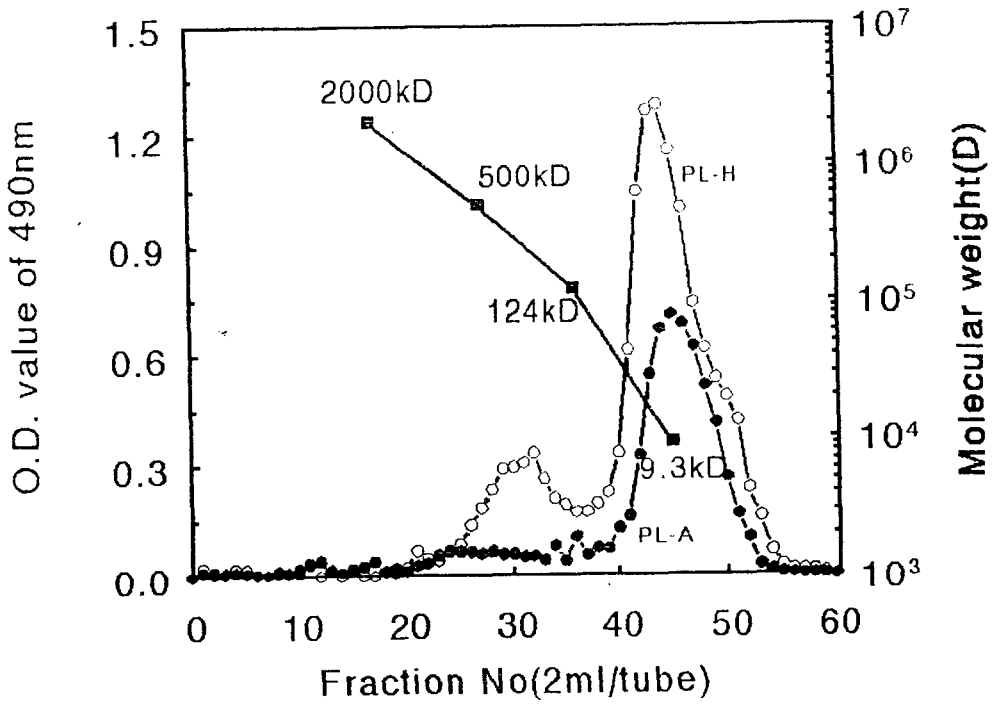


Fig 1. Pattern of molecular weight of polysaccharide extracted from *Phellinus linteus* fruit body on Sepharose CL-4B column chromatography.

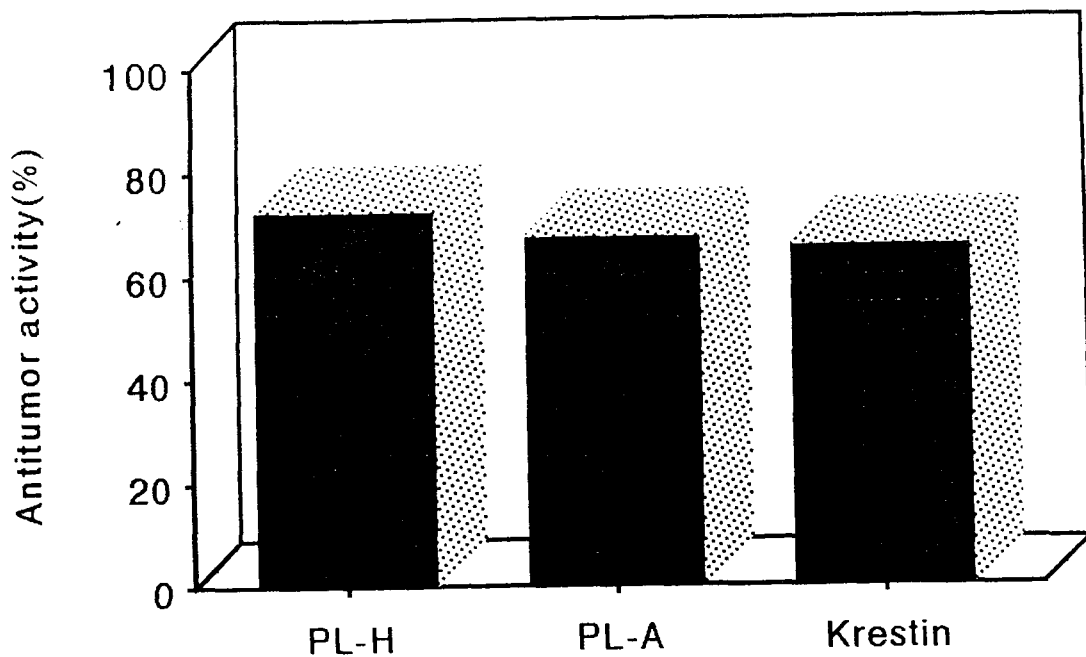


Fig 2. Antitumor activity of the polysaccharide extracted from *Phellinus linteus* fruit body sarcoma 180 tumor bearing mouse.

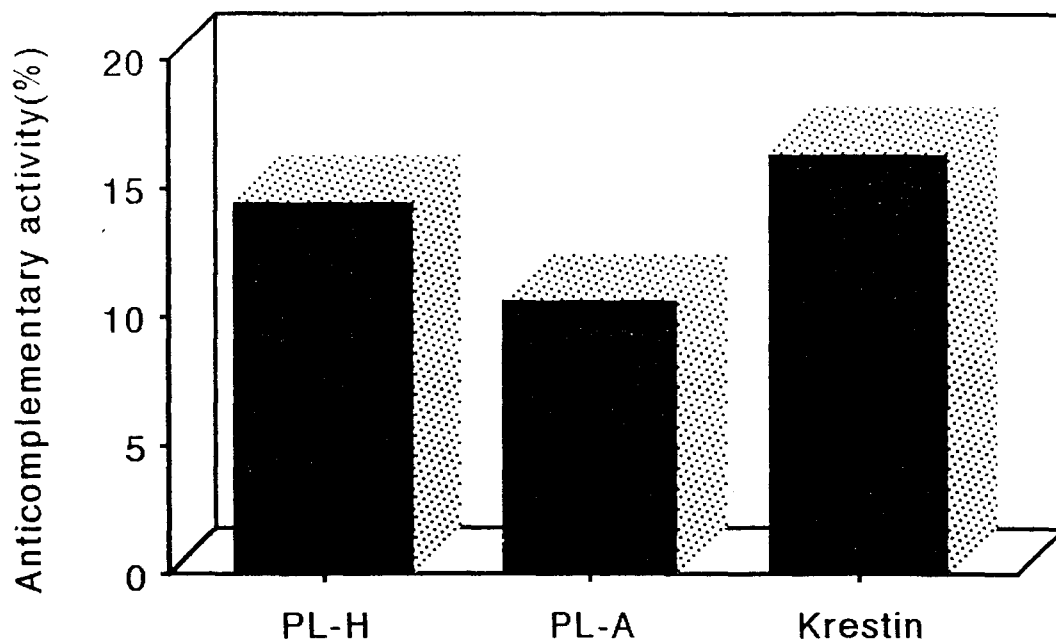


Fig 3. Anticomplementary activity of the polysaccharide extracted from *Phellinus linteus* fruit body.

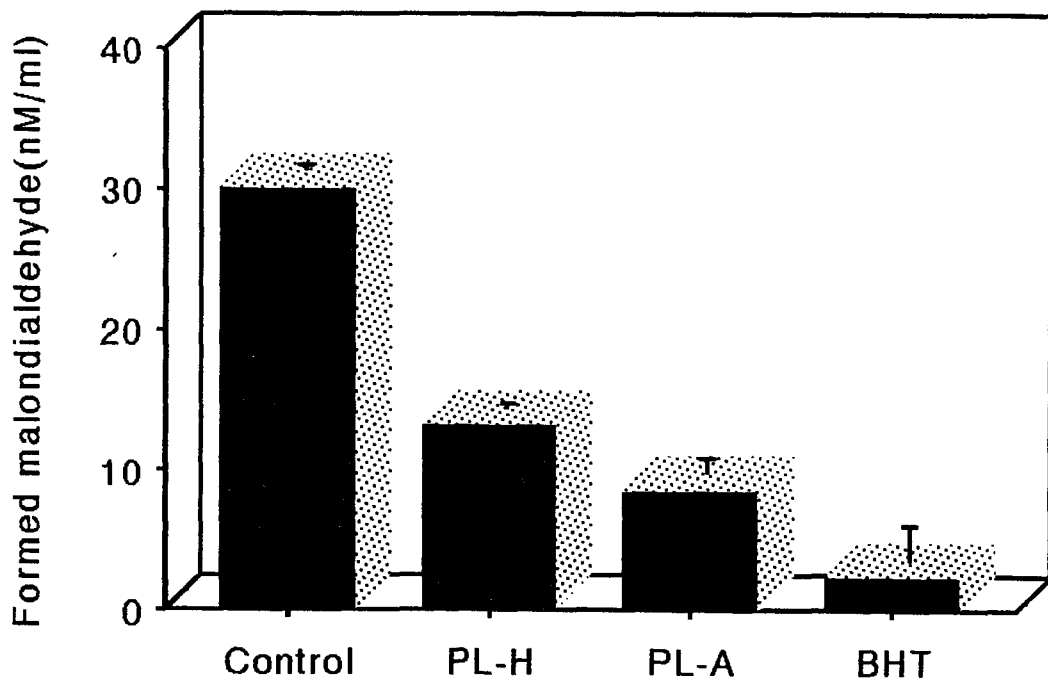


Fig. 4. Effect of the polysaccharide extracted from *Phellinus linteus* fruit body on ascorbate/ Fe^{2+} -induced lipid peroxidation formation of the liver homogenate.