

## 인공소화액이 영지 단백질 다당체의 항암 - 면역 활성화에 미치는 영향

유정실\* · 현진원\*\* · 김하원# · 심미자# · 김병각\*

\*서울시립대학교 생명과학과, \*서울대학교 약학대학 종합약학연구소,

\*\*서울대학교 의과대학 약리학교실

(Received May 19, 2000)

### Effects of Artificial Digestive Juice on the Antitumor-Immunity Activity of Protein-bound Polysaccharide from *Ganoderma lucidum*

Jeong Sil Ryu\*, Jin Won Hyun\*\*, Ha Won Kim#, Mi Ja Shim# and Byong Kak Kim\*

#Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743

\*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742

\*\*Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

**Abstract** — To examine influence of artificial digestive juice on the antitumor activity of *Ganoderma lucidum*-A(GL-A), protein-bound polysaccharide from *Ganoderma lucidum*, we compared the digested protein-bound polysaccharide with undigested one both on immunopotentiating activity and influence of digestive juices. Protein-bound polysaccharide GL-B was obtained by digesting the antitumor component GL-A with artificial digestive juices *in vitro*. When GL-A was administered orally to sarcoma 180 tumor-bearing ICR mice, the life prolonging effect was exhibited in a dose dependent manner. Not only GL-A but GL-B increased the production of colony forming unit (CFU) to 10- and 8-fold of that of the control, respectively. Both of the protein-bound polysaccharides also showed the secretion of nitric oxide in RAW 264.7 cell lines to 3.5- and 3.7-fold of that of the control, respectively. GL-A activated components of the alternative complement pathway, whereas GL-B did not. In humoral immunity, GL-A increased the activity of alkaline phosphatase in differentiated B cells to 3 times and GL-B to 4 times of that of the control. These results showed that the artificial digestive juices had no influence on the antitumor activity of the protein-bound polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and that its immunomodulating activity retained after treatment with artificial digestive juice. And this provides a basis of the protein-bound polysaccharide of *Ganoderma lucidum* as an peroral anticancer drug.

**Keywords** □ *Ganoderma lucidum*, artificial digestive juice, bone marrow stem cell, complement pathway.

현재 사용되고 있는 항암성 화학 요법제는 정상 세포에 대한 독성, 암세포의 내성 획득, 인체내에서의 신속한 분해와 배설 등의 결점을 지니고 있을 뿐만 아니라 숙주의 방어력에 중요한 역할을 담당하는 임파구 및 골수세포 등도 파괴한다는 연구가 보고되어 있다. 그러므로 화학 요법제의 면역세포에 대한 독성을 완화시킬 수 있는 약제를 개발하는 것이 암치료 분야에서

필요한 연구과제이다.

담자균류에서 분리한 단백질 다당체 성분이 숙주에 대해서 독작용을 나타내지 않으면서 중앙 억제작용을 나타냄이 보고된 이후로 담자균류의 항암성분의 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 항암성분은 부작용이 거의 없을 뿐만 아니라 식용으로 할 수 있어서 최근 암 질환이 계속 증가하고 있다는 통계와 사용중인 암치료용 화학 요법제가 심한 독성과 부작용을 나타낸다는 사실에 비추어 볼 때 실용가치를 더욱 높이고 있다. 그러므로 한국산 고등 균류로부터 독성이 없으면서도

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-2210-2480 (팩스) 02-2210-2554

우수한 중앙 억제작용을 나타내는 생체 반응조절 물질의 탐색은 근래에 연구되어 왔으며 그 구조적 특징 및 중앙 억제 작용의 기전이 보고되었다.

고등균류에 속하는 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 1960년 Roland 등이 *Calvatia gigantea*로부터 calvacin을 분리함으로써 시작되어,<sup>1)</sup> Chihara 등 (1970)이 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 분리한 고분자  $\beta$ -(1→3)-glucan인 lentinan이 마우스 sarcoma 180세포에 강력한 중앙 억제작용이 있음을 보고하였으며,<sup>2)</sup> Komatsu 등 (1969)은 *Schizophyllum commune*로부터  $\beta$ -(1→6);  $\beta$ -(1→3)-glucan인 schizophyllan을 분리하였고,<sup>3)</sup> Tsugagoshi 등(1974)은 *Coriolus versicolor*의 배양균사로부터  $\beta$ -(1→3);  $\beta$ -(1→4);  $\beta$ -(1→6)-glucan인 항암성 단백질다당체인 PS-K(Krestin)을 분리하였다.<sup>4)</sup> Fujii 등 (1978)은 *Lentinus edodes*의 배양균사체로부터 단백질이 결합된 다당체 KS-2를 분리한 후 인터페론 유발작용이 있음을 발표하였다.<sup>5)</sup> 이들 담자균류의 항암작용은 숙주의 면역활성 증가에 의한 것임이 보고되었으며,<sup>6)</sup> 만성 간염 및 human immunodeficiency virus(HIV)에 대한 영향이 Kitamura 등 (1986)에 의해 연구되었다.<sup>7)</sup> 담자균류에서 분리한 다당체 및 단백질 다당체를 다양한 추출법과 정제과정을 통하여 보다 우수한 항암효과를 나타내는 성분을 얻고자 하는 연구가 Ikekawa 등 (1982)에 의해 수행되었으며<sup>8)</sup> 다당체인  $\beta$ -(1→3)-D-glucan을 periodate로 산화시키거나 borohydride로 환원시키므로써 항암효과가 현저히 증강됨을 Sone 등 (1985)이 발표한 이후<sup>9)</sup> 다당체의 화학 구조와 분자량이 항암활성과 연관성이 있음을 Adachi 등 (1990)이 보고하였다.<sup>10)</sup>

한국산 담자균류의 항암 성분에 관한 연구는 Kim 등 (1979)이 구름버섯, 표고 및 느타리버섯의 자실체로부터 마우스의 sarcoma 180에 대해 강력한 항암작용을 나타내는 다당류와 단백질로 구성된 고분자 물질을 보고한 이래<sup>11)</sup> 버들송이<sup>12)</sup> 등의 자실체 또는 배양균사체로부터 마우스 sarcoma 180에 대해 항암 작용을 나타내는 단백질 다당체를 분리하여 보고하였다. 이와같이 담자균류가 숙주의 면역반응에 관여하는 대식세포, 항체, 세포 독성능 T 임파구 및 NK 세포 등의 작용을 증강시켜 담암으로 인해 현저히 저하된 면역반응을 활성화함으로써 항암효과를 나타내는 생체반응 조절물질이라는 관점에서 담자균류의 항암성 다당체의 면역조절기전 대한 새로운 검토가 이루어지고 있다.<sup>13)</sup>

한편 이러한 고등균류의 항암작용 및 그 작용기전에 관한 연구는 대부분의 경우 약효 성분을 추출하여 체내에 주사투여 하는 방법에 편중되어 왔다. 그러나 직접 주사하는데는 멸균 조작과 시료의 극도의 정제가 필요하고 주사의 위험성과 번거로움 등의 많은 불편한 점들이 있으며 특히 경구 투여하는 경우에 있어서는 소화관을 통해 흡수되어 작용을 나타낼 것이므로 소화효소의 작용과 pH 변동에 의한 약리 성분 및 작용변화에 대한 고찰이 필요하다.

영지 *Ganoderma lucidum*는 항 고혈압 작용, 혈소판 응집억제 작용, 항알러지 작용, 항염증 작용, 항 HIV 작용, 간경변에 대한 antifibrotic 효과를 가진 널리 시판되고 있는 약용버섯의 하나이다. 특히 균사체와 자실체 모두에서 현저한 항암효과가 인정되고 있다. 영지를 실제 복용하는 경우 주로 먹는 방법을 이용하는 데 경구투여시 약효 성분에 변화가 나타나는지에 대한 보고는 아직 없다. 본 연구에서는 영지의 항암성분에 소화액을 처리하여 그 소화액이 항암활성에 어떤 영향을 미치는지를 항암활성의 기전 측면에서 관찰하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 실험방법

**실험재료** - 영지 *Ganoderma lucidum*을 액내 배양 후 얻은 균사체를 열수 추출하고 DEAE-cellulose anion exchange chromatography를 이용하여 분리 정제한 단백질 다당체 GL-A를 실험시료로 사용하였다. Sepharose CL4B gel filtration에 의하여 GL-A의 분자량은 243 kDa이었다.

**인공 소화액의 조성 및 단백질 다당체 GL-A의 소화** - 인공 위액은 NaCl 2 g과 pepsin(550 units/mg, Sigma Chem. Co., USA) 6.4 mg을 염산 7 ml에 용해한 후 탈이온수에 가해 1 L로 하여 사용하였다. 인공 장액은  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.8 g을 탈이온수 250 ml에 용해하여 0.2 N NaOH 190 ml를 가하고 pancreatin(4×USP specification, Sigma Chem. Co., USA) 12.5 g을 넣은 후 0.2 N NaOH를 이용하여 pH 7.5±0.1로 맞춘 후 탈이온수를 가해 1 L로 만들어 사용하였다.

단백 다당체 GL-A의 소화과정은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 단백질 다당체 GL-A 0.5 g에 인공 위액 250 ml를 가해 37°C shaker에서 1시간 배양하고 0.2N NaOH를 넣어 pH 7.5를 맞춘뒤 인공 장액

1 L를 가해 6 시간 동안 37°C shaker에서 배양하였다. 100°C의 water bath에서 5 분간 넣어 효소 작용을 불활성화 시킨 후 냉각하였다. Cellouise dialysis tube에 넣어 탈이온수에서 3일간 투석한 후 동결건조하여 얻은 분말을 GL-B라 칭하였다. Sepharose CL4B gel filtration에 의하여 GL-B의 분자량은 238 kDa이었다.

**복수암에 대한 항암작용 검색** - 복수암에 대한 항암 검색 실험은 다음과 같이 실시하였다. ICR 마우스의 복강에 sarcoma 180 세포  $2 \times 10^5$  cells씩 이식하여 복수암을 유발시켰다. 암세포를 이식하고 24시간 후부터 생리식염수에 녹인 양성 대조군 krestin과 GL-A를 각각 20 mg/kg/day의 용량으로, 대조군에는 생리 식염수를 0.1 ml씩 매일 1회 10일간 연속하여 경구투여하였다. 결과 판정은 암세포 이식 후 대조군과 시료 투여군의 생존여부를 관찰하여 평균생존일(mean survival day)을 계산한 다음 평균 생존 백분율(mean survival rate, T/C %)로 항암효과를 계산하였다.  $T/C(\%) = 100 \times (\text{mean survival day of treated mice}) / (\text{mean survival day of control mice})$

**마우스의 조혈모 세포에 대한 작용** - 마우스의 조혈모 세포에 대한 증식 및 분화 능력에 변화가 있는지를 알아보기 위해 Kino(1987)의 방법에 따라 colony stimulating factor assay를 실시하였다.<sup>14)</sup> Balb/c 마우스를 경추탈구법에 의해 치사한 후 대퇴골을 무균적으로 절단하고 HBSS 용액이 들어있는 26 gauge 주사기로 대퇴골의 골수세포를 뽑아 내었다.  $300 \times g$ 에서 5 분씩 HBSS 용액으로 2회 원심분리 세척한 후 40% FCS 첨가  $2 \times EMEM$  배지에 골수 세포를  $3 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 부유시켰다. 1% agar 용액에 골수세포 50  $\mu$ l, 40% FCS 첨가  $2 \times EMEM$  950  $\mu$ l, GL-A와 GL-B를 각각 50, 100, 200 및 500  $\mu$ g/ml의 농도로 가하여 잘 혼합한 후 6 well plate에 고르게 가하여 상온에서 굳힌 다음, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 7일간 배양시킨 후 40 배율 하에서 위상차 현미경(Olympus optical co., Japan)으로 생성된 세포 집락(colony)수를 측정하였다. 이때 세포가 30개 이상 모인 것을 1 집락으로 간주하였다.

**마우스의 대식세포 활성화에 미치는 영향** - 활성화된 대식세포가 분비하는 것으로 알려진 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 Choi 등 (1994)의 방법에 따라 마우스의 단핵구 기원의 RAW 264.7 cell line을

이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 측정하였다.<sup>15)</sup>

세포 배양용 flask에 배양한 RAW 264.7 cell line을 1% trypsin(Gibco Co., USA)으로 처리하여 떼어낸 후 serum free DMEM으로  $300 \times g$ 에서 5분간 3회 원심분리 세척 후  $2 \times 10^5$  cells/ml로 조정하여 24 well multiplate에 분주하였다. PBS 20  $\mu$ l에 최종농도가 IFN- $\gamma$  10 U/ml, IFN- $\gamma$  10 U/ml와 LPS 1 ng/ml, GL-A와 GL-B를 각각 50, 100, 200, 500  $\mu$ g/ml 및 IFN- $\gamma$  10 U/ml와 LPS 1 ng/ml이 되도록 혼합 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 동안 배양한 후 10%가 되도록 FBS를 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.  $400 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 상등액 100  $\mu$ l만을 취하여 ELISA titer plate에 옮긴 후 100  $\mu$ l Griess reagent를 넣고 10분간 실온에 방치한 후 ELISA Reader(Flow Lab., UK)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrate의 검량선으로부터 nitric oxide의 대사체인 nitrite의 농도를 계산하였다.

**보체 대체경로의 활성화에 미치는 영향** - 보체 대체 경로(alternative complement pathway)에 대한 작용을 알아보기 위해 Adachi(1990)방법에 따라 실시하였다.<sup>10)</sup> 건강한 사람의 혈청 0.4 ml에 단백 다당체 성분 GL-A, GL-B 및 zymosan A(Sigma Chem. Co., USA)를 각각 1, 2.5, 5 mg/ml씩 가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양한 후 gelatin veronal buffered saline-EGTA Mg<sup>++</sup> 용액 0.3 ml과 rabbit red blood cell( $5 \times 10^7$  cells/ml) 0.2 ml씩 가하였다. 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 배양하고 gelatin veronal buffered saline-EDTA 용액 2 ml를 가하여 반응을 종결 시킨 후 1500 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액을 414 nm 흡광도에서 측정하였으며 보체 활성도는 다음 식에 의해 계산하였다.  $\text{Complement activity}(\%) = 100 \times (\text{TOD-COD}) / \text{COD}$ , 단, COD는 대조군의 평균 흡광도 값이며, TOD는 시료 투여군의 평균 흡광도 값이다.

**마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향** - 분화된 B 임파구의 표면에 발현되는 alkaline phosphatase를 Ohno 등 (1986) 등 방법에 따라 실시하였다.<sup>16)</sup> ICR 마우스를 경추탈구법으로 치사시키고 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망위에서 분쇄한 후 얻은 세포 부유액을 Histopaque 용액(Sigma Chem. Co., USA)에 천천히 2:1의 비율로 적가하여  $400 \times g$ 에서

20분간 원심분리 하였다. 단핵세포 층을 조심스럽게 취하여 300×g에서 5분씩 3회 원심분리하여 세척한 후 1×10<sup>6</sup> cells/ml로 하여 well당 1 ml씩 분주하고 GL-A와 GL-B를 각각 50, 100, 200, 500 및 LPS 50 µg/ml의 농도로 가하여 최종부피가 2 ml가 되도록 하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 동안 배양한 다음 400×g에서 10분간 원심분리하여 상등액은 버리고 남은 침전물에 p-nitrophenyl phosphate/50 mM sodium carbonate buffer 1 ml를 가한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 반응시켰다. 빙냉의 0.3 N NaOH용액 500 µl를 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 B 입파구의 alkaline phosphatase 활성은 다음 식에 따라 계산하였다. Alkaline phosphatase activity(p-nitrophenol µmol/10<sup>6</sup> lymphocytes/hr)=1.15×OD at 405 nm

**통계학적 분석** - 모든 자료는 mean ± standard deviation(S.D.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 student's t-test로 행하였다.

### 실험결과

**복수암에 대한 항암작용** - 영지로부터 분리한 단핵 다당체의 Sarcoma 180 복수암에 대해 항암 실험을 경구투여 방법에 의한 방법으로 실시한 결과 용량 의존적으로 담암 ICR 마우스의 생존일 수가 연장되었다. GL-A를 20 mg/kg/day과 30 mg/kg/day 용량으로 투여한 경우 평균 생존일 수가 대조군에 비해 각각 139%와 180%로 연장함으로써 현저한 수명 연장효과를 나타내었다(Table I). 따라서 GL-A는 소화효소의 영향

**Table I** - Effects of GL-A on sarcoma 180 ascitic tumor

Fraction	Dose (mg/kg/day)	Mean survival time (day, Mean ± S.D.)	T/C (%)**
Control	Saline	29.2 ± 10.4	100
Krestin	10	38.5 ± 11.5	132
GL-A	5	32.1 ± 6.7	110
	10	37.6 ± 8.9	128
	20	40.2 ± 15.2*	139
	30	53.5 ± 11.6*	180

Krestin or GL-A were injected to the ICR mice bearing sarcoma 180 at various dose for 10 days. Each value represents the mean ± S.D. of 10 mice.

\*Significantly different from the control (\*p<0.05).

\*\*T/C(%) =  $\frac{\text{Mean survival time of treated group}}{\text{Mean survival time of control group}} \times 100$

**Table II** - Effects of GL-A and GL-B on colony forming unit (CFU) of the murine bone marrow cells

Fraction	Concentration (ug/ml)	CFU
Control	Saline	5 ± 0.4
GL-A	50	18 ± 1.2*
	100	27 ± 3.2*
	200	48 ± 4.4*
	500	12 ± 3.1
GL-B	50	14 ± 1.8*
	100	34 ± 2.9*
	200	38 ± 2.4*
	500	13 ± 1.6*

Bone marrow cells of mouse were treated with GL-A or GL-B and incubated for 7 days on agar plates. Data are expressed as mean ± S.D. for three experiments.

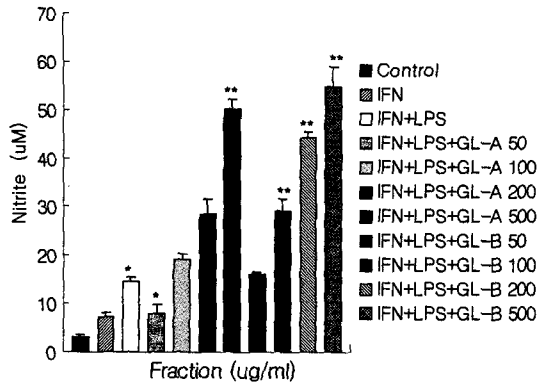
\*Significantly different from the control (\*p<0.01).

을 받지 않고 항암작용을 발휘할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

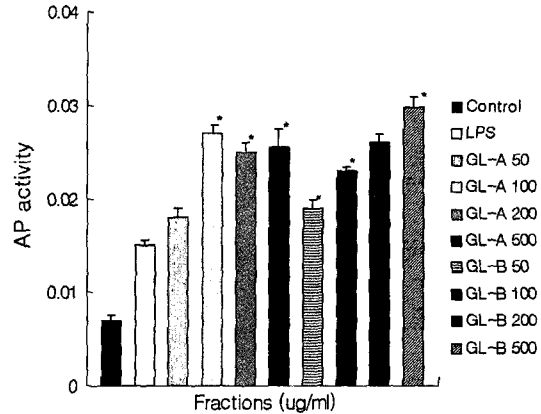
**마우스의 조혈모 세포에 대한 효과** - 조혈모 세포의 증식 및 분화에 미치는 GL-A의 작용 소화액에 의한 영향을 받는지를 알아보기 위하여 생성된 집락수로 측정된 결과 GL-A 200 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 대조군에 비하여 약 10배 정도 집락 수가 증가하였고 GL-B의 경우에서도 200 µg/ml 농도에서 가장 많은 집락 수가 증가하였으며 대조군에 비하여 약 8 배 정도 집락 수가 증가하였다(Table II). 따라서 GL-A에 소화액을 처리하더라도 조혈모세포의 활성에 대하여는 아무런 저해작용을 나타내지 않았다.

**마우스의 대식세포 활성화에 미치는 효과** - 마우스의 단핵구 기원의 RAW 264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 그 대사체인 nitrate의 농도를 측정하였을 때 IFN-γ 10 U/ml만을 처리하였을 때는 대조군과 차이를 보이지 않았으며 IFN-γ 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml을 함께 처리한 경우에는 대조군에 비하여 4배 IFN-γ 10 U/ml, LPS 1 ng/ml와 GL-A를 처리하였을 때 nitrite의 생성량은 시료 농도에 의존적으로 증가하였다. GL-A를 500 µg/ml로 처리한 경우 IFN-γ 10 U/ml와 LPS 1 ng/ml을 처리한 군에 비하여 3.5 배의 nitrite 증가를 보였고 동일 농도의 GL-B를 처리한 경우에도 3.7배의 증가를 보였으며 GL-A의 경우와 유의할 만한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

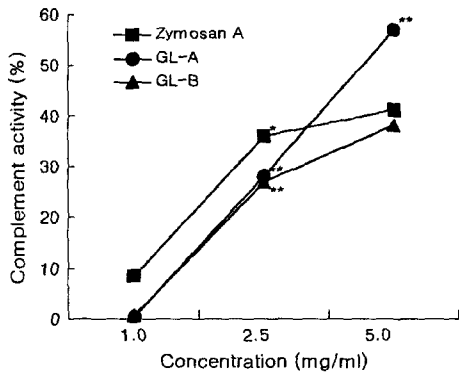
**보체 대체경로의 활성화에 미치는 효과** - 보체 대체



**Fig. 1** – Effects of GL-A and GL-B on nitrite production in activated macrophage cell line, RAW 264. 7. The cell line was treated with GL-A or GL-B at various doses and the production of nitric oxide was assayed using ELISA reader. Data are expressed mean  $\pm$  S.D. for three experiments. \* and \*\*Significantly different from the control (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).



**Fig. 3** – Effects of GL-A and GL-B on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Mouse lymphocytes were treated with GL-A or GL-B at various doses and the alkaline phosphatase activity was detected using spectrophotometer at 405 nm. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. for three experiments. \*Significantly different from the control ( $p$ <0.01).



**Fig. 2** – Effects of GL-A and GL-B on the alternative complement pathway. Human serum was treated with GL-A or GL-B at various doses and the complement activity was detected using spectrophotometer at 414 nm. Data are represented as mean  $\pm$  S.D. for three experiments. \* and \*\*Significantly different from the control (\* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.05). Complement activity (%) =  $100 \times (OD_{414} \text{ of treated} - OD_{414} \text{ of control}) / (OD_{414} \text{ of control})$ . -■-: Zymosan A, -●-: GL-A, -▲-: GL-B

경로에 대한 GL-A의 영향과 소화액 처리에 의한 변 화유무를 실험한 결과 양성 양성 대조군인 zymosan A와 GL-A 및 GL-B 모두 1 mg/ml 농도에서는 대조 군과 유사한 보체 활성을 보였으나 2.5 mg/ml 및 5 mg/ml의 농도에서는 GL-A와 GL-B 처리시 각각 54 %와 40 %의 보체 활성이 나타났다(Fig. 2).

**미우스의 B 임파구 활성화에 미치는 효과** - B 임파 구가 분화시 세포 표면에 발현되는 alkaline phosphatase 활성을 측정된 결과 GL-A 100, 200 또는 500  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 3배 정도의 발현이 증 가하였으며 GL-B도 100, 200 또는 500  $\mu$ g/ml 농도 에서 약 3-3.7배의 발현 증가가 일어나 GL-A와 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

**고 찰**

영지의 항암효과를 나타내는 단백 다당체 성분이 소화액에 의해 어떤 영향을 받는지를 알아보고자 우선 영지의 항암 활성성분인 단백 다당체를 sarcoma 180 담암 마우스에 경구 투여한 결과 용량 의존적으로 생 명일수를 연장시켰다. GL-A를 30 mg/kg/day의 용량 으로 투여하였을 때 대조군에 비해 180%의 수명 연 장효과를 나타내었다. 이는 마우스의 소화관을 통해 흡 수된 영지의 단백 다당체가 sarcoma 180 암세포에 대해서 유효한 항암 활성을 가짐을 보여준다.

담자군류에서 분리한 항암성 다당체들은 대부분 암 세포에 대한 직접적인 작용보다 담암으로 인해 억제된 숙주의 면역활성을 정상으로 회복시키거나 증강시키는 면역조절 기전으로 항암작용을 나타내는 것으로 보고 되어 있다.<sup>17)</sup> 이에 항암 활성의 기전이 되는 다양한

면역 세포 단계에 있어 면역증강 작용을 나타낸다고 알려져 있는 영지의 단백 다당체가 소화액 처리에 있어 어떻게 달라지는가를 각 면역 세포 측면에서 비교하였다.

골수의 조혈모세포에 대한 GL-A의 영향을 비교해 본 결과 증가된 집락 수로 보아 골수세포의 증식 및 분화에 관여하는 것으로 사료된다. 그리고 소화액 처리 후의 시료인 GL-B에 있어서도 약간의 활성 감소가 나타났으나 그 양상은 유의할 만한 수준이 아니었다.

대식세포는 외부로부터 들어오는 이물질을 직접 탐식하여 분해하고 제거하는 기능을 가짐으로써 자연 면역반응에 매우 중요한 기능을 수행할 뿐만 아니라 외부로부터 흡수한 항원을 적절히 변형시켜 세포 표면으로 발현하여 T 임파구로 하여금 그 항원을 인식하게 하고 그 항원에 대한 면역반응을 유도하여 궁극적으로 항체를 만들도록 한다. 대식세포는 활성화된 정도에 따라 항균 및 세포독성 작용에 차이가 있을 뿐만 아니라 숙주의 방어기능의 진전과 더불어 기생체의 생존 능력이 진보하므로 대식세포가 완전히 활성화되지 않으면 비록 탐식을 했더라도 세포내 사멸작용은 할 수 없어 탐식작용이 오히려 기생체에 이로운 역할을 할 수 있음이 보고되었다.<sup>18)</sup> GL-A 및 소화액 처리에 의해 마우스의 단핵구 기원의 RAW 264.7 cell line을 이용하여 nitric oxide의 생성량 변화를 그 대사체인 nitrite의 농도로 추정하였을 때 GL-A는 nitric oxide의 분비를 촉진하였고 그 효과는 소화액을 처리한 GL-B에 있어서도 동일하였다. 활성화된 대식세포만이 생성한다고 알려진 nitric oxide는 산소 중간물질 등에 내성을 보이는 기생체나 종양 세포에도 유효하다고 알려졌으며,<sup>19)</sup> 대식 세포가 nitric oxide를 생성하는데에는 반드시 helper T세포로부터 유래되는 gamma interferon(IFN- $\gamma$ )에 의하여 priming되고 그람 음성균에서 분리된 lipopolysaccharide(LPS)에 의하여 triggering 되어야 한다고 보고되었다.<sup>20)</sup>

보체 대체경로에 대한 실험 결과 GL-A와 GL-B 모두에서 보체의 활성화 효과를 관찰할 수 있었다. 보체 대체경로는 보체계 활성 물질인 lipopolysaccharide, 진균 및 효모 등에 의하여 활성화되는데 Hamuro 등(1978)은 sarcoma 180 암세포에 대한 다당체 항암성분이 높은 친화력으로 암세포막 주위로 대체경로의 보체들을 활성화시키므로 암세포 주변에 있는 활성화된 보체 성분들이 대식세포 및 여러 세포성, 체액성

인자들과 상호 작용하여 협동적으로 암세포를 손상시킨다고 보고한 바 있다.<sup>6)</sup>

B 임파구의 분화척도가 되는 alkaline phosphatase 활성이 증가된 것으로 보아 GL-A는 B세포의 분화단계에 작용하는 것으로 보인다. 그리고 GL-B에 있어서도 그 작용의 변화가 나타나지 않았다. Yadomae 등(1979)은 주발버섯 *Peziza vesiculosa* 자실체 성분인 vesiculogen이 강력한 B cell mitogen으로 작용할 뿐만 아니라 항원 비특이적으로 용혈반 형성세포 수를 증가시켜 B 임파구의 polyclonal B cell activator로서의 가능성을 제시하였다.<sup>21)</sup>

상기의 실험결과로부터 GL-A는 담암으로 인하여 저하된 숙주의 면역기능을 정상으로 회복시키거나 증강시켜 생체반응 조절물질로서 항암작용을 나타내는 것으로 사료되며 그 작용은 소화액 처리에 의해 유의할 만한 변화를 나타내지 않았다. 이는 담자균에서 분리한 단백 다당체가 숙주에 대해 거의 독작용을 나타내지 않으면서 생체 면역기능을 증강시켜 주므로써 항암 효과를 나타낼 뿐 아니라 식용이라는 일반적인 방법으로도 활성이 여전히 유효하다는 점을 확인하였으므로 그 실용적 가치를 더욱 높인다고 할 수 있고 나아가서는 경구 투여용 항암제로 개발할 수 있는 가능성을 시사한다.

## 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 약학대학 부속 종합약학연구소의 연구비로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Roland, J. F., Chmoilewicz, Z. F., Weiner, B. A. and Gross, A. M. : Calvacin: a new antitumor agent. *Science* **132**, 1987 (1960).
- 2) Chihara, G., Hamura, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk) Sing (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**, 2776 (1970).
- 3) 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).

- 4) Tsukagoshi, S. and Ohashi, F : Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann* **65**, 557 (1974).
- 5) Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Ishida, N. : Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from cultured mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics* **31**, 1079 (1978).
- 6) Hamuro, J., Hadding, U. and Suermann, D. B. : Solid phase activation of alternative pathway of complement by  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-glucans and its possible role for tumor regressing activity. *Immunol.* **34**, 695 (1978).
- 7) Kitamura, M. : Effect of *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on immunological liver cell injury and antibody production. *Jpn. J. Gastroenterol.* **83**, 1905 (1986).
- 8) Ikekawa, T., Ikeda, Y., Yoshioka, Y., Nakanishi, K., Yokoyama, E. and Yamazaki, E. : Studies on antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* II, the structure of EA3 and further purification of EA5. *J. Pharm. Dyn.* **5**, 576 (1982).
- 9) Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. : Structure and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2641 (1985).
- 10) Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T. : Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 988 (1990).
- 11) Kim, B. K., Park, E. K. and Shim, M. J. : Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Arch. Pharm. Res.* **2**, 145 (1979).
- 12) Kim, B. K., Hyun, J. W., Yoon J. M. and Choi, E. C. : Immunological studies on the antitumor components of the Basidiocarps of *Agrocybe cylindracea*. *Arch. Pharm. Res.* **20**(2), 128 (1997).
- 13) Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M. and Yadomae, T. : Antitumor and immunomodulating activities of a  $\beta$ -glucan obtained from liquid cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 410 (1989).
- 14) Kino, T., Hatanaka, H. Miyata, S. and Ochiai, T : FK-506, novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. *J. Antibiotics*, **150**, 1256 (1987).
- 15) Choi, S. H., Jun, C. D., Lee, B. S., Park, S. D., Oh, J. S. and Chung, H. T. : Effect of various extrinsic and intrinsic factors on the nitric oxide production of murine macrophages. *Korean J. BRM.* **3**, 15 (1994).
- 16) Ohno, N., Arai, Y., Suzuki, I. and Yadomae, T. : Induction of alkaline phosphatase activity in murine spleen cells treated with various mitogens. *J. Pharmacobio-Dyn.* **9**, 593 (1986).
- 17) Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 936 (1987).
- 18) Vanasbeck, B. S. and Hoidal, J., Vercellotti, G. M. Schwartz, B. A. Moldow, C. F. and Jacob, H. S. : Production against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocyte: role of red cell glutathione. *Science* **227**, 756 (1985).
- 19) Jan, A. M., Marielle, E. B., Peter, H. N., Pieter, S. H. and Ralph, V. F. : IFN- $\gamma$  induced L-arginine dependent toxoplasmastic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* **148**, 568 (1992).
- 20) Hibbs, J. B., Lambert, L. H. and Remington, J. S. : Possible role of macrophage mediated nonspecific cytotoxicity in tumor resistance. *Nature* **235**, 48 (1972).
- 21) Yadomae, T., Suzuki, I., Yonekubo, H., Nunomura, K. and Miyazaki, T. : Examination of the mitogenic activity of materials from fungi on murine lymphocytes *in vitro*. *Microbial. Immunol.* **23**, 815 (1979).