

영지버섯 균사체 (*Ganoderma lucidum* IY009)로부터 추출한 단백다당체의 항암활성

백성진[#] · 김용석 · 용환미 · 채주병 · 윤환민 · 박동우 · 김동연 ·
이정옥* · 이준우** · 박승국***

일양약품 중앙연구소, *한국화학연구원, **경북전문대 식품가공과,
***경희대학교 식품공학과

(Received October 11, 2001; Revised November 21, 2001)

Antitumor Activities of the Proteoglycans from the Mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009

Seong-Jin Baek[#], Yong-Seok Kim, Hwan-Mee Yong, Ju-Byung Chae,
Hwan-Min Yun, Dong-Woo Park, Dong-Yeon Kim, Jeong-Ok Lee*,
June-Woo Lee** and Seung-Kook Park***

IlYang Pharma. co., LTD. Central Research Institute, Yongin 449-900, Korea,

*Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-600 Korea,

**Department of Food and technology Kyungbuk College, Yeongju 750-712

***Department of Food Science and technology Kyunghee University, Yongin 449-701

Abstract — In this study, the antitumor activities were investigated using β -Immunan, a proteoglycan obtained from cultured mycelia of the IY009 strain of *Ganoderma lucidum* belonging to *basidiomycetes*. The result showed the significant effect of cytotoxicity test against murine sarcoma 180 and murine lymphocytic leukemia L1210 using immunized macrophage cultures by β -Immunan. When intraperitoneally injected at 40 mg/kg/day daily for 10 days, β -Immunan inhibited the growth of sarcoma 180 solid tumor in ICR mice by 88.8% ($p < 0.05$). It was also observed that β -Immunan increased life span by 85.2% ($p < 0.01$) after treatment of 100 mg/kg/day in BDF1 mice bearing lymphocytic leukemia L1210. And combination therapy with cisplatin (dosage: 4 mg/kg) increased life span by 140.4% ($p < 0.05$) after treatment of 100 mg/kg/day in BDF1 mice bearing lymphocytic leukemia L1210.

Keywords □ *Ganoderma lucidum* IY009, β -Immunan, sarcoma 180 proteoglycan, antitumor activity, life span

항암성 다당류들의 항암활성은 생체의 대식세포,^{1,2)} natural killer cell³⁾이나, cytotoxic T cell의 활성화,⁴⁾ 면역관련 세포들의 interleukin-1, colony-stimulating factor와 같은 cytokine 생산^{5,6)}의 활성화와 같은 구조적인 또한 면역학적인 성질에 의해 해석되어 지고 있다.⁴⁾

대부분의 항암 면역증강제의 가장 궁극적인 목적은 암환자들의 숙주 방어 활성을 높여 암세포와 다른 외

부의 여러 종류의 감염증에 저항할 수 있는 능력을 강화 시켜주는 것이다.^{4,7)}

담자균류의 항암효과가 처음으로 입증된 것은 Roland⁸⁾이 Calvacin이라는 담자균류 추출물질의 연구에서 시작되었는데 이후부터 항암성 다당체 또는 단백질 다당체가 분리 연구되기 시작하였고, 실제적으로 일본에서는 담자균류 유래 단백질다당체를 임상에서 이용하고 있는 것으로 보고되어 진다.⁹⁻¹³⁾

항암활성을 가지는 물질로서 이들 담자균류의 항암성 단백질 다당류들은 화학요법제들과는 달리 뚜렷한 부

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-281-7851 (팩스) 031-284-1010

작용이 없을 뿐만 아니라 기존 화학요법제와 병용 투여하였을 경우 화학요법제들이 가지고 있는 고유의 독성이나 부작용을 완화시켜주는 작용도 가지고 있고,¹⁴⁻¹⁷⁾ 항암활성의 상승효과를 나타낸다고 알려지고 있다.¹⁸⁾

영지[*Ganoderma lucidum*(Leyss.: Fr.) Karst.]을 균계(*Mycota*), 진핵균아계(*Eukaryomycota*), 담자균아문(*Basidiomycotina*), 진정담자균강(*Eubasidiomycetes*), 모균아강(*Hymenomycetidae*), 민주름버섯목(*Aphyllphorales*), 불로초과(*Ganogermataceae*), 불로초족(*Ganodermae* ITO), 불로초속(*Ganoderma* Leyss.: Fr.)Karst.으로 분류되고 있으며,¹⁹⁾ 영지에서 유래된 다당류는 종양에 대한 비특이적인 능동 면역을 부여할 수 있는 생체반응 조절물질로 인식되어 지고 있다.²⁰⁻²²⁾

영지 자실체 및 균사체 성분 중 다당류는 고형암 발생에 대한 억제효과를 가지는데, Kim 등²³⁾은 경기도 지방에서 자생하는 영지를 0.1N NaOH로 추출하여 그 추출물의 생쥐에서의 고형암 억제 효과를 실험한 결과 87.6%의 억제율을 나타내었으며, 추출 분획물의 구성당과 구성 아미노산을 확인한 결과 4가지의 단당과 8가지의 아미노산으로 구성되어 있음을 보고하였다.

강 등²⁴⁾은 영지 균사체의 배양 여액에서 단백 다당류를 추출 분리하여 종양 억제효과와 면역에 미치는 영향을 알아보았는데 sarcoma 180 세포를 투여한 생쥐에 대해 종양 억제 효과는 60%이상의 저지율을 나타내었으며, 단백 다당류를 주사한 생쥐에 면역 적혈구를 주사한 후 용혈반을 만드는 비장 세포의 수가 현저히 증가함을 관찰하였고, Mizuno 등²⁵⁾은 PMR, ¹³C-NMR spectra 그리고 효소 가수분해에 의하여 영지의 polysaccharide의 구조는 β -1,3 구조와 β -1,6 구조의 기본구조로 이루어져 있으며, 이 β -구조는 sarcoma 180세포주의 피사에 효과가 있으며 IR-spectrum에서 890 cm^{-1} 에 peak가 나타난다고 보고하였으며, Sone 등²⁶⁾은 영지 균사체의 세포외성 분획 다당인 β -D-glucan을 periodate oxidation과 borohydride reduction의 과정을 거쳐 변형된 polyol형태의 β -D-glucan의 고형암 억제효과를 본 결과 periodate oxidation과 borohydride reduction의 과정을 거치지 않은 β -D-glucan보다 높은 항암활성을 나타내었다고 보고하였다. 또한 한 등²⁷⁾은 영지 균사체의 세포벽에서 추출한 수용성 다당류이며 β -glucan성인 ganoderan

을 sarcoma 180 세포주가 이식된 생쥐에 투여하여 94%의 종양 억제율이 나타남을 보고하였다.

이 등²⁸⁾은 영지의 유기 용매 분획물을 생쥐에 투여하여 sarcoma 180 세포에 대한 수명 연장(life span) 효과를 살펴보았는데 대조군의 평균 생존일수는 12일이었는데 투여군은 최대 평균 생존 일수가 19.5일로써 생존율이 162.5%로 증가되었음을 보고하였다.

본 연구에서는 특히 등록된 균주인 영지 버섯(*Ganoderma lucidum* IY009) 균사체의 배양액을 알칼리 추출하여 얻은 단백 다당체인 β -Immunan의 항암 활성을 측정하기 위하여 *in vitro*에서 β -Immunan으로 면역화시킨 대식세포 배양물을 생쥐 암세포주 2종(sarcoma 180, L1210)에 단독 및 기존 항암제(cisplatin, 5-fluorouracil)와 병용 처리하여 암세포 독성을 MTT assay로 측정하였고, *in vivo*에서는 ICR계 생쥐를 대상으로 sarcoma 180에 대한 고형암 억제효과를 실험하였고, BALB/c계 BDF1 생쥐를 대상으로 leukemia L1210에 대한 수명연장 효과를 실험하였다.

실험방법

실험동물 및 사용 세포주

생쥐에서의 수명연장(life span)효과 실험에 이용된 동물들은 수컷 specific pathogen free(SPF) BALB/c 계 BDF1 생쥐로 생후 5-6주령으로 무게는 19-21 g의 것을 CNH 코리아로부터 공급받아 사용하였고, sarcoma 180 고형암 실험에서 사용한 실험동물은 수컷 SPF ICR계 생쥐로 생후 6-8주령으로 무게는 20-23 g의 것을 삼육 축산(주)로부터 공급받아 사용하였다. 사육 조건은 당 연구소 동물 실험실에서 항생제 무첨가 생쥐용 사료 및 물을 자유로 먹게 하였으며, 동물 사육실내는 항온 항습 장치를 이용하여 실내온도를 $22\pm 2^\circ\text{C}$, 습도를 50%로 유지하며 하루에 12시간씩 조명을 시행하였다

Sarcoma 180, L1210 암세포주, Raw 264.7 대식세포주는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 사용하였다.

배지 및 시약

L1210 암세포주를 위한 배지로서 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640을 사용하였으며, sarcoma 180 암세포주와 Raw 264.7 대식세포를 위한 배지로서 streptomycin($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$)과 penicillin($100\ \text{U}/\text{mL}$)이

함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하였다. RPMI 1640 배지, DMEM 배지 및 streptomycin 및 penicillin 등은 GIBCO(Grand Island, N.Y)사, fetal bovine serum은 Hyclone(Utah, USA)사로부터 구입하였다. 24 및 96-well tissue plate와 100 mm culture dish는 Falcon Inc.(Lincoln Park, NJ)에서 구입하였고, 양성대조약물인 Krestin(약칭:PSK)은 Sankyo(제조원: Kureha chemical Co., Japan, 사용기한: 2002년 11월)사 제품을 구입하여 사용하였다. 기타 시약들은 필요에 따라 1급 또는 2급 시약을 적절히 선택하여 사용하였다.

세포주 배양

Raw 264.7 대식세포는 부착성 세포로서 단층 배양을 하였고, 배지는 10% FBS가 포함된 DMEM을 사용하여 culture dish를 이용하여 2-3일 마다 계대 배양하여 사용하였다. L1210 암세포주의 배양은 리터 당 1 M HEPES buffer 10 ml, sodium bicarbonate 2 g 그리고 penicillin-streptomycin solution 10 ml을 함유한 RPMI 1640 배지에 56°C에서 30 분간 불활성화 시킨 fetal bovine serum(Hyclone)을 10% 첨가하여 사용하였다. 배양은 모든 경우에 있어서 NAPCO사의 CO₂ 배양기를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 상태에서 행하였다.

항암성 단백당체 β -Immunan의 조제

β -Immunan은 이미 보고된 영지버섯 균사체 유래 단백 당류 조제 방법²⁹⁾을 이용하여 얻었는데, 간단히 설명하면 특허균주 *Ganoderma lucidum* IY009를 7일간 균사체 배양하여 배양액을 최종 농도가 2N이 되게 NaOH(Sigma, USA)를 가한 후 실온에서 24시간 방치하고 acetic acid(Sigma, USA)로 중화(pH 7.0)시켜 3,200×g에서 15분간 원심 분리하여 세포균체는 제거하고 상층액만 얻었다. 이 상층액을 tubular type 한외여과막(membrane, M.W. 10 kD, PCI Co., Germany)이 장착된 한외여과장치를 이용하여 한외여과하여 분자량이 10 kD이상의 단백당체를 얻었으며, 산과 염기 반응에 의해 생성된 염들을 제거하기 위하여 1500배의 물을 첨가하여 농축과 희석을 반복하여 한외여과를 행한 후 동결 건조하였다.

β -Immunan으로 활성화된 대식세포 배양물의 조제

대식세포 배양물의 조제는 Sautois³⁰⁾의 단핵세포

자극효과의 시험 방법에서 사용된 conditioned medium조제방법을 변형하여 사용하였다. 즉 β -Immunan으로 활성화된 대식세포의 배양물을 얻기 위하여 96 well에 대식세포(Raw 264.7 cell)를 분주하고, 2시간 동안 전 배양하여 비부착 세포를 제거하였다. β -Immunan을 각 농도별로 처리한 균 및 대조물질을 가한 대조군을 37°C에서 5% CO₂, 24시간 동안 배양한 후 380×g에서 5분간 원심 분리하여 무균상태로 상등액만 얻어서 MTT assay에 이용하였다.

MTT assay

영지버섯(*Ganoderma lucidum* IY009) 균사체 알칼리 추출 단백당체 β -Immunan으로 면역화시킨 대식세포 배양물로 생쥐 암세포주 2종(sarcoma 180, L1210)을 단독 및 기존 항암제(cisplatin, 5-fluorouracil)와의 병용 처리하여 암세포 독성을 MTT assay로 측정하였다.^{31,32)} 간략히 설명하면 생존 암세포(viable cell)의 효소 작용에 의해 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)가 환원되어 formazan crystal로 침전되는 정도를 ELISA reader system(BIO-TEK, model Ceres 900, USA)을 이용하여 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하여 이로부터 항암제에 의해 암세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정하는 실험으로서, 부착성 세포인 sarcoma 180 세포의 경우는 0.05% trypsin-EDTA로 배양기에서 분리시킨 다음, 1×10⁵ cells/ml로 조정하여 각 well에 180 μ 씩 96-well plate에 분주하여 β -Immunan, Krestin으로 면역화시킨 대식세포 배양액을 각각 20 μ 씩 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 48시간 배양한 후 MTT를 이용한 세포 독성 및 형태변화를 관찰하였다. Leukemia L1210은 부유성 세포로서 1.5 × 10⁵ cells/ml로 조정하여 사용하였다.

양성대조군으로 interferon- γ (final concentration : 10 U/ml), lipopolysaccharide(final concentration : 10 ng/ml)로 면역화한 대식세포 배양액을 사용하였다. mitomycin C(MMC)의 경우는 직접 암세포에 처리하여 그 결과를 양성 대조군으로 삼았다.

병용 처리에 의한 암세포 독성 상승 효과에 대한 실험에서는 기존 항암제인 cisplatin과 5-fluorouracil은 암세포에 직접 처리하며, 병용 약물인 β -Immunan과 Krestin의 경우는 면역화시킨 대식세포 배양액을 처리하였다. MTT용액은 well당 100 μ g을 가하여 4시간

배양시켜 살아있는 세포에 의해 생성된 formazan crystal을 MTT solubilization solution(10% Triton X-100, 10% 1N HCl, 80% isopropanol)을 150 μ l 가한 후 반복적인 pipetting으로 완전히 녹인 후, ELISA를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 세포 독성(%)을 측정하였다. 흡광도 측정 시 사용할 blank로 세포 부유액 대신 배지만을 180 μ l 가하고 PBS를 20 μ l 첨가하였다.

In vivo 항암활성의 측정

Sarcoma 180에 대한 항암 효과 - 고형암 발생 억제 효과를 확인은 Ikegawa³³⁾와 Shimura²⁰⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 간단히 설명하면, 고형암 발생 유도를 위하여 ICR계 생쥐의 우측 서혜부에 0.1 ml(5×10^7 cells/ml)의 sarcoma 180 암세포를 피하 이식하고 72 시간 후, β -Immunan 및 대조약을 각 농도별로 1일 1회씩 10일간 연속 복강 투여하였다. 암세포 이식 30일째 되는 날에 생쥐로부터 고형암을 적출하여 중량을 측정하였다. 체중은 0.1 g 단위로 2일마다 측정하였다. 고형암의 증식 저지율은 아래와 같이 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 증식 저지 백분율(percent inhibition ratio : I.R., %)로 계산하였다.

$$\text{Inhibition ratio(I.R.)} = \{(Cw - Tw) / Cw\} \times 100 (\%)$$

Cw = 대조군의 평균 종양무게(g)

Tw = 처치군의 평균 종양무게(g)

생쥐 유래 암세포에 대한 수명 연장 효과 측정 . 생쥐 유래 암세포인 mouse leukemia L1210에 대한 수명 연장 효과를 검토하기 위하여 Otagiri 방법³⁴⁾을 변형하여 실험하였다. 약술하면, 6주령의 BDF1 생쥐를 대상으로 L1210 세포를 1×10^6 cells/0.1 ml씩 복강 내로 이식한 후 시료를 암 이식 1일 후부터 9일까지 1일 1회씩 연속하여 복강 투여하고 아래 식과 같이 각 실험군의 mean survival time으로부터 대조군에 대한 투여군의 평균 생존 일 비율(T/C, %)을 계산하여 항암 효과를 판정하였다. 기존 항암제와 병용 투여시 수명 연장(life span) 효과의 측정에서 β -Immunan의 투여 방법 및 기간은 동일하며, cisplatin 처리는 4 mg/kg을 암 이식 후 1일, 5일 및 9일째에 복강 내로 각각 투여하여 총 3회 투여하였고, 체중은 0.1 g 단위로 2일마다 측정하였다.

$$\text{T/C value}(\%) = (\text{Life time of treated group} / \text{Life time of control group}) \times 100$$

통계 처리 방법 - 동물 실험 결과는 student *t*-test를 이용하였고, mean \pm SD으로 표시하였으며 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

실험 결과 및 고찰

대식세포 배양액에서의 cytotoxicity 측정

단독 처리시의 암세포에 대한 cytotoxicity - 생쥐 육종암세포인 sarcoma 180에 대한 세포 독성을 측정하기 위하여 β -Immunan로 면역화한 대식세포 배양액과 대식세포 활성 물질의 하나인 lipopolysaccharide (LPS)와 interferon- γ (IFN- γ)를 처리한 대식세포 배양액의 세포 독성과 비교하였다(Fig. 1). β -Immunan의 경우 면역화된 대식세포 배양액에서 농도 의존적으로 암세포 독성이 나타났으며, 현재 일본에서 항암제 및 항암 보조요법제로 임상에 사용하고 있는 약물인 krestin의 암세포 독성에 비해 우수한 결과를 나타내었다.

생쥐 leukemia L1210에 대한 세포 독성을 측정하기 위하여 β -Immunan로 면역화한 대식세포 배양액을 사용하여 암세포 독성을 측정하였고, mitomycin C를 처리한 암세포에서의 세포 독성과 비교한 실험 결과는 Fig. 2와 같이 나타났다. β -Immunan의 경우 면역화된 대식세포 배양액에서 농도 의존적으로 암세포 독성이 나타났고 가장 고농도인 100 μ g/ml로 활성화된 대식

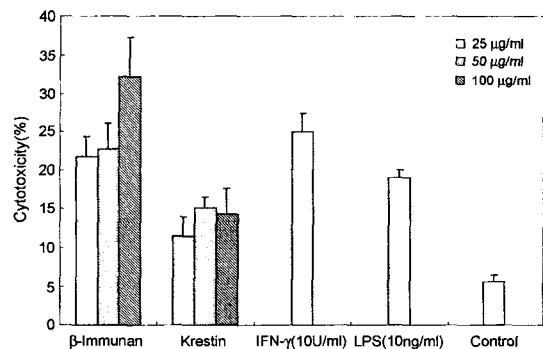


Fig. 1 - Effect of the supernatants of β -Immunan activated Raw 264.7 macrophage cell on the cytotoxic activity against sarcoma 180. Values are mean \pm SD(n=4).

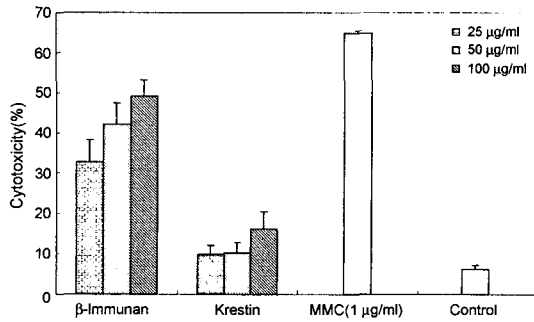


Fig. 2 - Effect of the supernatants of β-Immunan activated Raw 264.7 macrophage cell on the cytotoxic activity against L1210, murine lymphocytic leukemia. Values are mean ± SD(n=4).

세포 배양액에서 약 50%에 가까운 암세포 괴사를 야기하였다. 대조 약물로 직접적인 세포독성이 있는 mitomycin C(MMC)를 1 µg/ml 암세포 처리시의 독성은 60% 이상의 암세포 괴사를 나타내었으며, krestin의 경우는 β-Immunan에 비해 상대적으로 낮은 세포 독성을 나타내었다.

일반적으로 LPS나 IFN-γ의 경우 대식세포를 활성화시켜서 이로 인해 nitric oxide를 생성하여 항미생물 및 항종양 작용을 한다고 보고되고 있으며,²⁾ β-Immunan도 대식세포에 처리시 nitric oxide 및 cytokine의 분비를 촉진하여, 이 대사 산물이 암세포의 독성을 유발하여 세포의 necrosis를 야기하는 것으로 보여진다.^{5,6)}

기존 항암제와의 병용 처리시 암세포에 대한 cytotoxicity 상승 효과 - 생쥐 육종암세포인 sarcoma 180에서 기존 항암제와 병용 처리시의 암세포 독성 상승효과를 측정하기 위하여 단독 투여시의 처리 농도보다 낮은 농도로 기존 항암제인 CDDP(cisplatin)과 병용하여 처리시 β-Immunan의 경우 2배 이상의 암세포 독성을 일으키는 것을 확인할 수 있었으며, 이와는 대조적으로 krestin의 경우는 병용 처리시 아무런 세포독성의 상승효과가 나타나지 않았다(Fig. 3).

생쥐 Leukemia L1210에서 기존 항암제와 병용 처리시의 암세포 독성 상승효과를 측정하기 위하여 단독 투여시의 처리 농도보다 낮은 농도로 면역화된 대식세포 배양물로 기존 항암제인 CDDP(cis-platin) 및 5-FU(5-fluorouracil)과 병용하여 처리 시에 Fig. 4와 같은 암세포 독성을 나타냈다.

β-Immunan의 경우, CDDP 3.1 µg/ml, 5-FU 1.1

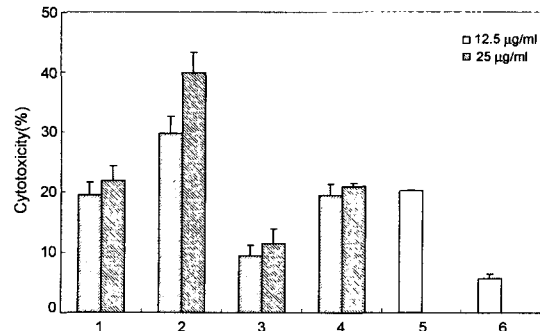


Fig. 3 - Synergy of the supernatants of β-Immunan activated Raw 264.7 macrophage cell and cisplatin on the cytotoxic activity against Sarcoma 180. 1: β-Immunan, 2: β-Immunan+CDDP(3 µg/ml), 3: Krestin, 4: Krestin+CDDP(3 µg/ml), 5: CDDP(3 µg/ml), 6: negative control. Values are mean ± SD(n=4).

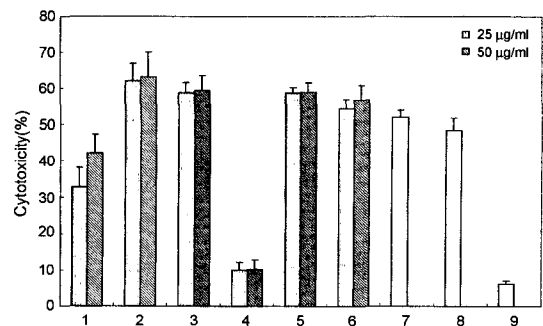


Fig. 4 - Synergy of the supernatants of β-Immunan activated Raw 264.7 macrophage cell and cisplatin (CDDP) or 5-fluorouracil (5FU) on the cytotoxic activity against L1210, murine lymphocytic leukemia. 1: β-Immunan, 2: β-Immunan+CDDP(3.1 µg/ml), 3: β-Immunan+5FU(1.1 µg/ml), 4: Krestin, 5: Krestin+CDDP(3.1 µg/ml), 6: Krestin+5FU(1.1 µg/ml), 7: CDDP(3.1 µg/ml), 8: 5FU(1.1 µg/ml), 9: negative control. Values are mean ± SD(n=4).

µg/ml 농도로 각각 단독 처리 할 때보다 약 10-13% 정도의 암세포 독성 상승효과가 있었지만, Krestin의 경우는 약 5-7% 정도의 암세포 독성 상승효과만 보였다.

고등 진균류인 담자균류에서 유래된 항암성 단백질들은 화학요법제들과는 달리 뚜렷한 부작용이 없을 뿐만 아니라 기존 화학요법제와 병용 투여하였을 경우 화학요법제들이 가지고 있는 고유의 독성이나 부작용을 완화시켜주는 작용도 가지고 있고,¹⁴⁻¹⁷⁾ 항암활성의 상승효과를 나타낸다고 알려지고 있는데,¹⁸⁾ β-Immunan의 경우 이러한 효과가 Krestin에 비해 월등

Table I – Antitumor effect of β -Immunan against sarcoma 180 solid tumor in the male ICR mice

	No. of mice	Dose (mg/kg/day)	Spleen weight (mg)	Average of tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)
Normal	10	-	128.4 \pm 20.7	-	
Saline	10	-	198.1 \pm 55.4	4.03	
β -Immunan	10	10	180.5 \pm 54.0	1.39	65.5
	10	20	257.4 \pm 76.0	0.98	75.7*
	10	40	205.2 \pm 83.4	0.45	88.8*

Values are mean \pm SD (n=10).

*P<0.05 as compared to control (saline)

히 우수하게 나타남을 확인할 수 있었다.

육종암 동물 모델에서의 항암 활성 측정

영지버섯 유래 단백질단백질 β -Immunan가 면역세포를 매개로 하여 기존의 면역 증강제에 비해 암세포에 대한 간접 독성이 높은 것이 *in vitro* 항암실험에서 확인되어 육종암 및 림프구암에 대한 *in vivo* 항암성 작용을 검색하였다. 육종암의 항암활성의 측정을 위하여, sarcoma 180을 서혜부에 이식하여 고형암을 유도한 후 항암활성을 확인할 수 있는 Ikekawa³³⁾ 및 Shimura²⁰⁾의 방법을 이용하였는데, 본 실험의 항암성 단백질단백질 β -Immunan를 10일간 복강 투여하여 항암활성을 검색하였다. 그 결과는 Table I에서와 같이 농도 의존적으로 항암활성을 나타내었으며, 40 mg/kg/day 복강 투여군에서는 약 90%의 제암 및 항암 활성을 나타내었다. 생쥐를 치사시키고 고형암을 적출하면서 spleen의 무게를 측정된 결과 β -Immunan 투여군에서 saline만 투여한 음성 대조군에 비해 무게의 증가를 확인할 수 있었는데 이는 이 약물의 면역증강 효과에 기인한 것임을 간접적으로 확인할 수 있었다.

생쥐 Leukemia L1210 에 대한 수명 연장 (life span) 효과 측정

BDF1 생쥐를 이용한 β -Immunan의 수명 연장 효과 실험의 결과는 Table II와 같이 나타났다. 음성 대조군의 평균 생존 일수가 9.7 \pm 3.4일 이었으나, β -Immunan 투여군에서는 농도의존적으로 평균 생존 일수가 늘어나는 것을 확인할 수 있었는데, β -Immunan 20, 50 및 100 mg/kg/day투여시 각각 15.2 \pm 6.7, 17.0 \pm 6.5 및 18.1 \pm 5.9로 가장 고농도 투여군에서의 평균 생존일수는 양성 대조군인 cisplatin보다 우수하게 나타났다. 이런 수명 연장 효과는 β -Immunan의 복강 투여에 의한 결과로 면역 초기 단계의 면역세포

Table II – Life span elongation effect of β -Immunan against L1210 leukemia cell in the BDF1 mice

	No. of mice	Dosage (mg/kg)	MST ^{a)} (day)	T/C value ^{b)} (%)
Normal	10	-	-	-
Saline	10	-	9.7 \pm 3.4	100.0
cisplatin	10	4	17.1 \pm 6.6	176.3**
β -Immunan	10	20	15.2 \pm 6.7	156.7*
	10	50	17.0 \pm 6.5	175.3**
	10	100	18.1 \pm 5.9	186.6**

Values are mean \pm SD(n=10).

^{a)}MST, Mean survival time

^{b)}T/C value, Life time of treated group/Life time of control group

*P<0.05 as compared to control (saline)

**P<0.01 as compared to control (saline)

인 대식세포의 활성화에 의한 nitric oxide, superoxide 및 여러 가지의 cytokine의 분비 촉진 등에 의해 암세포의 성장을 방해하고, 이차적으로 복강에서의 β -Immunan가 흡수되어 혈액으로 이동하면서 T cell, B cell 및 natural killer cell의 활성화가 진행되면서 복강에서 자라는 L1210의 성장을 방해하며 세포들을 괴사시키는 것으로 사료된다.

화학요법제와 병용 투여시 수명 연장 상승 효과 측정

cisplatin에 대한 β -Immunan의 병용투여효과에 대하여 실험하였을 때, cis-platin에 대해서 β -Immunan 100 mg/kg/day농도로 투여하였을 때 유의성 있는 약효의 증가를 확인할 수 있었으며, 대조약물로서 사용된 Krestin 투여군에서는 약효 증가를 관찰할 수 없었다(Table III).

cisplatin은 생체 내에 유입되면 암세포를 살해하는 효과가 있지만 정상세포에도 작용하여 여러 가지 독성을 야기시킨다.^{35,36)} 일반적으로 cisplatin은 생체에서 독성을 일으키는 원인중의 하나가 지질과산화물을 유도

Table III - Combination effects of β -Immunan and chemotherapeutical agents

	No. of mice	Dosage (mg/kg)	Combinated drug Dose (mg/kg)	MST ^{a)} (days)	T/C value ^{b)} (%)
Control	10	-		9.4	100
-	10	-	cisplatin (4)	18.1	192.6*
β -Immunan	10	100	cisplatin (4)	22.6	240.4*
	10	50	cisplatin (4)	18.6	194.7
Krestin	10	250	cisplatin (4)	15.0	159.6
	10	100	cisplatin (4)	17.0	180.9

^{a)}MST, mean survival time

^{b)}T/C value, life time of treated group/life time of control group

*P<0.05 as compared to control (saline)

하여 정상세포를 파괴하는 것인데 담자균류 유래 단백 다당체들은 생체막에서 일어나는 지질과산화 반응을 억제하는 효과가 탁월하기 때문에 임상에서 항암치료를 받을 시 cisplatin과 병용 투여하면 이 화합물에 의한 인체 독성들을 많이 줄일 수 있을 것으로 여겨진다.^{17,35)}

결 론

영지 버섯 균사체(*Ganoderma lucidum* IY009)유래 단백다당체인 β -Immunan의 항암 효과를 검색한 결과 들을 종합하였을 때 생쥐 육종암인 sarcoma 180과 Leukemia인 L1210을 대상으로 세포독성을 검색한 결과, 영지버섯(*Ganoderma lucidum* IY009) 균사체 유래 단백다당체인 β -Immunan은 면역세포인 대식세포를 활성화하여 생성되는 여러 가지 metabolite들에 의하여 간접적으로 암세포독성을 일으키며, 그 암세포 괴사능력은 IFN- γ , LPS등의 다른 생체 활성 물질들보다 우수하게 나타났고 생쥐 Leukemia인 L1210에 대해서는 약 50%에 가까운 암세포 괴사능력을 나타냈다. 기존 항암제인 cisplatin이나 5-FU와 병용처리 시에도 항암제의 단독 처리시보다 약 10-13% 정도의 암세포 독성의 상승효과가 관찰되었다. 생체 실험 결과에서도 생쥐의 서혜부에 이식한 sarcoma 180에 대한 항암활성에서 약 88.8%의 우수한 제암 및 항암 활성이 나타났다. 생쥐 Leukemia L1210에 대한 β -Immunan의 수명 연장 효과 실험의 결과는 평균 생존 일수가 β -Immunan 100 mg/kg/day 투여시 18.1 일로 양성 대조군인 cisplatin보다 뛰어난 수명 연장 효과가 있었고, cisplatin과 β -Immunan 병용 투여시에는 음성 대조군에 비해 약 2.4배 이상의 수명 연장 효과가 있는 것으로 나타나 항암성 단백 다당체 β -Immunan은 기존

화학요법제와 병용 투여하였을 경우 항암활성의 상승 효과가 나타남을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 항암 효과를 실험한 영지버섯 균사체 추출 단백다당체는 추가적인 인체암에 대한 항암실험을 진행함과 동시에 임상 시험도 병행하여 신약으로서 항암제 또는 항암 병용 요법제로의 개발할 수 있는 후보물질인 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Adachi, Y., M. Okazaki, N. Ohno, and T. Yamadae. : Enhancement of cytokine production by macrophage stimulated with (1 \rightarrow 3) β -D glucan grifolan (GRN) isolated from *Grifola frondosa*. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1554 (1994).
- 2) Hibbs, Jr, J. B., R. R. Taintor, Z. Vavrin and E. M. Rachlin. : Nitric oxide; A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87 (1988).
- 3) Di Renzo, L., E. Yefenof, and E. Klein. : The function of human NK cells is enhanced by beta-glucan, a ligand of CR3 (CD11b/CD18). *Eur. J. Immunol.* **21**(7), 1755 (1991).
- 4) Chihara, G. : Cancer and augmentation of immunoreponse., *Kodansha Tokyo*(in Japanese)(1980).
- 5) Denis, M. : Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill a virulent *M. avium*: Killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J. Leucocyte Biology.* **49**, 380 (1991).
- 6) Lafreniere R. and S. A. Rosenberg. : Successful

- immunotherapy of murine experimental hepatic metastasis with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Cancer Res.* **45**, 3735 (1985).
- 7) Amery, W. K. : Cancer immunotherapy: some critical comments regarding immunological monitoring. *Int. J. Immunopharmacol.* **3**, 339 (1981).
 - 8) Roland, J. F., Z. F. Chiniolowicz, B. A. Weiner, A. M. Gross, O. P. Boening, J. V. Luck, T. J. Bardos, H. C. Reilly, K. Sugiura, C. C. Stock, E. H. Lucas, R. V. Byerrum and J. A. Stevens. : Calvacin, a new antitumor agent., *Science*, **23**, 1897 (1960).
 - 9) Kosaka A. and A. Yamashita.: Lentinan as an effective immunomodulator against breast cancer, with special reference to clinical applications. *Int. J. Immunotherapy.* **IX**(2), 111 (1993).
 - 10) Yoshihiro F., T. Akiro, H. Yuki, Y. Yuuhiko and A. A. Johnosuke. : Clinical trial of cis-platinum(II) in combination with PSK and FT-207 in advanced stomach cancer., *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **12**(4), 960 (1985).
 - 11) 三尾 壽樹, 寺部 啓介. : 組織學的 Stage IVb胃癌に對する術後 5-FU, CDDP, Lentinan 併用療法の効果と CDDP, 5-FU の長期的な血行動態の検討., 癌と化學療法, **24**(30), 337 (1997).
 - 12) 日馬 幹弘, 木村 幸三郎, 鈴木 和信, 深谷 泰弘, 外 5 名. : 膵癌播種(P₃)を伴つた胃癌 の術後長期生存の1例., 癌と化學療法. **16**(10), 3453 (1989).
 - 13) 于原 吳郎. : 癌の轉移抑制に關する實驗的研究., 癌と化學療法. **12**(6), 1196 (1985).
 - 14) Foon, K. A. : Biological response modifiers: the new immunotherapy. *Cancer Res.* **49**, 1621 (1989).
 - 15) Ishii, K., T. Kita, J. Hirata, T. Tode, Y. Kikuchi and I. Nagata. : Antitumor effect of PSK and its combined effect with CDDP on ovarian serous adenocarcinombearing nude mice., *Acta. Obst. Gynaec. Jpn.* **45**(4), 333 (1993).
 - 16) Oldham R. K. : Biological response modifiers. *J. Natl. Cancer Inst.* **70**, 789 (1983).
 - 17) Parris M. K. : The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment., *Alternative Medicine Review*, **5**, 4 (2000).
 - 18) Suzuki, M., S. Higuchi, Y. Taki, S. Taki, K. Miwa and J. Hamuro. : Induction of endogenous lymphokine-activated killer activity by combined administration of lentinan and IL-2. *Int. J. Immunopharmac.* **12**, 613 (1990).
 - 19) 이태수, 이지열. : 한국 기록종 버섯 재정리 목록, 임업연구원, 서울, p.58 (2000).
 - 20) Hikino, H., C. Konno, Y. Mirin and T. Hayashi.: Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderans A and B, Glycans of *Ganoderma lucidum* fruit body. *Planta. Medica.* 339 (1985).
 - 21) Shimura, K., H. Ito and H. Hibasami. : Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Japan J. Pharmac.*, **33**, 403 (1983).
 - 22) 水野 卓, 川合正允: キノコの化學生化學, 新日本印刷株式會社, 東京, 日本 (1992).
 - 23) Kim, B. K., H. S. Chung, K. S. Chung and M. S. Yang. : Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* **8**(2), 107 (1980).
 - 24) 강창울, 심미자, 최응칠, 이영남, 김병각. : 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. 한국생화학회지, **14**(2), 101 (1981).
 - 25) Mizuno, T., N. Kato, A. Totsuka, K. Takenaka, K. Shinkai and M. Shimizu. : Fractionation, structural features and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from "Reishi", the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **58**(9), 871 (1984).
 - 26) Sone Y., R. Okuda, N. Wada, E. Kishida and A. Misaki. : Structures and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruit body and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Arig. Biol. Chem.*, **49**(9), 2641 (1985).
 - 27) 한만덕, 정훈, 이준우, 백성진, 김수웅, 윤경하. : 영지 IY009 균사체의 분획에 따라 추출된 ganoderan의 조성과 생리적 활성. 한국균학회지, **23**(4), 285 (1995).
 - 28) 이명희, 김하원, 심미자, 도상학, 최응칠, 김병각. : 한국산 고등균류의 성분 연구 : 영지의 성분 및 면역촉진작용. 한국균학회지, **14**(2), 149 (1986).
 - 29) 백성진, 김용석, 전역한, 이은숙, 이준우. : *Ganoderma lucidum* IY009 배양균사체 유래 단백질의 저분자와 고분자 분획의 특성. 한국균학회지, **29**(1), 1 (2001).
 - 30) Sautois, B., G. Fillet and Y. Beguin. : Comparative cytokine production by in vitro stimulated mononucleated cells from cord blood and adult

- blood. *Exp. Hematol.* **25**(2), 103 (1997).
- 31) Iselt, M., W. Holtei and P. Hilgard. : The tetrazolium dye assay for rapid *in vitro* assessment of cytotoxicity. *Arzneimittel Forschung.* **39**, 747 (1989).
- 32) Park, J. G., B. S. Kramer, S. M. Steinberg, J. Carmichael, J. M. Collins, J. D. Minna and A. F. Gazdar. : Chemosensitivity testing of human colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**, 5875 (1987).
- 33) Ikekawa, T., N. Uehara, Y. Maeda, M. Nakanishi and F. Fukuka. : Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res.* **29**(3), 734 (1969).
- 34) Otagiri, K., T. Ohkuma, T. Ikekawa and S. Tanaka. : Intensification of antitumor-immunity by protein-bound polysaccharide, EA6, derived from *Flammulina velutipes*(Curt. ex Fr) Sing. combined with murine leukemia L1210 vaccine in animal experiments. *J. Pharmacobiodyn.* **6**(2), 96 (1983).
- 35) Sadzuka, Y., T. Shoji and Y. Takino. : Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1872 (1992).
- 36) Sodhi, A. and P. Gupta. : Increased release of hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion by murine macrophages *in vitro* after cisplatin treatment. *Int. J. Immunopharmac.* **8**, 709 (1986).