

한국산 야생버섯의 용혈작용에 대한 연구
- 제 3보 : 무우자갈버섯(*Hebeloma crustuliniforme*)
용혈독소의 용혈특성 및 *in vivo* 독성 -

양희정 · 이지선 · 정경수*

충남대학교 약학대학, 미생물면역학교실

Studies on the Hemolytic Activities of Korean Wild Mushrooms (III)
- Hemolytic Characteristics and *in vivo* Toxicity of Hemolysin
of *Hebeloma crustuliniforme* -

Hee-Jung Yang, Ji-Seon Lee and Kyeong-Soo Chung*

Laboratory of Microbiology and Immunology, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
(Received February 8, 2002)

ABSTRACT: In the previous studies, we surveyed 68 Korean wild mushrooms for their hemolytic activity and found that cold-water extract of *Hebeloma crustuliniforme* contained heat-resistant hemolysin. In this study, partially purified hemolysin of the mushroom was obtained by cold-water extraction followed by precipitation with ammonium sulfate, solubility fractionation and then dialysis. The hemolysin was found to be > 12,000 in molecular weight and its optimal hemolytic temperature was 37°C and its hemolytic activity on washed erythrocytes and unwashed erythrocytes, respectively, was in the order of sheep > rat > human ≥ mouse > chicken and sheep > mouse > human ≥ rat > chicken. When ip injected into ICR mice at 1.38 mg/kg, it incurred prompt hemolysis as well as severe renal toxicity and hepatotoxicity. These results strongly suggest that the toxicity of *Hebeloma crustuliniforme*, which had been well-known as a toxic wild mushroom, may be at least partly due to its hemolysin.

KEYWORDS: *Hebeloma crustuliniforme*, Hemolysin, Hemolytic activity, Hepatotoxicity, Renal toxicity

한국에 자생하는 1,100여종의 버섯(이지영, 1993) 중 독버섯으로 알려진 것은 극히 일부에 불과하나 독버섯과 식용버섯을 구분할 수 있는 간단한 방법이 없기 때문에 중독 사고가 끊이지 않고 있다. 지금까지 알려진 독버섯 성분은 매우 다양하나(Lampe, 1979), 그 중 용혈독소(hemolysin)는 적혈구를 파괴하여 빈혈을 일으키며 심한 경우 사망을 초래할 수도 있어서 주의가 요구된다. 다행히 근년에 광대버섯속(*Amanita*) 버섯들의 용혈독소가 밝혀지고 있으나(Enjalbert *et al.*, 1993; Faulstich and Weckauf, 1974; Seeger *et al.*, 1973, 1976, 1981; Seeger, 1975a, 1975b; Seeger and Bunsen, 1980; Seitz *et al.*, 1981; Wieland and Faulstich, 1978), 한국산 야생버섯들의 용혈독소에 대하여는 구체적인 연구 사례를 찾아 볼 수 없었다. 이에 본 연구자들은 한국에 자생하는 46종의 야생버섯의 *in vitro* 용혈작용을 검색하여 무우자갈버섯을 위시한 12종의 용혈활성을 확인, 보고한 바 있으며(양 등, 1997), 제 2보에서는 22종의 용혈작용을 검색하여 색시줄각버섯 등의 용혈독성을 확인한 바 있다(정 등, 2000). 그 중 특히 무우자

갈버섯 냉침액은 강력한 용혈작용을 나타낼 뿐만 아니라 열에도 비교적 안정하여 치명적인 중독을 초래할 위험성이 제기되었다. 따라서 연구자들은 무우자갈버섯의 용혈독소를 부분정제하고, 그 용혈특성과 *in vivo* 독성에 관한 연구를 수행하여 신지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

무우자갈버섯 시료

무우자갈버섯(Fig. 1)은 충청북도 문동 지역 활엽수림 내에서 9월부터 10월에 채집하였고, 그 형태학적 특징을 관찰하여 도감(이, 1993; Gerhardt, 1995; Imazeki and Hongo, 1975; Lincoff, 1992)에 의거 동정하였으며 -50°C에서 동결건조한 후 실험에 사용하였다.

적혈구

사람을 포함한 5종의 동물 혈액을 그대로 혹은 헤파린(5 IU/ml) 함유 인산염완충액 (heparin-PBS, pH 7.2)으로 세척한 후 10배 희석하여 실험 적혈구로 사용하였다. 이 중 사람 혈액은 대한 적십자사 혈액원으로부터 O형 혈액

*Corresponding author <E-mail: chung_es@cnu.ac.kr>

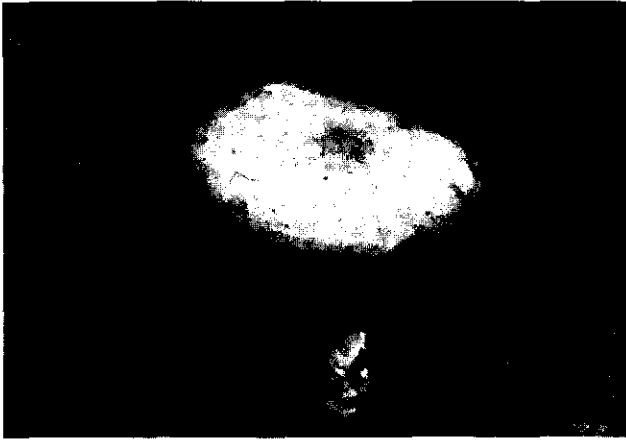


Fig. 1. The carpophores of *Hebeloma crustuliniforme* with white mycelium near the base of the stipe. The nearby leaf of a tree in the left shows the characteristic spore deposit.

을 구입하였으며, 마우스 혈액은 생후 약 5~6 주령의 ICR 마우스로부터, 래트 혈액은 Sprague-Dawley 래트로부터, 닭 혈액은 생후 약 5주령의 닭으로부터 각각 심장천공(heart puncture)하여 채취하였다. 면양 혈액은 한국 미디어(주)로부터 구입하여 채취일로부터 14일 내에 사용하였다.

용혈독소 분획의 분리정제

무우자갈버섯 동결건조 자실체를 분쇄하여 그 분말 20 g에 증류수 600 ml를 가하고 자석 교반기로 교반하며 빙육상에서 4시간 동안 추출하였다. 감압여과하여 여액을 분리한 후 잔사는 다시 600 ml의 증류수를 가하고 2차 추출하였다. 1, 2차 추출여액을 합하여 "냉침액"(cold-water extract, 1,094 ml)이라 하였다. 냉침액에 동일용적의 빙냉(ice-cold) 황산암모늄 포화수용액을 가하여 단백질을 침전시켰다. 15,000×rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 침전을 분리하고 이 침전을 300 ml의 증류수에 용해시켜 이용성 분획(freely soluble fraction)을 제거하였다. 잔사를 증류수에 재용해시켜 투석막(MWCO : 12,000, Sigma)에 넣어 4°C에서 하루 동안 증류수를 갈아가며 투석하였다. 투석내용물을 동결건조하여 부분정제된 무우자갈버섯 용혈독소 분획을 획득하였다.

용혈 실험

이미 보고한 바(양 등, 1997)와 같이 회석 냉침액 시료 100 μ l에 회석 적혈구 100 μ l를 가하고 37°C 수욕상에서 30분간 반응시켰다. 반응 종결을 위해 차가운 PBS 1.8 ml을 가하고 1,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액의 흡광도(415 nm)를 측정하였다.

Sarcoma 180 세포에 대한 세포용해활성(cytolytic activity) 실험

Sarcoma 180 세포는 ICR 마우스의 복강에 일주일 간격

으로 계대 중인 것을 복수와 함께 분리하여 생리식염수로 2회 세척하고 RPMI 1640 배지에 2×10^6 cells/ml 농도로 조절하였다. 이 때 RPMI 1640 배지는 Sigma 사의 분말 배지를 주사용 증류수(중외제약)에 용해시키고 10 mM HEPES buffer(*N*-2-hydroxyethyl piperazine *N*-2-ethan-sulfonic acid, Sigma), 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 및 56°C에서 30분간 불활성화시킨 fetal bovine serum 10%를 첨가한 후, 0.20 μ m membrane filter로 여과 멸균하여 세포 및 시료 회석에 사용하였다. Sarcoma 180 세포현탁액 500 μ l를 5 ml polypropylene round-bottom culture tube(Falcon 2063, Beckton Dickinson)에 넣고 동일 용적의 버섯 냉침액 회석 시료를 가한 후 37°C에서 5% CO₂ 대기하에 3시간 동안 배양하였다. 이어서 propidium iodide(PI, 최종농도 25 μ g/ml)를 가하고, 이미 보고한 바(Oh and Chung, 1998)와 같이 Becton Dickinson 사의 FACScan 유세포분석기를 이용하여 PI exclusion법으로 세포독성을 분석하였다.

온도에 따른 용혈작용 실험

6 ml 유리시험관에 미리 heparin-PBS로 3회 세척, 50배 희석한 사람혈액과 회석 시료 용액을 각각 1 ml씩 가하고, 정해진 시간에 따라 150 μ l 씩을 취하여 빙냉의 PBS 1.3 ml과 혼합 후 즉시 원심분리하여 상등액의 흡광도(415 nm)를 측정하였다.

In vivo 독성 실험

(주)대한바이오링크로부터 생후 약 4주령의 ICR 마우스 암컷을 분양받아 충남대학교 약학대학 동물실험실에서 3일 동안 안정화시킨 후 사용하였다. 사료(우성사료, 항생제 무첨가 마우스용)와 물은 자유로이 먹게 하였으며 실온은 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 50%를 유지하였고 하루에 12시간씩 조명을 시행하였다. 실험동물 복강 내에 무우자갈버섯 냉침액 또는 부분정제한 용혈성분을 복강주사한 후 이상행동을 관찰하고 30분, 2시간, 24시간 후에 혈액을 채취하여 혈청을 분리, 자동혈액분석기(Ciba-Corning, Express 550, USA)로 serum glutamic oxaloacetic transaminase(sGOT), serum glutamic pyruvic transaminase(sGPT), creatinine, blood urea nitrogen(BUN) 농도를 측정하였다. 모든 분석 결과는 Student's t-test로 통계적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

무우자갈버섯 냉침액의 종(species) 특이성 용혈작용

일반적으로 버섯의 용혈독소들은 동물의 종 및 적혈구의 세척여부에 따라 그 용혈강도가 달리 나타난다(Seeger, 1975). 한편 본 연구자들은 이미 무우자갈버섯 냉침액의 마우스 적혈구에 대한 용혈작용을 확인한 바 있으나 사람을 포함한 다른 동물에 대한 용혈작용은 구체적으로 실험

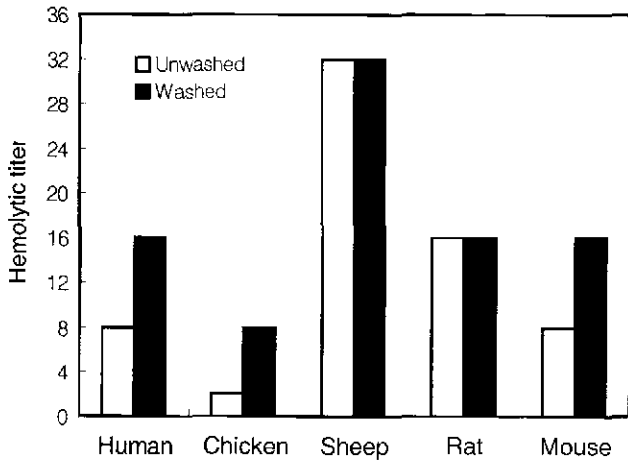


Fig. 2. Relative sensitivity of erythrocytes from five different species to hemolytic activity of the cold-water extract of *Hebeloma crustuliniforme*. The hemolytic titer is the highest dilution showing hemolytic activity.

한 바 없다. 따라서 본 연구에서는 사람을 포함한 5종의 동물혈액에 대한 무우자갈버섯 냉침액의 용혈작용을 비교 실험하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 무우자갈버섯 냉침액은 5종의 혈액 모두에 대하여 강력한 용혈작용을 나타내되 세척하지 않은 혈액에 대해서 면양 > 랫트 > 사람 ≥ 마우스 > 닭의 순으로 용혈작용을 나타냈으며, 세척한 혈액에 대해서는 면양 > 마우스 > 사람 ≥ 랫트 > 닭의 순으로 용혈작용을 나타내었다. 이 중 3종(사람, 닭, 마우스)의 적혈구는 세척 후 용혈작용이 증강되었고 2종(면양, 랫트)에 대하여는 변화가 없었다. 3종에서 세척으로 용혈작용이 증강된 것은 무우자갈버섯의 용혈독소의 작용을 저해하는 혈장단백질이 세척으로 인해 제거되기 때문으로 추정된다. 이와 유사한 결과는 큰갓버섯 (*Macrolepiota procera*)을 대상으로한 본 연구자들의 실험에서도 관찰되었다(자료제시 생략).

무우자갈버섯 냉침액의 sarcoma 180 세포에 대한 세포독성(cytotoxicity)

용혈독소(hemolysin)들은 후에 적혈구 이외의 다른 세포들에 대해서도 세포독성을 나타내는 경우가 많다. 따라서 본 연구에서는 무우자갈버섯의 용혈독소가 다른 세포에도 세포독성을 나타내는지 또는 적혈구에만 특이적으로 작용하는지 확인하기 위하여, 용혈활성이 무우자갈버섯과 대등한 것으로 제1보에서 확인한 붉은점박이광대버섯(*A. rubescence*) 및 알광대버섯(*A. phalloides*) 냉침액과 더불어 마우스 육종암세포인 sarcoma 180 세포에 대한 세포독성을 비교실험하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이, 붉은점박이광대버섯은 sarcoma 180 세포에 대해 강력한 세포독성을 나타낸 반면 무우자갈버섯과 알광대버섯은 세포독성을 거의 나타내지 않았다. 따라서 무우자갈버섯과 알광대버섯의 독성은 sarcoma 180 세포 보다는 적혈

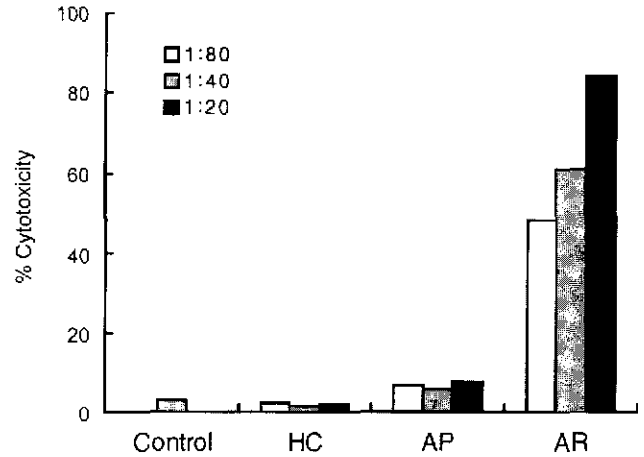


Fig. 3. Cytotoxicity of the cold-water extracts of *Hebeloma crustuliniforme* (HC), *Amanita phalloides* (AP), and *A. rubescence* (AR) against sarcoma 180 cells.

구에 대하여 선택적임을 알 수 있었다.

정제과정에 따른 용혈작용

무우자갈버섯 냉침액은 마우스 적혈구에 대해, 32배 희석액까지 용혈활성이 확인되었으나, 황산암모늄 침전물 중 이용성 분획(freely soluble fraction)은 용혈활성이 거의 확인되지 않았다(자료제시 생략). 그러나 이용성 분획을 제거하고 투석농결 건조하여 얻은 용혈성분(460 mg, 수율 2.3%)은 용혈활성이 매우 강력하여 5.5 µg/ml까지 용혈작용을 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 무우자갈버섯의

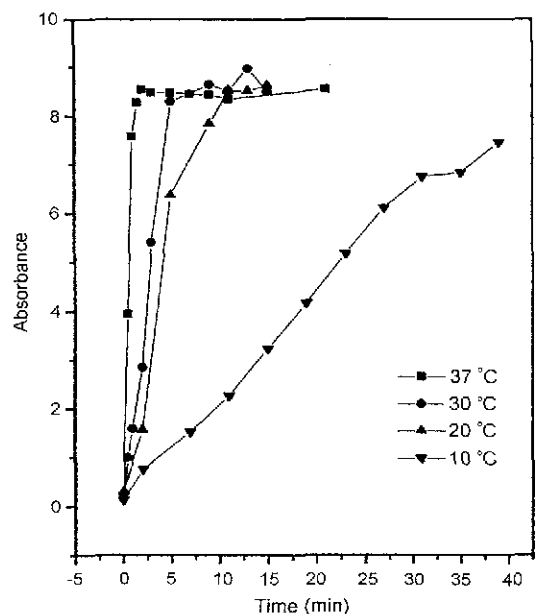


Fig. 4. Effect of temperature on the hemolytic activity of hemolysin of *Hebeloma crustuliniforme* on washed human erythrocytes. The absorbance value was calculated as follows : absorbance = measured absorbance value × dilution factor.

Table 1. *In vivo* toxicity of ip administered hemolysin fraction and cold-water extract of *Hebeloma crustuliniforme* in female ICR mice

Group	Dose ^a	n	Time (hr)	sGOT (U/l)	sGPT (U/l)	BUN	Creatinine	Absorbance
Normal	—	7	—	98.9±4.6 ^b	33.3±5.8	21.7±0.9	0.20±0.01	0.40±0.04
Hemolysin fraction	60	6	0.5	529.6±41.3**	132.8±21.0**	31.8±1.0*	0.21±0.01	0.92±0.31**
		5	2	398.9±124.1*	66.0±17.5	25.2±3.8	0.11±0.04*	0.24±0.02
Cold-water extract	6	6	0.5	140.6±12.1**	31.9±2.3	26.3±2.0	0.22±0.11	0.84±0.11**
		8	24	106.6±4.3	25.7±1.6	18.3±0.9*	0.17±0.11	1.43±0.59

^aEquivalent to mg of dried mushroom/mouse.

^bMean±S.E.

sGOT : serum glutamic oxaloacetic transaminase.

sGPT : serum glutamic pyruvic transaminase.

BUN : blood urea nitrogen.

* : significant at $p < 0.05$, ** : significant at $p < 0.01$.

용혈성분은 50% 포화 황산암모늄에 침전되며, 물에 쉽게 용해되지 않는, 분자량 12,000 이상의 물질로 추정된다.

온도에 따른 용혈작용

이미 보고한 바와 같이 무우자갈버섯 냉침액은 병육상에서도 용혈작용을 나타내었으며 알광대버섯의 용혈독소 phallolysin은 용혈 최적 온도가 20°C로 보고된 바도 있어 연구자들은 무우자갈버섯의 용혈성분의 용혈 최적온도 확인 실험을 수행하였다. 즉, 10°C, 20°C, 30°C 및 37°C에서의 용혈능력을 실험하되 측정된 흡광도치와 회석배수를 곱하여 용혈강도로 간주하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 37°C가 최적온도임을 알 수 있었다.

ICR 마우스에서의 *in vivo* 독성

무우자갈버섯 냉침액 0.3 ml(건조버섯 약 6 mg 해당량)을 ICR 마우스에 복강 주사한 결과 수분 내로 stretch 현상 및 행동 위축이 관찰되었다(자료제시 생략). 한편 부분 정제한 용혈성분을 1.38 mg/mouse(건조버섯 60 mg/mouse 해당량)의 용량으로 복강주사한 결과 Table 1에 나타난 바와 같이 30분만에 GOT, GPT, BUN, creatinine 및 흡광도치가 모두 유의성 있게 상승하여 무우자갈버섯의 용혈성분이 용혈 독성 뿐 아니라 급성 간손상 및 신장손상을 일으킴을 알 수 있었다. 그러나 2시간 후에는 GOT 값을 제외한 모든 수치가 정상범위내로 되돌아 간 것으로 보아 무우자갈버섯 용혈성분의 급성 독성은 의외로 신속히 회복되는 것으로 추정된다. 그러나 2시간 경과 후 측정치들 간의 차이가 큰 것으로 보아 개체에 따라 회복속도가 상당히 다른 것으로 판단된다. 한편 투여 용량을 낮추어 실험동물당 건조버섯 6 mg 상당량의 냉침액을 복강주사한 결과, 30분 후에 약간의 GOT치 상승이 관찰되었을 뿐 여타 수치는 정상 수준이었고 24시간 후에는 모든 수치가 정상 수준으로 회복되는 것으로 보아 무우자갈버섯의 독성은 농도의존적인 것으로 추정된다.

그러나, 연구자들은 플라스크 내에 인공 배양한 무우자갈

버섯 자실체 및 배양 균사체가 용혈독소를 함유한다는 증거를 얻지 못하였고, 오히려 균사체로부터 분리한 단백단량체 분획(HCA)은 항암효과 및 백혈구 감소증 억제효과가 입증되었다(조·정, 1999). 따라서 무우자갈버섯의 용혈성분은 야생환경 상태에서 생성되는 2차 대사물로 추정된다.

적 요

저자들은 한국산 야생버섯의 독성을 규명하기 위한 연구의 일환으로 전보에서 68종의 한국산 야생버섯의 용혈활성을 검토하였고 그 중 무우자갈버섯(*Hebeloma crustuliniforme*)이 열내성 용혈독소를 함유함을 보고하였다. 본 연구에서는 무우자갈버섯의 용혈성분을 냉침한 후, 황산암모늄 침전, 용해도 차이에 따른 분획 및 투석과정을 거쳐 부분정제하였다. 부분정제된 용혈성분은 분자량 분자량 12,000 이상으로서, 용혈 최적온도는 37°C이고 세척하지 않은 혈액에 대해서 면양 > 랫트 > 사람 ≥ 마우스 > 닭의 순으로, 세척한 혈액에 대해서는 면양 > 마우스 > 사람 ≥ 랫트 > 닭의 순으로 용혈활성을 나타내었다. 한편 무우자갈버섯의 냉침액 및 부분정제한 용혈성분을 마우스에 복강투여한 결과, 용혈은 물론 심한 급성 간독성 및 신장독성이 관찰되었다. 이러한 결과들은 독버섯으로 잘 알려진 무우자갈버섯의 독성이 최소한 부분적으로라도 그 용혈성분에 기인할 가능성을 강하게 암시하고 있다.

감사의 글

버섯채집과 실험에 도움을 준 충남대학교 약학대학 미생물면역학교실 정수현 박사, 이대우, 오정연, 김진향 석사들의 노고에 감사합니다.

참고문헌

양희정, 정수현, 김진향, 정경수. 1997. 무우자갈버섯(*Hebeloma*

- crustuliniforme*)을 위시한 한국산 담자균류 46종의 용혈활성 검색. 한국균학회지 25: 253-256.
- 이지열. 1993. 원색 한국버섯도감(3판). 도서출판 아카데미 서적, 서울.
- 정경수, 이지선, 조문주, 이임선. 2000. 한국산 야생버섯의 용혈 작용에 대한 연구 제 2보: 색시줄각버섯(*Laccaria vinaceo-avellanea*) 등 22종의 *in vitro* 용혈활성 검색-. 한국균학회지 28: 123-125.
- 조경주, 정경수. 1999. 무우자갈버섯(*Hebeloma crustuliniforme*) 배양 균사체로부터 분리한 단백다당체 분획 HCA의 항암 및 백혈구감소증 억제효과. 약학회지 43: 629-634.
- Enjalbert, F., Gallion, C., Jehl, F. and Monteil, H. 1993. Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon*. 31: 803-807.
- Faulstich, H. and Weckauf, B. M. 1974. Isolation and toxicity of two cytolytic glycoproteins from *Amanita phalloides* mushrooms. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 355: 1489-1494.
- Gerhardt, E. 1995. "BLV Handbuch, Pilze", BLV Verlagsgesellschaft mbH, Munchen.
- Imazeki, R. and Hongo, T. 1975. "Colored illustrations of fungi of Japan", Hoikusha Pub., Osaka.
- Lampe, K. F. 1979. Toxic fungi. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 19: 85-104.
- Lincoff, G. H. 1992. The Audubon Society field guide to North American mushrooms. Alfred A. Knopf, New York.
- Oh, J. Y. and Chung, K. S. 1998. Flow cytometrical analysis of the antitumor and immunomodulatory activities of GLB-A and GLB-B, the protein-polysaccharide fractions of the growing tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji* 42: 487-493.
- Seeger, R., Kraus, H. and Wiedmann, R. 1973. Presence of hemolysins in *Amanita* species. *Arch. Toxicol.* 30: 215-226.
- _____. 1975a. Demonstration and isolation of phallolysin, a haemolytic toxin from *Amanita phalloides*. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 287: 277-287.
- _____. 1975b. Some physico-chemical properties of phallolysin obtained from *Amanita phalloides*. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 288: 155-162.
- _____, Burkhardt, M., Haupt, M. and Feulner, L. 1976. The haemolytic effect of phallolysin. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 293: 163-170.
- _____, and Bunsen, E. 1980. Degranulation of rat mast cells *in vitro* by the fungal cytolytins phallolysin, rubescenslysin and fascicularelysin. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 315: 163-166.
- _____, Odenthal, K. P. and Mengs, U. 1981. Toxic effects in mouse and rat of rubescenslysin from *Amanita rubescens*. *Toxicol.* 19: 409-417.
- Seitz, J., Adler, G., Stofft, E. and Faulstich, H. 1981. The mechanism of cytolysis of erythrocytes by the mushroom toxin phallolysin. Morphological and biochemical evidence for sodium influx and swelling. *Eur. J. Cell. Biol.* 25: 46-53.
- Wieland, T. and Faulstich, H. 1978. Amatoxins, phallolysin, and antamanide. The biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC. Crit. Rev. Biochem.* 5: 185-260.