

# 산지별 상황버섯의 사이토카인 조절 효과에 관한 연구

김진수<sup>1</sup> · 김정효<sup>2</sup> · 이효정<sup>3</sup> · 길재호<sup>3</sup> · 김성훈<sup>4\*</sup> · 김동희<sup>1</sup>

1: 대전대학교 한의과대학, 2: 조선대학교 간호과대학, 3: 경희대학교 체육대학, 4: 경희대학교 동서의학대학원

## A Study on Cytokine Modulating Effect of Three Origins of Phellinus Linteus

Jin Soo Kim<sup>1</sup>, Jung Hyo Kim<sup>2</sup>, Hyo Jeong Lee<sup>3</sup>, Jae Ho Khil<sup>3</sup>, Sung Hoon Kim<sup>4\*</sup>, Dong Hee Kim<sup>1</sup>

1: Oriental Medical College, Daejeon University, 2: Nursing college, Chosun University, 3: Department of Sports science, Kyunghee university, 4: Department of Oncology, Kyunghee university.

Pellinus linteus has been used for the prevention of cancer traditionally. There are three origins of Pellinus linteus, Korea, China and Cambodia. However, their immunological activities were not evaluated comparatively. Thus, this study was done to evaluate immunomodulatory effects of Phellinus linteus(PL) from Korea, china and cambodia. We confirmed PL showed two major protein bands, 50 kDa and 80 kDa by protein analysis. These PL effectively upregulated the expressions of IL-2 at 10 ug/ml and GM-CSF, IL-4,IL-10,IL-12(p35), IL-12(p40), IL-18, IFN-r in all concentrations. However, Korea-PL upregulated the expression of IL-12 more effectively than the other PLs. It intended to increase NO with no significance. Those results indicate Phellinus linteus had cytokine modulating effect

Key words : Pellinus linteus, Korea-PI, China-PI, Cambodia-PI, cytokine, three origins, IL-12

### 서 론

상황버섯은 소나무 비늘버섯과의 진흙버섯(Phellinus)에 속하는 흰색 부후균이다. 이 버섯은 뽕나무와 활엽수 줄기에 자생하며, 보통 명은 목질진흙버섯(Phellinus linteus)이라고 하며, 중국, 캄보디아, 한국, 일본 등에서 자생 또는 재배하고 있다<sup>1)</sup>. 한의학 문헌에 나타난 상황버섯의 본초효능으로 허<sup>2)</sup>는 동의보감(東醫寶鑑)에서 桑木耳(삼목이)라하며 “性은 平微甘하고 微毒하며 主腸風, 瀉血 및 婦人腹痛, 崩漏, 下赤白 등을 치료하며 一名 桑黃이라고도 불리운다”라 하였으며, 李는 본초강목(本草綱目)에서 木耳(목이), 상이(桑耳), 상황(桑黃), 상신(桑臣), 桑上寄生(상상기생), 桑穉(상누), 桑鷄(상계), 桑蛾(상아) 등으로 언급하였으며, 본초효능은 기미가 甘平有毒(감평유독)하여 黑桑黃(흑상황)은 “婦人崩漏 下赤白汁 血病 癥瘕 痰癖 積聚 陰痛 陰陽寒熱 無子 月經不調” 등을, 金桑黃(금상황)은 “癖飲 積聚 腹痛 金瘡 女人崩漏 帶下 月閉 血凝 產後血凝 男子疥癬 止血吐 腸風瀉血 婦人心腹痛 利五臟 宣腸胃氣 排毒氣” 등을 다스리는 효능이 있다고 하여 상

황이 어혈, 혈병, 종양 등의 치료에 활용되고 가능성을 시사하고 있다. 최근의 상황버섯에 대한 연구로 일본 국립 암 연구 센터의 화학 연구실장이던 치하라 박사 팀은 sarcoma 180 고형 암에 대해서 종양 저지를 96.7%, 종양 완전퇴축 7/8 이라는 결과를 보고한 이래, 한 등<sup>3)</sup>은 국산 상황의 항암 및 항전이 효과를, 김 등<sup>4)</sup>은 국산 상황 다당체의 면역조절작용을, 송 등<sup>5)</sup>은 상황 다당체의 B 세포 자극효과를 보고하는 등, 상황버섯에서 추출한 다당체들이나 배양된 균사체를 이용한 다양한 면역 및 항암효과 연구가 주로 이루어졌다. 이와 같이 상황에 대한 연구는 주로 한국에서 국산 상황을 중심으로 이루어졌지만 상황을 산지별로 효능 비교한 연구는 거의 없다. 이에 저자는 이들 산지별 상황버섯의 효능을 비교하는 일환으로 먼저 면역조절작용에서 중요한 역할을 하는 Th1과 Th2관련 사이토카인을 중심으로 분자생물학적으로 발현 정도를 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 동물 및 약재

實驗 動物은 韓國化學研究所에서 購入한 雌性 BALB/C를 購入하여, 1週日 동안 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하

\* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서천리 1, 경희대학교 동서의학대학원 · E-mail : sungkim7@khu.ac.kr · Tel : 031-201-2179 · 접수 : 2003/03/21 · 수정 : 2003/04/27 · 채택 : 2003/07/15

었다. 動物 飼育室의 條件은 conventional system으로 22±2℃, 1 日中 12時間은 200-300 Lux로 照明하고, 12時間은 모든 빛을 遮斷하였다. 飼料는 固形飼料(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 充分히 供給하였다. 本 實驗에 使用한 상황버섯은 각각 캄보디아산 大(PI-K1), 中(PI-K2), 小(PI-K3), 중국산(PI-China) 및 한국산(PI-Korea)으로 표시하여 사용하였다.

2. 시료의 제조

PI-K1, PI-K2, PI-K3, PI-China 및 PI-Korea 각각 200g에 蒸溜水 1,000ml을 添加하여 熱湯 抽出器에서 3時間 동안 抽出하여 抽出液을 얻고, 이를 吸入 濾過하여 濾液을 減壓蒸溜裝置(Rotary evaporator, Buchi 461, switzerland)로 減壓 濃縮하고, 濃縮液을 다시 凍結 乾燥器(Freeze dryer, FDU-540, Eyla, U.S.A)를 이용, 完 전건조한 시료를 실험에 사용하였다.

3. RT-PCR analysis

1) 脾臟細胞內 cytokine 發顯 探索

正常 BALB/C 생쥐의 脾臟을 摘出하여 脾臟 細胞를 分離한 後 우태아 혈청 결핍 RPMI-1640 培養液에서 1시간 동안 培養한 後 PI(100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml)를 處理하고 3時間 동안 培養器(37℃, CO<sub>2</sub>, Napco, USA)에 培養하였다. PI를 처리한 세포를 RNazol을 이용하여 total RNA를 抽出하였다. 추출한 RNA를 정량하여 3µg의 RNA를 Oligo dT와 M-MLV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성한 후 합성한 cDNA를 template로 하여 Table 1.에서 제시한 primer(IL-2,4,6,12, INF-γ, TNF-α)로 PCR 방법으로 증폭하였다. 이때 internal control로 β-actin을 사용하였다. 증폭한 PCR 산물들을 1% agarose gel 상에서 전기영동 하여 확인하였다. PCR product의 양은 Windows 1D main program (AAB, USA)을 이용하여 최고값 (height, Ht)으로 測定하였다.

Table 1. Oligonucleotide Sequence of Primers

Gene	Primer	Sequence
β-actin	Sense	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAC-3'
	Antisense	5'-TAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
IL-2	Sense	5'-CTCCTTGTCAACAGCGCAC-3'
	Antisense	5'-TCAACAGCTCCAGGTGC-3'
IL-4	Sense	5'-ATTGCTCTCTCGTCACTGACG-3'
	Antisense	5'-TGTGAGGACGTTTGGCACATC-3'
IL-6	Sense	5'-ATTGCTCTCTCGTCACTGACG-3'
	Antisense	5'-TGTGAGGACGTTTGGCACATC-3'
IL-12	Sense	5'-ATCTGCTGCTCCACAAGAAG-3'
	Antisense	5'-TGATGAAGAAGCTGGTGCTG-3'
INF-γ	Sense	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3'
	Antisense	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
TNF-α	Sense	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3'
	Antisense	5'-GTCACAGTTTTCAGCTGTATAGGG-3'

4. 통계처리

다양한 實驗으로부터 얻은 結果는 mean±standard error로 記錄하였다. 有意性 檢證은 Student's t-test 分析 方法을 이용하여 決定하였다.

결 과

1. GM-CSF 遺傳子 發顯에 미치는 效果

GM-CSF 標準 指標 遺傳子(Internal control)는 β-actin이 使用되었다. GM-CSF NC(C) Ht값(lane 1,12)은 219로 나타났고, 陽性 對照群인 Con-A 投與群은 10µg/ml(lane 2,13) 濃度에서 229로 나타났으며, PI-K1 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml(lane 3, 4, 5) 濃度 投與群에서는 각각 228, 229, 228로, PI-K2 100µg/ml, 10µg/ml, 1 µg/ml(lane 6, 7, 8) 濃度 投與群에서는 각각 228, 228, 229로, PI-K3 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml(lane 9, 10, 11) 濃度 投與群에서는 각각 229, 228, 228로, PI-China 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml (lane 14, 15, 16) 濃度 投與群에서는 각각 229, 230, 228로, PI-Korea 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml(lane 17, 18, 19) 濃度 投與群에서는 각각 222, 213, 232로 나타나 모든 濃度에서 增加하였다. GM-CSF 標準 指標 遺傳子(Internal control)는 β-actin이 使用 되었다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Effects of PI on GM-CSF Gene Expression in Splenic Cells Culture

Drugs	Dose (µg/ml)	GM-CSF gene expression(Ht)
PBMC		219
Con A	10	229
	100	228
PI-K1	10	229
	1	228
	100	228
PI-K2	10	228
	1	229
	100	229
PI-K3	10	228
	1	228
	100	229
PI-China	10	230
	1	228
	100	222
PI-Korea	10	213
	1	232

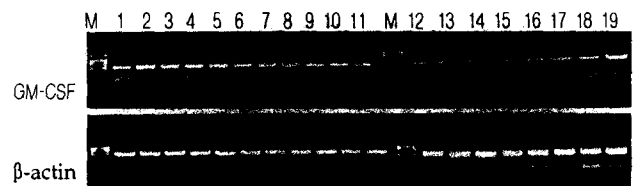


Fig. 1. Effects of PI on GM-CSF gene expression in splenic cell culture. BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1), 10 µg/ml Con-A (lane 2), 100 µg/ml PI-K1 (lane 3), 10 µg/ml PI-K1 (lane 4), 1 µg/ml PI-K1 (lane 5), 100 µg/ml PI-K2 (lane 6), 10 µg/ml PI-K2 (lane 7), 1 µg/ml PI-K2 (lane 8), 100 µg/ml PI-K3 (lane 9), 10 µg/ml PI-K3 (lane 10), 1 µg/ml PI-K3 (lane 11), 100 µg/ml PI-China (lane 14), 10 µg/ml PI-China (lane 15), 1 µg/ml PI-China (lane 16), 100 µg/ml PI-Korea (lane 17), 10 µg/ml PI-Korea (lane 18), 1 µg/ml PI-Korea (lane 19) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20µl reaction volume containing with 3µg total RNA and oligo d(T). And 3 µl of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized β-actin cDNA products by RT-PCR was used in internal control. M : 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods

2. IL-2 遺傳子 發顯에 미치는 效果

IL-2의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는 β-actin이 使用

되었다. IL-2 NC(C) Ht값(lane 1,12)은 147로 나타났고, 양성 對照群인 Con-A 投與群은 10 $\mu$ g/ml(lane 2,13) 濃度에서 213으로 나타났으며, PI-K1 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 3, 4, 5) 濃度 投與群에서는 각각 213, 197, 78로, PI-K2 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 6, 7, 8) 濃度 投與群에서는 각각 75, 79, 81로, PI-K3 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 9, 10, 11)濃度 投與群에서는 각각 77,161,60으로 나타났으며, IL-2 NC(C) Ht값(lane 1,12)은 51로 나타났고, 양성 對照群인 Con-A 投與群은 10 $\mu$ g/ml(lane 2,13) 濃度에서 213으로 나타났으며,PI-China 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml (lane 14, 15, 16) 濃度 投與群에서는 각각 81, 184, 201로, PI-Korea 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 17, 18, 19) 濃度 投與群에서는 각각 82, 161, 84로 나타나, 모든 濃度에서 增加하였다 (Table 3, Fig. 2).

Table 3. Effects of PI on IL-2 Gene Expression in Splenic Cells Culture

Drugs	Dose ( $\mu$ g/ml)	IL-2 gene expression(Ht)
PBMC		147
Con A	10	213
	100	213
PI-K1	10	197
	1	78
	100	75
PI-K2	10	79
	1	81
	100	77
PI-K3	10	161
	1	60
PBMC		51
Con A	10	208
	100	81
PI-China	10	184
	1	201
	100	82
PI-Korea	10	161
	1	84

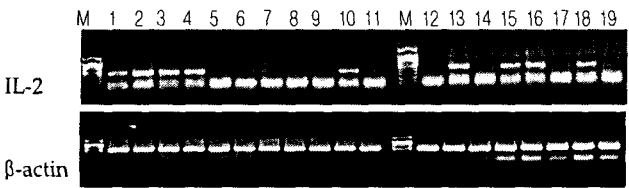


Fig. 2. Effects of PI on IL-2 gene expression in splenic cell culture.. BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1,12), 10  $\mu$ g/ml Con-A (lane 2,13), 100  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 3), 10  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 4), 1  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 5), 100  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 6), 10  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 7), 1  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 8), 100  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 9), 10  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 10), 1  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 11) 100  $\mu$ g/ml PI-China (lane 14), 10  $\mu$ g/ml PI-China (lane 15), 1  $\mu$ g/ml PI-China (lane 16), 100  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 17), 10  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 18), 1  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 19) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20  $\mu$ l reaction volume containing with 3  $\mu$ g total RNA and oligo d(T). And 3  $\mu$ l of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized  $\beta$ -actin cDNA products by RT-PCR was used in internal control. M : 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

3. IL-4 遺傳子 發顯에 미치는 효과

IL-4의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는  $\beta$ -actin이 使用되었다. IL-4 NC(C) Ht값(lane 1,12)은 195로 나타났고, 양성 對

照群인 Con-A 投與群은 10 $\mu$ g/ml(lane 2,13) 濃度에서 224로 나타났으며, PI-K1 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 3, 4, 5) 濃度 投與群에서는 각각 212, 213, 211로, PI-K2 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 6, 7, 8) 濃度 投與群에서는 각각 179, 147, 187로, PI-K3 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 9, 10, 11) 濃度 投與群에서는 각각 192, 208, 203으로 나타났으며,PI-China 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 14, 15, 16) 濃度 投與群에서는 각각 224, 221, 222로, PI-Korea 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 17, 18, 19) 濃度 投與群에서는 각각 222, 218, 220으로 나타났다(Table 4, Fig. 3).

Table 4. Effects of PI on IL-4 Gene Expression in Splenic Cells Culture

Drugs	Dose ( $\mu$ g/ml)	IL-4 gene expression(Ht)
PBMC		195
Con A	10	224
	100	212
PI-K1	10	213
	1	211
	100	179
PI-K2	10	147
	1	187
	100	192
PI-K3	10	208
	1	203
	100	224
PI-China	10	221
	1	222
	100	222
PI-Korea	10	218
	1	220

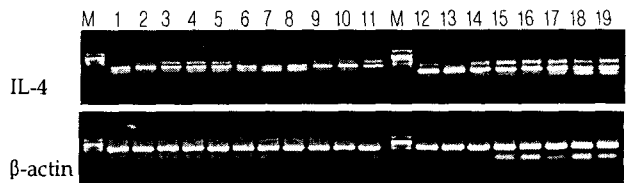


Fig. 3. Effects of PI on IL-4 gene expression in splenic cell culture. BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1,12), 10  $\mu$ g/ml Con-A (lane 2,13), 100  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 3), 10  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 4), 1  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 5), 100  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 6), 10  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 7), 1  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 8), 100  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 9), 10  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 10), 1  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 11),100  $\mu$ g/ml PI-China (lane 14), 10  $\mu$ g/ml PI-China (lane 15), 1  $\mu$ g/ml PI-China (lane 16), 100  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 17), 10  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 18), 1  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 19) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20  $\mu$ l reaction volume containing with 3  $\mu$ g total RNA and oligo d(T). And 3  $\mu$ l of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized  $\beta$ -actin cDNA products by RT-PCR was used in internal control. M : 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

4. IL-12(p35) 遺傳子 發顯에 미치는 효과

IL-12(p35)의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는  $\beta$ -actin이 使用되었다. IL-12(p35) NC(C) Ht값(lane 1,12)은 176으로 나타났고, 양성 對照群인 Con-A 投與群은 10 $\mu$ g/ml(lane 2,13) 濃度에서 228로 나타났으며, PI-K1 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 3, 4, 5) 濃度 投與群에서는 각각 228, 228, 173으로, PI-K2 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 6, 7, 8) 濃度 投與群에서는 각각 226, 228, 225로, PI-K3 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 9, 10, 11) 濃度 投

與群에서는 각각 190, 227, 212으로, PI-China 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 14, 15, 16) 濃度 投與群에서는 각각 163, 164, 159로, PI-Korea 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 17, 18, 19) 濃度 投與群에서는 각각 214, 211, 216으로 나타났다(Table 5, Fig. 4)

Table 5. Effects of PI on IL-12 (p35) Gene Expression in Splenic Cells Culture

Drugs	Dose ( $\mu$ g/ml)	IL-12(p35) gene expression(Ht)
PBMC		176
Con A	10	228
	100	228
	1000	228
PI-K1	10	228
	1	173
	100	226
PI-K2	10	228
	1	225
	100	190
PI-K3	10	227
	1	212
	100	163
PI-China	10	164
	1	159
	100	214
PI-Korea	10	211
	1	216

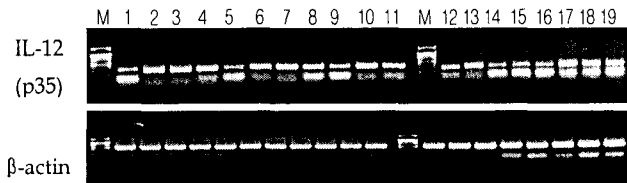


Fig. 4. Effects of PI on IL-12 (p35) gene expression in splenic cell culture. BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1,12), 10  $\mu$ g/ml Con-A (lane 2,13), 100  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 3), 10  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 4), 1  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 5), 100  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 6), 10  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 7), 1  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 8), 100  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 9), 10  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 10), 1  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 11), 100  $\mu$ g/ml PI-China (lane 14), 10  $\mu$ g/ml PI-China (lane 15), 1  $\mu$ g/ml PI-China (lane 16), 100  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 17), 10  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 18), 1  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 19) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20  $\mu$ l reaction volume containing with 3  $\mu$ g total RNA and oligo d(T). And 3  $\mu$ l of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized  $\beta$ -actin cDNA products by RT-PCR was used in internal control. M : 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

5. IL-12(p40) 遺傳子 發顯에 미치는 효과

IL-12(p40)의 標準 指標 遺傳子(Internal control)는  $\beta$ -actin이 使用되었다. IL-12(p40) NC(C) Ht값(lane 1,12)은 186로 나타났고, 陽性 對照群인 Con-A 投與群은 10 $\mu$ g/ml(lane 2,13) 濃度에서 223으로 나타났으며, PI-K1 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 3, 4, 5) 濃度 投與群에서는 각각 189, 180, 182로, PI-K2 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 6, 7, 8) 濃度 投與群에서는 각각 179, 182, 189로, PI-K3 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 9, 10, 11) 濃度 投與群에서는 각각 186, 193, 204로 PI-China 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 14, 15, 16) 濃度 投與群에서는 각각 219, 205, 202로, PI-Korea 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 17, 18, 19) 濃度 投與群에서는 각각 220, 218, 184로 나타났다(Table 6, Fig. 5).

Table 6. Effects of PI on IL-12(p40) Gene Expression in Splenic Cells Culture

Drugs	Dose ( $\mu$ g/ml)	IL-12(p40) gene expression(Ht)
PBMC		186
Con A	10	223
	100	189
	1000	180
PI-K1	10	180
	1	182
	100	179
PI-K2	10	182
	1	189
	100	186
PI-K3	10	193
	1	204
	100	219
PI-China	10	205
	1	202
	100	220
PI-Korea	10	218
	1	184

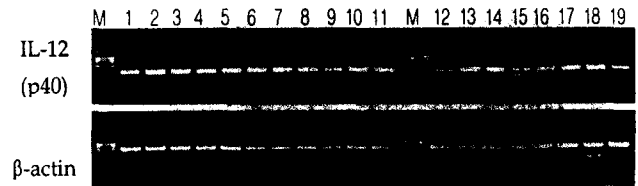


Fig. 5. Effects of PI on IL-12 (p40) gene expression in splenic cell culture. BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1), 10  $\mu$ g/ml Con-A (lane 2), 100  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 3), 10  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 4), 1  $\mu$ g/ml PI-K1 (lane 5), 100  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 6), 10  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 7), 1  $\mu$ g/ml PI-K2 (lane 8), 100  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 9), 10  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 10), 1  $\mu$ g/ml PI-K3 (lane 11), 100  $\mu$ g/ml PI-China (lane 14), 10  $\mu$ g/ml PI-China (lane 15), 1  $\mu$ g/ml PI-China (lane 16), 100  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 17), 10  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 18), 1  $\mu$ g/ml PI-Korea (lane 19) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20  $\mu$ l reaction volume containing with 3  $\mu$ g total RNA and oligo d(T). And 3  $\mu$ l of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized  $\beta$ -actin cDNA products by RT-PCR was used in internal control. M : 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

6. IFN- $\gamma$  遺傳子 發顯에 미치는 효과

IFN- $\gamma$  標準 指標 遺傳子(Internal control)는  $\beta$ -actin이 使用되었다. IFN- $\gamma$  NC(C) Ht값(lane 1)은 221로 나타났고, 陽性 對照群인 Con-A 投與群은 10 $\mu$ g/ml(lane 2) 濃度에서 221로 나타났으며, PI-K1 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 3, 4, 5) 濃度 投與群에서는 각각 219, 218, 218로, PI-K2 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 6, 7, 8) 濃度 投與群에서는 각각 218, 220, 220으로, PI-K3 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 9, 10, 11) 濃度 投與群에서는 각각 221, 223, 223으로 나타났다(Table 7, Fig. 6).

IFN- $\gamma$  NC(C) Ht값(lane 12)은 53으로 나타났고, 陽性 對照群인 Con-A 投與群은 10 $\mu$ g/ml(lane 13) 濃度에서 214로 나타났으며, PI-China 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 14, 15, 16) 濃度 投與群에서는 각각 51, 211, 189로, PI-Korea 100 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml(lane 17, 18, 19) 濃度 投與群에서는 각각 181, 201, 212로 나타났다(Table 7, Fig. 6).

Table 7. Effects of PI on IFN- $\gamma$  Gene Expression in Splenic Cells Culture

Drugs	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	IFN- $\gamma$ gene expression(Ht)
PBMC		221
Con A	10	221
	100	219
PI-K1	10	218
	1	218
	100	218
PI-K2	10	220
	-	220
	100	221
PI-K3	10	223
	1	223
PBMC		53
Con A	10	214
	100	51
PI-China	10	211
	1	189
	100	181
PI-Korea	10	201
	1	212

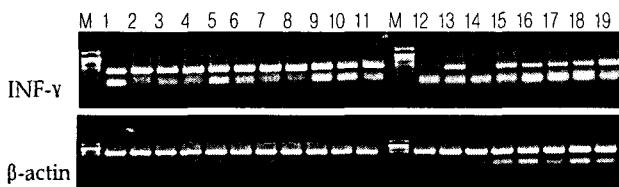


Fig. 6. Effects of PI on IFN- $\gamma$  gene expression in splenic cell culture. BALB/C splenic cells were activated with RPMI1640 medium (lane 1), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con-A (lane 2), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K1 (lane 3), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K1 (lane 4), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K1 (lane 5), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K2 (lane 6), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K2 (lane 7), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K2 (lane 8), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K3 (lane 9), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K3 (lane 10), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-K3 (lane 11), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-China (lane 14), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-China (lane 15), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-China (lane 16), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-Korea (lane 17), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-Korea (lane 18), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI-Korea (lane 19) for 3 hrs. Reverse transcription reactions were carried out 20  $\mu\text{l}$  reaction volume containing with 3  $\mu\text{g}$  total RNA and oligo d(T). And 3  $\mu\text{l}$  of resulting products were analyzed by PCR analysis. Synthesized  $\beta$ -actin cDNA products by RT-PCR was used in internal control. M : 100bp DNA ladder marker. Total RNA extraction and RT-PCR were carried out described in material and methods.

## 고찰

癌은 正常組織과는 달리 獨立的으로 자라 주변 組織을 浸潤하고 다른 組織으로 轉移되는 一種의 組織의 과잉 成長으로 현재 世界的으로 癌으로 인한 死亡이 1,2위가 되며 克服을 위한 努力이 全世界的으로 進行되고 있다.

癌의 發生은 發癌物質 등 環境의 要因과 바이러스 感染, 遺傳的 要因, 突然變異, 慢性刺戟 등에 의해 일정한 過程을 거쳐 癌細胞로 變形되면 癌細胞化와 癌成長 機轉을 거쳐 자라는데, 人體의 抗病 能力이 低下된 狀態에서는 免疫 防禦機能이 弱화되어 癌細胞化된 非正常細胞를 破壞 除去하지 못하게 되어 細胞調節機能을 잃고 增殖하게 되는 것이다. 癌에 대한 治療法으로 西洋醫學에서는 外科的 手術療法, 放射線療法, 化學療法 등이 多用되며 最近에는 免疫療法, 호르몬 療法등이 既存 治療法과 併用되거나 單獨으로 應用되고 있다. 하지만 이러한 治療法은 癌의 耐性を 誘發하고 끊임없이 變種細胞를 生成하고 있으며, 人體의 正常組織과 기관에 대한 毒性에 強하여 患者에게 消化器 障礙, 免疫機

能低下, 骨髓機能抑制, 身體衰弱, 炎症反應 등의 副作用을 誘發하는 短點이 많이 나타나고 있다. 이에 따라 이러한 副作用을 줄일 수 있는 物質, 또는 免疫系를 調節함으로써 癌의 增殖을 抑制할 수 있는 方法을 찾기 위한 努力이 活發하게 進行되고 있다. 이에 著者は 臨床에서 이미 抗癌效果가 認定된 桑黃버섯의 抗癌 효과를 사이토카인 면역조절 작용과 관련하여 연구하고자 하였다. 본 實驗의 試料인 桑黃버섯은 甘辛, 無毒한 性味를 가지고 있고, 止血, 活血, 化飲, 止瀉 등의 效能이 있어 血崩, 血淋, 脫肛瀉血, 帶下, 經閉, 癥瘕積聚, 癰陰, 脾虛泄瀉, 產後血凝 등을 치료한다<sup>23)</sup>. 脾臟은 생쥐와 기타 動物에서 造血機能(hematopoiesis)의 主要 部位이며, 免疫細胞를 위주로 한 血球과 血小板의 貯藏機關으로 알려져 있다. 사람에 있어서는 成人의 경우 造血機能이 대부분 骨髓에서 일어나지만, 胎兒期때나 骨髓의 非正常的 擴張에 의한 疾患의 경우 脾臟에서도 造血作用이 일어난다. 이러한 까닭에 實驗動物에서의 脾臟은 免疫機能과 造血機能의 實驗材料로서 適切하게 여겨지고 있다. Cytokine은 免疫反應의 調節이 主機能인 peptide로써, 각각 固有의 收容體를 통하여 免疫細胞의 成長과 分化의 complex network에서 多様な 機能을 나타낸다. 즉 細胞의 活性, 增殖 및 分化를 調節함으로써 正常人の 成長 및 發育에 關與할 뿐만 아니라, 여러 疾病의 pathogenic mediator로서 作用하여 疾病의 發生 및 治愈에 關與함이 알려지고 있다. Interleukin(between leukocytes)이라는 用語는 Arden등이 1979년 처음으로 使用하기 始作한 후 1986년 제 6차 International Congress of Immunology에서 公式的으로 Interleukin 命名法을 導入하기로 하였다. 이때 정해진 IL의 定義는 "lymphocyte나 antigen presenting cell들에 의하여 分泌되는 immunoregulatory molecule"로서 새로운 peptide의 amino acid sequence가 決定되면 IL뒤에 일련의 번호가 붙여진다. 현재 IL-1에서 IL-14까지가 報告되었고 IL의 범주에 들어가면서도 이들의 독특한 生理活性을 그대로 나타내는 원래 이름을 사용하는 IFNs, TNFs, CSFs 등의 cytokine들도 있다.

本 實驗에서는 多様な cytokine중 GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12(p35), IL-12(p40), IFN- $\gamma$  및 IL의 範圍에 들어가면서도 이들의 獨特한 生理活性을 나타내는 TNF- $\alpha$ 의 發顯을 PCR을 통하여 探索하여 보았다. 먼저 주로 활성화된 Tcell, Macophage, endothelial cell, neutrophils와 monocyte의 생성을 증가시키는 bone marrow에서 활성화되는 stromal fibroblast에 의해 만들어지는 cytokine인 Granulocyte monocyte colony stimulating factor(GM-CSF)의 유전자발현을 보았으며 모든 시료의 모든 濃度에서 增加하였다<sup>36)</sup>. 그 중에서도 PI-Korea 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度에서 가장 많이 증가되었다(Table 2, Fig. 1). 두번째로 T 細胞에서 生産되고 T 세포의 分化와 增殖을 促進시키며, NK 細胞의 cytolytic activity와 LAK (lymphocyte activated killer) 細胞의 活性化에 關與하고, 活性化된 B 細胞의 增殖과 Ig 分泌를 增進시키는 것으로 알려진 IL-2의 發顯量 檢索에서는 低濃度에서 遺傳子 發顯이 增加되었으나, 有意性있는 結果는 나타나지 않았다<sup>33)</sup>. (Table 3, Fig. 2). IL-4는 B 세포의 增殖에 anti-IgM 抗體와 함께 作用하는 lymphokine으로 처음 알려졌으며<sup>34)</sup>, TH2 細胞로부터 生産되

어 B 세포의 증식과 분화에 關與할 뿐만 아니라 T 세포, 大食細胞, mast 細胞의 成長因子로 休止期 B 細胞 表面의 class II MHC molecule을 增加시키며, IgE의 Fc 部位에 대한 low-affinity receptor(FcεR II, CD23)의 發顯을 增加시킨다고 알려져 있다<sup>34,35</sup>. 本 實驗에서는 IL-4의 發顯量이 濃度 依存的으로 增加되었으며, 特히 PI-Korea 100μg/ml 濃度에서 陰性對照群에 比하여 23.5% 增加하였다(Table 4, Fig. 3). IL-12는 p35-197 a.a 와 p40-306 a.a, heterodimer로 IL-2와 같이 處理했을때 NK 細胞, LAK 細胞 및 cytotoxic T 細胞를 活性化시키고 B lymphoblastoid 細胞로부터 生産된다<sup>37,38,39,41</sup>. 本 實驗에서는 p40 에서는 PI- K1,K2,K3에서의 對照群과 큰 差異를 보이지 않았으나, 特히 PI-Korea의 모든 濃度에서 증가하였음을 보여주었다 (Table 6, Fig. 5). p35에 對하여서는 陽性對照群과 더불어 PI-K1,K2,K3와 PI-Korea의 모든 濃度에서 큰 폭으로 遺傳子 發顯이 增加하였다. 特히 PI-K1,K2,K3의 모든 濃度에서 증가하였다 (Table 5, Fig. 4). IL-12가 IFN-γ에 의하여 誘導되는 IP-10(IFN-γ inducible 10kDa protein, a potent inhibitor of angiogenesis)에 의하여 調節되고 또한 抗血管 機能도 報告되고 있어, 이 같은 結果는 CAM 結果와 상응되는 점이다. IFN-γ는 T 細胞와 NK 細胞에서 生産되고 Class II MHC 發顯과 B細胞 增殖分化, 大食細胞의 活性化에 關與하며 IL-2 및 IL-4의 生産을 抑制하고 IgE 抗體와 IgG1 抗體를 抑制하나 IgG2a 抗體 生産은 촉진하는 것으로 알려져 있는데<sup>40</sup>, 本 實驗에서는 PI-K1,K2,K3는 대조군과 別 차이를 보이지 않았으나 PI-China와 PI-Korea에서 대조군에 比 해 큰폭으로 증가했음을 보여 주었으며 PI-China 10ug/ml에서 더욱더 증가했음을 보여주었다(Table 7, Fig. 6).

이상의 결과로 보아 상황버섯은 免疫 調節作用을 통하여 抗 癌效果를 발휘할 수 있을 것으로 思料되며, 이러한 淋巴球를 비롯한 免疫細胞들은 lymphokine 또는 cytokine을 분비하여 各 細胞에 信號를 보내면서 細胞間에 상호정보를 전달하거나 仲介하여 細胞增殖 및 細胞分化에 關與함으로써 免疫調節에 參與하는 것으로 보이나 보다 상세한 기전연구와 동물실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

산지별 상황버섯의 사이토카인을 통한 免疫調節作用을 실험 적으로 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다. Granulocyte monocytic colony stimulating factor(GM-CSF)의 유전자발현에서 는 모든시료의 모든 濃度에서 增加하였지만, 그 중에서도 PI-Korea 1ug/ml의 濃度에서 가장 많이 증가되었다. IL-2의 遺傳子 發顯은 對照群에 比하여 低濃度에서 遺傳子 發顯이 增加되었으나 유의성있는 結果는 나타나지 않았다. IL-4의 遺傳子 發顯은 對照群에 比하여 濃度依存的인 增加를 나타내었고, 特히 100 μg/ml 濃度에서 陰性對照群에 比하여 23.5% 增加하였다. IL-12의 遺傳子 發顯은 p40에서는 PI-K1,K2,K3에서의 對照群과 큰 差異를 보이지 않았으나, 特히 PI-Korea의 모든 濃度에서 증가하였음을 보여주었다. p35에 對하여서도 陽性對照群과 더불어 PI-K1,

K2,K3와 PI-Korea의 모든 濃度에서 큰 폭으로 遺傳子 發顯이 增加하였지만, 特히 PI-K1,K2,K3의 모든 濃度에서 증가되었다. IFN-γ의 遺傳子 發顯은 PI-K1,K2,K3는 대조군과 別 차이를 보이지 않았으나 PI-China와 PI-Korea에서 대조군에 比해 큰폭으로 증가되었으며 PI-China 10ug/ml에서 더욱 증가함을 보여주었다.

이상의 結果로 보아 상황버섯은 사이토카인 조절을 통해 抗癌效果를 나타내는 것으로 보이지만 상세한 기전연구와 동물 실험이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 Biogreen 21의 연구비 지원에 의해 수행되었기에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 박완희, 이호득: 한국약용버섯도감, 교학사, 558, 1999.
2. 허준: 동의보감, 남산당, 719, 1993.
3. 李時珍: 본초강목, 고문사, 980, 1975.
4. Han Sang-Bae, Lee Chang-Woo, Jeon Yong-Jin : The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* 41,157-164., 1999.
5. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID: Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol.*18(5):295-303, 1996.
6. Lee JH, Cho SM, Song KS, Hong ND, Yoo ID: Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immuno-stimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*44(5):1093-5, 1996.
7. Song KS, Cho SM, Lee JH, Kim HM, Han SB, Ko KS, Yoo ID.: B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 43(12):2105-8, 1995.
8. Greenberg J.T., Guo A., Klessig D. F., Ausubel F. M., : Programmed cell death in plants : a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77(4), p.551-63, 1994.
9. 邢雪梅 : 抗癌中藥의 生物治療效能研究近況, 한글판 中醫雜誌, No.3, pp. 85-90, 1994.
10. 尹星默 外 : 息賁湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響, 東醫病理學會誌, Vol.10, No.2, 1996.
11. 全英秀 : 加味慈桃丸의 抗癌 및 免疫增強效果에 關한 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院 博士學位論文, 1998.
12. 崔仁和 外 : 仙方活命飲의 抗癌 및 免疫反應에 關한 實驗的 研究, 慶熙韓醫大論文集, Vol.15, p.341, 1992.

13. 葉銘洪 : 治癌中藥及處方, 臺北, 花聯出版社, pp.1-10, 1996.
14. 方藥中 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.12-16, 621-635, 1986.
15. 郎偉君 : 抗癌中藥一千方, 北京, 中國醫藥技術出版社, pp.5-17, 1994.
16. 余桂清 : 歷代中醫腫瘤案論選粹, 北京, 北京出版社, pp.1-2, 1988.
17. Onogi N., Okuno M. : Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid, *Nutr Cancer*, 32(1) : 20-4, 1998.
18. Winer J., Jung CK., Shackel I., Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem.* 270(1):41-9, 1999.
19. Thorbecke, G. T. et al. : The affinity of the reticulo-endothelial system on the various serum proteins, *Brit. J. Exp. path.*, 41(2) ; 190-198, 1990.
20. Katsuyama K., Shichiri M. : NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(11) : 1796-1802, 1998.
21. 全國醫科大學教授 譯 : 오늘의 진단 및 치료, 도서출판 한우리, pp.69-71, 1999.
22. 儲水鑫 : 惡性腫瘤中醫調理四法, 上海中醫藥雜誌, 第7期, pp.33-34, 1992.
23. 全國韓醫科大學 本草學教授 共著 : 本草學, 서울, 永林社, pp.193-196, 201-202, 223-224, 302-306, 385-386, 414-415, 417-420, 423-425, 498-499, 531-538, 540-541, 556-557, 559-560, 568-569, 580-581, 594-597, 626-627, 1991.
24. 程劍華 外 : 抗癌植物藥及其驗方, 江西科學技術出版社, p.91, 159,272, 288, 1997.
25. 李權益 : 丹蔘의 抗癌 活性에 對한 實驗의 研究, 大田大學校 大學院 博士學位論文, 1995.
26. 金聖勳 : 白花蛇舌草의 抗癌活性, 忠南大學校 大學院 博士學位論文, 1994.
27. 閔昌泓 外 : 最新微生物學, 高文社, p.79, 1989.
28. Janis Kuby : Immunology(second edition), W.H. Freeman and Company, p.3, p.10, pp.47-52, pp.85-92, 1994.
29. Sell, S. : Cell-mediated immunity in vitro in immunology, immunopathology and immunity, Hagerstown, Maryland, Harpes & Row Pub., pp.144~171, 1980.
30. Janis Kuby : Immunology(second edition), W.H. Freeman and Company, p.3, p.10, pp.47-52, pp.85-92, 1994.
31. 金周德 外 : 로이트必須免疫學, 高文社, pp.2~15, pp.20~30, 1991.
32. Balkwill F. R. : Interferons. In *Cytokines in cancer therapy*. Oxford University Press, 1989
33. Smith K. A. : Interleukin-2 ; Inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-76, 1988
34. Yokota T, Arai N, de Vries J. et al: Molecular biology of interleukin-4 and interleukin-5 genes and biology of their products that simulate B cells, T cell and hemopoietic cells. *Immunol Rev* 102:137-87, 1988
35. Snapper C.M., Finkelman F.D., Paul W.E.: Regulation of IgG2 and IgE production by interleukin-4. *Immunol Rev* 102:29-56, 1988.
36. Mitani H., Katayama N., Araki H., Ohishi K., Kobayashi K., Suzuki H., Nishii K., Masuya M., Yasukawa K., Minami N., Shiku H. Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br J Haematol.* 109(2):288-95, 2000.
37. Brunda, M. J., L. Luistro, L. Rumennik, R. B. Wright, J. M. Wigginton, R. H. Wiltrot, J. A. Hendrzak, and A. V. Palleroni. Interleukin-12: murine models of a potent antitumor agent. *Ann. NY Acad. Sci.* 795:266, 1996.
38. Nastala, C. L., H. D. Edington, T. G. McKinney, H. Tahara, M. A. Nalesnik, M. J. Brunda, M. K. Gately, S. F. Wolf, R. D. Schreiber, W. J. Storkus, and M. T. Lotze. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-g production. *J. Immunol.* 153:1697, 1994.
39. Atkins, M. B., M. J. Robertson, M. Gordon, M. T. Lotze, M. DeCoste, J. S. DuBois, J. Ritz, A. B. Sandler, H. D. Edington, P. D. Garzone, J. W. Mier, C. M. Canning, L. Battiato, H. Tahara, and M. L. Sherman. . Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* 3:409, 1997.
40. Okamura, H., H. Tsutusui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Hattori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, F. Shigeharu, and M. Kurimoto. Cloning of a new cytokine that induces IFN-g production by T cells. *Nature* 378:88, 1995.
41. Angiolillo, A. L., C. Sgadari, and G. Tosato. A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin 12. *Ann. NY Acad. Sci.* 795:158, 1996.