

큰갯버섯(*Lepiota procera*) 추출물의 면역자극 활성화에 의한 항암 증진 효과

김도희 · 한경훈 · 송관영 · 이계희 · 조선영¹ · 이석원¹ · 윤택준^{1*}
서울의료원 의학연구소, ¹유한대학 식품영양과

Activation of Innate Immunity by *Lepiota procera* Enhances Antitumor Activity

Doh-Hee Kim, Kyung-Hoon Han, Kwan-Yong Song, Kye-Heui Lee, Sun Young Jo¹,
Seog-Won Lee¹ and Taek Joon Yoon^{1*}

Division of Clinical Research, Medical Institute, Seoul Medical Center, Seoul 135-740, Korea

¹Department of Food & Nutrition, Yuhan University, Bucheon 422-749, Korea

Abstract – The present study was designed to explore an immunostimulating activity of crude extracts of *Macrolepiota procera*, and a combination therapy of cisplatin and *Macrolepiota procera* extracts which can potentiate the anti-cancer activity of cisplatin. For these, water extraction of *Macrolepiota procera* were performed at 4°C(MPE-4) and 100°C(MPE-100). In experimental metastasis of colon26-M3.1 cells, prophylactic intravenous administration of MPE (80-2,000 µg/mouse) inhibited tumor metastasis compared with tumor control. Peritoneal macrophages stimulated with MPE produced IL-12 as well as induced tumoricidal activity. In an analysis of NK-cell activity, i.v. administration of MPE (200 µg/mouse) significantly augmented NK cytotoxicity to YAC-1 tumor cells. The combination treatments of cisplatin (20 µg) and MPE (100 µg) exhibited prolongation of lifespan in colon26-M3.1 tumor bearing mouse. These results suggested that MPE stimulate immune system non-specifically and application as adjuvant in cancer treatment.

Key words – *Macrolepiota procera*, macrophage, NK-cell, metastasis, synergistic activity

여러 가지 생약 중에서 버섯류는 항암활성을 가지는 가장 대표적인 물질로 보고되고 있다.¹⁾ 즉, 여러 가지 버섯의 자실체 및 균사체는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 높은 항암활성을 가지고 있으며 버섯의 다당체인 lentinan 등은 면역증강 활성화에 의한 항암활성이 인정되어 이미 실용화 되어 있다.¹⁻³⁾ 버섯 추출물 혹은 버섯으로부터 분리한 성분은 높은 선천 면역계를 활성화 시키고 이들과 항암제와의 병용투여는 높은 항암 상승작용이 있음을 보고하고 있다.⁴⁻⁵⁾ 한편, 우리나라를 포함하여 세계 각지에 분포하며 여름과 가을에 숲, 풀밭 등에서 서식하는 큰갯버섯(*Macrolepiota procera*)은 주름버섯과(Agaricaceae)에 속한다. 특히 큰갯버섯은 우리나라 제주도의 말의 목장지대에서 많이 서식하기에 말뚝버섯 혹은 초이버섯으로 불리고 있다. 큰갯버섯은 식용버섯임에도 불구하고 생리활성에 대한 논문으로 항돌연변이원성⁶⁾ 및 항

산화작용⁷⁾에 대한 것이 일부 있지만, 다른 식용버섯의 생리활성 연구가 진행된 것과 비교하여 국내외에서 거의 연구가 되어 있지 않은 버섯 중의 하나이다.

악성종양 즉, 암의 발병과 그에 의한 희생은 현재 인류가 극복해야 할 가장 중요한 질병의 하나로 인식되고 있다. 암의 극복을 위하여 전통적으로 수술요법(surgery), 방사선요법(radiation therapy), 약물요법(chemotherapy)을 이용하고 있으나, 현재까지 1차암으로부터 전이력을 획득하여 원격전이를 일으킨 악성 종양세포에 대하여 완벽한 치료효과를 가지는 방법은 개발되지 않고 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 이의 대안으로 많은 학자들은 면역요법(immunotherapy) 및 기존의 치료방법을 혼합한 병용요법(combination therapy)이 암의 극복을 위해 개발되어야 할 가장 중요한 도구로 인정하고 있다.⁸⁾ 악성종양의 극복방법으로서의 종양 특이적인 면역요법(immunotherapy)은 생체내의 면역세포를 이용함으로써 다른 약물 혹은 방사선 요법에 비하여 부작용이 억제됨으로서 안전성

*교신저자 (E-mail): yoon_tj@yuhan.ac.kr
(Tel): +82-2-2610-0804

이 높은 가장 자연적인 치료방법으로 인정되고 있다.⁹⁾ 그러나 임상적으로 면역요법 단독으로는 재발과 전이와 같은 문제로 인해 치료효과의 한계를 보임으로서^{9,10)} 종양의 성장이나 전이를 억제하기 위하여 비특이적인 면역계를 자극시킬 수 있는 방법에 관한 여러 연구가 진행되었다. 예로서, 불활성화 시킨 bacteria나 bacteria의 대사산물인 lipopolysaccharide(LPS) 혹은 LPS 유도체 등은 면역계를 비특이적으로 자극시켜, 종양의 증식을 억제시키는 등 유효한 생물학적 활성이 인정되었으나 그들의 강한 독성 및 발열반응 등의 심각한 부작용으로 인하여 임상에는 적용하지 못하는 실정이다.¹¹⁾ 따라서 부작용이 없는 물질을 찾으려는 시도로써, 과거로부터 민간요법으로 사용되어온 생약에 대한 관심이 높아지고 있다.¹²⁾ 이러한 관점에서 종양에 대한 선천면역계를 자극하거나 항암제와 병용투여 할 수 있는 병용요법제재로서도 가장 가능성이 있는 생약의 탐색은 종양의 극복하기 위한 주요한 수단 하나가 될 것이다.^{2,3,12-14)} 특히 우리나라는 전통적으로 한방에서 여러 식물을 이용한 약제를 사용하여온 경험이 있기에, 이러한 후보 약제를 현대 과학에 접목하여 결과를 유도한다면 이는 이후 임상에 적용할 수 있는 약제로 가능성이 클 것으로 생각한다. 따라서 본 연구는 큰갯버섯 추출물의 선천면역계 자극 활성에 의한 종양전이 억제 효과 및 항암제와 병용투여에 의한 항암 상승작용에 대한 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 - 생후 6-8주령의 자성 BALB/c(20 g±1 g)를 (주)나라에서 분양 받아 유한대학 실험동물장에서 사육하였다. 마우스는 사육조에 5-10 마리씩 넣어 정수 된 물과 실험동물용 펠릿사료(Sam-yang Co Ltd, Incheon, Korea)를 자유 공급하였고, 온도 22°C, 습도 50%, 12시간 간격으로 자동 조명되는 상태에서 스트레스를 받지 않도록 주의하여 사육하였다.

큰갯버섯 추출물 제조 - 본 실험에 사용한 큰갯버섯은 강원도 양양군 강현면의 김영록님으로부터 기증받아 사용하였다. 큰갯버섯의 추출은 버섯 자실체를 세절하고 중량의 10배되는 증류수를 첨가한 후 4°C에서 16시간 추출(MPE-4) 혹은 100°C에서 2시간 동안 가열하여 추출(MPE-100)하였다. 각 추출물은 원심분리(1,800×g, 30 min)를 통하여 상등액을 회수 후 50 mg/ml의 농도로 조정하였다. 그 후 0.2 μm의 pore size를 가지는 membrane filter(Whatman, Philadelphia, PA, USA)를 이용하여 filter 후에 후 4°C에 보관하면서 실험에 적용하였다.

세포배양 및 세포독성 - 종양세포의 배양을 위한 RPMI-1640과 Eagle's minimal essential medium(EMEM) 배지, fetal bovine serum(FBS), vitamin solution, non-essential

amino acid, L-glutamic acid, thioglycollate 등은 Gibco (Carlsbad, CA, USA)사에서 구입하였다. 종양세포주인 colon26-M3.1 lung carcinoma 및 B16-BL6 melanoma의 배양은 7.5% FBS, vitamin solution, sodium pyruvate, non-essential amino acid, L-glutamine이 함유된 EMEM 배지를, macrophage 및 lymphocytes의 배양은 7.5% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하였으며 5% CO₂, 95% 습도 및 37°C의 배양기(Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA)에서 배양하였다. 시료의 종양세포에 대한 세포독성 조사를 위하여 5×10³/well의 밀도로 각 종양세포를 96-well plate의 각 well에 plating 한 후, 시료의 최종농도가 2 mg/ml 부터 31.3 μg/ml가 되게 조정 후 3일간 배양하였다. 각 물질의 세포 독성 효과는 WST-1을 이용하는 cell counting kit(EZ-Cytox, Daeil Lab. Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Macrophage로부터 생산된 Cytokine의 측정 - BALB/c 마우스에 3% thioglycollate를 1 ml 복강주사하고 3일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10 ml를 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수확한 PEC를 24 well culture plate에 1.5×10⁶/ml의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착 후, 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거 후 여러 농도(0.5 - 500 μg/ml)로 조정된 각 시료를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. Cytokine 생산을 위한 양성대조군으로는 lipopolysaccharide(LPS; 1 μg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다.¹⁴⁾ 배양완료 후, 배양 상등액에 유도 분비된 TNF-α 및 IL-12의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit(Pharmingen, San Jose, CA, USA)을 구입하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

NK-cell 활성 측정 - 6주령의 Balb/c 마우스에 200 μg의 각 시료를 정맥주사하고 3일 후에 마우스의 비장을 멸균적으로 취하여 비장세포(effector cell; E)를 준비하였다. U-bottomed 96-well plate에 마우스로부터 얻은 비장세포와 NK-sensitive 세포로 알려진 YAC-1 세포(target cell; T)를, E/T 비가 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1이 되도록 조정하여 6시간 동안 공동 배양하였다. 배양종료 후에 원심분리를 통하여 배양상등액을 취한 후 살해된 암세포가 유리한 LDH의 양을 kit를 이용하여 제조사(Promega)의 지침에 따라 측정하였다.

Cytotoxicity (%) = [(experimental release - spontaneous release)/(maximum release - spontaneous release)] × 100

마우스에서 NK-cell의 제거 - 실험전이 모델에서 시료에 의한 항암활성이 NK-세포의 활성화에 의하여 유도되는지 확인하기 위한, 마우스로부터 NK-cell의 제거는 기논문

발표된 것을 참고로 실시하였다.¹⁵⁾ 즉, 마우스에 50배 희석된 anti-asialo GM1 혈청(Wako Pure Chemicals Industries, Ltd., Osaka, Japan) 500 µl를 종양접종 1일 및 3일전에 각각 복강주사 하였다.

시료가 투여된 마우스의 macrophage에 의한 종양세포 살해 활성 - 시료의 투여에 의한 대식세포 매개 세포독성 효과를 측정하기 위한 실험동물은 BALB/c 마우스를 이용하였으며 200 µg의 각 시료를 마우스에 복강주사 하였다.¹⁴⁾ 주사 2일 후 마우스를 희생시키고 복강으로부터 복강세포를 회수하였다. 대조군으로는 PBS를 주사한 마우스를 이용하였다. 96 well plate의 각 well에 2.5×10^5 cell의 대식세포를 분주하고, target 세포로 colon26-M3.1 cell을 첨가하고 12시간동안 배양하였다. 이때 대식세포 : target cell인 colon26-M3.1 cell의 비율은 각각 100, 50, 25, 12.5가 되도록 조정하였다. 배양 완료 후, 상등액 100 µl를 수집하고 살해된 세포의 정도를 측정하기 위하여 LDH kit(Promega, Madison, WI, USA)의 용액을 제조사의 지침에 따라 첨가하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대식세포에 의한 암세포의 살해비율은 다음식에 의하여 구하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \left[\frac{(\text{OD value of experimental group} - \text{OD value of spontaneous group})}{(\text{OD value of untreated group} - \text{OD value of spontaneous group})} \right] \times 100$$

종양 전이 모델 - 시료의 항종양 효과는 colon26 세포로부터 얻은 고전이성 세포주인 colon26-M3.1 carcinoma를 이용하는 실험동물 종양 전이 모델을 이용하였다.¹⁴⁾ 실험동물로 각각 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종은 colon26-M3.1 carcinoma 세포주의 경우 마우스당 3×10^4 cells를 정맥주사(i.v.) 하였다. 종양 접종 14일 후에 마우스를 희생시키고 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 종양의 군집 수를 측

정하였다. 한편, 시료에 의한 항종양 전이 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교함으로써 조사하였고, 시료는 종양 접종 2일 전에 1회 정맥주사(0.8-50 mg/kg)하였으며,군당 각각 5마리의 마우스를 이용하였다. 담압 마우스의 연명을 실험을 위하여 3×10^4 의 colon26-M3.1 carcinoma cells를 혈관주사하고 1일 후부터 3일 간격으로 1 mg/kg의 cisplatin 및 큰갯버섯 추출물을 각각 5 mg/kg씩 단독 혹은 동시에 총 7회 혈관주사 하고 생존 시까지 관찰하였다.

통계처리 - 대조군에 대한 실험군 간의 통계적 유의성은 Student's two-tailed *t*-test로 분석하였다.

결과 및 고찰

큰갯버섯 추출물의 예방적 투여에 의한 종양전이 억제 효과 -4°C 및 100°C의 물로 추출한 큰갯버섯 추출물의 선천적 면역(innate immunity) 증진활성을 조사하기 위하여 colon26-M3.1 carcinoma를 이용한 동물실험모델에서 종양 전이에 미치는 활성을 측정하였다(Fig. 1). 종양접종 2일전에 각 마우스에 16, 80, 400 및 2,000 µg의 MPE-4 및 MPE-100를 각각 1회 정맥 투여한 결과, 최대 활성을 나타내는 MPE-4 및 MPE-100의 농도는 각각 400 및 2,000 µg으로 종양대조군에 비하여 각각 96% 및 81%이었다. 통계적으로 유의하게 종양의 전이를 억제하는 MPE-4의 투여용량 범위는 80-2,000 µg이었고 MPE-100의 경우는 400-2,000 µg이었으며 이용량의 투여에서 마우스에게 외형상 어떠한 부작용도 관찰되지 않았다. 종양전이 모델에서 생약의 투여에 의한 종양전이 억제효과는 주로 macrophage 혹은 NK-세포 등의 선천면역계가 활성화에 기인되는 효과임은 잘 보고되어 있는 바,^{15,16)} 본 시료의 투여에 의한 선천면역 기구의 활성화에 대한 연구가 요구되었다.

큰갯버섯 추출물의 세포 독성 효과 - 큰갯버섯 추출물인

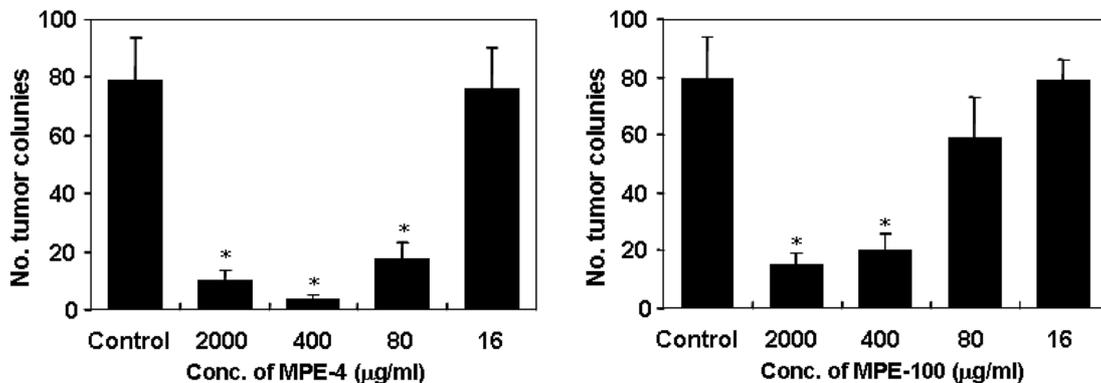


Fig. 1. Effect of *Lepiota procera* extracts on the tumor metastasis. Groups of five BALB/c mice were inoculated i.v. with 3×10^4 colon 26-M3.1 arcinoma cells. All mice were administered i.v. with the indicated doses of the sample 2 days before tumor inoculation, and euthenized 14 days after tumor inoculation for evaluation.

**p*<0,001, compared with the untreated group (by Student's two tailed *t*-test)

MPE-4 및 MPE-100의 colon26-M3.1 carcinoma 및 B16-BL6 melanoma에 대한 세포독성 효과를 *in vitro*에서 조사하였다(Fig. 2). 암세포의 증식을 50% 억제하는 IC₅₀ 농도를 조사한 결과 MPE-4는 두가지 종양세포주에 대하여 각각 약 250 µg/ml 및 350 µg/ml인 결과를 나타낸 반면, MPE-100의 경우는 두가지 종양세포주에 대하여 2000 µg/ml 이상인 결과를 보였다. 본 결과에서 암세포에 대한 세포독성 효과를 보이는 성분은 온도를 달리하는 추출방법에 의하여 차이가 있는 결과를 보였다. 현재까지 여러 가지 버섯류에서 암세포에 대한 활성성분은 주로 단백질 혹은 성분이 많이 보고되고 있으나 큰갓버섯에 대한 암세포에 대한 세포독성 효과를 가지는 성분에 대한 보고는 없었던 바, 앞으로 이들 세포독성을 나타내는 성분에 대한 연구가 필요할 것으로 사료되었다.^{17,18)}

큰갓버섯 추출물의 대식세포 활성화 - 실험전이 모델에서 MPE-4 및 MPE-100의 예방적 투여는 혈관으로 투여된 암의 전이를 유의하게 억제하였다(Fig. 1). 이 결과는 혈관

에 투여된 암세포가 그들의 목표기관(target organ)인 폐(lung)에 부착(adhesion) 후 증식되기 전에 투여된 시료에 의하여 이미 활성화된 cytolytic macrophage, NK-cell 등 여러 가지 작동세포에 의해 살해되기에 나타나는 현상으로 사료되었다.^{10,15,19)} 이러한 비특이적 혹은 특이적 면역세포의 증식 및 작동세포로서의 활성은 주로 자신들이 생산하는 cytokine들에 의하여 조절되고 있다.^{14,19,20)} 선천면역계를 구성하는 세포 중 macrophage는 여러가지 cytokines을 유도하고 이들은 면역조절능력을 가진다는 것은 잘 알려져 있다.^{16,19,20)} MPE-4 및 MPE-100의 면역자극 효과를 macrophage로부터 cytokines의 유도능으로 조사하기 위하여 macrophage를 각 시료로 자극 후, 배양 상등액에 생산된 cytokine의 유도능을 조사한 결과, 두 시료 모두 macrophage로부터 TNF-α 및 IL-12 등의 cytokines을 농도 의존적으로 생산함으로써 면역반응의 개시단계인 대식세포와 같은 선천적 면역계(innate immune system)를 직접 활성화시키는 능력이 있음을 확인하였다(Fig. 3). Macrophage로부터 생산되는 염증성 cytokine

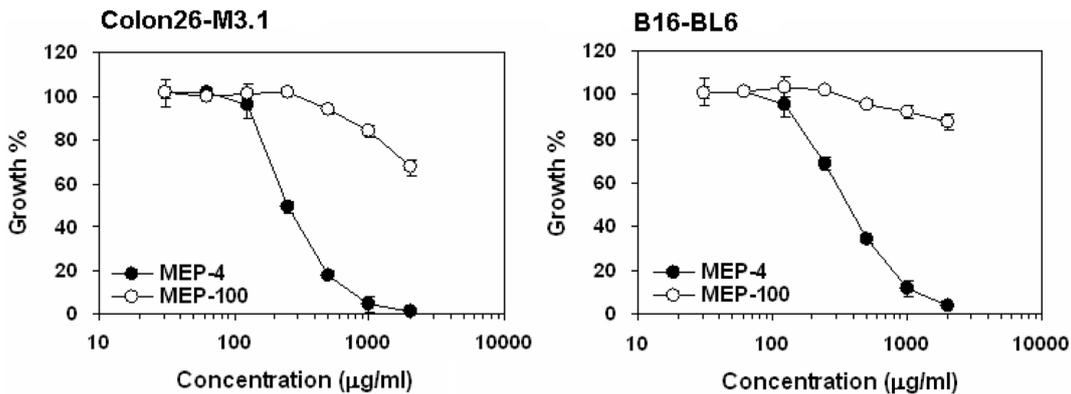


Fig. 2. Effect of *Lepiota procera* extracts on the growth of tumor cells. Colon26-M3.1 carcinoma and B16-BL6 melanoma were co-cubated with the indicated doses of MPE-4 and MPE-100 for 72 h. The proliferation of these cells was measured by a cell counting kit described in Materials and Methods.

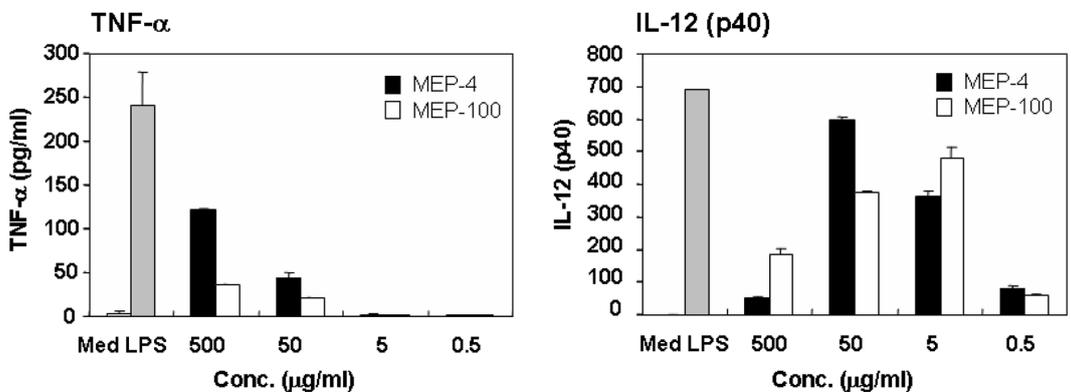


Fig. 3. Effect of *Lepiota procera* extracts on induction of cytokines from macrophages. Peritoneal macrophages (1×10^6 /ml/well) were treated with the indicated doses of samples in 24-well plate for 24 hr. The level of each cytokine in the supernatants of the cultures was determined by ELISA kits. The level of cytokines in the group treated with LPS (5 µg/ml) was as follows. IL-12; 535.8 ± 46.7 pg/ml, TNF-α; 204.5 ± 76.4 pg/ml

인 TNF- α 는 대표적인 multi-functional cytokine으로서 IL-1 β 와 함께 작용하여 면역관련 세포를 염증 부위에 모이게 하고, T-세포의 분화 및 증식에 관여함으로써 암의 억제에 있어 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다.^{13,19)} IL-12는 면역반응의 초기단계에서 생산되는 cytokine으로서 IFN- γ 의 생산에 직접관여하며, 따라서 세포독성 T 세포(cytotoxic T lymphocyte; CTL)을 유도하는 세포성 면역의 매개자로서의 역할 뿐 아니라 암세포의 존재 시 암세포에 작용하는 NK-cell의 활성화에 직접 관여함으로써 항암활성의 유도에서 가장 중요한 cytokine의 하나로 인정되고 있다.^{9,16,21)} 본 실험 결과 MPE-4 및 MPE-100의 cytokine inducer로서의 작용은 선천면역계에서 종양에 대한 살해력을 가지는 macrophage 및 NK-cell의 활성화 여부와 관련이 있을 것으로 사료되었다.^{14,21)}

큰갯버섯 추출물 투여에 의한 NK-세포의 활성화 - NK-세포는 주로 혈액에 존재하는 세포로서 바이러스 감염세포 혹은 암세포 등의 비자기(non-self) 세포를 살해하는 세포성 면역활성을 가지고 있으며 macrophage가 생산하는 cytokine 중의 하나인 IL-12에 의하여 종양세포를 살해하는 작동력 획득하게 된다.^{9,13,21)} 동시에 활성화된 NK-cells는 IFN-g를 생산함으로써 macrophage를 활성화 시킴으로 종양에 대하여 대항하게 된다.^{16,21)} 시료에 의한 NK-cell 활성화 조사는 시료가 주사된 마우스의 비장세포와 NK-sensitive 세포로

알려진 YAC-1 세포를 동시배양 후, YAC-1의 살해정도를 측정하였다. NK-cell의 활성화 측정을 위한 두시료의 투여 용량은 종양전이 모델에서 유의한 항종양 활성을 나타낸 200 μ g을 각각 혈관주사 하였다. Fig. 4의 결과에 나타난 바와 같이, MPE4 및 MPE-100을 정맥주사하고 2일이 경과된 마우스의 비장세포는 대조군의 정상 마우스의 비장세포에 비하여 약 2배 정도 YAC-1의 살해효과를 증강시킴으로 NK-cell의 종양세포 살해능을 증진시키는 결과를 보였다. 따라서 Fig. 1에 제시한 시료의 항종양 전이 효과가 시료의 투여에 의하여 활성화된 NK-cells에 의한 활성인지를 확인하기 위하여 anti-asialo GM1 항체를 투여하여 마우스의 NK-cell을 제거한 마우스를 이용한 실험전이 모델에 적용하였다. 그러나 실험 결과, 마우스의 NK-cell이 제거된 마우스의 경우에서도 시료에 의한 항종양 활성이 인정됨으로서, MPE-4 및 MPE-100의 투여에 의한 항종양 활성은 시료에 의하여 활성화된 NK-cells는 일부의 작동력을 가지게 되고 실질적으로 암세포를 살해하는 작동세포는 macrophage 등의 다른 작동세포가 관여한다는 것을 강하게 암시하였다.²³⁾

마우스의 macrophage의 종양세포 살해 활성 - MPE-4 및 MPE-100의 cytokine inducer로서의 활성이 있음을 확인한 바, *in vivo*에서 각 시료를 투여한 마우스의 macrophage가 종양세포에 대한 살해 활성을 획득하였는지를 확인하였다. MPE-4 및 MPE-100 각각을 200 μ g씩 복강주사하고 3

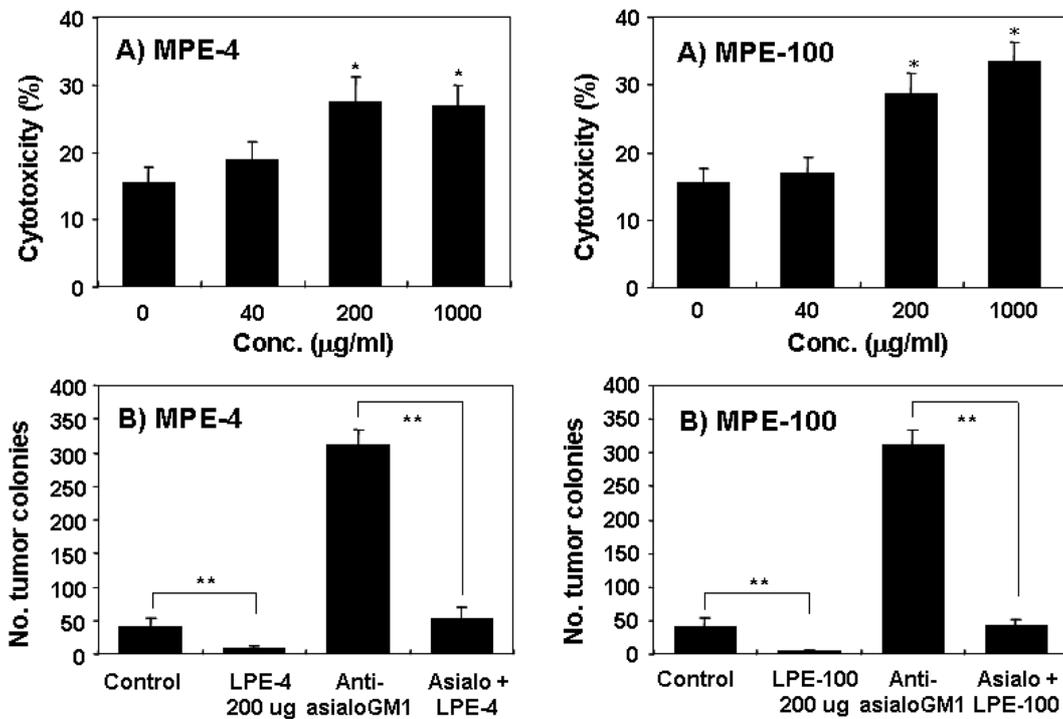


Fig. 4. Effect of *Lepiota procera* extracts on the enhancement of NK cell activity. A) NK activity was determined by a 6 hr-incubation assay using by LDH kit. B) Effect of anti-asialo-GM-1 on the inhibition of tumor metastasis by *Lepiota procera* extracts * $p < 0.01$, compared with the control group (by Student's two tailed *t*-test)

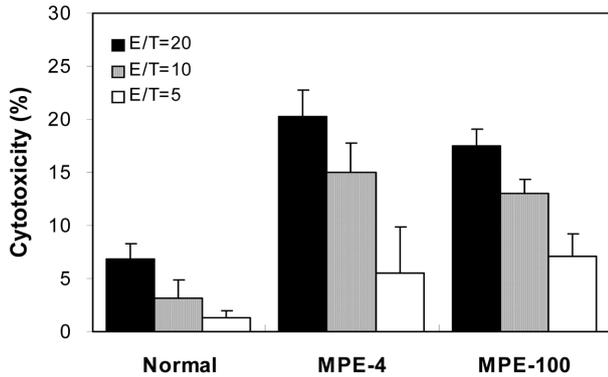


Fig. 5. Effect of *Lepiota procera* extracts on macrophage-mediated cytotoxicity against tumor cells. Peritoneal macrophages were co-incubated with colon26-M3.1 cells for 24 hr. After incubation, LDH solution was added to the cultures, and the absorbance value of each well was measured at 620 nm. * $p < 0.01$, compared with the untreated group (by Student's two-tailed t -test)

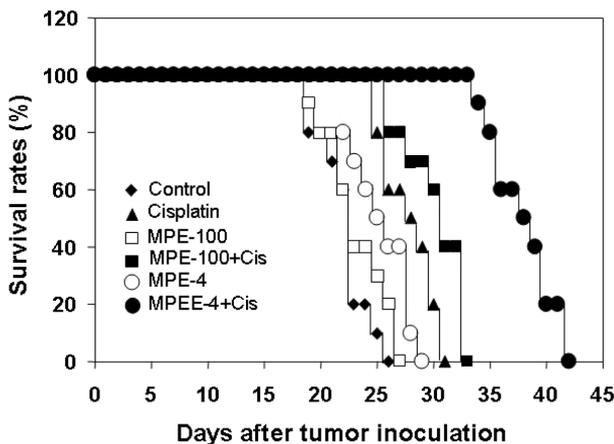


Fig. 6. Synergic effect of *Lepiota procera* extracts on the life span in tumor inoculated mouse treated with cisplatin. Ten BALB/c mice per group were administered i.v. with *Lepiota procera* extracts and cisplatin for consecutive 3 day interval after colon26-M3.1 cells inoculation. The survival times of tumor-bearing mice were monitored until the mice succumbed naturally.

일 후에 마우스로부터 macrophage (Effector cell; E)를 수집하였고, 종양세포로는 암전이 모델에서 사용한 colon 26-M3.1 cell (target cell; T) 을 적용하였다. 실험결과 MPE-4 및 MPE-100를 투여한 마우스의 macrophage는 정상 마우스의 macrophage에 비하여 통계적으로 유의하게 높은 종양세포의 증식억제 활성을 보였다 (Fig. 5). 특정 자극을 받은 macrophage는 TNF- α 및 nitric oxide와 같은 cytokines 및 세포독성 성분을 생산함에 의하여 종양세포에 대한 작동세포(killer)로의 기능을 획득한다고 보고되고 있다.^{19,20} Fig. 3의 결과에서 MPE-4 및 MPE-100은 대식세포를 직접 자극

하여 cytokines를 유도하는 활성이 있음을 확인 한 바, MPE-4 및 MPE-100은 *in vivo*에서 종양에 대하여 살해활성을 가지는 macrophage를 활성화시키는 작용이 있음을 확인하였고 이 결과는 실험동물모델에서 본 실험의 큰갯버섯 추출물의 항종양 전이 활성을 유도하는 작동기중 하나인 결과로 사료되었다.^{14,19,20,22}

Cisplatin과 큰갯버섯 추출물의 병용투여에 의한 항암 상승작용의 유도 - 실험동물 전이모델에서 큰갯버섯 추출물의 예방적 투여는 유의미한 항종양 전이 억제 효과를 보였다. 이 결과를 근거로 큰갯버섯 추출물의 치료적 투여 및 항암제인 cisplatin과의 병용 투여에 의한 치료활성의 상승효과를 조사하였다. 종양접종 1일 후부터 3일 간격으로 매일 100 μ g의 MPE-4 및 MPE-100를 혈관주사 하였다. 실험결과, 종양을 가지고 있는 마우스에 MPE-4 및 MPE-100 단독투여에서 LEP-4의 경우만 유의성 있는 생명연장 효과를 유도하였다. 한편, 종양접종 1일 후부터 3일 간격으로 cisplatin 20 μ g을 투여한 경우 종양대조군에 비하여 유의한 생명연장 효과를 보였다. 큰갯버섯 추출물과 cisplatin의 병용투여 결과 MPE-4 및 MPE-100 모두 cisplatin 단독 투여군에 비하여 높은 생명연장 효과를 보였으며, MPE-4이 경우 가장 좋은 항암활성을 유도하였다. 항암제 병용투여에 의한 항암 상승효과는 주로 항암제와 동시에 투여되는 시료의 면역세포 활성화에 의한 암세포의 살해작용, 면역세포의 분화와 증식을 유도하는 조혈세포의 증식작용, 투여된 항암제에 의하여 활성이 약해진 암세포를 면역세포가 쉽게 살해하는 작용 등이 보고되고 있다.^{16,21} 따라서 앞으로 큰갯버섯의 항암 활성 및 항암제와 병용투여에 의한 상승작용에 대한 기전을 설명하기 위하여 활성성분의 규명 및 작동기전에 대한 다양한 연구가 요구되었다.

결론

큰갯버섯(*Lepiota procera*)는 주름버섯과(Agaricaceae)에 속하는 식용버섯으로 국내외에서 그 생리활성에 대한 연구 보고는 극히 제한적이었다. 본 연구는 큰갯버섯의 기능성소재로 개발 가능성을 보고자 생체 면역계에 미치는 활성을 검토하였다. 4°C(MPE-4) 및 100°C(MPE-100)의 물로 추출한 시료의 colon26-M3.1 carcinoma 및 B16-BL6 melanoma에 대한 세포독성 효과를 조사한바, IC₅₀ 농도는 각각 250 mg/ml 및 350 mg/ml였다. MPE-4를 마우스에 투여한 결과, 선천면역계를 구성하는 macrophage 및 NK-세포를 자극하는 활성이 있었으며, 실험동물 전이모델에서 80 μ g의 MPE-4 및 400 μ g의 MPE-100 투여에서 비슷한 항암활성을 보였다. 또한, 담암마우스에서 항암제 cisplatin과 병용투여는 cisplatin 단독 투여군에 비하여 높은 연명효과를 나타냈다. 본 결과로부터 큰갯버섯은 추출방법에 따라 면역자극

활성의 차이가 있음을 확인하였고, 그 성분은 종양에 대한 세포성 면역증강 효과를 유도하는 소재로 개발 가능성이 있음을 제시하였다.

인용문헌

- Rhee, Y. K., Han, M. J., Park, S. Y. and Kim, D. H. (2000) *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of fruit body of *Phellinus linteus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**: 477-480.
- Wasser, S. P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 258-274.
- Zaidman, B. Z., Yassin, M., Mahajna, J. and Wasser, S. P. (2005) Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 453-468.
- Collins, L., Zhu, T., Guo, J., Xiao, Z.J. and Chen, C. Y. (2006) *Phellinus linteus* sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *Br. J. Cancer* **95**: 282-288.
- Masuda, Y., Inoue, M., Miyata, A., Mizuno, S. and Nanba, H. (2009) Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *Int. Immunopharmacol.* **9**: 620-626.
- Kim, H. J. and Lee, I. S. (2004) Antimutagenic and cytotoxic effects of Korean wild mushrooms extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**: 662-668.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J. S. and Ferreira, I. C. (2007) Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 4781-4788.
- Kadhim, S. and Penney, C., Lagraoui, M., Heibein, J., Attardo, G., Zacharie, B., Connolly, T. and Gagnon, L. (2000) Synergistic anti-tumor activity of a novel immunomodulator, BCH-1393, in combination with cyclophosphamide. *Int. J. Immunopharmacol.* **22**: 659-671
- Strome, S. E., Voss, S., Wilcox, R., Wakefield, T. L., Tamada, K., Flies, D., Chapoval, A., Lu, J., Kasperbauer, J. L., Padley, D., Vile, R., Gastineau, D., Wettstein, P. and Chen, L. (2002) Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res.* **62**: 1884-1889.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C. and Restifo, N. P. (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**: 909-915.
- Gupta, R. K. and Siber, G. R. (1995) Adjuvant for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* **13**: 1263-1376.
- Huang, C. F., Lin, S. S., Liao, P. H., Young, S. C. and Yang, C. C. (2008) The immunopharmaceutical effects and mechanisms of herb medicine. *Cell Mol. Immunol.* **5**: 23-31.
- Ha, E. S., Hwang, S. H., Shin, K. S., Yu, K. W., Lee, K. H., Choi, J. S., Park, W. M. and Yoon T. J. (2004) Anti-metastatic activity of glycoprotein fractionated from *Acanthopanax senticosus*, involvement of NK-cell and macrophage activation. *Arch. Pharm. Res.* **27**: 217-224.
- Yoon, T. J., Yoo, Y. C., Kang, T. B., Song, S. K., Lee, K. B., Her, E., Song, K. S. and Kim, J. B. (2003) Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 861-867.
- Lin, Y., Vandeputte, M. and Waer, M. (1997) Natural killer cell- and macrophage-mediated rejection of concordant xenografts in the absence of T and B cell responses. *J. Immunol.* **158**: 5658-5667.
- Whitmore, M. M., DeVeer, M. J., Edling, A., Oates, R. K., Simons, B., Lindner, D. and Williams, B. R. (2004) Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res.* **64**: 5850-5860.
- Zheng, Y., Zhao, B., Lu, C., Lin, X., Zheng, Z. and Su, W. (2009) Isolation, structure elucidation and apoptosis-inducing activity of new compounds from the edible fungus *Lentinus striguellus*. *Nat. Prod. Commun.* **4**: 501-506.
- Park, B. T., Na, K. H., Jung, E. C., Park, J. W. and Kim, H. H. (2009) Antifungal and Anticancer Activities of a Protein from the Mushroom *Cordyceps militaris*. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **13**: 49-54.
- Saiki, I., Saito, S., Fujita, C., Ishida, H., Iida, J., Murata, J., Hasegawa, A. and Azuma, I. (1988) Induction of tumoricidal macrophages and production of cytokines by synthetic muramyl dipeptide analogues. *Vaccine* **6**: 238-844.
- Lee, H. H., Lee, J. S., Cho, J. Y., Kim, Y. E. and Hong, E. K. (2009) Study on immunostimulating activity of macrophage treated with purified polysaccharides from liquid culture and fruiting body of *Lentinus edodes*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 566-572.
- Schnurr, M., Scholz, C., Rothenfusser, S., Galambos, P., Dauer, M., Robe, J., Endres, S. and Eigler, A. (2002) Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells. *Cancer Res.* **62**: 2347-2352.
- Lee S. J., Saiki, I., Hayakawa, Y., Nunome, S., Yamada, H. and Kim, S. H. (2003) Antimetastatic and immunomodulating properties of a new herbal prescription, Bojung-ban-gam-tang. *Int. Immunopharmacol.* **3**:147-157.

(2010. 4. 27 접수; 2010. 6. 7 심사; 2010. 6. 9 게재확정)