

영지버섯이 탐식세포의 IL-1, TNF 및 IL-12 유전자 발현에 미치는 영향

배 지 현

계명대학교 식품영양학과

Effects of *Ganoderma lucidum* on the IL-1, TNF and IL-12 Gene Expression of Macrophages

Ji-Hyun Bae

Dept. of Food Science and Nutrition, Keimyung University, Daegu 705-701. Korea

Abstract

In order to investigate the immunomodulatory mechanism of *Ganoderma lucidum*, the effects of protein-bound polysaccharide of *Ganoderma lucidum* on the proliferation and cytokine gene expression of mouse peritoneal macrophages was studied. In the macrophage proliferation assay using the BrdU labeling reagent, the GLA component extracted from *Ganoderma lucidum* or GLB from the bud of *Ganoderma lucidum* were added to the medium at the concentration of 0 to 256ug/ml. DNA synthesis of the macrophage was increased at 16ug/ml of GLA and 64ug/ml of GLB, respectively. In the reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), the cytokine(TNF, IL-1, and IL-12) gene and β -actin expression were also analyzed. 20ug/ml of either GLA or GLB increased TNF and IL-1 expression of the macrophages.

Key words: *Ganoderma lucidum*, macrophages, cytokine, gene expression

서 론

최근 모든 질병의 예방 또는 치료제를 식품 또는 천연물 성분에서 얻고자 하는 움직임이 일고 있고 성경에도 식물 속에 각종 약용식물이 있음을 가르치고 있다. 동양의학에서의 생약은 물론이고 서양의학의 수많은 의약품도 바로 이 약용식물에서 추출되어져 사용되고 있다. 우리 선조들의 사물에 대한 놀라운 직관력과 예견은 천연에서 자란 버섯류를 식용 또는 약용으로 널리 사용해 오게 했으며, 현대 실증적 과학의 발달은 이러한 버섯류들의 가치를 구체적으로 입증하고 있다. 영지버섯의 생리활성을 검색한 연구는 주로 항암(1-3), 항균활성(4)을 중심으로 지질대사에 대한 영향(5-8)과 혈압강하 작용(9)등에 관하여 보고되고 있으며, 영지버섯이 면역계에 미치는 영향에 관한 연구는 주로 입파구를 가지고 이루어져 왔다(10). 한편 면역계에 주요 방어기능을 담당하는 탐식세포는 체내로 들어온 이 물질을 비특이적으로 탐식하고 소화하며, 각종 세포독성물질(반응산소 중간물질이나 nitric oxide)을 분비하여 이종세

포나 암세포를 파괴하는 세포이다. 또한 탐식세포는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며 염증반응, 조절기구 등에도 관여하고 있다(11). 본 연구에서는 영지버섯 성분이 탐식세포의 IL-1, TNF, IL-12 등과 같은 cytokine분비에 의한 면역기능조절에 미치는 영향을 분자생물학적 수준에서 규명해 보고자 한다. 본 실험결과를 토대로 영지버섯에 의한 탐식세포의 cytokine 분비기전을 유전자 수준에서 이해하고자 하며 이러한 자료들은 면역기능 증강제로서의 영지버섯의 효능을 보다 과학적으로 입증하는데 유용되리라 사료된다.

재료 및 방법

영지버섯 다당체 시료

본 실험에서 사용한 영지버섯 다당체는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)의 자실체로부터 분리한 단백다당체와 생장점에서 분리한 단백다당체를 각각 GLA, GLB로 명명하여 사용하였다. GLA 및 GLB 성분을 10% fe-

⁸ 본 논문은 1996년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음

tal bovine serum이 들어있는 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Gibco, BBL)배지에 10mg/ml 농도로 용해하고 filter sterilization한 후 cryoprotective vial (Corning Co)에 소분하여 -20°C에 냉동 보관 하면서 필요시마다 1개씩 취하여 사용하였다.

실험동물

실험에 사용한 마우스는 생후 6~8주 가량된 체중 20~25g의 ICR 마우스로 본교의 의과학연구소 동물실험 사용실에서 기른 후 수컷만을 골라 사용하였다. 사육실 온도는 22°C 내외, 습도는 55~60%로 유지하고 light dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, 마우스용 고형사료와 물을 제한없이 공급하였다.

마우스 복강 탐식세포의 분리 및 배양

각 실험조건에 따른 마우스의 복강을 약 10ml의 DMEM배지를 넣어 씻어낸 다음 추출된 탐식세포를 두번 정도 원심 세척하였다 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, BBL)과 항생제(antibiotics-penicillin, streptomycin, Gibco, BBL)가 첨가된 DMEM배지에 2×10⁶ cells/ml 농도로 조절한 부유세포를 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에 약 3시간 정도 배양시킨 후, 부착되지 않은 세포를 PBS(phosphate buffered solution, Gibco, BBL)로 씻어버렸다. 부착된 세포에 DMEM10 배지나 GLA 또는 GLB를 넣어주고 실험 목적에 맞게 배양하였다(12).

세포증식능 측정

영지버섯 단핵다당체 GLA 또는 GLB가 마우스 복강 탐식세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) labeling reagent(Boehringer Mannheim)를 사용하였다. 배양세포액에 GLA 또는 GLB를 0~256ug/ml 농도로 첨가한 뒤 48시간 동안 37°C에서 배양하였으며, 배양 48시간 때 BrdU로 label하고 24시간 더 배양하였다. 상층배지를 제거하고 FixDenat용액을 넣어 30분간 실온에 방치하였다. FixDenat을 제거하고 anti-BrdU POD를 넣어 120분간 실온에서 incubation하였다. Washing solution으로 3회 씻어낸 후 substrate를 넣고 30분간 반응시킨 후 ELISA reader(Bio Rad Co.)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다(13).

RNA 분리 및 농도 측정

비교군과 영지버섯의 GLA 또는 GLB성분으로 자극

한 실험군의 탐식세포를 scraper로 긁어 수거한 후 RN-Azol B(Cinna Co.)를 사용, total RNA를 추출하였다.

RNAzol B 1ml를 첨가하여 15초간 vortexing하고 chloroform 100ul를 첨가, 다시 15초간 vortexing한 뒤 얼음에 10분간 방치하였다. 세포용해액을 원심분리(12,000 rpm, 15min, 4°C)한 뒤 상층액을 취하여 새 tube에 옮기고 동량의 ice-cold isopropanol을 첨가, -20°C에 하룻밤 두어 RNA를 침전시켰다. 원심분리(12,000rpm, 15 min, 4°C)하여 RNA pellet을 수거하고 0.8ml의 75% ethanol을 첨가, 원심 세척한 뒤 Speed Vac(DNA plus, Heto lab. equipment)으로 건조시켰다. 여기에 30ul nuclease free distilled water를 첨가하고 80°C에 10분간 두어 RNA pellet을 완전히 녹인 후, UV-spectrophotometer(Beckman Co.)로 RNA 농도와 순도를 측정하였다(14).

Genebank search에 의한 primer 제작

T-cell 등의 많은 세포에서 분비되어 면역세포간의 상호작용을 매개하는 messenger로서 알려진 cytokine 중 대식세포에서 분비되어 염증과 면역반응에 관여하는 IL-1, TNF, IL-12 등의 유전자 정보를 조사하였다. 본 실험에 사용한 마우스의 β-actin, IL-1, TNF 및 IL-12의 DNA sequence를 Genebank database system을 이용하여 확보하고 단백질 지령부위의 ATG codon을 중심으로 sense primer를, termination codon을 중심으로 antisense primer를 design하였다(Table 1). Design한 각 primer는 한국생공에 의뢰해 제작하였고, 1.5 ml Eppendorf tube에 50pmole 농도로 희석, 소분하여 -20°C에 냉동보관하면서 사용하였다. 산생될 cDNA 구조는 DNAsis(Hitachi Co.) computer program을 이용, 분석하였다.

Table 1 Primer sequences used for the detection of cytokine gene expression

Primer name	Oligonucleotide sequence
β-Actin S	5'-ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTC-3'
β-Actin AS	5'-ACTCCTGGACTGGCTCCAGCAGTC-3'
IL-1 S	5'-CCATGGCAGAAGTACCTGAGTCTGCC-3'
IL-1 AS	5'-TTAGGAAGACACAAAATTGCATGGT-3'
TNF S	5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATC-3'
TNF AS	5'-TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTA-3'
IL-12 S	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3'
IL-12 AS	5'-CTACATTTGCCGGAAGAGCCCTCAGG-3'

S: Sense primer

AS: Antisense primer

Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) 및 전기영동

IL-1, TNF, IL-12 등의 cytokine 유전자 발현능을 조사하기 위해 RT-PCR법을 이용하였다. RT-PCR은 Perkin Elmer사의 RT-PCR kit를 이용 RT reaction mixture를 만들고 여기에 80°C에서 10분간 변성시킨 total RNA를 200ng/ul 농도로 첨가한 후 mineral oil을 첨가. 실온에 10분간 두었으며 PCR machine(Perkin Elmer Cetus 480)을 이용 역전사시켰다(42°C, 60min; 95°C, 5min). 생성된 RT product에 PCR mixture를 첨가한 후 94°C, 1 min; 56°C, 1min; 72°C, 1min을 1 cycle로 하여 총 23~28 cycles를 반응시켰으며, 마지막으로 72°C에 5분간 두어 cDNA합성을 연장시킨 후 PCR을 종료하였다. RT-PCR의 정확성을 확인하기 위해 internal standard로 β -actin gene을 동시에 증폭시켰다. 생성된 PCR product 15ul에 3ul의 6X gel loading buffer를 첨가하고 1.5% agarose gel상에서 100bp size marker와 함께 100V로 20분간 전기영동시킨 후 각각의 cDNA를 관찰하였다(15).

결과 및 고찰

세포증식능

세포증식은 세포내 DNA 복제를 전제조건으로 하기 때문에 DNA합성 정도를 조사함으로써 세포증식을 간접적으로 측정하였다. BrdU labeling법은 thymidine 대신에 pyrimidine analogue인 BrdU가 DNA에 incorporation되는 정도를 측정하는 것으로, 종래의 ^3H -thymidine incorporation assay와는 달리 방사능 물질을 사용하지 않고 세포증식효과를 측정할 수 있는 편리한 방법이다. 영지버섯 단백질다당체 GLA성분의 경우 16ug/ml농도에서 세포내 DNA 합성이 증가했으며(Fig. 1), GLB 성분은 64ug/ml 농도에서 DNA 합성이 증가되었다(Fig. 2).

Cytokine 유전자 발현능

영지버섯의 GLA 또는 GLB성분이 마우스 복강 탐식세포의 각종 cytokine(IL-1, TNF, IL-12) 분비에 미치는 영향을 RT-PCR법을 이용하여 검색하였다. RT-PCR법은 세포에서 분리한 total RNA를 oligo dT primer와 reverse transcription을 이용하여 cDNA로 만들고 이것에 측정하고자 하는 cytokine에 특이적인 primers를 적용, polymerase chain reaction으로 증폭시킴으로써 초기의 mRNA 양을 비교하는 방법이다. 이 방법은 극히 소량의 시료만으로 여러 종류의 유전자 발현

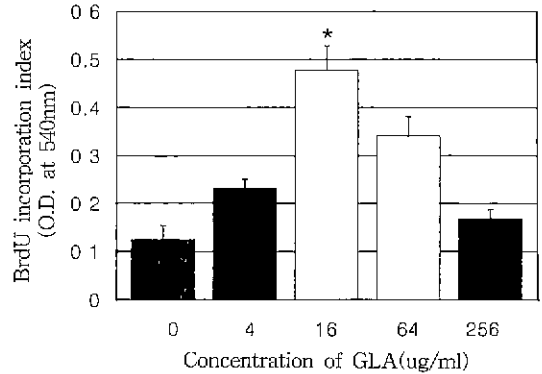


Fig. 1. Effect of protein-bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* (GLA) on the DNA synthesis of mouse peritoneal macrophages. Each value is mean \pm S.D. of triplicates. *Significantly different at $p < 0.01$

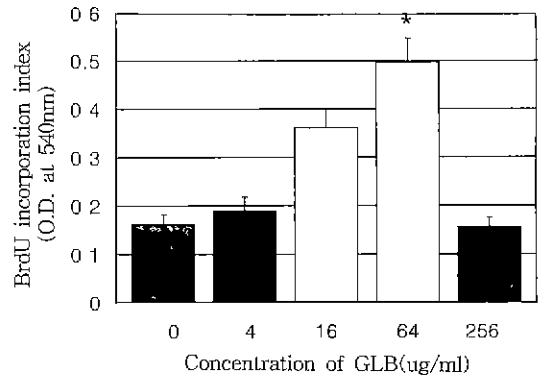


Fig. 2. Effect of protein-bound polysaccharide extracted from the bud of *Ganoderma lucidum* (GLB) on the DNA synthesis of mouse peritoneal macrophages. Each value is mean \pm S.D. of triplicates. *Significantly different at $p < 0.01$

을 비교할 수 있어 널리 이용되고 있다. 본 실험에서는 영지버섯의 GLA 또는 GLB성분을 농도별(2ug/ml, 20 ug/ml, 200ug/ml)로 각각 배지에 첨가한 후 배양 후 2시간, 4시간 및 8시간 때 세포를 각각 수거하여 RT-PCR 방법으로 β -actin, TNF, IL-1, 및 IL-12 등의 cDNA를 증폭시켰다. 이들의 발현 최저시간은 4시간이었으며 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. 세포내 cytoskeleton의 구성 성분으로 항상 동일한 양이 발현되는 β -actin은 대조군이 나 단백질다당체 투여군 모두에서 일정한 양이 발현되었고 IL-12의 경우 발현이 나타나지 않았다. IL-1 이나 TNF의 경우는 20ug/ml 농도에서 대조군에 비해 증가함을 보였으며 200ug/ml를 첨가했을 때 TNF의 발현은 오히려 미약하였다. TNF의 2번 lane과 IL-1의 2번

β-Actin TNF IL-1 IL-12
 0 1 2 3 0 1 2 3 0 1 2 3 0 1 2 3

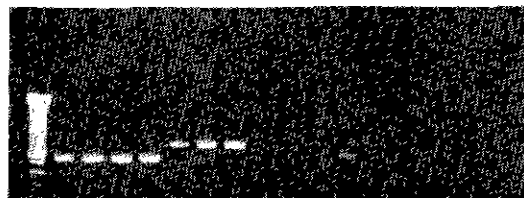


Fig. 3. Effects of protein-bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on the TNF, IL-1 and IL-12 gene expression of mouse peritoneal macrophages.

Mouse peritoneal macrophages treated with GLA or GLB at the 2ug/ml (lane 1), 20ug/ml (lane 2), 200ug/ml (lane 3) or control (lane 0) were cultured for 4hrs. Complementary DNA of β-actin, TNF, IL-1 and IL-12 were amplified from RNA of each sample by RT-PCR.

lane band size가 각각의 control에 비해 현저하게 크게 나타나 TNF와 IL-1의 분비량이 증가했음을 알 수 있었으나 TNF의 3번 lane에서는 band를 확인할 수 없었다. 영지버섯의 GLA성분이나 GLB성분간의 차이는 검출할 수 없었으며 cytokine 유전자 발현에 미치는 두성분의 효과는 동일하였다. 영지버섯에 의해 발현이 증가된 TNF와 IL-1은 둘다 면역계에 의한 염증 반응을 매개하는 cytokine으로서 그 기능은 다음과 같다. IL-1은 다양한 pro-inflammatory effect를 가지며 IL-6와 더불어 T-cell 및 B-cell의 기능을 활성화시키는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 IL-2 및 IFN과 더불어 natural killer cell의 기능을 증가시킨다(16,17). TNF는 IL-1과 더불어 면역계와 염증계를 연결시키는 주요 cytokine으로 분류되고 있으며 여러가지 암세포의 피사에 관여하는 단백질로 알려져 있다(18). 200ug/ml의 영지버섯 단백다당체를 첨가했을 때 TNF의 발현유도가 대조군에 비해 적은 이유는 본 실험의 결과만으로는 알 수가 없으며 이에 대한 규명이 필요하다고 사료된다. 또한 영지버섯이 생체내에서 면역계에 미치는 영향을 보다 더 잘 이해하기 위해서는 본 실험의 결과와 더불어 동물실험 등의 연구가 계속 진행되어야 한다고 생각된다.

요 약

영지버섯이 면역계에 미치는 작용기전을 알아보기 위하여 영지버섯의 단백다당체 성분이 마우스 복강 탐식세포의 증식에 미치는 영향과 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 조사해 보았다. GLA 또는 GLB성분을 탐식세포 배양액에 0~256ug/ml 농도로 첨가하여 배양한 후 BrdU labeling법으로 분석을 실시한 결과 GLA

성분은 16ug/ml 농도에서 세포내 DNA 합성이 증가했으며, GLB성분의 경우 64ug/ml 농도에서 DNA 합성이 증가되었다. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용하여 영지버섯 단백다당체에 의해 발현이 증가하는 cytokine을 조사한 결과 IL-1과 TNF의 발현이 20ug/ml 농도에서 대조군보다 증가되었다

감사의 글

본 연구를 위해 영지버섯 단백다당체를 제공해 주신 충남대학교 약학대학의 정경수 교수님께 감사를 드립니다.

문 헌

1. 이권행, 이준우, 한만덕, 정 훈, 김영일, 오두환 : *Ganoderma lucidum* IY 009 조다당 분획들의 항암활성과 항보체활성간의 상관관계. 산업미생물학회지, 22, 45(1994)
2. 이권행, 이정옥, 이준우, 정 훈, 한만덕, 정준호, 오두환 : *Ganoderma lucidum* IY 009로부터 분리된 항암성 다당류의 약리 및 독성. 산업미생물학회지, 22, 182(1994)
3. 이권행, 정 훈, 이준우, 한만덕, 최경숙, 오두환 : *Ganoderma lucidum* IY 009로부터 분리된 항암성 다당류의 정제 및 구조분석. 산업미생물학회지, 22, 190(1994)
4. 정동욱, 정지훈 : 영지의 항산화성 물질에 관한 연구. 한국식품과학회지, 24, 552(1992)
5. 정승용, 김성애, 김성희, 김한수, 김근자, 김희숙, 정효숙 : 영지 열수추출액이 식이성 콜레스테롤혈증 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 한국영양학회지, 19, 180(1990)
6. 정동욱 : 영지의 항산화성 물질에 관한 연구. 한국식품과학회지, 24, 497(1992)
7. 김근자, 김한수, 정승용 : 콜레스테롤혈증 유발 흰쥐에 있어서 버섯류가 지질성분에 미치는 영향. 한국영양학회지, 21, 131(1992)
8. 김근자, 김한수, 김성희, 김희숙, 최은정, 정승용 : 식용버섯과 식물성 유지의 혼합 급여가 흰쥐 간장의 지질성분 및 지방산조성에 미치는 영향. 한국영양학회지, 23, 736(1994)
9. 박준희, 김학원, 김영중, 최응칠, 김병각 : 한국산 영지의 혈압강화성분에 관한 연구. 식품위생학회지, 2, 57(1987)
10. 정경수 : 버섯류의 생리활성 성분. 식품과학과 산업, 28, 29(1995)
11. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. : *Immunology*. 4th ed.. Mosby(1996)
12. Stuart, A. E., Haveshaw, J. A. and Davidson, A. E : *Phagocytes in vitro*. In "Handbook of experimental immunology" Weir, D. M.(ed.), 2nd ed , Blackwell, p.244 (1993)
13. Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H. Shevach, E. M. and Strober, W. : *Current protocols in immunology*. Wiley Interscience, NIH, p.7.10 1(1991)
14. Irimis, M. A., Gelfand, D. H., Shinsky, J. J and White,

- T. J. : *PCR protocols*. Academic Press, p.21(1990)
15. McPherson, M. J., Quirke, P. and Taylor, G. R. : *PCR a practical approach*. IRL Press, p.215(1991)
16. Arai, K., Harper, J. W. and Fett, J. W. : Cytokines; Coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev. Biochem.*, **59**, 783(1990)
17. Thompson, A. : *The cytokine handbook*. Academic Press, p.47,257(1994)
18. Callard, R. and Gearing, A. : *The Cytokine Facts Book*. IRL Press, p.31(1994)

(1997년 7월 19일 접수)