

## 영지버섯 다당체의 항미생물작용 및 항암작용에 관한 연구

김 성 환

중부대학교 식품영양학과

### Studies on Anti-Microbial and Anti-Cancer Functions of Polysaccharide Extracted from *Ganoderma lucidum*

Sung-Whan Kim

Dept. of Food Science and Nutrition, Joongbu University, Choong-nam 312-940, Korea

#### Abstract

This study was carried out to elucidate the immunomodulating activity of protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*(PSG). Macrophage-driven reactive radicals were known as an effector for antimicrobial and anticancer functions. The promising immune response molecule, reactive oxygen intermediates(ROIs), was determined in TIB 71 cells with PSG at various experimental conditions. Treatment with 0.5mg PSG significantly increased the production of ROIs, superoxide anion as well as hydrogen peroxide, from TIB 71 cells( $p < 0.001$ ). Under the same concentration, considerable results were obtained from 24 hour cultivation with  $10^6$  cells at 5% CO<sub>2</sub> incubator. The cells were triggered with PMA(5.3 $\mu$ M) after primed BCG(100 $\mu$ M) or IFN- $\gamma$ (100U) alone could not induce the production of ROIs, but it had a significant potentiating effect on ROIs secretion when the cells were treated with PSG.

**Key words:** anti-microbial, anti-cancer, reactive oxygen intermediates

#### 서 론

동물의 결합조직이나 체액에 많이 존재하는 뮤코폴리다당류는 생체내에서 단백질과 결합된 복합체로서 존재하는데 이들은 생체내 중요한 성분으로 많은 연구가 수행되어 왔다(1).

이와는 달리 많은 식물성 다당류는 수용성 다당류로서 진해제, 소염제, 피부병치료제, 식사요법제, 완하제, 진위제, 면역부활제 등으로 이용되어 왔으며 최근에는 효소에 비활성을 나타내고 종양이나 알러지를 유발하지 않고 독성 등이 없으며 물리, 화학적으로 안정하고 순수한 다당류가 담자균류를 비롯하여 진균류, 효모류, 세균, 지의류, 해조류, 고등식물 등에서 분리정제되고 있다. 특히 이들은 종양세포에 대한 직접적인 세포독성은 없으나 특이적 또는 비특이적 면역증강에 의한 숙주 자체의 방어기구 부활효과를 나타내는 것으로 그 기전이 조금씩 밝혀지고 있으며 이와 관련하여 버섯중에 함유되어 있는 다당체들의 항암 및 면역조절 작용 등과 관련하여 많은 연구가 진행되고 있다(2-21).

따라서 본 연구에서는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)으로부터 추출분리한 다당체가 면역계 전체의 기능을

조정하는 대식세포의 활성화 단계 전후에 있어 대식세포의 활성화에 영향을 미치는 유사분열능 증가( $p < 0.001$ )와 Interleukin-2 수용체 증가( $p < 0.001$ ) 및 탐식작용을 대조군에 대하여 16% 이상 높였으며(14), cytokine 생성능은 특히 Interleukin-2의 경우 대조군에 대하여 현저한 증가( $p < 0.001$ )를 나타냈다(15). 그리고 항암작용 등 면역증강작용을 측정하는 새로운 방법으로 연구되고 있는 자유라디칼 형성반응(21-44)중 반응질소 대사산물의 생성능과 생성기전 연구결과에 의하면 영지버섯다당체와 BCG 및 Interferon- $\gamma$ 을 동시 투여시 BCG 또는 Interferon- $\gamma$ 을 각각 단독 처리시 보다 약 7~8배의 nitrite 생성증가를 보였다는 연구보고(21)에 이어 면역계에 있어서 호중구와 함께 이 물질에 대한 숙주의 일차방어계를 담당하는 대식세포의 기능에 미치는 영지버섯 다당체의 항미생물작용 과 항암작용을 활성화 산소 대사산물의 생성능과 관련하여 연구하였다.

#### 재료 및 방법

##### 영지버섯 다당체

본 실험에서 사용한 영지버섯 다당체(PSG)는 영지

버섯에서 분리한 배양균사체로부터 얻은 다당체로서 88.2%의 중성당과 우론산, 단백질이 각각 18.4%, 0.7%를 함유하고 있으며 글루코스를 주성분으로 한 글루칸에 미량의 단백질이 함께 구성된 단백다당체이다(14,15).

### TIB 71 대식세포주 배양

American Type Culture Collection(ATCC)의 마우스 대식세포주인 TIB 71 세포는 중앙대의대 미생물학 교실에서 분양받았다. 세포배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제(penicillin 100 unit 및 streptomycin 100 $\mu$ g/ml, GIBCO)가 첨가된 DMEM에서 수행하였다. 다습한 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 정도 증식시킨 세포를 FBS를 제외한 DMEM에 24시간 동안 연장배양 후에 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 세포는 trypan blue exclusion 검사로 생존율 95% 이상인 것만을 선택 사용하였다(14,15,45).

### 영지버섯 다당체의 처리 조건

영지버섯 다당체(PSG)는 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 필요한 농도로 현탁하여 멸균하였다. 배양액을 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 교환하고, 배양세포에의 PSG 처리는 투여 총 용량이 100 $\mu$ l이 되게 각각의 농도 실험군을 조정하였으며, 24시간 처리를 기본 배양시간으로 하였다(14,15).

### 반응산소 대사산물 생성능 측정

반응산소 대사산물(reactive oxygen intermediates : ROI) 혹은 활성산소의 하나인 과산화이온(superoxide anion O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 과산화수소(hydrogen peroxide : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)는 화학발광물질인 lucigenin(C<sub>28</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> F.W. 510.5, Sigma) 및 luminol(C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> F.W. 156.1, Sigma) 그리고 Luminometer(LB 9505, Berthold Co., Germany)를 이용하여 측정하였다(36,37). 생존율 95% 이상의 1 $\times$ 10<sup>6</sup> TIB 71 세포를 PSG와 24시간 혼합 배양한 후에 300 $\mu$ l의 veronal buffered saline(VBS : sodium chloride 21.75g, barbital 2.53g, magnesium chloride 0.25g, calcium chloride 0.052g, bovine serum albumin 0.5g, 1 N hydrochloric acid 8.75ml)에 현탁시킨 후 lucigenin (10 $\mu$ M) 및 luminol(10 $\mu$ M)을 혼합한 후 빛을 차단한 상태에서 Luminometer에 cuvette을 삽입시켰다. 각 검체는 15분 동안의 안정기 후에 70분 동안 방출되는 화학광을 측정하였다. 측정개시 5분경에 10 $\mu$ l의 phorbol-12-myristate 13-acetate(C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>O<sub>8</sub> F.W. 616.8, Sigma : PMA, 최종 농도 5.3 $\mu$ M)를 hamilton 주사기로 부가하

였으며 각각의 화학광은 photon 형태로 photomultiplier 감광기에 모아져서 electron으로 전환되어 Luminometer에 연결된 computer에 의하여 counts per minutes(CPM)으로 환산된 전체 적분면적값으로 나타났다.

### 통계처리

실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차(Mean $\pm$ S.D.)로 표시하였으며 실험에 사용한 각 실험군간의 유의성 검정은 computer program을 이용하여 Student's t-test를 실시하였으며 상관계수를 이용하여 유의도를 판정하였다(46).

### 결과 및 고찰

PSG 농도에 따른 과산화이온 생성은 대조군의 2,060 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm에 비해서 0.1mg 처리시 3,235 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm으로 유의한 증가를 보였다(p<0.001). 0.5mg 처리군에서 5,971 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm으로 대조군보다 3배 정도의 증가된 과산화이온 생성을 나타냈으나 그 이상의 농도에서는 오히려 0.5mg 처리군보다 감소하였다(Fig. 1).

PSG를 0.5mg 처리하면서 처리시간에 따른 과산화이온의 생성변화는 Fig. 2에 나타냈는데 처리전 1,633 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm에서 처리 12시간 후 2,695 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm으로 유의한 증가(p<0.001)가 시작되어 24시간 처리군에서 5,971 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm으로 최고치를 보였으나 48시간 처리군에서 4,668 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm, 72시간 처리군에서 3,135 $\times$ 10<sup>6</sup>cpm으로

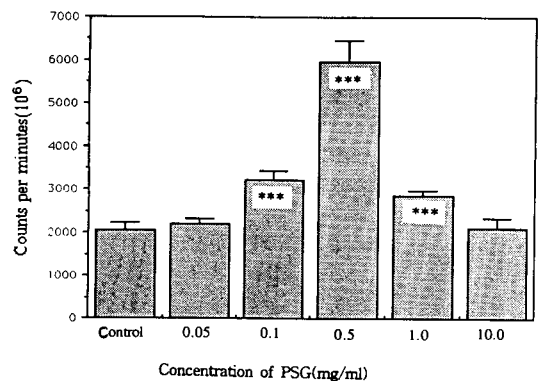


Fig. 1. Dose dependent production of superoxide anion from TIB 71 cells treated with protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. The cells(1 $\times$ 10<sup>6</sup>) were cultured with various concentrations of protein bound polysaccharide for 24hrs at 5% CO<sub>2</sub> incubator. Superoxide anion was determined by chemiluminescens using lucigenin as an amplifier and PMA as a stimulator. Data was expressed as a mean $\pm$ S.D. of hexaplicates. \*\*\* is significantly different from control at 0.001% level.

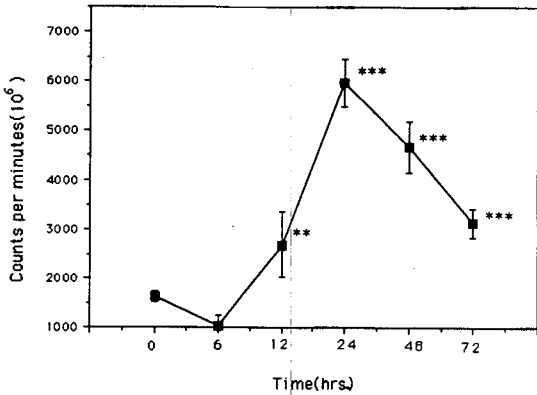


Fig. 2. Time dependent production of superoxide anion from TIB 71 cells treated with protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. The cells ( $1 \times 10^6$ ) were cultured with PSG 0.5 mg at 5% CO<sub>2</sub> incubator for 24hrs. Superoxide anion was determined by chemiluminescens using lucigenin as an amplifier and PMA as a stimulator. Data was expressed as a mean  $\pm$  S.D. of hexaplicates. \*\* is significantly different from control at 0.05% level. \*\*\* is significantly different from control at 0.001% level.

로 시간이 경과함에 따라 감소경향을 보였다.

TIB 71 세포수의 변화에 따른 과산화이온 생성을 조사하기 위하여 PSG 0.5mg을 24시간 처리하여 행한 각각의 실험에서 과산화이온 생성은 Fig. 3에서 보듯이 모든 실험군에서 PSG 처리군이 PSG를 처리하지 않은 군보다 약 2배 이상 높았다. 또한 PSG 처리 유무와 관련

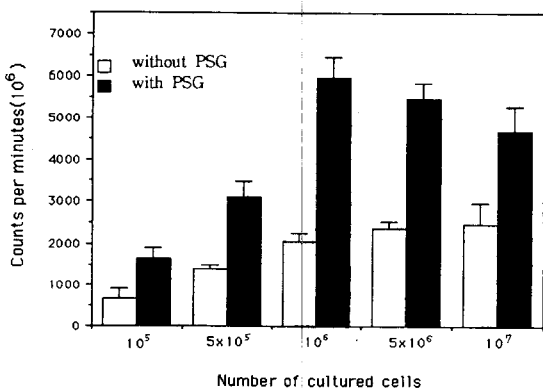


Fig. 3. Cell number dependent production of superoxide anion from TIB 71 cells treated with (●)/without (○) protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. Production of superoxide anion from TIB 71 cells treated with (●)/without (○) PSG 0.5mg. The various numbers of cells were incubated with PSG for 24 hrs. Superoxide anion was determined by chemiluminescens using lucigenin as an amplifier and PMA as a stimulator. Data expressed as mean  $\pm$  S.D. of hexaplicates.

하여 세포수 변화에 따른 과산화 이온의 생성은 10<sup>6</sup> 세포군에서 가장 큰 차이를 나타냈다.

PSG 처리에 의한 TIB 71 세포의 과산화수소의 생성능에 대한 효과를 알아보기 위하여 10<sup>6</sup>개의 TIB 71 세포와 함께 여러 농도로 PSG를 24시간 혼합배양한 후에 과산화수소를 측정된 결과, Fig. 4에서와 같이 대조군의 과산화수소 생성은  $603.20 \times 10^6$ cpm이었으며 PSG 0.05mg을 처리한 실험군에서 부터  $870.00 \times 10^6$ cpm으로 유의한(p<0.001)증가를 나타내었고 10mg 처리시  $1,633.00 \times 10^6$ cpm으로 최고치를 보였다. 0.1mg 처리군과 0.5mg 처리군 사이의 과산화수소 생성능은 유의한 차이(p<0.001)가 있었으나 0.5mg 이상 처리군 상호간에 과산화수소 생성능의 변화에서는 통계적인 유의성이 없었다.

또한 대식세포의 활성산소 생성에 대한 PSG, BCG 및 감마인터페론의 상호작용을 알아보기 위하여 PSG 0.5mg을 24시간 처리군과 비처리군, BCG를 단독처리한 군과 BCG 및 PSG를 병용처리한 군 그리고 IFN- $\gamma$ 를 단독처리한군 과 IFN- $\gamma$  및 PSG를 병용처리한 군의 과산화이온 생성정도를 측정하였다. 실험결과 Fig. 5에서와 같이 대조군은  $2,060.00 \times 10^6$ cpm이고 PSG 처리군은  $5,971.80 \times 10^6$ cpm으로 PSG와 병용처리한 군이 대조군에 비하여 약 3배 가까운 과산화이온의 생성 증가를 보였다. 그리고 BCG를 단독처리한 군은  $2,460.00 \times 10^6$ cpm, BCG와 PSG를 병용처리한 군은  $2,648.00 \times 10^6$ cpm으로, BCG를 단독처리한 실험군은 대조군보다

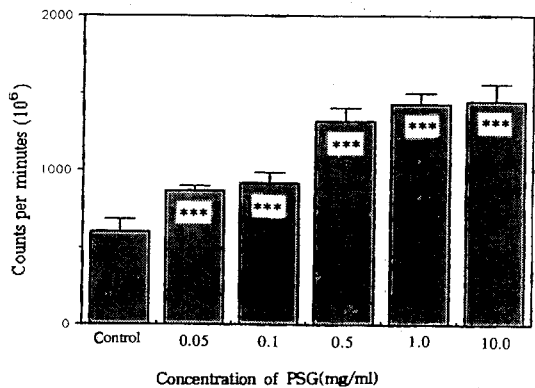
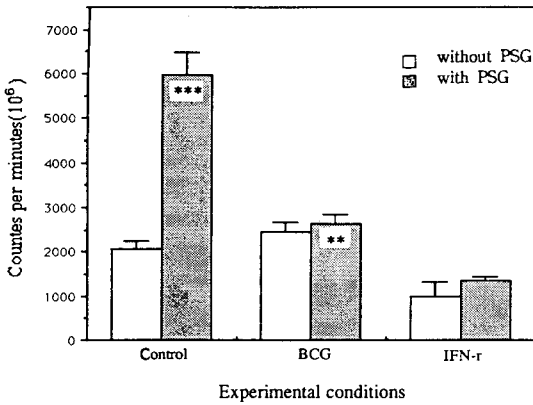


Fig. 4. Dose dependent production of hydrogen peroxide from TIB 71 cells treated with protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. The cells ( $1 \times 10^6$ ) were cultured with various concentrations of PSG for 24 hrs at 5% CO<sub>2</sub> incubator. Production of hydrogen peroxide was determined by chemiluminescens using luminal as an amplifier and a PMA as a stimulator. Data was expressed as a mean  $\pm$  S.D. of hexaplicates. \*\*\* is significantly different from control at 0.001% level.



**Fig. 5. Production of superoxide anion with(■)/without (□) protein bound polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* in TIB 71 cells which were triggered with PMA(5.3μM) after priming with BCG(100μg) or IFN-γ(1000U).** PSG was added 1 × 10<sup>6</sup> TIB 71 cells for 24 hrs at 5% CO<sub>2</sub> incubator. Effects of BCG and IFN-γ on the production of superoxide anion were determined from TIB 71 cells which were triggered with PMA(5.3μM) after priming with BCG(100μg) and PSG(0.5mg)/IFN-γ(1000U) and PSG(0.5mg). Data was expressed as a mean ± S.D. of hexaplicates. \*\* is significantly different from control at 0.05% level. \*\*\* is significantly different from control at 0.001% level.

미세한 증가를 보였으나 통계적 유의성은 없었고 BCG와 PSG를 병용처리한 실험군은 대조군보다 증가하였다(p<0.005). 그러나 IFN-γ 단독처리군은 992.00 × 10<sup>6</sup> cpm, IFN-γ와 PSG 병용처리군은 1,354.50 × 10<sup>6</sup> cpm으로 양자 모두 대조군 및 PSG 처리군과 비교하여 과산화이온의 생성 저하를 보였으며, 또한 BCG 단독 및 BCG와 PSG를 병용처리한 실험군 모두에서도 PSG 처리군보다 과산화이온의 생성 저하를 보였다. 이는 BCG 또는 IFN-γ 처리에 의하여 대식세포가 초기에 활성화된 상태에서 화학발광체인 lucigenin 첨가에 의하여 측정전의 안정화 기간인 15분 동안 과산화이온 대부분이 방출되어서 실제 반응산소 대사산물의 측정시에는 quenching effect에 의한 감소로 낮아지는 것으로 사료되며 이러한 결과로 보아 영지버섯 다당체가 대식세포 활성화를 지속시키지는 않은 것으로 생각되나 synergic effects는 규명할 수 없었다. PSG와 BCG 혹은 IFN-γ의 대식세포에 대한 상호작용 관계를 정확히 측정하기 위해서는 또 다른 실험방법이 요구되리라 생각된다.

반응산소 대사산물은 대부분의 체세포(mammalian cell), 간세포, 대식세포, 그리고 호중구 등에서 호흡폭발(respiratory burst)의 기전으로 생성된다(25-27,31,33).

Adachi 등(19)은 β-1,3-결합을 가진 D-Glucan이 대식세포를 활성화한다고 보고하였으며, Hibbs(22)와

Nathan 등(23)에 의하여 대식세포가 어떤 일련의 자극을 받아서 활성화되면 세균 치사작용(microbicidal) 및 종양세포 치사작용(tumouricidal)을 가진다는 사실이 확인된 이후로 그 기전을 밝히고자 많은 연구가 지속되고 있으며 그 작용기전의 하나로 강한 반응성을 가지는 무기화합물 반응산소 대사산물에 대한 연구가 활발하다(21-44).

특히 대식세포에서 생성된 반응산소 대사산물에 의한 종양세포치사는 작용기전이 다른데 첫째로 반응산소 대사산물이 단독으로 직접 종양세포에 작용하여 종양세포막 지질성분의 산화에 의한 기능상실을 유도한다. 둘째의 기전은 반응산소 대사산물이 비항체의 의존적으로 작용하기도 하며 또는 반응산소 대사산물이 항체의 의존적 혹은 어떤 대식세포에 대한 약리적 자극을 주어서 형질전환된(transformed) 종양세포를 치사시키는 것으로 알려져 있다(22-27,32).

이때 대식세포의 종양세포치사 기능은 반응산소 대사산물의 분해물질(scavenger)인 superoxide dismutase, catalase, 2,3-dihydroxy benzoate, ethanol 그리고 cytochrome c에 의해서 방해받지 않는다(41).

반응산소 대사산물은 대식세포의 탐식과정 중에서 가장 현저한 생성을 관찰할 수 있는데 그 과정은 O<sub>2</sub> + e<sup>-</sup> → O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, O<sub>2</sub><sup>-•</sup> + O<sub>2</sub><sup>-•</sup> + 2H<sup>+</sup> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe(II) → HO<sup>•</sup> + HO<sup>•</sup> + Fe(III)의 주된 대사경로를 가지며 이 중 O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 HO<sup>•</sup>는 강력한 환원력을 가진 작용기로써 O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 ferricytochrome, nitroblue tetrazolium(NBT)의 환원반응이나 epinephrine이 adrenochrome으로 변화하는 산화반응 등을 이용하여 측정이 가능하다. 특히 화학광(chemiluminescence)을 이용한 측정법이 감도가 높고 안전하기 때문에 각광을 받고 있다(36-40).

PSG의 세균치사작용에 대한 보고로는 이와 정(17)이 영지버섯추출물을 생리식염수에 녹여 백혈구의 탐식능을 측정한 것이 있으며 PSG가 대식세포에서 반응산소 대사산물 생성에 미치는 효과에 대한 연구로는 현등(18)이 cytochrome c를 이용하여 마우스 복강 대식세포에서 30분간 과산화이온 생성을 측정하고 보고했다. 하지만 이 방법은 BRM을 이용한 대식세포 기능평가시에는 대식세포기능이 정상적인 대사만을 하지 않을 가능성이 있기 때문에 영지버섯 다당체의 면역효과 측정에는 부적절할 수 있다.

본 실험에서는 PSG 0.5mg의 농도와 24시간 작용시킨 실험군에서 반응산소 대사산물 생성량이 최고치를 보인 것은 Lieu 등(35)의 보고서에서 0.05mg이 최고 효과 농도인 것과 상이하였는데 이는 검체 및 추출물방법,

반응산소 대사산물의 생성 기원세포의 종류 및 수 그리고 활성상태의 차이에 기인하였으리라고 생각된다. 특히 IFN- $\gamma$ 은 항종양면역 효과에 중요한 역할을 한다는 사실이 알려졌으며 최근에 lymphocyte activate killer cell(LAK)와 NK 세포를 활성화하여 세포성 면역는 물론 항종양작용을 인정받고 있다. 또 BCG는 암세포 파괴에 가담하여 세포성 면역을 증강시키므로 과거 많은 관심을 가지고 연구하였다(42,43). 특히 BCG는 adjuvant의 기능을 발휘하며 T 세포를 활성화시켜서 각종 세포성 면역을 증강시키고 있다. 본 실험에서도 이러한 효과를 확인할 수 있었다.

요 약

영지버섯 다당체가 대식세포의 항미생물작용과 항종양작용에 미치는 효과를 연구하기 위해 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)으로부터 분리 배양한 균사체를 알카리추출하여 얻은 다당체와 ATCC의 마우스 유래 탐식 세포주 TIB 71을 사용하여 실험하였다. 면역계 전체의 기능을 담당하고 통제하는 대식세포의 면역능에 있어서 특히 그 작용기전의 하나로 주목 받고 있는 반응성이 강한 무기화합물 중 반응산소 대사산물 등을 실험하였다. 대식세포의 과산화이온 및 과산화물의 생성에 영향을 미치는 영지버섯 다당체의 효과는 실험한 결과 과산화이온의 생성은 0.1mg 이상 실험군에서, 과산화물의 생성은 실험군 모두에서 대조군에 비해 영지버섯 다당체 처리군이 유의하게 증가(p<0.001)하였다. 특히 과산화이온의 생성은 0.5mg 실험군의 경우 대조군에 비해서 3배 정도의 증가된 과산화이온 생성을 나타냈다. 또한 CO<sub>2</sub> 배양시간에 따라, 처리세포 수에 따라 변화를 보였으며 실험결과 영지버섯의 다당체는 처리 농도 0.5 mg 실험군에서, 배양시간 24시간 실험군에서 우수하였고 10<sup>6</sup>개의 세포주를 사용하는 것이 좋은 결과를 나타냈다. 한편 대식세포 자극인자로 널리 알려진 BCG와 IFN- $\gamma$  및 PSG의 상호작용의 가능성을 알아본 실험결과 영지버섯 다당체를 각각 BCG 또는 IFN- $\gamma$ 와 병용처리시 대식세포의 반응산소 대사산물(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·)의 생성능은 영지버섯 다당체만 처리한 실험군과 비교하여 현저히 감소하였다. 이는 BCG 또는 IFN- $\gamma$ 가 대식세포를 조기에 활성화시켜 실제 측정시에는 quenching effect에 의한 감소로 낮아지는 것으로 사료되며 이러한 결과로 보아 영지버섯 다당체가 대식세포 활성화를 지속시키는 것은 아니므로 생각되나 synergic effects는 규명할 수 없었다. 이상의 결과를 보면 영지버섯 균사체 배양물로부터 추출분리한 다당체의 항미생물작용과

항암작용은 대식세포로부터 분비되는 물질에 의한 직접적인 효과작용 즉 미생물 및 종양세포에 대한 직접적인 세포독성과 대식세포 활성화에 따른 숙주에의 면역 조절 작용에 의해 숙주의 면역기능이 활성화되어 면역능을 높이는 작용에 의한 것이라고 생각된다.

문 헌

1. Lehninger, A. L. : *Principles of biochemistry*. Worth Publishers, Inc., New York, p.292(1982)
2. 허준 : *東醫寶鑑*. 남산당, 서울, p.1177(1992)
3. 相賀徹夫 : *中藥大辭典*. 上海科學技術出版社小學館, 上海, p.5767(昭和60年)
4. 천연물화학연구회 : *천연물 화학*. 진명출판사, 서울, p.651(1979)
5. Franz, G. : Polysaccharides in pharmacy; current applications and future concepts. *Planta Med.*, **55**, 493(1989)
6. 毛利威徳 :キノコ類の呈味作用と藥理的效果. 缶詰時報, **55**, 26(1976)
7. 久保道徳 : *靈芝*. 明寶出版社, 서울, p.51(1986)
8. 水野卓, 加藤尚美, 戶塚篤史, 竹中一秀, 新海健吉, 清水雅子 : *マンネンタケ(靈芝)의 水溶性 多糖類의 分畫, 構造, 抗腫瘍活性について*. 日本農藝化學會誌, **58**, 871(1984)
9. Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fuji, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Uchida, M. : The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum*(FR.) KARST : Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1367(1985)
10. Kabir, Y., Kimura, S. and Tamura, T. : Dietary effect of *Ganoderma lucidum* : Mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats. (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 433(1988)
11. Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, S. : Effects of the extracts of *Ganoderma lucidum* on blood glucose level in rats. *Planta Med.*, **54**, 290(1988)
12. 정명현 : 영지버섯의 간중독 및 고지혈증에 대한 약효. 제3회 영지버섯 국제심포지움 학술발표회 초록, p.37(1991)
13. Stavinoha, W. B. : 영지버섯의 항염증작용. 제3회 영지버섯 국제심포지움 학술발표회 초록, p.9(1991)
14. 김성환, 김울상, 김영식 : 영지버섯에서 분리한 항암성 다당체의 연구. *한국영양식품학회지*, **24**, 147(1995)
15. 김성환, 김울상 : 영지버섯 다당체의 마우스 대식세포 면역증강 효과. *한국식품영양과학회지*, **26**, 148(1997)
16. 김명자, 김하원, 이영순, 심미자, 최용칠, 김병각 : 영지의 안전성에 관한 연구. *한국균학회지*, **14**, 49(1986)
17. 이미숙, 정규선 : 영지추출물 및 *Escherichia coli* 배양액이 백혈구의 Chemotaxis에 미치는 영향. *한국균학회지*, **15**, 1(1987)
18. 현진원, 최용칠, 김병각 : 한국산 고등균류의 성분연구(제67보) : 영지버섯 자실체의 항암성분. *한국균학회지*, **18**, 58(1990)
19. Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T. : Macrophage activation *in vitro* by chemically cross-linked(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Glucan. *Chem. Pharm.*

- Bull.*, **38**, 988(1990)
20. Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. : Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2641(1985)
  21. 김성환 : 영지버섯 다당체의 nitric oxide 생성능 및 생성기전 연구. *한국식품영양과학회지*, **27**, 333(1998)
  22. Hibbs, J. B. Jr. : The macrophage as a tumoricidal effector cell : A review of *in vivo* and *in vitro* studies on the mechanism of the activator macrophage nonspecific cytotoxic reactions. In the macrophage in neoplasia, Academic press, New York, p.83(1976)
  23. Nathan, C. F., Silverstein, S. C., Bruker, L. D. and Lohn, Z. A. : Extracellular cytolysis by activated macrophages & granulocytes. *J. Exp. Med.*, **149**, 100(1979)
  24. Brozna, J. P., Horan, M., Rademacher, J. M. and Pabst, K. M. : Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis* : Inhibition of priming for interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha and altered protein phosphorylation. *Infection and Immunity*, **59**, 2542(1991)
  25. Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. : Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **141**, 2407(1988)
  26. Unanue, E. R. and Allen, P. M. : The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, **236**, 551(1987)
  27. Adams, D. and Hamilton, T. A. : The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, **2**, 283(1984)
  28. Marodi, L., Kalmar, A. and Karmazsin, L. : Stimulation of the respiratory burst and promotion of bacterial killing in human granulocytes by intravenous immunoglobulin preparations. *Clin. Exp. Immunol.*, **79**, 164(1990)
  29. Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. : Nitric oxide : physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109(1991)
  30. Vanderslice, W. E. and Collins, J. L. : Differences in the tumor necrosis factor- $\alpha$  mediated lysis by fixed natural cytotoxic cells and fixed cytotoxic macrophages. *J. Immunol.*, **146**, 156(1991)
  31. Kwon, N. S., Stuehr, D. S. and Nathan, C. F. : Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.*, **174**, 761(1991)
  32. Nathan, C. F. and Hibbs, J. B. R. : Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, **3**, 65(1991)
  33. Henry, W. M. and Rachel, F. T. : L-Arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.*, **27**, 513(1992)
  34. Stuehr, D. J. and Nathan, C. F. : Nitric oxide : a macrophage product for cytostasis & respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.*, **169**, 1543(1989)
  35. Lieu, C. W., Lee, S. S. and Wang, S. Y. : The effect of *Ganoderma lucidum* on induction of differentiation in Leukemic U937 cells. *Anticancer Research*, **12**, 1211 (1992)
  36. Gyllenhammar, H. : Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J. Immunol. Methods.*, **97**, 209(1987)
  37. Hallett, M. B., Edwards, S. W., Barrow, S. C. L. and Campbell, A. K. : Dependence of PMNL luminol dependent chemiluminescence on oxygen. In analytical applications of Bioluminescence and Chemiluminescence. Academic press, New York, p.347(1984)
  38. Harpe, D. L. J. and Nathan, C. F. : A semi-automated micro-assay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol. Methods*, **78**, 323(1985)
  39. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall P. A. and Freeman, B. A. : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Medical Sciences*, **87**, 1620(1990)
  40. Ito, M., Suzuki, H., Nakano, N., Yamashita, N., Sugiyama, E., Maruyama, M., Hoshino, K. and Yano, S. : Superoxide anion and hydrogen peroxide release by macrophage from mice treated with *Nocardia rubra* cell-wall skeleton : Inhibition of macrophage cytotoxicity by a protease inhibitor but not by superoxide dismutase and catalase. *Gann.*, **74**, 128(1983)
  41. Klebnoff, S. J. : Phagocytic cells : Products of oxygen metabolism in inflammation : Basic principles and clinical correlates. Gallin, J. I., Goldstein, I. M. and Snyderman, R. (eds.), Raven Press, New York, p.391(1988)
  42. Liew, F. Y., Li, Y. and Millott, S. : Tumor necrosis factor- $\alpha$  synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.*, **145**, 4306(1990)
  43. Stuehr, D. J. and Marletta, M. A. : Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG Infection, Lymphokines or Interferon- $\gamma$ . *J. Immunol.*, **139**, 518(1987)
  44. Liew, F. Y. and Cox, F. E. G. : Nonspecific defence mechanism : the role of nitric oxide nonspecific defence. Elsevier Science, p.17(1991)
  45. Hay, R., Macy, M., Chen, T. R., McClintock, P. and Reid, Y. : American type culture collection catalogue of cell lines and hybridomas. 6th ed., American Type Culture Collection, Maryland, p.254(1988)
  46. 채서일, 김범중 : SPSS/PC+를 이용한 통계분석. 범문사, 서울, p.61(1989)