THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vol. 29, No 1, p15-21 April 2001
Copyright © 2001 by The Korean Society of Mycology
Printed in S. KOREA

Ganoderma lucium IY009 유래 단백다당류의 분자량 차이에 따른 면역증강활성

이준우* · 백성진[1] · 방광웅 · 김용석[1] · 김광수 · 전억한[2]

경복전문대학 식품가공과, [1]일양약품㈜ 중앙연구소 생물공학팀, [2]경희대학교 식품가공학과

Immunomodulatory Activities by Difference in Molecular Size of the Proteoglycan Extracted from *Ganoderma lucidum* IY009

June-Woo Lee*, Seong-Jin, Baek[1], Kwang-Woong Bang, Yong-Seuk Kim[1], Kwang-Soo Kim and Uck-Han Chun[2]

Department of Food Science and Technology, Kyungbuk College, Yeongju 750-712
[1]Biotechnology Lab., Central Research Institute, Il Yang Pharm. Co. Ltd., Yongin 449-900
[2]Department of Food Science and Technology, Kyunghee University, Yongin 449-701

ABSTRACT: This study was conducted to investigate the immunomodulatory activities of proteoglycan extracted from cultured mycelia of *Ganoderma lucidum* IY009. The proteoglycan contained two polymer peaks, one was the higher MW peak of 2,000 kD and the other was low peaks of 12 kD. To understand the part of strong pharmaceutical activity between two peak, the proteoglycan was separated by ultrafiltration and column chromatography and then examined the various pharmaceutical effects. High molecular weight fraction possesing high content of β-linked glucan was exhibited high antitumor activity against sarcoma 180 bearing ICR mouse. And also, anticomplementary activity was highly observed in high molecule fraction than low it fraction. When the raw 264.7 and murine peritoneal macrophage treated with low fraction, high fraction and other stimuli. The activities inducing tumor necrosis factor of the high fractions were 2.2~2.5 times stronger than that of low fraction.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum*, **Immunomodulatory activities, Macrophages**

영지의 약효에 대한 연구는 많은 연구자들에 의해 수행되었는데, 항종양 및 면역 활성화 작용(Mizuno 등, 1981; Sone 등, 1985), 간 보호 및 지질 과산화 억제 작용(Lee 등, 1996), 간섬유화 억제작용(Park 등, 1997), 혈당 강하 작용(Hikino 등, 1985), 혈압 강하 작용(Lee 등, 1990), 혈소판 응집저해 작용(Shimizu 등, 1985), histamine 유리 억제 작용(Kohda 등, 1985), 단백질 및 핵산 합성작용, 근육계 이상 조절 작용, 항균 작용, 항 돌연변이 작용, 모발 보호 작용, 피부 보호 작용 등이 있는 것으로 알려졌다(Jong and Birmingham, 1992).

영지 유래 다당류의 약리활성에 관한 연구는 주로 면역·항암활성에 관한 연구가 주를 이루어 왔다. Kang 등(1981)은 영지 균사체의 배양 여액에서 단백 다당류를 추출 분리하여 종양 억제효과와 면역에 미치는 영향을 알아보았는데 sarcoma 180 세포를 투여한 쥐에 대해 종양 억제 효과는 60% 이상의 저지율을 나타내었으며, 단백 다당류를 주사한 쥐에 면양 적혈구를 주사한 후 용혈반을 만드는 비장 세포의 수가 현저히 증가함을 관찰하였고, Lee 등(1990)은 배양 균사체를 알칼리 추출한 다당류가 sarcoma 180 암세포 증식저해 활성, 보체계 활성화 및 대식세포의 탐식능이 증가하는 작용을 갖고 있음을 보고하였다. Lee 등(1986)은 영지의 유기 용매 분획물을 쥐에 투여하여 sarcoma 180 세포에 대한 수명 연장(life span) 효과를 살펴보았는데, 대조군의 평균 생존일수는 12일이었는데 투여군은 최대 평균 생존 일수가 19.5일로써 생존율이 162.5%로 나타났음을 보고하였다. 혈당강하 작용의 경우, Hikino 등(1985, 1989)은 영지 자실체의 다당류 분획물인 ganoderan A와 B를 분리하여 정상군의 쥐에 100 mg/kg 농도로 투여한 결과, ganoderan A와 B는 혈장내 포도당의 수치가 각각 44% 및 16% 감소하였으며, alloxan으로 유도된 고혈당 쥐에 100 mg/kg의 농도로 투여시 ganoderan A와 B는 혈장의 포도당 수치가 각각 33% 및 23% 감소한 것으로 보고하였다. 혈압 강하 작용의 경우, Park 등(1987)은 영지 자실체를 열수 추출하여 에탄올로 저분자를 분획하여 유효성분을 선천성 고혈압 쥐에 투여했을 때 대조군에 비해 심박수 및 수축기 혈압 및 확장기 혈압이 강하됨을 보고하였으며, Kabir 등(1988)은 자연 발생적인 고혈압 쥐에 영지 자실체로부터 추출한 과립을 투여하여 혈압과 지방 감소 효과를 관찰하였는데 심장 수축 혈압과 간의 cholesterol과 triglyceride의 수치가 현저히 감소하였고, cholesterol 대사작용에서 cholesterol 합성을 억제함을 보고하였다. Lee 등(1994, 1996)은 CCl_4에 의해 간 손상된 쥐에 영지 균사

*Corresponding author <E-mail: jwlee@mail.kbc.ac.kr>

체 알칼리 추출물인 G009를 투여한 후 혈중 GOT, GPT가 현저히 감소함으로써 지방간 회복 효과와 급성 간염 억제 효과가 있으며, 정상군의 쥐에 비해 혈청 내에 지질과산화 억제능이 59.3%의 수치로 나타난다고 보고하였다. Sugiura 등(1977)은 영지 자실체를 열수 추출하여 총 추출물과 고분자 분획물을 mouse, rat, guinea pig에 투여하여 급·만성독성 시험을 실시하여 투여 가능한 최대용량에서도 독성을 나타내지 않았으며, 30일간 장기 투여하였을 경우에도 체중 변화, 혈액 검사, 장기 검사 등에서 이상이 발견되지 않았다고 보고하였으며, Kim 등(1986)은 영지의 열수 추출물로 안전성 실험을 하였는데, 쥐를 이용한 급성독성실험에서 5,000 mg/kg 이상 투여시에만 독성이 나타났으며 경구투여의 경우에 30일 동안 투여하여도 체중 감소가 보이지 않았으며 혈액학적 검사에서 적혈구의 수, hematoglute치, hemoglobin양이 정상군과 유사하게 나타났다고 보고하였다. Nogami 등(1986)은 영지 열수 추출물을 guinea pig와 rat에 투여하여 항원 항체 반응과 피부의 이종단백질에 대한 과민성 반응(PCA)을 통한 복막 비만 세포로부터 histamine 유리 억제능을 측정한 결과, 500 mg/kg 투여시 40.9%의 억제 효과를 보였다고 보고하였다. 이와 같이 영지 유래의 다당류는 다양한 약리활성을 갖는 것으로 보고됨으로서 이들에 대한 약리학적 작용기전 규명을 위한 기초연구가 이루어져야만 할 것이다.

따라서 본 연구는 면역·항암활성이 우수한 *Ganoderma lucidum* IY009 균사체의 alkali 추출 단백다당류인 GMPG를 한외여과(ultrafiltration system)와 gel chromatography를 이용하여 고분자와 저분자로 분획화하여 항보체 활성능을 측정하였고, 초기 면역반응에 관여하는 대식세포로부터 nitric oxide 및 *TNF-α* 생성능을 조사하였다.

재료 및 방법

배지 및 시약

동물세포 배양을 위한 배지로서 10% fetal calf serum이 함유된 RPMI 1640을 사용하였으며, 대식세포 배양을 위한 배지는 streptomycin(100 μg/ml)과 penicillin(100 U/ml)이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium) 배지를 사용하였다. RPMI 1640, DMEM 배지 및 fetal new born calf serum은 GIBCO(Grand Island, N.Y)사, streptomycin, penicillin, LPS(*E. coli* 0127 : B8), IFN-γ 및 $NaNO_2$ 등은 Sigma 사, mTNF-α는 Genzyme(USA, Cambridge MA)사, 96-well tissue plate와 100 mm petridish는 Falcon Inc.(Linclon park, NJ), 기타 시약들은 필요에 따라 1급 또는 2급 시약을 적절히 선택하여 사용하였다.

실험동물 및 배양

복강 대식세포의 분리를 위한 실험 동물은 웅성의 ICR계 *mouse*로 생후 *8~10* 주령으로 무게는 *20~25 g*의 것을 삼육축산으로부터 공급받아 사용하였다. Mouse의 사육 조건으로 실험동물실 온도는 22±2℃, 습도는 55~60%, light cycle은 12시간씩 빛과 암상태를 유지하였으며, 마우스용 고형 사료와 물을 무제한 공급하였다. Raw 264.7 대식 세포주는 원광대 의대 미생물학 교실에서 분양 받아 사용하였다. Mouse의 복강 대식세포와 Raw 264.7 대식세포는 부착성 세포로서 단층 배양하였다. 배지로는 10%의 fetal calf serum (FCS)이 포함된 DMEM을 사용하여 petri dish를 이용하여 2~3일 마다 계대하여 주면서 실험 목적에 따라 다르게 사용하였다.

항보체 활성의 측정

보체활성은 Yamada 등(1987)의 방법을 변형하여 측정하였으며, 실험의 정확을 기하기 위하여, complement와 hemolysin에 대한 활성 역가를 측정하여 실험에 이용하였다. 항보체 활성은 대조군 대비 총보체 용혈율(50% of total complement hemolysis, TCH_{50}, %)의 저지율(inhibition of TCH_{50}, $ITCH_{50}$, %)로 나타내었다.

Mouse 복강 대식세포의 분리

Mouse 복강 대식세포의 분리는 10 ml의 Ca^{2+}, Mg^{2+}-free Hanks' balanced salt solution을 복강 내로 주입하고, mouse를 상하 좌우로 가볍게 흔든 다음 주사기를 이용하여 세포를 모아 200 × g에서 5분간 원심분리를 2회 반복 실시하였다. 분리된 세포는 DMEM에 부유시켜 petri dish에 분주한 다음 5% CO_2, 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액의 비부착성 세포를 제거한 후, 10% FCS가 함유된 DMEM 배지를 교환하여 이를 실험 목적에 따라 사용하였다.

Nitric oxide의 측정

대식세포로부터 생성되는 NO를 측정하기 위해서, 96 well에 대식세포를 분주하고, 2시간 동안 전 배양하여 비부착 세포를 제거하였다. GMPG, GMPG 고분자, 저분자 분획물 및 대조물질은 각 well에 10 μg/ml 농도로 가하여 37℃에서 5% CO_2 incubator에서, 24시간 동안 배양 한 후, NO를 측정하였다. 대식세포에 의해 생성되는 NO는 Ding 등(1988)의 방법에 따라 정량하였다. 간략하면, 100 μl의 배양액과 동량의 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4)를 가하여 실온에서 10분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 ELISA reader(Bio-Tek instrument, Inc. Ceres UV. HDi)를 이용하여 측정하였다. NO_2의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻어진 흡광도로부터 표준 곡선을 작성하여 측정하였다.

TNF-α의 측정

대식세포 배양물내 TNF-α의 정량은 multiple antibody *sandwich* 원리를 이용한 *solid-phase ELISA* 방법을 통하여 다음과 같이 측정하였다. 대식세포 배양액에 GMPG, GMPG

고분자, 저분자 분획물 및 대조물질 등을 가하고 24시간 동안 배양한 후, 배양 상층액을 수획하여 원심분리를 하였다. 원심분리를 통해 얻어진 상층액들은 -70℃에서 동결 보관하면서 실험에 이용하였다. 배양 상층액내의 TNF-α 정량법의 정량은 Pizarro 등(1994)의 방법을 이용하였다. 반응 정지 후 실온에서 10분 동안 방치하고 30분 이내에 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료속의 mTNF-α양은 표준 mTNF-α의 농도의 흡광도를 이용하여 얻어진 표준 곡선으로부터 계산하였다.

항산화 효과의 측정

Microsome의 분리와 지질 과산화 유발은 Kiso(1984)의 방법에 따라 실시하였다. 지질 과산화 정도는 Ohkawa 등(1979)의 방법에 준하여 표준물질로 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 이용하여 표준곡선을 작성하고, 시료의 지질 과산화물(malondialdehyde, MDA) 양을 측정하였다. 또한 지질 과산화 억제정도는 다음의 계산식으로 표시하였다.

$$\text{Inhibition ratio}(\%) = \frac{\text{MDA of control - MDA of sample}}{\text{MDA of control}} \times 100(\%)$$

결 과

항보체 활성

GMPG와 이의 고분자 및 저분자 분획들의 항보체 활성화에 대한 실험 결과는 Fig. 1에 나타내었다. GMPG에서는 19.6%의 항보체 활성능을 나타냈으며, 항암 활성이 높았던 GMPG-CH 분획에서 가장 높은 39.3%의 활성능을

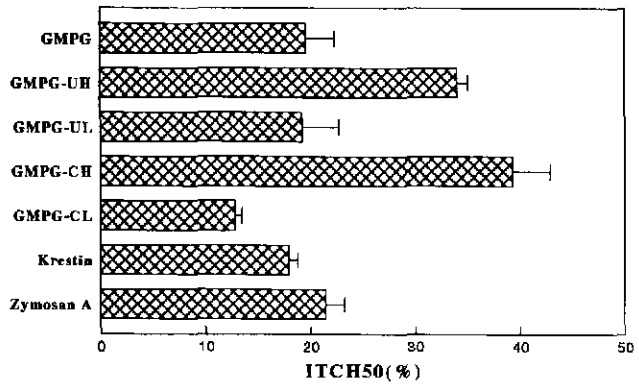

Fig. 1. Anticomplementary activity of GMPG, GMPG high and low molecule, obtained from *G. lucidum* IY009. GMPG: *Ganoderma lucidum* mycelial proteoglycan, GMPG-UH: High molecule fraction by ultrafiltration of GMPG, GMPG-UL: Low molecule fraction by ultrafiltration of GMPG, GMPG-CH: High molecule fraction by column fractionation of GMPG, GMPG-CL: Low molecule fraction by column fractionation of GMPG.

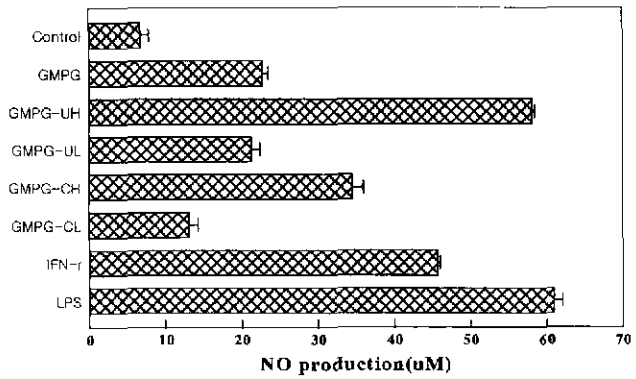

Fig. 2. Production of nitric oxide by each fraction and GMPG treated Raw 264.7 macrophage cell.

보였으며, 고분자 분획이 저분자 분획보다 높은 항보체 활성능을 나타냈다. 양성대조물질로 사용한 krestin과 zymosan A의 경우 각각 18.0과 21.5%의 항보체 활성능을 나타내었다. Okuda 등(1972)은 β-glucan성 다당류의 항암활성은 항보체 활성능과 밀접한 관계가 있다고 보고하였는데, 본 연구의 결과에서도 항암활성능이 높았던 분획에서 항보체 활성능이 높게 나타나므로 서 β-glucan성 단백다당류의 항보체 활성은 분자량의 크기에 따른 구조적 특징에 기인하는 것으로 추정된다.

Raw 264.7 세포에 의한 NO 생성

Ganoderma lucidum IY009의 배양 균사체로부터 분리된 GMPG와 이의 고분자 및 저분자가 Raw 264.7 세포주에서 nitric oxide 생성능에 미치는 효과를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 영지 균사체의 알칼리 추출물인 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자 단백 다당류도 대식세포의 nitric oxide 생성을 촉진하는 것으로 나타났다. GMPG 처리시는 22.7 μM, GMPG-UH와 GMPG-UL은 각각 58.1 μM과 21.3 μM, column 분획은 GMPG-CH와 GMPG-CL은 각각 34.5 μM과 13.1 μM의 NO를 생성하는 것으로 조사되었다. 양성대조물질로 사용한 IFN-γ와 LPS에서는 각각 45.7 μM과 60.9 μM로 나타났다.

이와 같이 항암 및 항보체 활성능을 갖는 것으로 조사된 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자 분획에서 생성되는 NO는 체내에서 다양한 면역학적 활성을 유도할 것이며, 또한 고분자 분획에서 다량의 nitric oxide가 분비되는 것으로 보아 고분자 중합도가 높은 단백다당류가 1차적으로 대식세포 등을 자극하여 2차적으로 면역세포들을 활성화시키는 것으로 여겨진다(Adams and Nathan *et al.*, 1983).

혼합 첨가에 따른 NO 생성

대식세포의 활성인자인 IFN-γ를 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자들과 혼합 첨가하여 Raw 264.7 세포의 활성화에 미치는 영향을 알아본 결과는 Fig. 3과 같다. IFN-γ의 단일

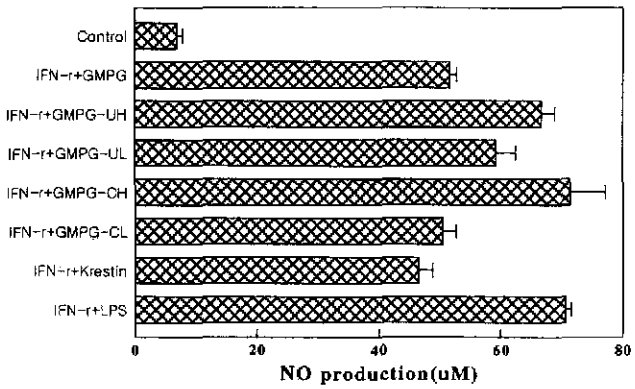

Fig. 3. Production of nitric oxide by the mixture of each fraction and IFN-γ treated Raw 264.7 macrophage cell.

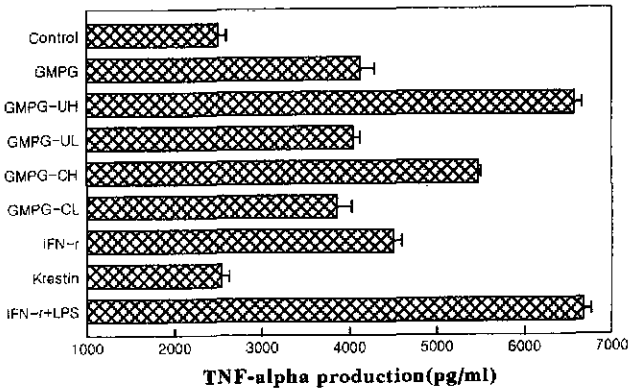

Fig. 5. TNF-α production from Raw 264.7 cell treated with GMPG and each fraction.

활성인자를 첨가한 대식세포보다 각 단백다당류들을 혼합할 경우 약 5~26 μM의 nitric oxide 생성을 증가시켰다. IFN-γ는 T 세포와 NK 세포에서 생산되고, B 세포의 분화 및 대식세포를 활성화시키는 것으로 알려졌으므로, 영지 유래 단백다당류는 면역활성을 위한 상승제 역할을 하며, adjunvant로서의 기능을 수행 할 수 있을 것으로 여겨진다 (Trinchieri and Perussia *et al.*, 1985).

정상 Mouse Periotoneal Macrophage에서의 NO 생성

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자들의 정상 mouse 복강 대식세포에서 NO 생성능을 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조물질로 사용한 IFN-γ와 LPS는 각각 15.9 μM과 13.0 μM의 NO를 생성하였다. GMPG는 6.0 μM, GMPG-UH와 GMPG-UL은 각각 11.7 μM과 5.7 μM, column 분획인 GMPG-CH와 GMPG-CL은 각각 6.2 μM 및 5.5 μM의 NO를 생성하였다. 다당류는 이들간 분자의 중합도, chain packing 및 분지도의 차이와 약리활성간에 상관성이 있는 것으로 알려졌으므로(Gao *et al.*, 1988), 영지 유래 단백다당류 분자량에 따른 활성의 차이는 고분자 중합도가 큰 단백다당류가 대식세포 활성화 등을 포함하는 일련의 면역반응을 촉진하는 것으로 추정된다.

Raw 264.7 세포로부터 TNF-α 생성

Ganoderma lucidum IY009의 배양 균사체로부터 분리된 GMPG와 이의 고분자 및 저분자가 Raw 264.7 세포주로부터 TNF-α 생성능에 미치는 효과를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 대식세포로부터 TNF-α 생성 유도 물질인 IFN-γ와 LPS 처리시는 각각 4,501.5 pg/m*l*과 5,600.5 pg/m*l*, GMPG 처리시는 4,128.3 pg/m*l*의 TNF-α를 생성하였다. 또한 GMPG-UH와 GMPG-CH 경우는 각각 6,573.4 pg/m*l*과 5,471.8 pg/m*l*의 TNF-α를 생성함으로서 고분자 중합도가 높은 고분자 분획이 저분자 분획보다 대식세포의 cytokine 생성능에 더 큰 유도작용을 하는 것으로 나타났다.

대식세포 활성인자와 혼합 첨가에 따른 TNF-α 생성

GMPG, GMPG 고분자 및 저분자들과 IFN-γ를 Raw 264.7 세포주에 동시에 투여하여 TNF-α 생성능에 미치는 효과를 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. IFN-γ와 GMPG를 동시에 처리시에 6,435.8 pg/m*l*로 GMPG 단독처리시보다 약 1.6배 증가 효과를 나타내어 IFN-γ가 TNF-α 생성에 있어서 상승작용 효과가 있음을 나타냈으며, IFN-γ와 GMPG-UH, GMPG-CL을 동시에 처리시는 각각 6,736.9 pg/m*l*과 6,802.0 pg/m*l*의 TNF-α를 생성함으로서 단백다당류 단독

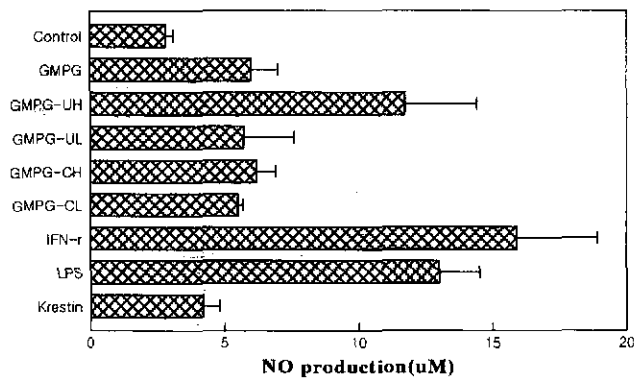

Fig. 4. Production of nitric oxide by each fraction and GMPG treated normal mouse periotoneal macrophage.

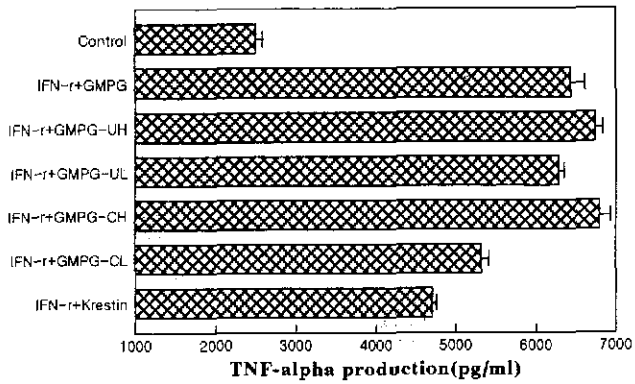

Fig. 6. TNF-α production on the combination with GMPG and IFN-γ.

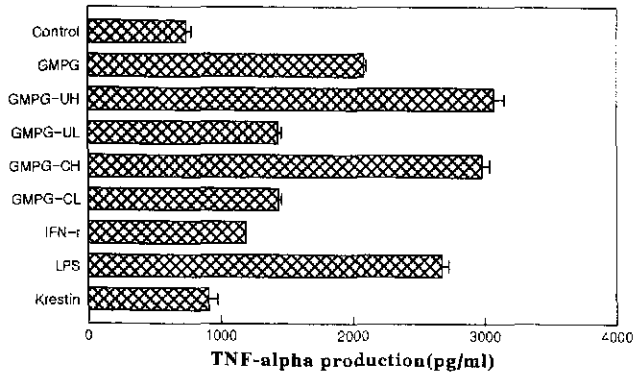

Fig. 7. TNF-α production from normal mouse peritoneal macrophage treated with GMPG and each fraction.

처리시와 동일한 경향을 보였다.

정상 mouse로부터 분리된 대식세포로부터 TNF-α 생성

GMPG와 이의 고분자 및 저분자가 정상 쥐로부터 분리된 대식세포로부터 TNF-α 생성능에 미치는 효과를 측정한 결과는 Fig. 7과 같다. IFN-γ와 LPS 처리시는 각각 1,189.1 pg/m*l* 및 2,678.1 pg/m*l*, GMPG 처리시는 2,084.8 pg/m*l*의 TNF-α를 생성하였다. GMPG-UH, GMPG-CH 처리시는 각각 3,068.0 pg/m*l*과 2,975.3 pg/m*l*의 TNF-α를 생성함으로서 정상 쥐로부터 분리된 대식세포에서도 고분자 중합도가 높은 고분자의 분획이 저분자 분획보다 대식세포를 활성화시키는 것으로 나타났다.

AsA-Fe^{2+}로 유도된 지질 과산화에 대한 영향

담자균류 유래 일부 단백다당류의 간장보호 효과의 일부는 간세포막의 지질 과산화 억제를 통하여 일어나는 것으로 보고되었다(Lee 등, 1996). 영지 유래 다당류의 지질 과산화 억제효과를 알아보기 위해, 배양균사체의 알칼리 추출물인 GMPG와 그의 한외여과 및 컬럼 분획물들에 대한 지질 과산화 억제활성을 조사하기 위하여 *in vitro*에서 간 microsome에 시료를 가한 후, 비효소적인 방법으로 지질 과산화를 유도시켜 생성된 MDA의 양을 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. GMPG의 한외여과 고분자 분획인 GMPG-UH에서 92.3%로 지질 과산화 억제능이 있는 것으로 나타났으며, 컬럼 분획 고분자인 GMPG-CH의 경우는 40.3%로 나타났다. 즉, 컬럼에 의한 분획보다는 한외여과 분획 고분자에서 지질 과산화 억제능이 높은 것으로 나타났다.

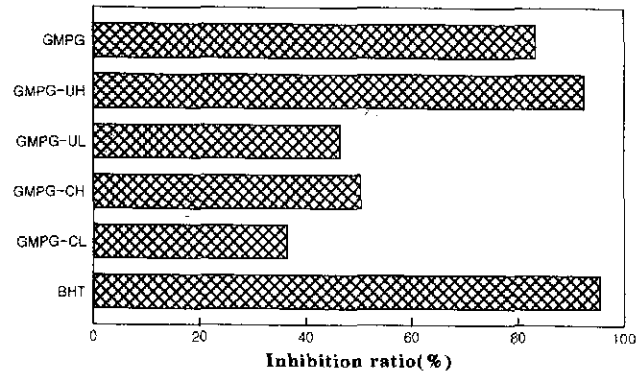

Fig. 8. Effect of GMPG and each fraction on ascorbate/Fe^{2+}-induced lipid peroxidation by rat liver microsome.

고 찰

영지(*Ganoderma lucidum*) 유래 다당류는 면역 촉진 효과, 항암활성 및 간 보호 작용 등의 다양한 약리활성을 갖는 것으로 알려졌다(Mizuno 등, 1984; Sone 등, 1985). GMPG와 이의 고분자 및 저분자 분획들의 항보체 활성화에 대한 실험 결과는 GMPG에서는 19.6%의 항보체 활성능을 나타냈으며, 항암 활성이 높았던 GMPG-CH 분획에서 가장 높은 39.3%의 활성능을 보였으며, 고분자 분획이 저분자 분획보다 높은 항보체 활성능을 나타냈다. 양성 대조물질로 사용한 krestin과 zymosan A의 경우 각각 18.0과 21.5%의 항보체 활성능을 나타내었다. 보체계는 면역계에서 식작용, 면역 부착작용, peptidase 활성, 대식세포의 유주활성, anaphylatoxin 등에 관여한다고 알려졌다(Shimura 등, 1983). 또한 대식세포에는 활성화된 C3 단편들의 수용체가 존재하며, 이들 수용체는 보체 활성화물 또는 분해물들과 결합하여 대식세포를 활성화시켜 다양한 생리활성 물질들을 분비하여 항암활성을 발휘하는데 참여하고 있다고 알려졌다(Lambris 등, 1988; Keller 등, 1973). Okuda 등(1972)은 β-glucan성 다당류의 항암활성은 항보체 활성능과 밀접한 관계가 있다고 보고하였으며, 본 연구의 결과에서도 항암활성능이 높았던 분획에서 항보체 활성능이 높게 나타남을 알 수 있었다. Raw 264.7 세포주에 GMPG 처리시 22.7 μM의 NO를 생성시켰으며, UF 분획인 경우 GMPG-UH와 GMPG-UL은 각각 58.1 μM과 21.3 μM, column 분획에 있어서는 GMPG-CH와 GMPG-CL은 각각 34.5 μM과 13.1 μM의 NO를 생성하는 것으로 조사되었다. 양성 대조물질로 사용한 IFN-γ와 LPS에서는 각각 45.7 μM과 60.9 μM로 나타났다. 대식세포의 활성인자인 IFN-γ를 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자들과 혼합하여 Raw 264.7 세포의 활성화는 IFN-γ의 단일 활성인자를 첨가한 Raw 264.7 세포보다 각 단백다당류들을 혼합할 경우 약 5~26 μM의 nitric oxide 생성을 증가시켰다. GMPG, GMPG 고분자 및 저분자들의 정상 mouse 복강 대식세포에서 NO 생성능을 측정한 결과는 GMPG는 6.0 μM, UF 분획에서는 GMPG-UH와 GMPG-UL은 11.7 μM과 5.7 μM, column 분획인 GMPG-CH와 GMPG-CL 6.2 μM과 5.5 μM의 NO를 생성하였다. 또한 대조물질인 IFN-γ와 LPS는 각각 15.9 μM과 13.0 μM의 NO를 생성하였다. GMPG, GMPG 고분자 및 저분자가 Raw 264.7 세포주로부터 cytokine 중 하나인 TNF-α 생성에 미치는 효과는 GMPG 처리시는 4,128.3 pg/m*l*, GMPG-UH, GMPG-CH는 각각6,573.4 pg/m*l*과 5,471.8 pg/m*l*의 TNF-α를 생성함으로서 고분자 중합도가 높은 고분자 분획이 저분자보다 Raw 264.7 세포주의 cytokine 생

성에 더 큰 유도작용을 하는 것으로 나타났으며, 대식세포로부터 TNF-α 유도물질인 IFN-γ와 LPS 처리시는 4,501.5 pg/m*l*과 5,600.5 pg/m*l*로 나타났다. 그리고 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자와 IFN-γ를 Rew 264.7 세포주에 동시에 투여하여 TNF-α 생성능에 미치는 효과를 측정한 결과는 IFN-γ와 GMPG를 동시에 처리시에 6,435.8 pg/m*l*로 GMPG 단독처리시보다 약 1.6배 증가 효과를 나타내어 IFN-γ가 TNF-α 생성에 있어서 상승작용 효과가 있음을 나타냈으며, IFN-γ와 GMPG-UH, GMPG-CL을 병용 처리시는 6,736.9 pg/m*l*와 6,802.0 pg/m*l*의 TNF-α를 생성함으로서 단백다당류 단독 처리시와 동일한 경향을 보였다. GMPG, GMPG 고분자 및 저분자가 정상 쥐로부터 분리된 대식세포로부터 TNF-α 생성능에 미치는 효과를 측정한 결과, IFN-γ와 LPS 처리시는 각각 1,189.1 pg/m*l*과 2,678.1 pg/m*l*, GMPG 처리시는 2,084.8 pg/m*l*의 TNF-α를 생성하였다. GMPG-UH, GMPG-CH 처리시는 각각 3,068.0 pg/m*l*과 2,975.3 pg/m*l*을 생성함으로서 정상 쥐로부터 분리된 대식세포에서도 고분자 분획이 대식세포를 활성화시키는 것으로 나타났다.

IFN-γ와 LPS에 의해 활성화된 대식세포는 NO를 생성하며, 이 때 생성된 NO는 항미생물 및 항종양 작용하는 것으로 알려졌다(Hibbs 등, 1988; Moncada 등, 1991). 이와 같이 항암 및 항보체 활성능을 갖는 것으로 조사된 GMPG, GMPG 고분자 및 저분자 분획에서 생성되는 NO는 체내에서 다양한 면역학적 활성을 유도할 것이며, 또한 고분자 분획에서 다량의 nitric oxide가 분비되는 것으로 보아 고분자 중합도가 높은 다당류가 대식세포를 매개로한 항종양 효과 및 항미생물 효과를 나타낼 것으로 추정된다. 또한 이들의 항종양 효과는 대식세포의 개입에 의해 직접적으로 활성화시키거나 B 세포 및 T 세포의 활성화를 통한 일련의 면역반응에 의해 일어나는 것으로 추정된다.

적 요

본 연구는 *Ganoderma lucidum* IY009 유래 단백다당류의 분자량 차이에 따른 면역증강활성을 조사하였다. 이것의 분자량은 12 kD와 2,000 kD의 분자량 분포를 지닌 단백다당류이며, 이 둘 중 어느 분획이 주 약리활성을 나타내는지 규명하기 위해, ultrafiltration 및 column chromatography를 실시하여 고분자 및 저분자 분획으로 분획화를 실시하여 이들에 대한 약리활성을 조사하였다. 항보체 활성화 정도는 항암 활성이 높았던 GMPG-CH 분획에서 가장 높은 39.3%의 활성능을 보였으며, 고분자 분획이 저분자 분획보다 높은 항보체 활성을 나타내어 단백다당류의 항보체 활성은 항암 활성과 어떠한 관계가 있는 것으로 추정된다. 대식세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Raw 264.7 세포에 고분자 및 저분자 분획을 첨가하고 nitric oxide 생성능을 측정한 결과, β-결합 당의 함량이 높은 고분자 분획이 대식세포에 대한 NO 생성능이 높게 나타나는 것을 알 수 있었으며, 대식세포의 활성화 인자인 IFN-γ의 병용 첨가시에는 IFN-γ의 단독 첨가시 보다 약 5~26 μM의 nitric oxide 생성을 증가시키는 것을 알 수 있었다. 종양세포의 괴사 및 NK 세포의 활성화에 관여하는 것으로 알려진 TNF-α의 생성을 알아본 결과, 고분자 분획인 GMPG-UH와 GMPG-CH는 각각 3,068.0 ρg/m*l*과 2,975.3 ρg/m*l*였고, 저분자에서는 GMPG-UL과 GMPG-CL은 각각 1,400 ρg/m*l*를 생성하는 것으로 조사되었다.

참고문헌

Adams, D. O. and Nathan, C. F. 1983. Molecular mechanisms in tumor killing by activated macrophages. *Immunol. Today*, **4**: 166-170.

Ding, A. J., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **144**: 2407-2413.

Gao, Q. P., kyohara, H., Cyong, J. C. and Yamada, H. 1988. Chemical properties and anti-complement activities of polysaccharide fractions from roots and leaves of *Panax ginseng*. *Planta Med.* **55**: 9-12.

Hibbs, Jr, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, E. M. 1988. Nitric oxide; A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **157**: 87-94.

Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y. and Hayashi, T. 1985. Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderans A and B, Glycans of *Ganoderma lucidum* fruit body. *Planta. Med.* 339-340.

Jong, S. C. and Birmingham, J. M. 1992. Medicinal benifits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.* **37**: 101-134.

Kabir, Y., Kimura, S. and Tamura, T. 1988. Dietary effect of Ganoderma lucidum mushroom on blood pressure and lipid levels *in spontaneously hypertensive rats (SHR)*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **34**: 433-438.

Kang, C. Y., Shim, M. J., Choi, E. C., Lee, Y. N. and Kim. B. K. 1981. Studies on antitumor components of the basidiomycetes of korea. -Antitumor components and culture of the mycelia of *Ganoderma lucidum*-. *Kor. Biochem. J.* **14**(2): 101-112.

Keller, R. 1973. Cytostatic elimination of syngeneic rat tumor cells *in vitro* by nonspecifically activated macrophages. *J. Experimental Medicine.* **138**: 625-644.

Kim, M. J., Kim, H. W., Lee, Y. S., Shim, M. J., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1986. Studies on safety of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **14**(1): 49-59.

Kiso, Y., Tohkin, M., Hikino, H., Hattory, M., Sakamoto, T. and Namba, T. 1984. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin; Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med.* **50**: 298-303.

Kohda, H., Tokumoto, W., Sakamoto, K., Fujii, M., Hirai, Y., Yamasaki, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Uchida, M. 1985. The biologically active constituents of

Ganoderma lucidum (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 1367-1374.

Kubota, T., Asaka, Y., Miura, I. and Mori, H. 1982. 62. structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Helvetica. Chimica. Acta.* **65**: 611-619.

Lambris, J. D. 1988. The multifunctional role of C3, the third components of complememt. *Immunol. Today* **9**: 387.

Lee, J. W., Chung, C. H., Jeong, H. and Lee, K. H. 1990. Effects of alkali extract of Ganoderma lucidum IY007 on complement and reticuloendotherial system. *Kor. J. Mycol.* **18**(3): 137-144

Lee, J. W., Jeong, H., Kim, K. N., Lee, S. M., Han, M. D., Lee, S. Y. and Kang, S. M. 1996. Effect of G009 on lipid peroxidation induced by peroxidizer in rats. *The J. Appl. Pharmacol.* **4**: 244-250.

Lee, J. Y., Park. K. S., Chung, J. H., Cho, M. K., Ko, K. H., Lee, J. W., Jeong, H. and Lee. S. Y. 1994. Effects of G009 on chemical-induced liver damage in rats. *J. Appl. Pharm.* **2**: 206-212.

Lee, M. H., Kim, H. W., Shim, M. J., Do, S. H., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1986. Studies on constituents of higher fungi of Korea. Constituents of *Ganoderma lucidum* and immunostimulating action. *Kor. J. Mycol.* **14**(2): 149-163.

Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K. and Shimizu, M. 1984. Fractionation, structural features and antitumor activity of water-soluble polysaccharide from "Reishi", the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **58**(9): 871-880.

Moncada, S., R. Palmer, M. J. and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide; Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.

Nogami, M., Tsuji, Y., Kubo, M., Takahashi, M., Kimura, H. and Matsuike, Y. 1986. Studies on *Ganoderma lucidum*. VI. Anti-allergic effect (2). *Yakugaku Zasshi* **106**: 600-604.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbiyuric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351-358.

Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K. 1972. Anticomplementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature New Biol.* **238**: 59-60.

Park, E. J., Ko, K. I., Kim, J. B. and Sohn, D. H. 1997. Antifibrotic effects of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*, glycyrrhizin, and pentoxifylline in rats with cirrhosis induced biliary obstruction. *Biol. Pharm. Bull.* **20**(4): 417-420.

Park, J. H., Kim, H. W., Kim, Y. C., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1987. Studies on antihypertensive components of *Ganoderma lucidum* in Korea. *Kor. J. Food. Hygiene* **2**(2): 57-65.

Pizarro. 1994. Genezyme user mannual. ELISA kit for quantification of mouse tumor necrosis factor-α. Genezyme corporation. Cambridge MA. USA.

Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y. and Inada, Y. 1985. Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 3012-3025.

Shimura, K., Ito, H. and Hibasami, H. 1983. Screenig of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Japan J. Pharm.* **33**: 403-408.

Sone Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharide isolated from fruit body and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Arig. Biol. Chem.* **49**(9): 2641-2653.

Sugiura M. and Ito, H. 1977. Toxicological studies of *Ganoderma lucidum* Karst. *Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo.* **27**: 722-733.

Trinchieri, G. and Perussia, B. 1985. Immune interferon: A pleiotropic lymphokine with multiple effects, *Immunol. Today* **6**: 131-136.

Yamada, H., Yoshino, T., Matsumoto, T., Nagai, T., Kyohara, H., Cyong, J. C., Nakawa, A., Tanaka, H. and Omura, S. 1987. Effects of phytosterols on anti-complementary activity. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 4851-4855.