

게르마늄 강화 효모의 대식 세포 활성화 효과에 관한 연구

이성희* · 노숙령² · 손창욱¹

¹게란티제약(주) 중앙연구소, ²중앙대학교 생활과학대학

Efficacy Study of Activation on Macrophage in Germanium-fortified Yeast

Sung-Hee Lee*, Sook-Nyung Rho² and Tsang-Uk Sohn¹

¹GerantiPharm. LTD. 678-20 Yoksam-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-080, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chung Ang University, Kyunggi-Do, 456-756, Korea

Received July 20, 2005; Accepted August 17, 2005

The aim of this study was to evaluate an efficacy about activation on macrophage, using model that measured cell viability, nitric oxide (NO), iNOS (inducible nitric oxide synthase) expression and tumor necrosis factor- α (TNF- α) on Raw 264.7 cells following treatment of Germanium-fortified Yeast in 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the same concentration of dried yeast without germanium. Cell viability (%) and NO produced in activated-macrophage were dose-dependant, a significant increase of the cell viability (132.5%) and NO in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$). Increase in iNOS level was in 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. TNF- α was produced dose-dependant, e.g. in activated-macrophage with a significant increase of the TNF- α in 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$). Therefore, Germanium-fortified Yeast had an efficacy of NO mediated iNOS and TNF- α production by activated macrophage. This result showed that Germanium-fortified Yeast induced activation of cellular immunity, returned to normalcy on injured immune system and procured anticancer system by activation of macrophage, which was important in immune and anticancer function.

Key words: Germanium-fortified Yeast, macrophage, immune system

서 론

최근 식생활의 향상과 의학의 발달로 인간의 평균 수명이 연장되고 문명의 발달에 따른 환경의 오염, 스트레스 및 운동 부족이 원인이 되어 만성 퇴행성 질환과 노인성 질환 등이 증가되고 있다.¹⁾ 이에 최근 천연물질 중 암 예방 성분이나 생리활성 조절물질(biological response modifiers, BRM) 및 식품 중 기능성 성분을 찾아내어 이를 건강의 유지와 증진을 위해 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며,²⁻⁴⁾ 이 중 식품 내에 존재하는 성분들의 단순한 영양소 역할 외에 기능성 물질로서의 역할에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 추세에 부응하여 천연 식물 자원을 대상으로 노화방지, 성인병 예방, 면역증강 효과 등에 대한 연구와 항체 생성 및 항산화 효과와 같은 각종 생리활성을 나타내는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁵⁻⁷⁾

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 인체에 무해한 미생물로 알

려져 왔고 효모에서의 추출물은 다양한 용도로 사용되었다. 효모의 사용 기원은 발효 문화의 기원과 함께 움직였으며, 그 작용 물질이 효모의 작용이었음을 알기 시작한 것은 불과 170여 년 전이다. 빵 효모를 중심으로 효모는 어느 미생물보다도 인류의 생활과 밀접하게 연결되어 왔고, 지난 20년간 이룩된 분자 생물학, 분자유전학을 비롯한 여러 분야의 생물학 연구의 model system으로서 지대한 기여를 해왔다.⁸⁾ 즉, 효모는 단백질, 핵산, 지질, 비타민의 원료로 사용되어 왔으며, 효모 엑기스는 이러한 효모의 자가소화에 의해 생산되며, 미생물 발효 배지, 조미료, 건강 식품 등의 원료로서 전 세계적으로 큰 시장을 형성하고 있다.⁹⁾ 효모는 영양학적으로 우수한 것으로 알려져 있으며, 수 천년 동안 인류의 식생활에 이용되었을 뿐만 아니라 그 자체로 단백질, 비타민, 미네랄 등이 함유된 훌륭한 영양공급원으로 저지방·고단백질을 특징으로 하는 차세대 단백질 공급원인 단일세포 단백질로 각광 받고 있다. 효모는 단일 세포로는 최고의 비타민 B군 공급원이고, 생체 내의 대사활동에 중요한 역할을 담당하는 효소를 다량 함유하고 있어, 기능성 원료로 애용되고 있는 실정이다.¹⁰⁾ 이러한 효모를 이용한 기능성 제품의 연구로는 박 등¹¹⁾의 효모 변이주를 이용하여 배타 글루칸 면역활성능에 대한 연구와 강 등¹²⁾의 효모로부터 B형

*Corresponding author

Phone: +82-2-556-1367; Fax: +82-2-553-7851

E-mail: gepharm@gerantiusa.com

간염 백신을 생산하여 그 면역성과 안정성에 관하여 연구한 것과 유 등¹³⁾의 효모 추출물을 이용한 월경전증후군(premenstrual syndrome, PMS) 감소 효과에 관한 연구 등 많은 분야에서 연구가 활발하게 진행되고 있다.

게르마늄은 항암, 항염증 및 면역 증강 기능 등 생리화학적 효능이 알려져 있으며,¹⁴⁻¹⁶⁾ 이후 인삼, 영지, 마늘, 명일엽 등 보양과 강장의 작용이 있다고 알려진 식품에 비교적 많은 양의 천연유기게르마늄이 존재한다는 사실이 밝혀졌고,¹⁷⁻¹⁸⁾ 이에 게르마늄 강화 효모는 효모를 이용한 기능성 소재로 효모 자체가 지니는 기능성 외 배지 조성에 강화된 유기 게르마늄이 지니는 기능성을 함께 지니는 신소재로 개발되었다.¹⁹⁾ 효모를 이용한 유기게르마늄의 생산은 기능성 식품과 의약품 소재로 중요한 의미를 갖게 되었다.

대식세포(macrophage)는 조직에서 볼 수 있는 단핵식세포로서 골수의 조혈성 간세포에서 형성된다. 이렇게 형성된 대식세포는 세포표면에 immunoglobulin 항원을 가지고 있어 이물질 배제 기능이 있으며, 또 항원을 포착하고 이것을 처리한 후 T-림프구에 넘기는 작용이 있어 항원제시세포(antigen-presenting cell; APC)라고도 한다. 이러한 대식세포의 기능에는 비특이적 식작용 및 세포흡수작용, Fc 수용체 및 보체 수용체에 의해서 증대되는 opsonin 작용을 받는 미생물에 대한 특이적 탐식작용, 섭취된 미생물의 살해와 T-림프구 및 B-림프구에 대한 항원제시기능이 있다. 또한 lysozyme, collagenase, elastase, acid hydrolase 등의 많은 효소, 몇 개의 보체 성분 및 응고 인자, prostaglandin, leukotriene, 암세포를 괴사시키는 것으로 알려진 TNF- α 및 몇 개의 조절 분자(interferon, interleukin-1)를 포함한 여러 가지 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다. 또 대식세포는 lymphokine의 일종인 interferon- γ 에 의해 활성화 된다.²⁰⁻²¹⁾

Klapcinska 등이 *Ps. Putida* 세포 중의 게르마늄의 축적은 주로 수용성 분획에 있고 대다수가 핵산과 단백질에 결합돼 있음을 전자현미경을 통해 확인 보고하였으며,²²⁾ 효모에 의한 게르마늄 축적은 증식이 저해되는 게르마늄 농도에서 배양을 통해 유기게르마늄이 함유된 효모를 생산할 수 있다고 보고하였다.²³⁾ 또한, 효모가 무기원소의 독성을 무독화 시킨다는 보고²⁴⁾는 효모 내에서 대사과정에 의해 무기게르마늄이 유기게르마늄으로 전환시켜 생물학적 동화작용에 의해 독성이 없어진다는 것을 의미한다.

따라서 본 시험은 게르마늄이 지니는 면역 증강 기능을 좀 더 안전한 형태로 결합시킨 게르마늄 강화 효모가 면역력을 활성화시키는지 알아보기 위하여 *in vitro* 상에서 대식세포 활성화 정도에 영향을 주는 요인²⁰⁾ 중 면역조절 기능을 조절하는 유리 라디칼의 하나인 NO와 항암 및 항염증 기능을 지닌 TNF- α 및 NO 생성에 관여하는 효소인 iNOS 발현 정도를 단백질 수준에서 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

게르마늄 강화 효모의 제조 공정. 게르마늄 강화 효모의 제조 공정은 Fig. 1과 같다. 게르마늄 강화 효모의 제조에 사용된 균주는 생명공학연구소(KRIBB) 유전자은행(KCTC)에서 분양 받은

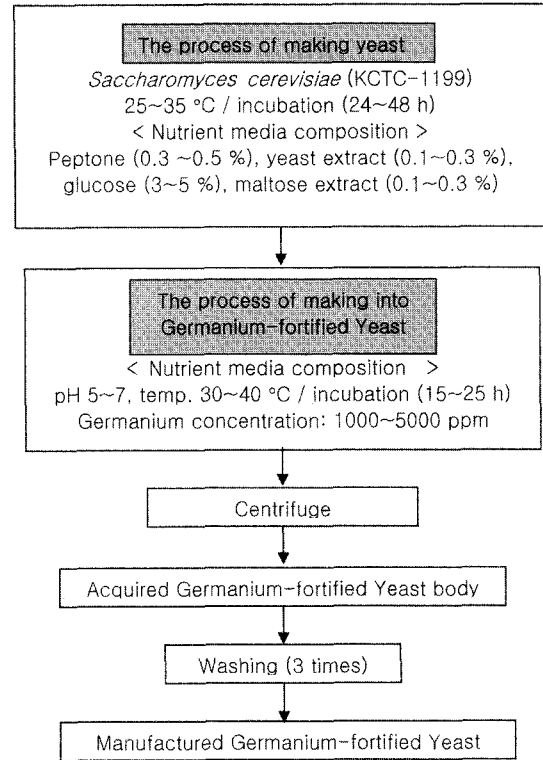


Fig. 1. Scheme of the manufacturing process of the Germanium-fortified Yeast.

Saccharomyces cerevisiae(KCTC-1199)균주를 다량 배양한 후 이중 우량 균주를 선별하여 사용하였으며, 배양시 균체만을 분리한 후, 균체에 게르마늄 용액과 배양액을 넣어 균체와 게르마늄을 일정 조건에서 다시 배양하여 게르마늄 이온을 균체 내로 유입시키는 공정을 거쳤으며, 각 공정은 균체 생산 공정 및 균체 유입 공정의 2단계로 나누어 게르마늄 강화 효모를 제조하였으며,¹⁹⁾ 건조효모분말은 제2공정인 균체 유입공정에서 게르마늄을 첨가하지 않았으며, 그 외의 나머지 공정은 게르마늄 강화 효모와 같은 공정을 거쳐 제조하여 사용하였다.

Cell culture and MTT assay. 면역계에서 중요한 역할을 담당하는 세포 가운데 하나인 대식세포인 RAW 264.7(macrophage, mouse)은 한국세포주은행(KCLB)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM(Gibco BRL)에서 배양하였다. 시료인 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말은 DMEM 배지에 녹여 처리하였으며, 세포 생존율을 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 통하여 구하였다. MTT assay는 세포 1×10^4 cells/ml를 10% FBS DMEM에 suspension하여 96 well plate에 각 well당 180 μ l씩 분주하여 4일간 incubation하였다. 4일 후 plate의 각 well당 1mg 농도의 MTT를 10 μ l씩 가한 후 4시간 동안 incubation하였다. 이후 배양 종료한 후 plate를 450 g \times 5 min간 원심분리 후 생성된 formazan 결정을 가라앉힌 후 약 30 μ l supernatant를 남긴 후 multidispenser를 이용하여 제거한 후 DMSO를 200 μ l 가하여 15분간 가볍게 진탕한 후 96 well plate용 ELISA reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 산출하였다.

NO production. NO는 반감기가 5초-4분 이내의 매우 불안정한 유리 라디칼이기 때문에 NO의 측정은 실제적으로 불가능하다. 따라서 Griess 방법²⁵⁾에 준해서 배양액에 포함되어 있는 NO₂(nitrite)를 spectrophotometer의 540 nm 파장으로 측정함으로써 NO의 생산을 산정하였다. 96 well plate의 각각의 well에 RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/ml 를 분주하고 RAW 264.7 배양세포에 시료인 게르마늄 강화 효모를 48시간 동안 처리한 후, 그 배양액을 ELISA reader를 이용하여 nitrite를 측정하였으며, 양성대조물질로는 lipopolysaccharide(LPS, Lot. 023K4043, Sigma) 분말을 사용하였다.

Western blotting. Western blotting은 Towbin 등²⁶⁾의 방법으로 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하였고 nitrocellulose membranes(Millipore, Bredford, USA) 에 전이시킨 후(100V, 3 시간), 0.5% Tween 20(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 함유한 Tris-buffered saline(TBS, pH 8.0)에 녹인 5% 탈지분유로 4°C에서 18시간 동안 처리하였다. 전이시킨 membrane은 1:1000 희석한 rabbit anti-iNOS(inducible nitric oxide synthase) 항체에 2시간 반응시킨 후 1:5000 희석한 anti-rabbit Ig에 반응시킨 후 ECL(enhanced chemiluminescence)로 developing 시켰다.

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) production. RAW 264.7 배양세포에 시료인 게르마늄 강화 효모를 48시간 동안 처리한 후, 그 배양액을 이용하여 TNF- α 는 ELISA kit(Chemicon, USA)를 이용하여 TNF- α 를 측정하였으며,²⁰⁾ 양성 대조 물질로는 lipopolysaccharide(LPS, Lot. 023K4043, Sigma) 분말을 사용하였다.

자료 분석 및 통계처리. 연구 결과는 SAS(Statistical Analysis System) PC package program을 이용하여 분석하였다. 각 실험군의 결과는 평균값과 표준편차를 산출하였고, 각 실험군간의 비교는 paired *t*-test를 실시하여 군간의 통계적 유의성을 검증하였으며, 처리농도별 비교는 ANOVA로 분석 후 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 Duncan's multiple range test에 의해 실험 군간의 차이를 검정하였다.

결과 및 고찰

본 시험은 면역계에서 중요한 역할을 담당하는 세포가운데 하나인 대식세포(Raw 264.7)를 게르마늄 강화 효모가 활성화시키는 지 여부를 알아보기 위하여 시험물질을 처리한 대식세포의 배양액으로부터 NO와 TNF- α 의 생성을 *in vitro* 상에서 알아보고 iNOS의 발현 정도를 확인하고자 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

Cell culture and MTT assay. RAW 264.7를 시험 세포주로 사용하여, 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말을 0, 5, 10, 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 의 농도로 첨가하여 배양하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같이 나타났다. 대식세포에 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말을 각각 처리 후 세포 생존율(%)을 측정한 결과 게르마늄 강화 효모의 처리에 의존적으로 대식세포가 성장이 촉진되는 것을 알 수 있었다. 게르마늄 강화 효모의 처리 농도 5, 10, 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 의 세포 생존율(%)은

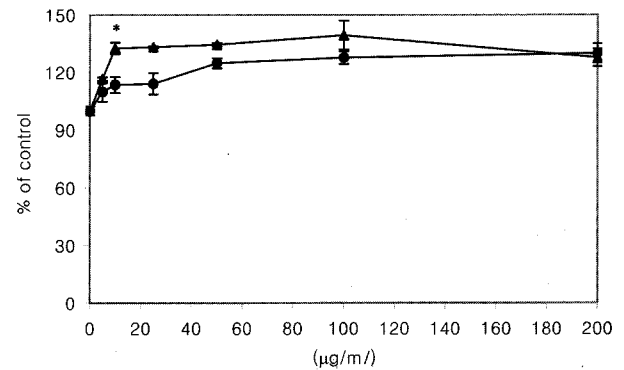


Fig. 2. Cell viability on Raw 264.7 cells following treatment of Germanium-fortified Yeast and dried yeast (without germanium). # of measurement (n=16). Control (○ $\mu\text{g}/\text{m}^2$), ▲: Germanium-fortified Yeast (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$), *: dried yeast (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$), *: $p < 0.05$.

116.5, 132.5, 133.2, 134.5, 139.4 및 127.6으로 각각 나타나 처리농도가 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 일 때 최고의 생존율을 나타냈다. 이에 비해 게르마늄을 첨가하지 않은 건조효모분말은 5~200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 농도로 정하여 배양하면 대식세포의 성장이 다소 촉진됨을 알 수 있었으나 게르마늄 강화 효모의 같은 처리 농도에 비해 생존율이 낮은 것으로 나타났다. 처리 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 인 경우 게르마늄을 첨가한 게르마늄 강화 효모가 게르마늄을 첨가하지 않은 건조효모분말보다 유의적으로 높은 세포 생존율을 나타냈으며($p < 0.05$), 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 이상의 농도에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 게르마늄 강화 효모가 건조효모분말보다 높은 세포 생존율을 나타내어 이는 배양시에 게르마늄 강화 효모에 첨가된 게르마늄에 의한 세포 성장 촉진 효과에 의한 영향으로 사료된다.

대식세포는 활성화되면 부착성이 강해지며 암세포독성을 유도할 수 있는 물질과 면역력을 활성화시키는 물질을 생산하는 특성을 가지고 있다.²⁷⁾ 대식세포는 세균이나 이물질 등을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역현상을 조절하며, 염증 반응과 조혈 기구 등에도 관여하는 세포 중의 하나로²¹⁾ 위의 Fig. 2의 실험 결과로 보면 게르마늄 강화 효모가 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 의 농도에서 대식세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았으며, 농도가 증가함에 따라 대식세포가 활성화되어 면역 증진 효과를 지니는 것으로 사료된다.

NO production. 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말을 0, 5, 10, 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 의 농도로 첨가하여 NO의 생성 정도를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 이 때 생성되는 NO 생성물은 양성 대조군으로 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하여 NO가 활성화되는지 확인하였다(자료 미제시). 대식세포에 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말을 각각 처리 후 NO 생성능을 측정한 결과 게르마늄 강화 효모의 처리 농도가 5-100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 인 경우 세포 생존율의 결과와 같은 경향으로 농도 의존적으로 증가한 것을 알 수 있었다. 게르마늄 강화 효모의 처리 농도 5, 10, 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 에서 NO 생성능은 각각 15.32, 21.9, 23.3, 22.98, 24.16 및 22.19 μM 로 나타나 처리농도가 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 일 때 최고의 생성능을 나타냈다. 이에 비해 게르마늄을 첨가하지 않은 건조효모분말을 5-200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 로 처리하

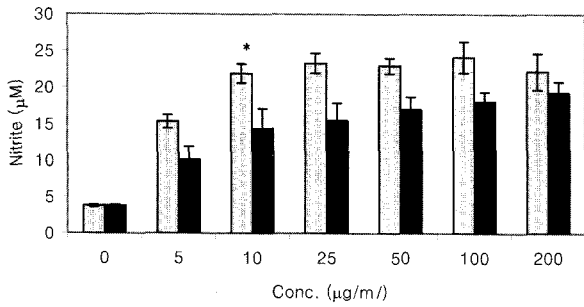


Fig. 3. Nitric oxide production on Raw 264.7 cells following treatment of Germanium-fortified Yeast and dried yeast (without germanium). # of measurement (n=8). ▨: Germanium-fortified Yeast (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml), ■: dried yeast (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml), *: $p < 0.05$.

면 농도 의존적으로 NO 생성능이 증가되는 것을 알 수 있었으나 게르마늄 강화 효모에 비해 생성능이 낮은 것으로 나타났다. 처리 농도가 10 µg/ml인 경우 게르마늄을 첨가한 게르마늄 강화 효모가 게르마늄을 첨가하지 않은 건조효모분말보다 유의적으로 높은 NO 생성능을 나타냈으며 ($p < 0.05$), 10 µg/ml 이상의 농도에서는 군간의 유의차는 나타나지 않았지만 게르마늄 강화 효모가 건조효모분말보다 NO 생성능을 나타내어 이는 배양시에 게르마늄 강화 효모에 첨가된 게르마늄에 의한 NO 생성능 증진 효과에 의한 영향으로 사료된다. 박 등¹¹⁾의 효모 변이주를 이용한 대식세포의 활성화 증진 효과나 NO 생성능 증진 연구 결과와 유사한 경향으로 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말 모두 처리 농도에 의존적으로 NO의 생성량이 증가하는 것으로 나타났다. 김²⁸⁾의 연구 결과 게르마늄의 약 30% 이상 게르마늄 강화 효모가 대식세포 및 ROS(reactive oxygen species) 활성화 정도가 높은 것으로 보고하였으며, 게르마늄의 면역 증진 효과 연구 결과^{14,29)}를 나타낸 연구 결과와 박, 오³¹⁾ 및 차³²⁾의 연구 결과에서 나타난 게르마늄에 의한 대식세포 활성화 효과 연구 결과와 같은 경향으로 나타나 게르마늄 강화 효모에서 나타난 NO 생성 능력의 증진 및 대식 세포 활성화 효과 결과는 효모 배양시 첨가한 게르마늄에 의한 효과로 사료된다.

Western blotting. 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말을 0, 5, 10, 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 농도로 첨가하여 대식세포 내의 iNOS 활성화에 미치는 영향을 살펴보았으며, 결과는 Fig. 4와 같다. NO의 생성에는 NO synthase(NOS)라는 효소가 관여하며 이 효소는 L-arginine과 O₂와 반응하여 citrulline과 NO를 생성한다. NOS 중 iNOS는 감염, 사이토카인, 자외선 등에 의해 유도되며 NO를 생성하여 세균과 암세포 등을 죽이는 숙주 방어 작용에 관여한다.³³⁾ 이러한 iNOS의 활성화 정도를 살펴본 결과 NO 생성 정도와 그 결과가 일치하여 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 게르마늄 강화 효모 25 µg/ml 이상을 처리한 경우 iNOS의 발현 정도가 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 약간 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다. 건조효모분말을 처리한 경우 게르마늄 강화 효모와는 달리 그 발현 정도가 미약하였으며, 200 µg/ml을 처리한 경우에만 증가하는 것으로 나타났다. 이는 게르마늄 강화 효모 내에 배양시 첨가된 게르마늄의 생성이 iNOS 발현에 영향을 주는 것으로 사료된다.

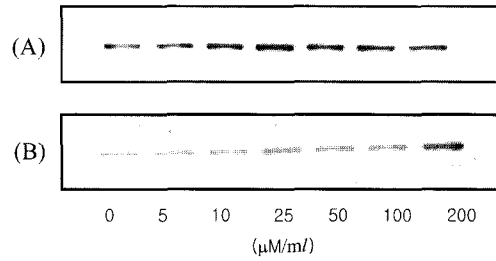


Fig. 4. Increase in iNOS levels in Raw 264.7 cells. (A) Effects of Germanium-fortified Yeast. Raw 264.7 cells were treated with Germanium-fortified Yeast (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml) for 24h. Cells were harvested and total protein was subjected to western blotting analyses using anti-iNOS antibody. (B) Effects of dried yeast (without germanium). Raw 264.7 cells were treated with dried yeast (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml).

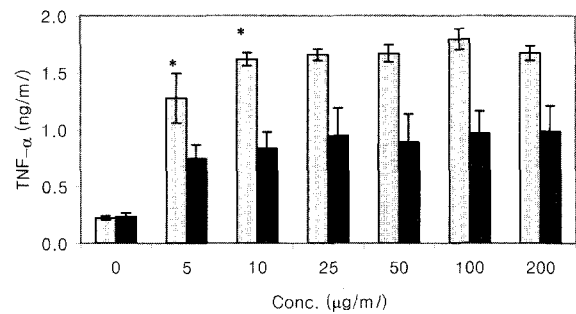


Fig. 5. TNF-α production on Raw 264.7 cells following treatment of Germanium-fortified Yeast and dried yeast (without germanium). # of measurement (n=8). ▨: Germanium-fortified Yeast (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml), ■: dried yeast (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml), *: $p < 0.05$.

이렇게 발현된 iNOS는 NO 생성을 매개하며,²²⁾ 면역조절 기능에 도움을 줄 것으로 사료된다.

Tumor necrosis factor-α(TNF-α) production. 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말을 0, 5, 10, 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 농도를 첨가하여 대식세포의 활성화의 지표로 세포 배양액의 TNF-α 함량을 측정하였으며, 결과는 Fig. 5와 같다. 대식세포에 게르마늄 강화 효모와 건조효모분말을 각각 처리 후 TNF-α 생성 농도를 측정된 결과 게르마늄 강화 효모의 처리 농도가 5-100 µg/ml인 경우 대식 세포 활성화 결과와 같은 경향으로 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이 때 게르마늄 강화 효모의 처리 농도 5, 10, 25, 50, 100 및 200 µg/ml에서 TNF-α 농도는 1.27, 1.62, 1.66, 1.67, 1.79 및 1.67 ng/ml로 나타났으며 처리농도가 100 µg/ml일 때 최고의 생성 농도 수치를 나타냈다. 이에 비해 게르마늄을 첨가하지 않은 건조효모분말을 5-200 µg/ml로 처리하면 농도 의존적으로 TNF-α 생성이 증가되는 것을 알 수 있었으나 게르마늄 강화 효모에 비해 TNF-α의 생성 정도는 낮은 것으로 나타났다. 처리 농도가 5, 10 µg/ml인 경우 게르마늄 강화 효모가 게르마늄을 첨가하지 않은 건조 효모분말보다 유의적으로 높은 TNF-α 생성 농도를 나타냈으며 ($p < 0.05$), 10 µg/ml 이상의 농도에서는 게르마늄 강화 효모가 건조효모분말보다 TNF-α 생성 농도가 높은 경향으로 나타나 이는 배양시에 게르마늄 강화 효모에 첨가된 게르마늄에 의한 TNF-α 생성 증진 효과에 의한 영향으로 사료

된다. 따라서 게르마늄 강화 효모가 대식세포의 TNF- α 분비를 촉진시키는데 영향을 주며 항암 및 면역 증진 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 연구 결과로부터 게르마늄 강화 효모가 면역계 작용을 담당하는 세포 중의 하나인 대식세포를 활성화시키는지 알아보기 위하여 *in vitro* 상에서 NO와 TNF- α 의 생성 및 단백질 수준에서 iNOS의 발현 정도를 측정하였으며, 그 결과 게르마늄 강화 효모의 처리 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향으로 나타났으며, 이 중 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 면역 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 본 시험 모델에서 게르마늄 강화 효모는 iNOS 발현을 조절하여 NO 및 TNF- α 의 생성을 매개하여 면역조절 기능에 도움을 줄 것으로 사료된다. 이것은 면역기능에 있어서 중요한 역할을 하는 대식세포를 활성화시켜 면역력을 활성화시키므로 세포성 면역의 활성화를 도모하고 손상된 면역 체계를 정상화할 수 있을 것으로 보이며, 면역 강화 및 항암 예방 기능성 신소재로의 가능성을 지닌다고 사료된다.

초 록

본 시험은 면역계에서 중요한 역할을 담당하는 세포 가운데 하나인 대식세포(Raw 264.7)를 게르마늄 강화 효모가 활성화시키는 여부를 알아보기 위하여 대식세포의 배양액으로부터 NO와 TNF- α 의 생성을 *in vitro* 상에서 알아보고 iNOS의 발현 정도를 확인하고자 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 게르마늄 강화 효모 처리 후 세포 생존율(%)과 NO 생성량은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리 농도에서 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 또한 NO 생성을 매개하는 iNOS의 발현 역시 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 증가한 것으로 나타났다. 면역 및 항암 조절 인자로 알려진 TNF- α 의 생성 역시 농도 의존적으로 증가하였으며, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리 농도에서 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 이는 게르마늄 강화 효모가 항암 및 면역 증진 기능과 관련이 있는 TNF- α 분비를 촉진시키는데 영향을 준 것으로 사료된다.

따라서 본 시험 모델에서 게르마늄 강화 효모는 iNOS 발현을 조절하여 NO 및 TNF- α 의 생성을 매개하여 면역조절 기능에 도움을 줄 것으로 사료된다. 이것은 면역기능에 있어서 중요한 역할을 하는 대식세포를 활성화시켜 면역력을 활성화시키므로 세포성 면역의 활성화를 도모하고 손상된 면역 체계의 정상화에 영향을 주어 면역 강화 및 항암 예방 기능성 신소재로의 가능성을 지니는 것으로 사료된다.

Key words: 게르마늄 강화 효모, 대식세포 활성화, 면역

참고문헌

- Annual report on the cause of death statistics. (2001) In *National Statistical Office*, Republic of Korea.
- Kim, S. W. and Kim, E. S. (1997) Studies on the immunomodulating effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutri.* **26**, 148-153.
- Ryu, H. S. and Kim, H. S. (2004) Effect of *Zingiber Officinale* Roscoe extracts on mice immune cell activation. *Korean J. Nutri.* **37**, 23-30.
- Park, J. C., Ok, M., Cha, J. Y. and Cho, Y. S. (2003) Isolation and identification of the high-glutathione producing *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 from Korean traditional rice wine and optical producing conditions. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 348-352.
- Pyo, M. Y. and Hyun, S. M. (2001) Effects of *Phellinus linteus* extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide treated mice. *J. Appl. Pharmacol.* **9**, 194-200.
- Park, J. S. and Chyun, J. H. (1993) Effects of low fat diet and saturated fat supplementation on the immune status of BALB/c mouse. *Korean J. Nutri.* **26**, 578-585.
- Wagner, H. (1990) Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity. *Pure Appl. Chem.* **66**, 1271-1277.
- Kim, J. U. and Park, J. S. The classification, characterization and utilization in yeast. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 26-33.
- Choi, S. J. and Jung, B. H. (1998) Simultaneous production process of invertase and yeast extract from baker's yeast. *Korean J. biotechnol. Bioengi.* **13**, 308-311.
- Anna, K. K. (1990) In *Yeasts and yeast-like organisms*. (1st ed.), VCH Press, New York, pp. 131-205.
- Park, J. H., Kang, M. S., Kim, H. I., Chung, B. H., Lee, K. H. and Moon, W. K. (2003) Study on immuno-stimulating activity of β -glucan isolated from the cell wall of yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 483-492.
- Kang, J. K., Kim, Y. B., Kim, K. H. and Ha, S. K. (1986) A study of the immunogenicity and reactogenicity of the Smith Kline_RIT recombinant DNA yeast-derived hepatitis B in healthy young adults. *Korean J. Int. Med.* **31**, 318-322.
- Yu, K. W., Oh, S. H., Choi, Y. S., Hwang, W. J. and Suh, H. J. (2001) The reduction effect of yeast hydrolysate SCP-20 on premenstrual syndrome. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutri.* **30**, 1000-1003.
- Sandra, G. (1988) Therapeutic effects of organic germanium. *Medical Hypotheses* **26**, 207-215.
- Ikemoto, K., Kobayashi, M., Fukumoto, T., Morimatsu, M., Pollard, R. B. and F. Suzuki. (1996) 2-Carboxyethylgermanium sesquioxide, a synthetic organogermanium compound, as an inducer of contrasuppressor T cells. *Experientia.* **52**, 159-166.
- Nakada, Y., Kosaka, T., Kuwabara, M., Tanaka, S., Sato, K. and Koide, F. (1993) Effects of 2-carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) as an immunological modifier of postsurgical immunosuppression in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **55**, 795-799.
- Lee, H. K., Kim, J. S. and Kang, T. B. (2004) Extraction of Organic Germanium Compound from Garlic. *Inst. Natural Sci. Sangmyung Univ.* **12**, 1-18.
- Schroeder, H. A. and Balassa, J. J. (1967) Arsenic, germanium, tin, and vanadium in mice: Effects on growth, survival and tissue levels. *J. Nutr.* **92**, 245-252.
- Song, W. J., Lee, S. C. and Oh, T. K. (1995) Preparation of organic germanium by yeast cell. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 87-90.
- Q, N., Deron, B., Jean, P., Mark, C., Reginald, G., Edward, C.,

- Fung, L., Jin, W. D., Ming, F. L., Ori, R. M., James, P., and Gary, L. (1998) Ribairin inhibits viral-induced macrophage production of TNF, IL-1, the procoagulant f β 12 prothrombinase and preserves Th1 cytokine production but inhibits Th2 cytokine response. *J. Immunol.* **160**, 3487-3493.
21. Kanami, O., Nobuyuki, U., Kanichiro, K., Koji, S., Xiaotong, L., Masasmichi, T., Nobuo, O., Tatsuji, N., and Naoyuki, T. (2003) Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J. Immunol.* **170**, 3688-3695.
22. Klapcinska, B. and Chmielowski, J. (1986) Binding of germanium to *Pseudomonas putida* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1144-1147.
23. Wei, X. S. (1992) Effect of yeast on bioenrichment of germanium. *Food Science.* **149**, 49-54.
24. Lynn, M. R. and Geoffrey, M. G. (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *Microbiol. Lett.* **152**, 293-298.
25. Giovannoni, G., Land, J. M., Keir, G., Thompson, E. J. and Heales, S. J. R. (1997) Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann. Clin. Biochem.* **34**, 193-198.
26. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1976) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
27. Helen, S., Goodridge, E. H., Wilson, W. H., Carol, C., Campbell, M., M, H. and Foo, Y. L. (2001) Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *acanthocheilonema viteae*. *J. Immunol.* **167**, 940-945.
28. Kim, K. W. (2003) Anti-inflammatory activity of organic germanium. Master Thesis. *Chung-ang University*, Korea.
29. DiMartino, M. J. (1986) Antiarthritic and immunoregulatory activity of spirogermanium. *J. Pharmacol. & Exp. Ther.* **236**, 103-236.
30. Park, E. S. (1994) Effect of GE-132 on the hepatotoxicity in rat. Master Thesis, Dong-A University, Pusan.
31. Oh, M. S. (1997) Effect of germanium on the macrophage activation. Master Thesis, Chun-buk University, Chunju.
32. Cha, B. S. (1984) Effects of cadmium, zinc and organic germanium on the primary immune response. Ph. D. Thesis, Yonsei University, Seoul.
33. Di Rosa, M., Radomaski, M., Carnuccio, R. and Moncada, S. (1990) Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1246-1252.